

**POLAR FORMDA MONODİSPERS-MAKROGÖZENEKLİ
PARTİKÜLLERİN SENTEZİ VE MİKROTAŞIYICI OLARAK
KULLANIM POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ**

**SYNTHESIS OF POLAR MONODISPERSE-
MACROPOROUS PARTICLES AND DETERMINATION OF
THEIR POTENTIAL AS MICROCARRIES**

SELİN SAĞLAM


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

2011


Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

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

Başkan


.....
(Prof. Dr. Tülay DURUSOY)

Üye (Danışman)


.....
(Prof. Dr. Süleyman Ali TUNCEL)

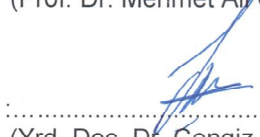
Üye


.....
(Prof. Dr. Zümriye AKSU)

Üye


.....
(Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR)

Üye


.....
(Yrd. Doç. Dr. Cengiz KOÇUM)

ONAY

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

Prof.Dr. Adil DENİZLİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

CANIM AILEME EN ÖZEL SEVGİLERİMLE...

POLAR FORMDA MONODİSPERS-MAKROGÖZENEKLİ PARTİKÜLLERİN SENTEZİ VE MİKROTAŞIYICI OLARAK KULLANIM POTANSİYELLERİNİN BELİRLENMESİ

Selin SAĞLAM

ÖZ

Tez kapsamında çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyon yöntemi kullanılarak monodispers, makrogözenekli poli (gliserol dimetakrilat-co-gliserol-1,3-digliserol diakrilat) (poli(GDMA-co-GDGD)) partikülleri elde edilmiştir. Partiküllerin manyetizasyonu için iki farklı yöntem kullanılmıştır. Birinci yöntemde, mikrosüspansiyon polimerizasyonu tamamlanmadan önce, ikinci yöntemde ise polimerizasyon tamamlandıktan sonra demir tuzları polimerizasyon ortamına eklenerek partikül gözenekleri içinde manyetik nanopartiküllerin oluşumu sağlanmıştır. Bu partiküller, taramalı elektron mikroskobu (SEM), Titreşimli Örnek Manyetometresi (Vibrating Sample Magnetometer, VSM) ve UV spektrofotometresi ile karakterize edilmiştir. Karakterizasyon sonucunda, sentezlenen partiküllerin monodispers yapıda olduğu ve mikrosüspansiyon polimerizasyonu sonrası manyetikleştirme metodu ile sentezlenen partiküllerin daha yüksek manyetik doygunluk değerlerine sahip olduğu görülmüştür. Fonksiyonel manyetik partiküllerin karboksil ve dimetilamino etil içerikleri sırasıyla potansiyometrik titrasyon ve elementel analiz yöntemleri kullanılarak 2.16 mmol/g ve 147.1mg/g bulunmuştur. Model protein olarak Albumin seçilerek, plain ve fonksiyonel manyetik partiküllerin BSA adsorpsiyonu incelenmiştir. Maksimum BSA adsorpsiyonu izoelektronik noktada, 300 mg BSA/g partikül değerinde gözlenmiştir. Bazı koşullarda, BSA proteininin, plain ve fonksiyonel manyetik partiküllerden kantitatif olarak desorplandığı görülmüştür. İkinci metot ile sentezlenen manyetik partiküller L929 fibroblast hücreleri, alveolar makrofajlar ve HeLa hücreleri ile etkileştirilmiştir. Etkileştirilen tüm manyetik partiküllerde, partikül konsantrasyonu arttıkça hücre yüzeyine tutunan partikül sayısının da arttığı görülmüştür. Hücre yüzeyine maksimum partikül tutunması DMAEM fonksiyonel

grubuna sahip manyetik partikül türünde gözlenmiştir. Makrofajlar ile etkileşim çalışmalarında ise zamanla yüzeye tutunan partikül sayısındaki artış net olarak gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Monodispers-manyetik partikül, gözenekli partikül, biyomolekül izolasyonu, protein, adsorpsiyon, ilaç-hedefleme, fagositoz

Danışman: Prof.Dr. S.Ali TUNCEL

Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü, Kimya Mühendisliği ABD

SYNTHESIS OF POLAR MONODISPERSE-MACROPOROUS PARTICLES AND DETERMINATION OF THEIR POTENTIAL AS MICROCARRIES

Selin SAĞLAM

ABSTRACT

Monodisperse and macroporous poly(GDMA-co-GDGDA) particles are synthesized by multi-stage microsuspension polymerization. Two different methods were used for magnetization of the particles. In the first method, ferric salts were added to the polymerization medium before the end of the microsuspension polymerization while it was added after the polymerization in the second method. Hence, the formation of the magnetic nanoparticles in the pores of the poly(GDMA-co-GDGDA) particles was ensured. These particles were characterized by using scanning electron microscopy (SEM), vibrating sample magnetometer (VSM) and UV spectrophotometer. It was seen that the particles were monodisperse, and the particles synthesized with the second method have higher magnetic saturation values. The carboxyl and dimetilaminoethyl contents of functional magnetic particles were determined as 147,1 mg/g and 2,16 mmol/g, by potentiometric titration and elemental analysis, respectively. Albumin was selected as the model protein and the adsorption of albumin onto the plain and functional magnetic particles was investigated. The maximum BSA adsorption was observed at the isoelectronic point as 300 mg BSA/g particles. BSA could be quantitatively desorbed from both plain and functional magnetic beads, in slightly alkaline medium.

The magnetic particles synthesized with the second method, are interacted with L929 fibroblasts, alveolar macrophages and HeLa cells. For all magnetic bead types, the amount of particles adhered to the cell surface increased with increasing concentration of magnetic particles. The maximum particle adherence was observed for the particles with DMAEM functionality. In the case of macrophages, the number of particles adhered to the cells also increased with increasing time.

Keywords: Monodisperse-magnetic particle, porous particle, adsorption, isolation of biomolecules, protein, adsorption, drug targeting, phagocytosis

Advisor: Prof.Dr. S.Ali TUNCEL

Hacettepe University, Department of Chemical Engineering

TEŞEKKÜRLER

Çalışmamın her aşamasında sahip olduğu bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, çalışma azmi ve temposuyla bana her zaman örnek olan, tezime ve eğitimime yaptığı sonsuz katkılarından dolayı çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. S. Ali TUNCEL'e

Tez çalışmam süresince birlikte çalışma imkanı bulduğum için kendimi çok şanslı saydığım, bilgisine, zekasına ve disiplinine hayran kaldığım, hiçbir zaman yardımlarını benden esirgemeyen sevgili hocam Sayın Prof. Dr. M. Ali Onur'a

Tez çalışmam boyunca bilgisi, neşesi, çalışkanlığı ve tüm fedakarlığı ile bana yardım ettiği, en kötü zamanlarımda yanımda olup beni motive ettiği, yüksek lisansın bana kattığı en önemli şeylerden biri olan ve bundan sonra da hep devam edecek olan dostluğu için canım dostum Çiğdem Gölgelioğlu'na

İhtiyacım olduğunda, her zaman yanımda olduğunu hissettiren, samimiyeti ve enerjisi ile çalışma hayatıma renk katan ve hayatımda çok önemli bir yer edinen canım dostum Aslıhan Bayraktar'a,

Birlikte çalışmaktan keyif aldığım, bilgilerini ve yardımlarını daima benimle paylaşan laboratuvar hocam Saba Samatya'ya, tanımaktan çok mutluluk duyduğum, güzel bir çalışma ortamının oluşmasını sağlayan canım arkadaşım Nilüfer Eminoğlu ve laboratuvar arkadaşlarım Nehar Çelikkın, Ayça İskifoğlu, Özlem Özkul, Bilginur Maraş, Bekir Çelebi, Erdal Uğuzdoğan, Oğulcan Evirgen'e

Önemli dostlukların oluşması için sürenin değil paylaşılan şeylerin önemli olduğunu anlamamı sağlayan ve her anımda yanımda olan sevgili dostlarım Özge Yüksel, Pınar Kodal ve Özlem Nazlı'ya

Yüksek lisans yoluna birlikte başladığım, her gördüğümde yüzümün gülmesini sağlayan canım arkadaşlarım Dicle Demir, Hande Günan Yücel ve Ümit Kolsuz'a

Ve hayattaki en büyük şansım olan, her anımda bana destek olan ve güvenen canım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

SELİN SAĞLAM

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa No

| | |
|---|-------|
| ÖZ..... | i |
| ABSTRACT..... | iii |
| TEŞEKKÜR..... | v |
| ŞEKLLER DİZİNİ..... | x |
| ÇİZELGELER DİZİNİ..... | xvi |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ..... | xviii |
| 1 GİRİŞ..... | 1 |
| 2 GENEL BİLGİLER..... | 3 |
| 2.1 Manyetik Partiküller..... | 3 |
| 2.1.1 Demir oksit nanopartiküller..... | 3 |
| 2.1.1.1 Manyetit..... | 3 |
| 2.1.2 Demir oksit nanopartikül sentez yöntemleri..... | 4 |
| 2.1.2.1 Birlikte çöktürme yöntemi..... | 5 |
| 2.1.3 Manyetik polimerik partiküller..... | 5 |
| 2.1.4 Polimerik partiküllerin sentez yöntemleri..... | 7 |
| 2.1.4.1 Dispersiyon polimerizasyonu..... | 7 |
| 2.1.4.2 Çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu..... | 7 |
| 2.1.5 Manyetik polimerik partiküllerin sentez yöntemleri..... | 9 |
| 2.2 Manyetizma..... | 13 |
| 2.2.1 Manyetizma türleri..... | 14 |
| 2.2.1.1 Ferromanyetizma..... | 14 |
| 2.2.1.2 Diyamanyetizma..... | 15 |
| 2.2.1.3 Paramanyetizma..... | 16 |
| 2.2.1.4 Süperparamanyetizma..... | 16 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 2.3 | Manyetik Partiküllerin Uygulama Alanları | 17 |
| 2.3.1 | Adsorpsiyon ve manyetik ayırma | 18 |
| 2.3.2 | Fagositoz | 22 |
| 2.4 | Hidrojel | 26 |
| 2.4.1 | Hidrojellerin sınıflandırılması..... | 28 |
| 2.4.2 | Hidrojellerden ilaç salınım mekanizmaları..... | 29 |
| 3 | DENEYSEL ÇALIŞMALAR | 31 |
| 3.1 | Manyetik Monodispers Polimerik Partiküllerin Üretimi..... | 31 |
| 3.1.1 | Çıkış lateksinin üretimi | 31 |
| 3.1.1.1 | Materyal | 31 |
| 3.1.1.2 | Polimerizasyon yöntemi | 31 |
| 3.1.2 | Çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyon yöntemi ile manyetik partiküllerin sentezi..... | 32 |
| 3.1.2.1 | Materyal | 33 |
| 3.1.2.2 | Polimerizasyon yöntem | 33 |
| 3.1.3 | Manyetizasyon..... | 36 |
| 3.1.3.1 | Mikrosüspansiyon polimerizasyonu sırasında manyetikleştirme | 36 |
| 3.1.3.1.1 | Materyal | 36 |
| 3.1.3.1.2 | Yöntem..... | 37 |
| 3.1.3.2 | Mikrosüspansiyon polimerizasyonu sonrası manyetikleştirme ... | 39 |
| 3.1.3.2.1 | Materyal | 39 |
| 3.1.3.2.2 | Yöntem..... | 40 |
| 3.2 | Manyetik Monodispers Polimerik Partiküllerin Karakterizasyonu..... | 43 |
| 3.2.1 | Morfolojik özelliklerinin belirlenmesi..... | 43 |
| 3.2.1.1 | Elektron mikroskopu..... | 43 |
| 3.2.1.2 | Yüzey alanı ve gözeneklilik ölçüm cihazı | 43 |

| | | |
|---------|---|----|
| 3.2.2 | Kimyasal özelliklerin belirlenmesi | 44 |
| 3.2.2.1 | FTIR spektroskopisi | 44 |
| 3.2.2.2 | Elementel analiz..... | 44 |
| 3.2.2.3 | Potansiyometrik titrasyon | 44 |
| 3.2.3 | Manyetik özelliklerinin belirlenmesi..... | 45 |
| 3.2.3.1 | VSM analizleri | 45 |
| 3.2.3.2 | UV spektrofotometresi ile optik izleme | 45 |
| 3.3 | Protein adsorpsiyonu..... | 45 |
| 3.3.1 | Materyal..... | 45 |
| 3.3.2 | Yöntem | 46 |
| 3.3.2.1 | pH etkisinin incelenmesi..... | 46 |
| 3.3.2.2 | Başlangıç protein derişim etkisinin incelenmesi | 47 |
| 3.3.2.3 | Sorbent derişim etkisinin incelenmesi | 48 |
| 3.3.2.4 | Adsorpsiyon kinetiği | 49 |
| 3.3.2.5 | Desorpsiyon | 50 |
| 3.4 | Hücre Etkileşim Çalışmaları | 51 |
| 3.4.1 | Materyal..... | 52 |
| 3.4.2 | Yöntem | 53 |
| 3.4.2.1 | Fibroblastlar ile etkileşim..... | 53 |
| 3.4.2.2 | Makrofajlar ile etkileşim..... | 54 |
| 3.4.2.3 | Kanser hücreleri ile etkileşim..... | 55 |
| 4 | DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA..... | 56 |
| 4.1 | Mikrosüspansiyon Polimerizasyonu Sırasında Yapılan Manyetizasyon ile Sentezlenen Monodispers-Gözenekli Partiküllerin Karakterizasyonu | 56 |
| 4.1.1 | GDMA derişimi etkisi | 56 |
| 4.1.2 | Manyetik partikül yükleme etkisi | 59 |
| 4.1.3 | Kaplamada fonksiyonel grup etkisi | 62 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 4.1.4 | NH ₄ OH derişimi etkisi | 66 |
| 4.2 | Mikrosüspansiyon polimerizasyonu sonrasında yapılan manyetizasyon ile Sentezlenen monodispers-gözenekli partiküllerin Karakterizasyonu..... | 68 |
| 4.2.1 | Fonksiyonel monomer etkisi | 68 |
| 4.2.2 | pH etkisi..... | 77 |
| 4.3 | Manyetik partiküllerin Protein Adsorpsiyon Özellikleri | 80 |
| 4.3.1 | pH etkisi..... | 80 |
| 4.3.2 | Başlangıç protein derişimi etkisi..... | 81 |
| 4.3.3 | Partikül derişimi etkisi | 82 |
| 4.3.4 | Adsorpsiyon kinetiği..... | 83 |
| 4.3.5 | Desorpsiyon..... | 84 |
| 4.4 | Partikül Hücre Etkileşim alışmaları | 86 |
| 4.4.1 | Fibroblastlar ile etkileşim..... | 87 |
| 4.4.2 | Makrofajlar ile etkileşim..... | 92 |
| 4.4.3 | HeLa hücreleri ile etkileşim..... | 98 |
| 5 | SONUÇLAR..... | 103 |
| | KAYNAKLAR..... | 107 |
| | ÖZGEÇMİŞ..... | 113 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | <u>Sayfa No</u> |
|--|-----------------|
| Şekil 2.1. Manyetin kristal yapısı | 4 |
| Şekil 2.2. Süperparamanyetik demir oksit nanopartiküllerinin üç farklı yolla sentezi ile ilgili yayınlanan çalışmaların karşılaştırılması (Mahmoudi et al., 2011)..... | 4 |
| Şekil 2.3. Manyetik polimerik partiküllerin çeşitli yapıları (a) eklentili, (b) polimer ile kaplı, (c) yüzey kaplamalı, (d) polimer içine gömülü, (e) gözenekler içine çöktürülmüş (Yuan and Williams, 2007). | 6 |
| Şekil 2.4. Manyetik polimerik partikül hazırlama metotları (Yuan and Williams, 2007). | 9 |
| Şekil 2.5. Koloidal manyetik nanopartiküllerin kaplanması (Yuan and Williams, 2007). | 11 |
| Şekil 2.6. Emülsiyon yolu ile manyetik polimerik partiküllerin hazırlanması. (a) manyetik bileşenlerin polimer/monomer fazı içerisinde dağıtılması, (b) manyetik bileşenleri içeren damlacıkların oluşması amacıyla dispers fazın emülsiyonlaşması, (c) çözücü buharlaştırma, çapraz bağlanma veya süspansiyon polimerizasyonu yöntemleri ile manyetik bileşenlerin polimer matrisinin içine alınması (Yuan and Williams, 2007). | 12 |
| Şekil 2.7. Histeresis eğrisi | 15 |
| Şekil 2.8. Manyetizmada dipol farklılıkları..... | 16 |
| Şekil 2.9. Ferromanyetik, süperparamanyetik, paramanyetik ve diyamanyetik nanopartiküllerin histeresis döngüleri (Arruebo et al., 2007; Natelson et al., 2006)..... | 17 |
| Şekil 2.10. Makrofaj fagositozu. | 22 |
| Şekil 2.11. Bağışıklık sisteminde görev alan hücrelerin gelişimi..... | 25 |
| Şekil 3.1. Çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu..... | 33 |
| Şekil 3.2. Poli(GDMA-co-GDGDGA) partikülünün kimyasal yapısı. | 35 |
| Şekil 3.3. Mikrosüspansiyon Polimerizasyonu sırasında manyetikleştirme yönteminin şematik gösterimi. | 39 |
| Şekil 3.4. Mikrosüspansiyon Polimerizasyonu sonrasında manyetikleştirme yönteminin şematik gösterimi | 41 |

| | |
|--|----|
| Şekil 3.5. Manyetik polimerik partiküllerin yüzey kaplamasında kullanılan monomer çeşitleri. (a) 2-(Dimetilamino) etil metakrilat (b) Metakrilik asit (c) 2-hidroksietil metakrilat (d) Gliserol dimetakrilat | 42 |
| Şekil 4.1. Farklı kaplama koşulları ile üretilen Manyetik polimerik partiküllerin SEM fotoğrafları. MY1 kodlu partikül, büyütme: (a) 40000X, (b) 4757X. MY2 kodlu partikül, büyütme: (c) 50454X, (d) 4000X..... | 56 |
| Şekil 4.2. Farklı kaplama koşulları ile hazırlanan MY1 ve MY2 kodlu manyetik partiküllerin VSM analizi. | 58 |
| Şekil 4.3. Farklı kaplama koşulları ile hazırlanan MY1 ve MY2 kodlu manyetik partiküllerin manyetik davranışının UV spektrofotometresi ile izlenmesi..... | 59 |
| Şekil 4.4. Farklı manyetik yükleme ile üretilen manyetik polimerik partiküllerin SEM fotoğrafları. MY2 kodlu partikül, büyütme: (a) 50454X, (b) 4000X. MY7 kodlu partikül, büyütme: (c) 40000X, (d) 4000X..... | 60 |
| Şekil 4.5. Farklı manyetik yükleme ile üretilen MY2 ve MY7 kodlu manyetik partiküllerin VSM analizi. | 61 |
| Şekil 4.6. Farklı manyetik yükleme ile üretilen MY2 ve MY7 kodlu manyetik partiküllerin manyetik davranışının UV spektrofotometresi ile izlenmesi..... | 62 |
| Şekil 4.7. Farklı monomer türleri ile hazırlanan manyetik polimerik partiküllerin SEM fotoğrafları. MY4 kodlu partikül, büyütme: (a) 59461X, (b) 4000X. MY5 kodlu partikül, büyütme: (c) 48315X, (d) 4000X. MY6 kodlu partikül, büyütme: (e) 60050X, (f) 4000X. | 63 |
| Şekil 4.8. Farklı monomer türleri ile hazırlanan MY4, MY5 ve MY6 kodlu manyetik partiküllerin VSM analizi..... | 65 |
| Şekil 4.9. Farklı monomer türleri ile hazırlanan MY4, MY5 ve MY6 kodlu manyetik partiküllerin manyetik davranışının UV spektrofotometresi ile izlenmesi..... | 65 |
| Şekil 4.10. Farklı NH ₄ OH derişimi ile hazırlanan manyetik polimerik partiküllerin gözenek yapısı ve boy dağılımını gösteren SEM fotoğrafları. MY2 kodlu partikül, büyütme: (c) 50454X, (d) 4000X. MY5 kodlu partikül, büyütme: (c) 48315X, (d) 4000X..... | 66 |
| Şekil 4.11. Farklı NH ₄ OH derişimi ile hazırlanan MY2 ve MY5 kodlu manyetik partiküllerin VSM analizi. | 67 |
| Şekil 4.12. Farklı NH ₄ OH derişimi ile hazırlanan MY2 ve MY5 kodlu manyetik partiküllerin manyetik davranışının UV spektrofotometresi ile izlenmesi..... | 68 |

| | |
|--|----|
| Şekil 4.13.Farklı monomer türleri ile hazırlanan manyetik polimerik partiküllerin SEM fotoğrafları. MYA kodlu partikül, büyütme: (a) 38905X, (b) 4000X. MYD kodlu partikül, büyütme: (c) 34372X, (d) 4000X. MYE kodlu partikül, büyütme: (e) 37483X, (f) 4000X. | 69 |
| Şekil 4.14.Farklı monomer türleri ile hazırlanan MYA, MYD ve MYE kodlu manyetik partiküllerin VSM analizi..... | 71 |
| Şekil 4.15.Farklı monomer türleri ile hazırlanan MYA, MYD ve MYE kodlu partiküllerin manyetik davranışının UV spektrofotometresi ile izlenmesi..... | 71 |
| Şekil 4.16.Farklı monomer türleri ile hazırlanan (a) MYA, (b) MYD, (c) MYE kodlu manyetik partiküllerin yüzey FTIR spektrumları. | 73 |
| Şekil 4.17.Farklı monomer türleri ile hazırlanan (a) MYA, (b) MYD, (c) MYE kodlu manyetik partiküllerin yığın FTIR spektrumları. | 74 |
| Şekil 4.18.(a) 0.1 M NaOH çözeltisi içerisine dispers edilen karboksil fonksiyonel grubuna sahip MYD kodlu manyetik polimerik partikülün 0.1 M HCl çözeltisi ile, (b) 0.1 M NaOH çözeltisinin 0.1 M HCl çözeltisi ile titrasyonundan elde edilen potansiyometrik titrasyon eğrileri..... | 76 |
| Şekil 4.19.Farklı pH değerlerinde sentezlenen manyetik polimerik partiküllerin SEM fotoğrafları. MYA kodlu partikül, büyütme: (a) 38905X, (b) 4000X. MYC kodlu partikül, büyütme: (c) 40000X, (d) 4000X. | 77 |
| Şekil 4.20.Farklı pH değerlerinde hazırlanan MYA ve MYC kodlu manyetik partiküllerin VSM analizi. | 79 |
| Şekil 4.21.Farklı pH değerlerinde hazırlanan MYA ve MYC kodlu manyetik partiküllerin manyetik davranışının UV spektrofotometresi ile izlenmesi..... | 79 |
| Şekil 4.22.Farklı monomer türleri ile hazırlanan MYA, MYD VE MYE kodlu partiküller üzerine BSA adsorpsiyonunda pH etkisi. BSA konsantrasyonu: 12mg/mL. | 80 |
| Şekil 4.23.Farklı monomer türleri ile hazırlanan MYA, MYD VE MYE kodlu partiküllerin BSA adsorpsiyonuna BSA konsantrasyonu etkisi. pH: 5, tampon çözeltisi: sodyum asetat tamponu..... | 82 |
| Şekil 4.24.Partikül miktarı değişiminin MYA kodlu partikülün BSA adsorpsiyonuna etkisi. pH: 5, tampon çözeltisi: sodyum asetat tamponu | 83 |
| Şekil 4.25.MYA kodlu partikül üzerine BSA adsorpsiyonunun zamana bağlı değişimi. pH: 5, Tampon çözeltisi: Sodyum asetat tamponu, BSA konsantrasyonu: 12mg/mL. | 84 |

| | |
|--|----|
| Şekil 4.26. Başlangıç protein derişiminin, BSA desorpsiyon değerlerine etkisi. pH: 9, tampon çözeltisi: Borat tamponu..... | 85 |
| Şekil 4.27. Başlangıç protein derişiminin, BSA desorpsiyon değerlerine etkisi. pH: 8, Tampon çözeltisi: 1M sodyum klorür tuzu (NaCl) içeren pH 8 HEPES tamponu. | 86 |
| Şekil 4.28. 3200 partikül/µl tampon derişimdeki manyetik partiküller ile etkileştirilen L929 hücrelerinin 12. saatin sonunda optik mikroskop altında alınan fotoğrafları. (a) MYA, (b) MYC, (c)MYD, (d) MYE. Büyütme: X400. | 87 |
| Şekil 4.29. 3200 partikül/µl tampon derişimdeki manyetik partiküller ile etkileştirilen L929 hücrelerinin 24. saatin sonunda optik mikroskop altında alınan fotoğrafları. (a) MYA, (b) MYC, (c)MYD, (d) MYE. Büyütme: X400. | 88 |
| Şekil 4.30. 16000 partikül/5µl tampon derişimdeki manyetik partiküller ile etkileştirilen L929 hücrelerin 48. saatin sonunda optik mikroskop altında alınan fotoğrafları. (a) MYA, (b) MYC, (c)MYD, (d) MYE. Büyütme: X400. | 89 |
| Şekil 4.31. 16000 partikül/5µl tampon derişimdeki manyetik partiküller ile etkileştirilen L929 hücrelerin 72. saatin sonunda optik mikroskop altında alınan fotoğrafları. (a) MYA, (b) MYC, (c)MYD, (d) MYE. Büyütme: X400. | 89 |
| Şekil 4.32. 12800 partikül/ µl tampon derişimdeki MYA, MYC, MYD ve MYE kodlu manyetik partiküllerin fibroblast hücreleri üzerine tutunma davranışının zamana bağlı değişimi. | 90 |
| Şekil 4.33. MYA, MYC, MYD ve MYE kodlu manyetik partiküllerin (a) 12., (b) 24., (c) 48., (d) 72. saat sonunda hücre yüzeyine tutunan miktarlarının, etkileştirilen partikül konsantrasyonuna bağlı olarak değişimi. | 91 |
| Şekil 4.34. 3200 partikül/µl tampon derişimdeki manyetik partiküller ile etkileştirilen makrofaj hücrelerin 10. dakikanın sonunda optik mikroskop altında alınan fotoğrafları. (a) MYA, (b) MYC, (c)MYD, (d) MYE. Büyütme: X400. | 92 |
| Şekil 4.35. 3200 partikül/µl tampon derişimdeki manyetik partiküller ile etkileştirilen makrofaj hücrelerin 20. dakikanın sonunda optik mikroskop altında alınan fotoğrafları. (a) MYA, (b) MYC, (c)MYD, (d) MYE. Büyütme: X400. | 93 |
| Şekil 4.36. 3200 partikül/µl tampon derişimdeki manyetik partiküller ile etkileştirilen makrofaj hücrelerin 30. dakikanın sonunda optik mikroskop altında alınan fotoğrafları. (a) MYA, (b) MYC, (c)MYD, (d) MYE. Büyütme: X400. | 93 |

| | |
|--|-----|
| Şekil 4.37.3200 partikül/µl tampon derişimdeki manyetik partiküller ile etkileştirilen makrofaj hücrelerin 60.dakikanın sonunda optik mikroskop altında alınan fotoğrafları. (a) MYA, (b) MYC, (c)MYD, (d) MYE. Büyütme: X400. | 94 |
| Şekil 4.38.3200 partikül/µl tampon derişimdeki manyetik partiküller ile etkileştirilen makrofaj hücrelerin 120.dakikanın sonunda optik mikroskop altında alınan fotoğrafları. (a) MYA, (b) MYC, (c)MYD, (d) MYE. Büyütme: X400. | 94 |
| Şekil 4.39.1600 partikül/µl tampon derişimdeki MYA, MYC, MYD ve MYE kodlu manyetik partiküllerin fibroblast hücreleri üzerine tutunma davranışının zamana bağılı değişimi. | 95 |
| Şekil 4.40.12800 partikül/µl tampon derişimdeki MYA, MYC, MYD ve MYE kodlu manyetik partiküllerin fibroblast hücreleri üzerine tutunma davranışının zamana bağılı değişimi. | 96 |
| Şekil 4.41. MYA, MYC, MYD ve MYE kodlu manyetik partiküllerin (a) 30., (b) 60. dakikanın sonunda hücre yüzeyine tutunan miktarlarının etkileştirilen partikül konsantrasyonuna bağılı olarak değişimi. | 97 |
| Şekil 4.42.3200 partikül/µl tampon tampon derişimdeki manyetik partiküller ile etkileştirilen HeLa hücrelerinin başlangıçta optik mikroskop altında alınan fotoğrafları. (a) MYA, (b) MYC, (c)MYD, (d) MYE. Büyütme: X400. | 98 |
| Şekil 4.43.3200 partikül/µl tampon derişimdeki manyetik partiküller ile etkileştirilen HeLa hücrelerinin 12.saatin sonunda optik mikroskop altında alınan fotoğrafları. (a) MYA, (b) MYC, (c)MYD, (d) MYE. Büyütme: X400. | 99 |
| Şekil 4.44.3200 partikül/µl tampon derişimdeki manyetik partiküller ile etkileştirilen HeLa hücrelerinin 24.saatin sonunda optik mikroskop altında alınan fotoğrafları. (a) MYA, (b) MYC, (c)MYD, (d) MYE. Büyütme: X400. | 99 |
| Şekil 4.45.3200 partikül/µl tampon derişimdeki manyetik partiküller ile etkileştirilen HeLa hücrelerinin 48.saatin sonunda optik mikroskop altında alınan fotoğrafları. (a) MYA, (b) MYC, (c)MYD, (d) MYE. Büyütme: X400. | 100 |
| Şekil 4.46.3200 partikül/µl tampon derişimdeki manyetik partiküller ile etkileştirilen HeLa hücrelerinin 72.saatin sonunda optik mikroskop altında alınan fotoğrafları. (a) MYA, (b) MYC, (c)MYD, (d) MYE. Büyütme: X400. | 100 |
| Şekil 4.47.3200 partikül/µl tampon derişimdeki MYA, MYC ve MYD kodlu manyetik partiküllerin HeLa hücreleri üzerine tutunma davranışının zamana bağılı değişimi. | 101 |

Şekil 4.48.MYA, MYC ve MYD kodlu manyetik partiküllerin 12.saatin sonunda hücre yüzeyine tutunan miktarlarının etkileştirilen partikül konsantrasyonuna bağlı olarak değişimi.....102

ÇİZELGELER DIZINI

| | <u>Sayfa No</u> |
|--|-----------------|
| Çizelge 3.1. Çıkış lateksin sentez koşulları..... | 32 |
| Çizelge 3.2. Çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu çalışma koşulları..... | 36 |
| Çizelge 3.3. Mikrosüspansiyon polimerizasyonu sırasında manyetikleştirme metodu ile sentezlenen partiküllerin çalışma koşulları..... | 38 |
| Çizelge 3.4. Mikrosüspansiyon polimerizasyonu sonrası manyetikleştirme yöntemi ile sentezlenen manyetik polimerik partiküller için uygulanan yüzey polimerizasyon koşulları..... | 42 |
| Çizelge 3.5. Hücre kültür çalışmalarında kullanılan deney koşulları..... | 52 |
| Çizelge 4.1. Farklı kaplama koşulları ile hazırlanan manyetik partiküllerin ortalama partikül boyu (Dp) ve değişim katsayısı (CV) değerleri..... | 57 |
| Çizelge 4.2. Farklı manyetik yükleme ile üretilen manyetik partiküllerin ortalama partikül boyu (Dp) ve değişim katsayısı (CV) değerleri..... | 60 |
| Çizelge 4.3. Farklı monomer türleri ile hazırlanan manyetik partiküllerin ortalama partikül boyu ve değişim katsayısı değerleri..... | 64 |
| Çizelge 4.4. Farklı NH ₄ OH derişimi ile hazırlanan manyetik partiküllerin ortalama partikül boyu ve değişim katsayısı değerleri..... | 67 |
| Çizelge 4.5. Farklı monomer türleri ile hazırlanan manyetik partiküllerin ortalama partikül boyu ve değişim katsayısı değerleri..... | 70 |
| Çizelge 4.6. Farklı monomer türleri ile hazırlanan MYA, MYD VE MYE kodlu manyetik partiküllerin yüzey alanı değerleri..... | 72 |
| Çizelge 4.7. Farklı monomer türleri ile hazırlanan MYA, MYD ve MYE kodlu partiküllerin yüzey FTIR spektrumundaki karakteristik pikleri..... | 73 |
| Çizelge 4.8. Farklı monomer türleri ile hazırlanan MYA MYD ve MYE kodlu partiküllerin yığın FTIR spektrumundaki karakteristik pikleri..... | 75 |
| Çizelge 4.9. MYE kodlu manyetik polimerik partikül ve poli(GDMA-co-GDGA) partikülü için elemental analiz sonuçları..... | 77 |
| Çizelge 4.10. Farklı pH değerlerinde hazırlanan MYA ve MYC kodlu manyetik partiküllerin ortalama partikül boyu (Dp) ve boy dağılım değişim katsayısı (CV) değerleri..... | 78 |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | | |
|---|---|---|
| μ_0 | : | Boşluğun manyetik geçirgenlik katsayısı |
| μ_{toplam} | : | Toplam manyetik moment |
| AIBN | : | 2-2'-azobisisobütironitril |
| A | : | Amper |
| A_0 | : | absorbans değeri |
| B | : | Manyetik akı yoğunluğu |
| BET | : | Brunauer- Emmet-Teller |
| BPO | : | benzoil peroksit |
| BSA | : | Sığır serum albumin |
| C | : | Curie sabiti |
| $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ | : | sodyum asetat trihidrat |
| CV | : | boy dağılım değişim katsayısı |
| CycOH | : | sikloheksanol |
| DBP | : | dibütilftalat |
| DMAEM | : | 2-dimetil amino etil metakrilat |
| D_p | : | ortalama partikül boyu |
| Et-OH | : | etil alkol |
| FBS | : | fetal sığır serumu |
| Fe_3O_4 | : | demir (II,III) oksit |
| $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | : | demir (III) klorür hekzahidrat |
| FeSO_4 | : | demir (II) sülfat |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | : | demir (II) sülfat heptahidrat |
| GDGDA | : | gliserol-1,3-digliserol diakrilat |

| | | |
|--|---|---|
| GDMA | : | gliserol dimetakrilat |
| GMA | : | glisidil metakrilat |
| H | : | Manyetik alan şiddeti |
| HCL | : | hidroklorik asit |
| HELA | : | insan servikal karsinoma hücre hattı |
| HEMA | : | 2-hidroksietil metakrilat |
| HEPES | : | 4-(2-hidroksietil)-1-piperazin etan sülfonik asit |
| IAA | : | İzoamil alkol |
| KPS | : | potasyum persülfat |
| M | : | Mıknatıslanma vektörü |
| MAA | : | metakrilik asit |
| MRI | : | Manyetik rezonans görüntüleme |
| $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ | : | disodyum tetraborat dekahidrat |
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | : | sodyum dihidrojen fosfat dihidrat |
| NaNO_2 | : | sodyum nitrit |
| NaOH | : | sodyum hidroksit |
| NH_3 | : | amonyak |
| PBS | : | fosfat tampon solüsyonu |
| poli(HEMA) | : | poli(2-hidroksietil metakrilat) |
| PVA | : | polivinil alkol |
| PVP K-30 | : | polivinil piroolidon K-30 |
| SDS | : | sodyum dodesil sülfat |
| SEM | : | Scanning Electron Microscope |
| T | : | Ortamın mutlak sıcaklığı |

THF : Tetrahidrofuran

VSM : titreşimli örnek manyetometresi

1 GİRİŞ

Polimerik materyallerin hücreler ile etkileşimini gerektiren biyoteknolojik ve biyomedikal uygulamaların çoğunda hidrojel formunda materyaller önemli bir yer tutmaktadır. Hidrojeller, suyu yapılarına alarak şişebilmeleri, biyouyumluluklarının yüksek olması ve biyolojik ortamda bozunabilmeleri gibi özellikleri sayesinde bu alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

Manyetik polimerik kürelerin sentezi ve özellikleri, son on yıl içerisinde giderek gelişen yeni bir araştırma konusu haline gelmiştir. Manyetik polimerik partiküller bir manyetik bileşen ve polimerik matristen oluşan mikrokürelerdir. Manyetik bileşen, partiküle manyetik özelliğini kazandırarak, bu partiküllerin bir manyetik alan varlığında hızlı ve kolay şekilde ortamdan ayrılmasını sağlamaktadır. Manyetik enerjiyi ısı enerjisine çevirebilen manyetik partiküller, ısı üretici olarak çeşitli uygulamalarda kullanılabilir. Bir kanser tedavi yöntemi olan hipertermi bu uygulamaya örnek olarak verilebilir. Polimerik matris ise manyetik bileşeni taşıyarak kararlı bir yapı oluşturmakta, partiküle istenilen fiziksel ve kimyasal özellikleri sağlamakta, mikrokürelerin şişebilme yeteneğini ve elastikliğini arttırmaktadır. Ayrıca, kullanılan polimerin türüne göre manyetik kürelerin yüzeyleri istenilen fonksiyonel grupları içeren polimerler ile kaplanabilmektedir. Böylece, bu partiküllerin immunoserolojik yöntem, nükleik asit, protein ve hücre izolasyonu gibi uygulamalarda da kullanılabilmesini sağlanmaktadır.

Tez kapsamında öncelikle farklı yüzey fonksiyonel gruplarına sahip manyetik partiküllerin sentezi hedeflenmiştir. Bu amaçla hidrofilik formda monomer ve çapraz bağlayıcılar, çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu yönteminde kullanılarak monodispers ve makrogözenekli (poli(GDMA-co-GDGD)) partikülleri sentezlenmiş ve bu partiküllerin manyetik formlarının elde edilmesi için iki farklı yöntem kullanılmıştır. İlk yöntem olan mikrosüspansiyon polimerizasyonu sırasında manyetikleştirme prosedürü ile manyetik demir oksit nanopartiküllerin mikroküre gözenekleri içerisine çöktürülmesi sağlanmış ve nanopartikülleri gözenek yapısı içerisinde barındıran hidrojel mikrokürelerin yüzeyi ince bir polimer film ile kaplanmıştır. Yüzeyde farklı fonksiyonel grupları barındıran film tabakasının elde edilmesi amacıyla gliserol dimetakrilat (GDMA), metakrilik asit (MAA) ve 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) monomerleri kullanılmıştır.

İkinci yöntem olan mikrosüspansiyon polimerizasyonu sonrasında manyetikleştirme prosedürü ile elde edilen manyetik partiküllerin yüzeyi GDMA, MAA ve 2-dimetil amino etil metakrilat (DMAEM) monomerleri kullanılarak farklı fonksiyonel gruplara sahip ince bir polimerik film tabakasıyla kaplanmıştır. Elde edilen manyetik partiküller ile BSA adsorpsiyon çalışmaları yapılarak, BSA adsorpsiyonuna pH, zaman, başlangıç BSA derişimi ve partikül derişimi etkisi incelenmiştir.

Elde edilen farklı yüzey fonksiyonel gruplarını içeren monodispers ve makrogözenekli manyetik partiküller fibroblast hücreleri, makrofaj hücreleri ve HeLa kanser hücreleri ile etkileştirilerek, hücrelerin partiküllere karşı fagositik cevabı ve partiküllerin hücrelere yapışma davranışının incelenmesi hedeflenmiştir. Hücreler ile etkileştirilen manyetik partiküllerin belli zaman aralıklarında yüzeye tutunma davranışı incelenmiştir. Dört farklı konsantrasyonda hazırlanan ve partikül yüzeyinde nötral (hidroksil), katyonik (dimetilamino) ve anyonik (karboksil) fonksiyonel grupları içeren manyetik partiküllerin hücre yüzeyine tutunma davranışının partikül derişimi ile değişimi, belli bir zaman aralığı için incelenmiştir.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Manyetik Partiküller

Nanometreden mikrometre boyutuna kadar çeşitli boyutlarda sentezlenebilen manyetik partiküller, manyetik kuvvete karşı gösterdikleri tepki sayesinde kolaylıkla hareket ettirilebilmektedir. Bu özellikleri ile ilk başta biyolojik ve medikal alanlar olmak üzere birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır (Ma and Liu, 2007).

2.1.1 Demir oksit nanopartiküller

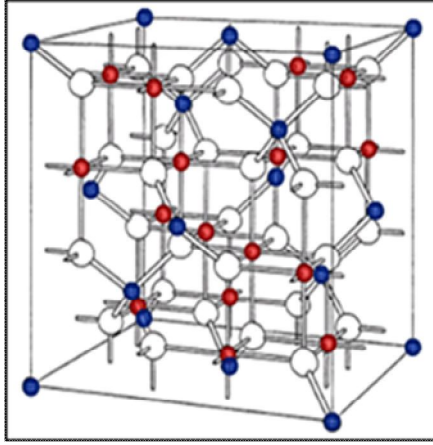
Manyetik metal oksitler, yüksek manyetik özelliğe sahip kobalt, nikel, demir gibi saf metallere göre daha kararlı olmaları, kolaylıkla üretilebilmeleri nedeniyle daha çok tercih edilmektedir (Philippova et al., 2010). Bunlar arasında ise biyouyumlu olmaları ve manyetik doygunluk değerinin yüksek olması gibi özellikleri sayesinde demir oksitler biyomedikal uygulamalarda en sık kullanılan metal oksitlerdendir.

Demir oksitler, manyetit (Fe_3O_4), manyetitin oksitlenmiş formu olan maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) ve hematit ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) olmak üzere üç temel gruba ayrılmaktadır.

Maghemit ve manyetit benzer fiziksel özelliklere ve kristal yapısına sahiptir. Maghemit sadece Fe^{+3} iyonlarından oluşurken manyetit $\frac{1}{2}$ molar oranında Fe^{+3} ve Fe^{+2} iyonlarından oluşmaktadır. Manyetit, açık havada maghemite ve daha yüksek sıcaklıklarda ise hematite okside olabilmektedir.

2.1.1.1 Manyetit

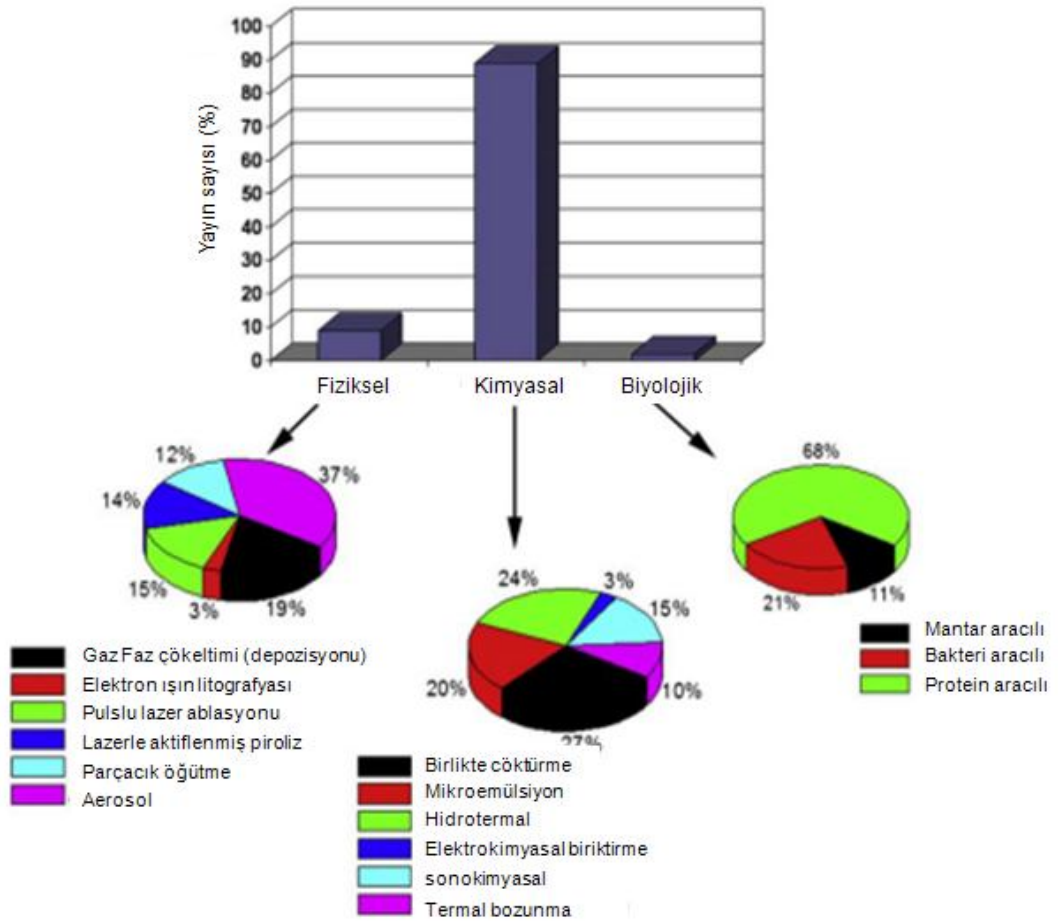
Manyetit (Fe_3O_4), yeryüzünde bilinen en eski ve en genel demir oksit bileşimidir. Doğa araştırmaları insandan bakteriye çok sayıda türün manyetit üretebildiğini ortaya çıkarmıştır. Manyetit, kübik ters bir spinal kristal yapıya sahiptir. Fe iyonları bazı yerlerde 4, bazı yerlerde ise 6 oksijen atomuyla çevrelenmiştir. Şekil 2.1.'de manyetitin kristal yapısı gösterilmektedir.



- Tetrahedral yapıdaki Fe²⁺ iyonları
- Oktahedral yapıdaki Fe²⁺/Fe³⁺ iyonları
- Oksijen atomu

Şekil 2.1. Manyetitin kristal yapısı

2.1.2 Demir oksit nanopartikül sentez yöntemleri

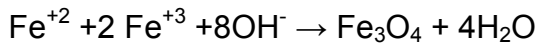


Şekil 2.2. Süperparamanyetik demir oksit nanopartiküllerinin üç farklı yolla sentezi ile ilgili yayınlanan çalışmaların karşılaştırılması (Mahmoudi et al., 2011).

Demir oksit nanopartiküller kimyasal, fiziksel yada biyolojik olarak sentezlenebilmektedir. Şekil 2.2.'de bu partiküllerin sentezi için yayınlanan en önemli yollar gösterilmektedir (Mahmoudi et al., 2011).

2.1.2.1 Birlikte çöktürme yöntemi

En basit, ucuz ve çevre dostu yöntem olarak bilinen birlikte çöktürme yöntemi, Fe^{+2} ve Fe^{+3} iyonlarının bazik bir ortamda aynı anda çöktürülmesine dayanmaktadır (Que et al., 1999). Bu yöntemde gerçekleşen reaksiyon temel olarak aşağıdaki formüldeki gibidir.



Birlikte çöktürme yöntemi yaygın olarak iki farklı şekilde uygulanabilmektedir. Bunlardan ilkinde, çeşitli yükseltgen maddeler kullanılarak demir hidroksit süspansiyonlarının kısmi olarak oksitlenmesi sağlanmaktadır. Bir başka ifadeyle, $Fe(II)$ tuzu, bir baz ve bir yükseltgeyici kullanılarak eşboyutlu küresel manyetit partiküller elde etmek mümkündür. Örneğin, Sugimoto ve Matijevic (1980) potasyum nitrat ve potasyum hidroksit varlığında, birlikte çöktürme metodu kullanarak, demir tuzundan küresel manyetit nanopartiküller sentezlemişlerdir (30-200nm) (Indira and Lakshmi, 2010).

Diğer metot ise $Fe(II)$ ve $Fe(III)$ hidroksitlerinin sulu çözeltisinden manyetit partikül elde edilmesidir (Massart, 1981). Bu metot, oksijensiz ortamda, 1/2 oranında Fe^{+2} ve Fe^{+3} iyonlarından oluşan sulu çözeltiye baz eklenerek eş-boyutlu ve küresel manyetit nanopartiküllerinin siyah çökeltisinin elde edilmesine dayanmaktadır (<20nm). Çökeltme ortamının pH'ı ve iyonik şiddeti ayarlanarak partiküllerin boyutunu kontrol etmek mümkün olmaktadır (Mahmoudi et al., 2011).

2.1.3 Manyetik polimerik partiküller

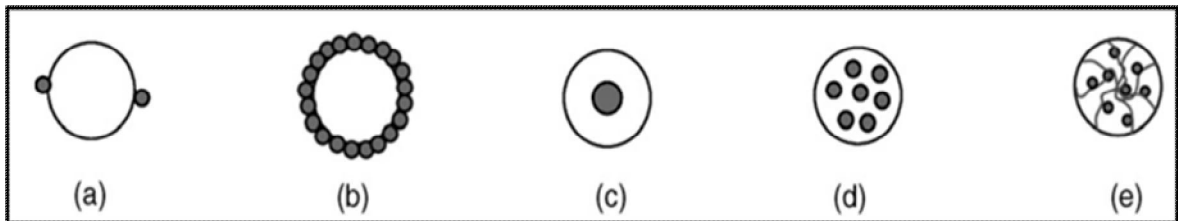
Manyetit veya maghemit nanopartiküller genellikle polimer/yüzey aktif madde, inorganik metaller (altın vb.) ya da oksitlerle (silika, alüminyum oksit vb.) oluşturulan tabakalar sayesinde modifiye edilmektedir. Bu tabakalar sayesinde ise

çeşitli biyomoleküllerin yapıya eklenerek partikülün fonksiyonlaştırılması mümkün hale getirilmektedir. Bu partiküller ya bir sıvı içerisinde dağılmış halde ya da polimer veya inorganik matrislerle bileşik oluşturmuş halde elde edilmektedir (Ma and Liu, 2007).

Manyetik polimerik partiküller bir manyetik bileşen ve polimerik matristen oluşan mikrokürelerdir. Manyetik bileşen, partiküle manyetik özelliğini kazandırırken, polimerik matris manyetik bileşeni taşıyarak ona istenilen fiziksel ve kimyasal özellikleri sağlamaktadır. Polimerik kaplama, manyetik partikülün organik maddelerle uyumunu arttırmakta, içerdiği materyalin dışarı süzülmesini engellemekte ve partikül yüzeyini oksidasyona karşı koruyarak kimyasal kararlılığını arttırmaktadır (Yuan and Williams, 2007 ; Ma and Liu, 2007).

Manyetik polimerik partiküllerin çeşitli yapıları, manyetik materyallerin polimerik matrisin içinde değişik şekillerde düzenlenmesiyle elde edilmektedir. Bu yapılar Şekil 2.3.'te gösterilmiştir. Bunlar :

- a. Dış yüzeyine birkaç manyetik taneciğin takılı olduğu polimerik mikroküreler.
- b. Manyetik taneciklerin dış yüzeyi kapladığı mikroküreler.
- c. Polimer tarafından kaplanan tek bir manyetik tanecik.
- d. Polimer matris içine gömülü çoklu manyetik tanecikler.
- e. Polimer matrisin gözenekleri içine çöktürülmüş manyetik materyaller.



Şekil 2.3. Manyetik polimerik partiküllerin çeşitli yapıları (a) eklentili, (b) polimer ile kaplı, (c) yüzey kaplamalı, (d) polimer içine gömülü, (e) gözenekler içine çöktürülmüş (Yuan and Williams, 2007).

Şekiller içinde a ve b tipindeki partiküllerin manyetik bileşenleri tamamen yüzeyde bulunmaktadır. Bu manyetik materyallerin direk olarak çevresel ortamla temasta olması bu tip partiküllerin kullanımlarını kısıtlamaktadır. Bunların dışındaki c, d ve e tipindeki partiküller, manyetiklik özelliklerinin ve yüzey kimyalarının kolayca kontrol edilebilmesinden dolayı geniş kullanım alanına sahiptir.

2.1.4 Polimerik partiküllerin sentez yöntemleri

2.1.4.1 Dispersiyon polimerizasyonu

Dispersiyon polimerizasyonu, özellikle 1-10 µm boyut aralığında ve eş boyut dağılımlı polimerik partiküllerin sentezi için uygun olan bir yöntemdir. Bu polimerizasyonda, monomer fazı, dağıtma fazında çözünmekte fakat polimerizasyon işlemi sonunda oluşan polimer, dağıtma fazında çözünmemektedir. Polimerizasyon sistemi, başlangıçta içinde monomer, başlatıcı ve stabilizörün bulunduğu tek fazlı, homojen bir ortamdan oluşmaktadır. Katı partiküllerin oluşumuyla birlikte polimerizasyon sistemi polimer ve dağıtma ortamını içeren iki fazlı bir ortama dönüşmektedir.

Bu polimerizasyon metodunda, dağıtma ortamı türü, monomer/dağıtma fazı oranı, karıştırma hızı, başlatıcı ve stabilizör türü ve derişimi, polimerizasyon sıcaklığı gibi faktörler monomer dönüşümü, partikül boy dağılımı ve molekül ağırlığı üzerinde oldukça etkilidir (Elaissari et al., 2003; Kim and Suh, 2000).

2.1.4.2 Çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu

Eş boyut dağılımlı polimerik partiküller, kromatografik dolgu malzemesi (Wang et al., 1992), iyon değiştirici reçineler, katalitik substratlar, protein ayrımı için kullanılan ortamlar, ilaç salınımı gibi birçok çevresel ve biyomedikal alanda büyük ilgi görmektedir. Eş dağılımlı ve çapraz bağlı polimerlerin hazırlanması için kullanılan teknikler son 20 yıl içerisinde büyük gelişme göstermiştir (Jose et al., 2005).

Genel olarak polimerik küreler, ortalama boyutlarının, karıştırma hızı ve koşulları ile kontrol edilebildiği, klasik süspansiyon yöntemiyle üretilmektedir. Bu yöntem basit bir teknik olmasına rağmen, oluşan küreler geniş bir boy dağılımına sahip olmaktadır. Eş dağılımlı polimer partiküllerinin, yüksek verimle elde edilebilmesi için birçok metot geliştirilmiştir. Bu metotlardan birisi de, eş boyutlu seed partiküllerinin, bir monomer karışımının içerisinde şişirilmesine dayanan yöntemdir. Seed şişirme işlemi genel olarak dinamik (Okubo et al., 1997) ve aktive edilmiş şişirme olarak ikiye ayrılabilir. Ugelstad ve ark. (1980) aktive edilmiş şişirme yöntemiyle iki basamaklı mikrosüspansiyon metodunu geliştirmiştir. Frechet ve ark. ise çok basamaklı polimerizasyon metodunu kullanarak es boyutlu ve makrogözenekli poli(stiren-divinilbenzen) partiküllerini sentezlemiştir. Tek basamaklı şişirme ve polimerizasyon metodu ise Ogino (1995) tarafından uygulanmıştır (Srisopa et al., 2011; Tuncel et al., 2001; Zhang et al., 2010).

Ugelstad ve ark.(1980) ve Galia ve ark.(1994) tarafından ortaya konan prensiplere dayanan, modifiye edilmiş çok basamaklı polimerizasyon yöntemi, genel olarak dört ana basamaktan oluşmaktadır (Camli et al., 2004).

İlk basamak, dispersiyon polimerizasyonu ile çıkış lateksinin sentezlenmesini içermektedir. Dispersiyon ortamının şartları, çıkış lateksinin eş boyutlu olması için iyi ayarlanmalıdır. Çıkış lateksi ayrıca emülsiyon polimerizasyonu ile de sentezlenebilmektedir.

İkinci basamakta , çıkış lateks partikülleri düşük molekül ağırlıklı organik ajanla şişirilmektedir. Aktivasyon ajanı ve diluent yerine de geçen bu organik ajan, çıkış partiküllerindeki polimer zincirlerinin relaksasyonunu sağlayarak, monomer moleküllerinin, çıkış lateks partikülleri içerisine difüzyonunu sağlamaktadır.

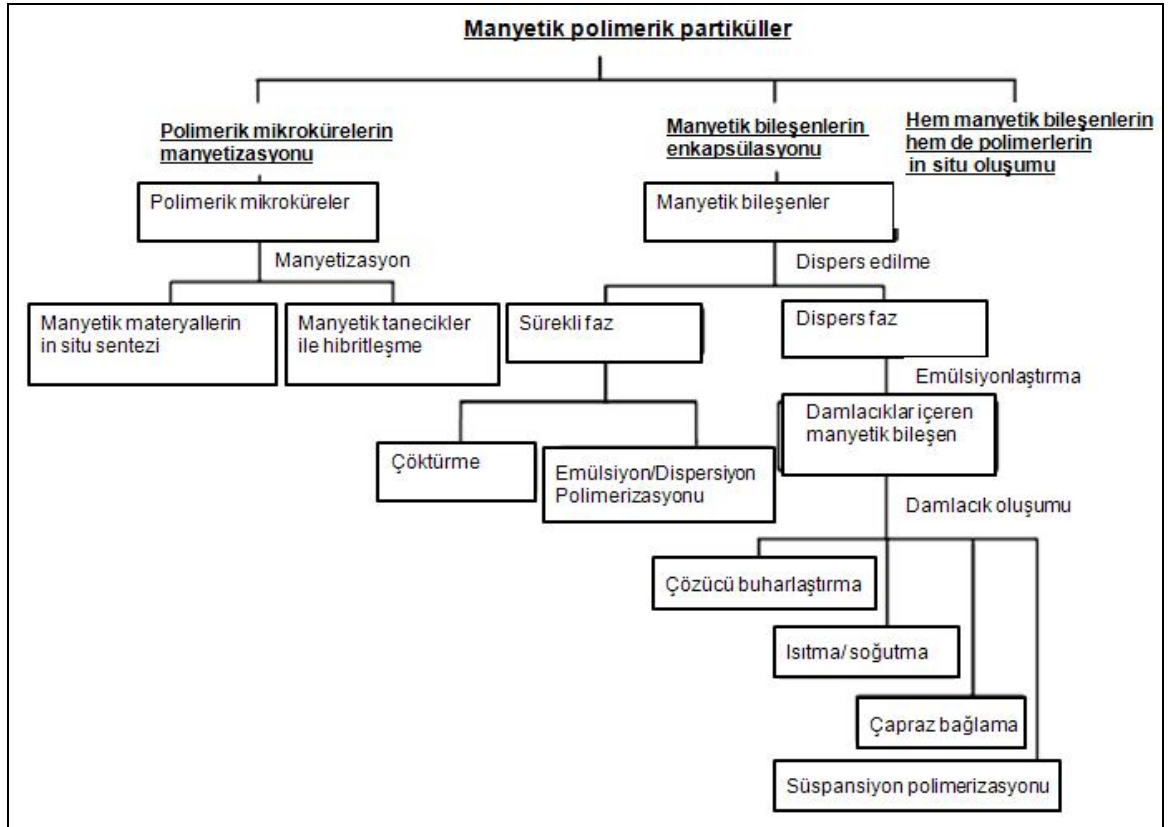
Üçüncü basamakta, şişmiş olan çıkış partiküllerinin, monodispersitesi korunarak, sulu emülsiyon ortamında, monomer fazı ile tekrar şişirilmesi işlemi gerçekleşmektedir. Bu monomer karışımı, yağda çözünen bir başlatıcı, monomer ve bir çapraz bağlayıcı ajan içermektedir. Bu şişirme basamakları sırasında seed partiküllerinin monodispersitesi, diluent/seed lateks ve monomer fazı/seed lateks oranları uygun değerlere ayarlanarak korunabilmektedir.

Son basamakta ise partiküllerin bulunduğu sulu emülsiyon ortamının sıcaklığı artırılarak, monomer fazın, şişmiş olan seed partiküllerinin içerisinde polimerleşmesi sağlanmaktadır. Oluşan bu monodispers ve gözenekli partiküllerdeki bloklaşmanın önlenmesi için ortama polimerik bir stabilizör eklenebilmektedir.

Çok basamaklı seeded polimerizasyonu sonunda kararlı bir yapı elde etmek amacıyla, partiküller, diluent fazı ve dönüşmeyen monomerin uzaklaştırılması için, uygun bir çözücü kullanılarak yıkanmaktadır (Lin et al., 2010; Unsal et al., 2004;).

2.1.5 Manyetik polimerik partiküllerin sentez yöntemleri

Fiziksel hibritleşmeden, manyetik nanopartiküllerin in situ sentezine kadar çok sayıda ve çeşitte manyetik polimerik partikül sentez yöntemleri bulunmaktadır. Bu yöntemler Şekil 2.4.'te özetlenmiştir.



Şekil 2.4. Manyetik polimerik partikül hazırlama metotları (Yuan and Williams, 2007).

Genel olarak bu sentez yöntemleri üç ana başlık altında toplanmaktadır.

(a) Önceden hazırlanan polimer mikrokürelerin manyetizasyonu yöntemi: Bu yöntem, öncelikle gözenekli polimer mikrokürelerin sentezi ve sonrasında manyetik materyallerin bu hazırlanan polimer partiküllerine eklenmesine dayanmaktadır. Bilinen en iyi ticari manyetik partiküller (Dynabead) çok basamaklı partikül şişirme yöntemi kullanılarak Ugelstad ve ark. tarafından geliştirilmiştir (Ugelstad et al., 1983). Bu yöntem ilk olarak gözenekli ve eşboyutlu polimer lateks oluşumunu daha sonra manyetik nanopartiküllerin bu gözeneklere çöktürülmesini son olarak ise gözeneklerin bir polimer tabakasıyla kaplanmasını içermektedir. Bu partiküller elde edilirken genel olarak hidrofobik özellik gösteren polisitren kullanılmakta ve bu da nonspesifik protein adsorpsiyonuna neden olmaktadır.

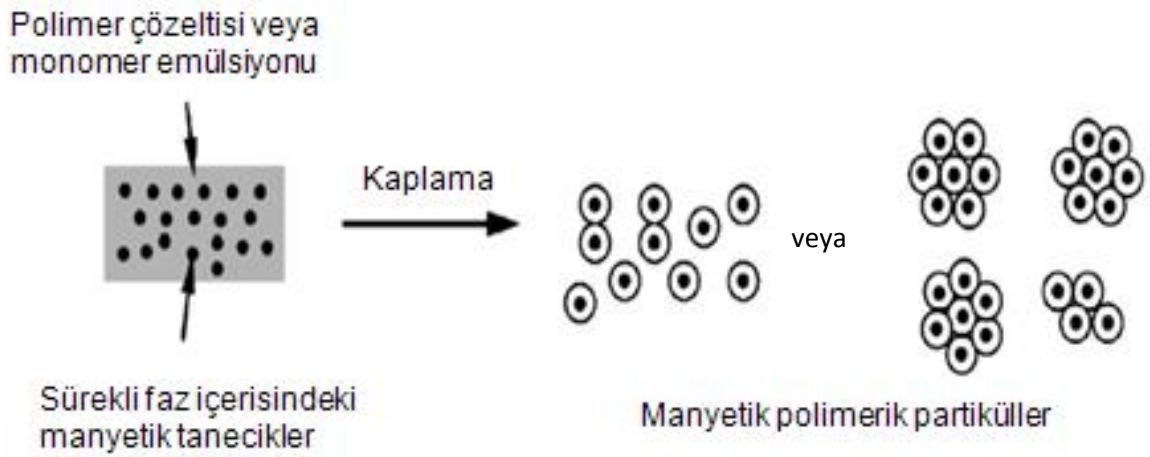
Bahsedilen metot kullanılarak manyetik partiküller, biyolojik ve medikal alanlarda kullanılmak üzere sentezlenmiştir (Prestvik et al., 1997). İlk olarak manyetik materyaller polimer mikrokürelerin gözeneklerinde in situ olarak demir tuzlarından sentezlenmiştir. Bundan sonra bu manyetik parçacıkları polimerde sabitlemek amacıyla gözenek yüzeyi $-NO_2$ fonksiyonel grubuyla modifiye edilmiştir. Sonuçta gözenek yüzeyinde oluşturulan $-NH_2$ grupları protein ve nükleotitler gibi aktif ajanların bağlanmasında kullanılmıştır.

Polimer varlığında manyetik nanopartiküllerin sentezi yönteminin, son zamanlardaki gelişimi, polimer jellerin kullanımına dayanmaktadır. Polimer jellerdeki polimer ağının sahip olduğu kısıtlı yapı sayesinde demir oksitin çekirdeklenmesi ve büyümesi kontrol edilebilmektedir (Philippova et al., 2011; Breulman et al., 1998). Yapılan bir çalışmada elastik PS-poliakrilat kopolimer jelinin gözeneklerinde manyetit oluşumu incelenmiştir. Sentezlenen partiküllerin, 16 nm çapında olduğu ve jel gözenegindeki karboksilat fonksiyonel gruplarına bağlandığı gözlenmiştir (Breulman et al., 1998). Bir başka çalışmada ise polimer olarak hidrofilik mikrojel kullanılarak manyetit nanopartiküllerin mikrojel içinde in situ olarak sentezlenmesi sağlanmıştır (Zhang et al., 2004).

(b) Manyetik bileşenlerin kapsüllenmesi yöntemi (enkapsülasyon) : Bu yöntem, manyetik partiküllerin kaplanmasını ya da polimerin içine alınmasını kapsamaktadır. Kaplama ile genelde 1 mikron boyutundan küçük partiküller elde

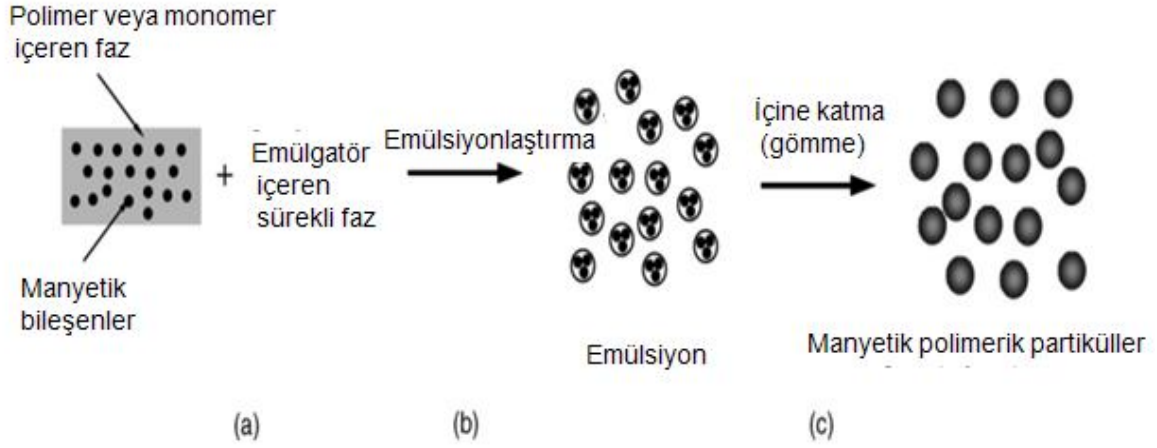
edilirken polimer içine alma yöntemi ile daha büyük partiküller elde edilebilmektedir (Philippova et al., 2011; Yuan and Williams, 2007).

Kaplama yönteminde, manyetik parçacıklar ilk olarak, polimer çözeltisi veya monomer emülsiyonundan oluşan sürekli faz içinde dağıtılmakta, sonrasında ise çözünmüş veya oluşturulmuş polimer zincirleri ile kapsül içine alınmaktadır (Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. Koloidal manyetik nanopartiküllerin kaplanması (Yuan and Williams, 2007).

Polimer içine alınması yönteminde ise manyetik parçacıklar öncelikle, emülsiyonlaştırma ile sürekli fazda birer damla haline getirilmektedir. Daha sonra bu damlalar çözücü buharlaştırma, çöktürme, çapraz bağlanma veya süspansiyon polimerizasyonu yoluyla polimerin içine alınmaktadır (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. Emülsiyon yolu ile manyetik polimerik partiküllerin hazırlanması. (a) manyetik bileşenlerin polimer/monomer fazı içerisinde dağıtılması, (b) manyetik bileşenleri içeren damlacıkların oluşması amacıyla dispers fazın emülsiyonlaşması, (c) çözücü buharlaştırma, çapraz bağlanma veya süspansiyon polimerizasyonu yöntemleri ile manyetik bileşenlerin polimer matrisinin içine alınması (Yuan and Williams, 2007).

Gruttner ve ark. (1997) çalışmalarında süperparamanyetik partikülleri, hem doğal hem de sentetik hidrofilik polimerler ile kaplayarak biyobozunur manyetik polimerik partiküller sentezlemiştir (Yuan and Williams, 2007).

Polimer içine alınması yöntemi kullanılarak hidrofilik manyetik polimerik partiküller, su/yağ emülsiyon sistemi ile polimer sulu çözeltilerinden elde edilmiştir. Bu yöntem ile yapılan çalışmalarda K-karragenan , kitosan (Denkbaş et al., 2002; Jiang et al., 2005), jelatin (Saravanan et al., 2004) ve polivinilalkol (Müller-Schulte et al., 1997) gibi sentetik veya doğal polimerler kullanılmıştır (Philippova et al., 2011). Son zamanlarda ise, homojen manyetik polimer mikrokürelerin sentezlenmesindeki gelişmelere bağlı olarak membran ve mikroakışkan emülsiyonlaştırma teknikleri kullanılmaktadır. Membran emülsifikasyon tekniği temel olarak dağınık fazın mikrogözenekli bir membrandan geçirilerek sürekli akış içerisinde damlacıklar elde edilmesinden oluşmaktadır. Mikroakışkan yönteminde ise mikroakışkan cihazlar oluşturmak için kanallar kullanılmakta ve bu cihazlar sayesinde membran yöntemindekine benzer şekilde emülsiyonlar oluşturulmaktadır (Yuan and Williams, 2007). Polimerik mikroküreler tek-fazlı veya çok-fazlı akış içerisinde üretilmektedir (Park et al., 2010). Mikroakışkan ve membran yöntemleri ile

birçok hidrofilik ve hidrofobik polimer mikroküreler elde edilebilmesine rağmen, bu prosedürlerin manyetik mikrokürelerin sentezlenmesi için kullanılması daha başlangıç aşamasındadır. Gelecekte bu yöntemler kullanılarak polimer mikrokürelerin sentezlenmesinin yaygınlaşacağı beklenmektedir (Philippova et al., 2010).

(c) Hem manyetik bileşenin hem de polimerin in situ olarak sentezlenmesi yöntemi: Manyetik polimer sentezlenmesinde kullanılan bu yöntemde, polimer partikülleri direk olarak demir iyonları çözeltisi ve monomer dispersiyonunu içeren ortamdan elde edilmektedir.

2.2 Manyetizma

Manyetizma geçmişi çok uzun olan bir konudur ve ilk önce pusula gibi basit cihazlarda insanların yönlerini bulmalarında kılavuzluk yaparak hizmete başlamıştır.

Atomdaki parçacıklar sabit olmayıp hareketleri söz konusudur. Atom çekirdeğinde bulunan protonlar ve nötronlar kendi etraflarında, çekirdek çevresinde bulunan elektronlar ise hem kendi etrafında, hem de belli yörüngelerde dönmektedir. Manyetizma, elektrik yüklü partiküllerin hareketleri sonucu oluşmaktadır.

Genellikle, atomda bir elektronun manyetik momentinin, yine aynı atomun ters yönde dönen elektronunun manyetik momentiyle dengelenerek etkisiz hale gelmesi sonucu madde manyetik olmaz. Bu nedenle tüm maddelerin elektronları olduğu halde bazı maddeler manyetik değildir.

Manyetizmada bir tek manyetik yükten bahis edilememektedir. Örneğin, kuzey ve güney kutbu olan bir çubuk mıknatıs ne kadar küçük parçalara bölünürse bölünsün, sonunda elde edilecek parça iki kutuplu olmayı koruyacaktır. Böyle bir yapı manyetik dipol momenti adı verilen μ ile tanımlanır.

Maddenin manyetik halini anlatmak amacıyla mıknatıslanma vektörü (M) denen bir niceliğin kullanılması kolaylık sağlamaktadır. M birim hacim başına düşen

manyetik momenti gösterir. V toplam hacmi, μ_{toplam} toplam manyetik momenti tanımlamaktadır. Bu değerleri birbirine bağlayan formül Eş. 2.1.de gösterilmiştir.

$$M = \mu_{\text{toplam}} / V \quad (2.1)$$

1895 yılında Pierre Curie bir maddenin mıknatıslanmasını, Curie yasası adı verilen formülle göstermiştir (Eş. 2.2.).

$$M = C * (B/T) \quad (2.2)$$

Burada T ortamın mutlak sıcaklık değerini, C de Curie sabitini göstermektedir.

Bir maddenin toplam manyetik alanı veya manyetik akı yoğunluğu (B), maddenin mıknatıslanmasına ve ona uygulanan dış alana bağlıdır. Manyetik alan şiddeti H , boşluğun manyetik geçirgenlik katsayısı (μ_0) ile tanımlanabilir. SI birim sisteminde H ve M ' in birimi A/m (Amper/metre) dir.

Buna göre boşlukta yani manyetik maddelerin bulunmadığı bir ortam için H ve B arasında doğrusal bir ilişki vardır (Eş. 2.3.).

$$H = B_0 / \mu_0 \quad (2.3)$$

İçinde manyetik maddeden çekirdek bulunan bir kangalın oluşturduğu toplam manyetik alan akı yoğunluğu ise Eş.2 4.'teki gibidir.

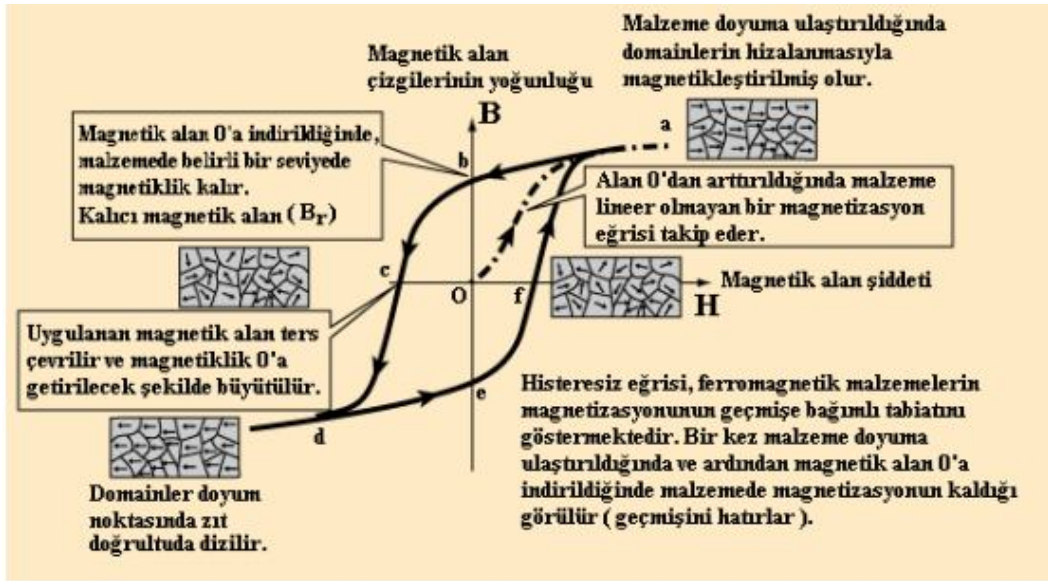
$$B = \mu_0 (H+M) \quad (2.4)$$

2.2.1 Manyetizma türleri

2.2.1.1 Ferromanyetizma

Ferromanyetik maddeler, belirli bir sıcaklığın (Curie sıcaklığı) altında kalıcı manyetik özelliğe sahip maddelerdir. Bu tür maddeler bir manyetik alan içinde, alanla aynı yönde ve çok şiddetli olarak mıknatıslanırlar (Şekil 2.8.). Ayrıca dış manyetik alan kalktığında da manyetik özelliklerini korurlar. Ferromanyetik maddelere demir, kobalt, nikel, godyum ve dispozyum gibi oldukça manyetik maddeler örnek gösterilebilir.

Ferromanyetik maddelerin manyetizasyon eğrileri histeresis eğrileri olarak adlandırılmaktadır. Miknatıslığı tamamen giderilmiş bir malzemeye değişken bir dış manyetik alan uygulandığında, bu alan ile akı yoğunluğu ölçülerek histeresis eğrisi çizilebilir (Şekil 2.7.). Bu kapalı döngüde H değeri sıfırdan başlayarak bir yöndeki maksimum değere çıkmakta sonra sıfıra inmekte, oradan zıt yönlü fakat bir öncekiyle aynı değerli bir maksimuma artmakta, tekrar sıfıra inmekte ve bu çevrimi tekrarlayıp durmaktadır.



Şekil 2.7. Histeresis eğrisi

2.2.1.2 Diyamanyetizma

Atomları sürekli manyetik dipol momente sahip olmayan, tüm elektronları eşleşmiş olan maddelere diyamanyetik maddeler denir. Diyamanyetik maddelerin miknatıslanmaları çok zayıf ve miknatıslayıcı alanla zıt yönlüdür (Şekil 2.8.). Bakır, gümüş, antimon, bizmut gibi metaller diyamanyetik maddelere örnek olarak verilebilir.

2.2.1.3 Paramanyetizma

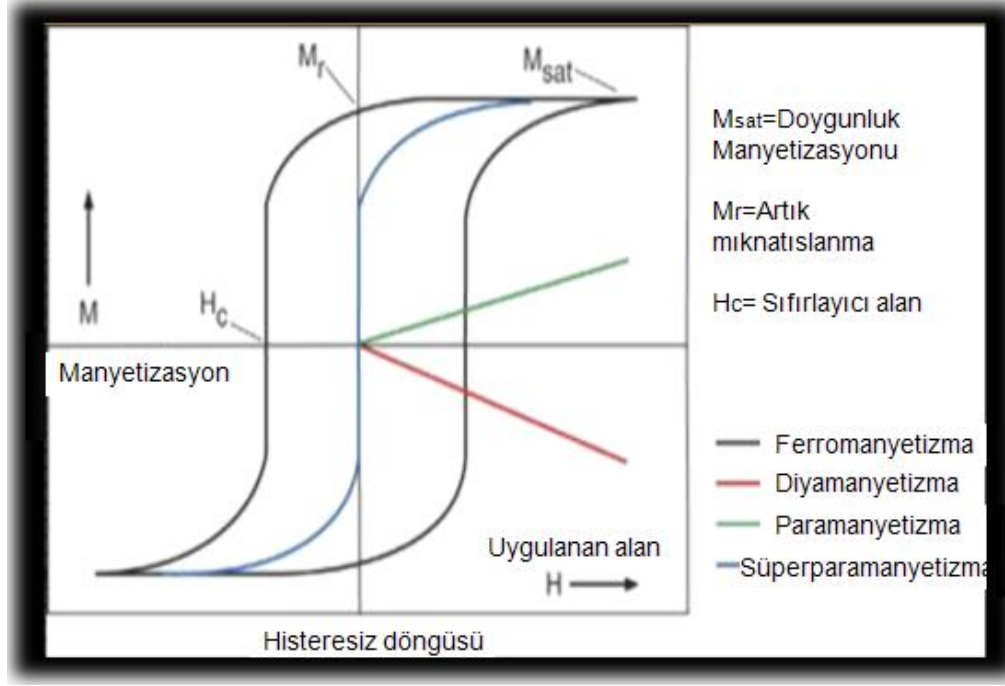
Atomun son elektron yörüngesinde eşleşmemiş elektronlara sahip olan paramanyetik maddeler, manyetik alan tarafından zayıfça çekilirler. Elektronların spin ve orbital hareketleri manyetizmayı doğurur. Dış manyetik alan kalktığında manyetizmaları yok olur. Paramanyetik maddelere oksijen, alüminyum gibi örnekler verilebilir.



Şekil 2.8. Manyetizmada dipol farklılıkları

2.2.1.4 Süperparamanyetizma

Manyetik maddelerin boyutları belli bir değerin altına düştüğünde bu maddeler süperparamanyetik özellik göstermektedir. Süperparamanyetik maddeler için elde edilen histeresis eğrilerinde, ferromanyetik maddelerden farklı olarak, atık mıknatıslanma gözlenmez yani dışarıdan uygulanan manyetik alan sıfıra indirildiğinde malzemede bir manyetiklik kalmaz. Maddenin manyetik dipolleri eskisi gibi gelişigüzel dizilir ve geride atık mıknatıslanma kalmadığı için bunu yok etmek amacıyla ekstra bir enerji verilmesine gerek kalmaz (Şekil 2.9.). Bu özellik canlı dokulardaki uygulama alanında büyük avantajlar sağlamaktadır. Örneğin uygulanan bir terapi sona erdiğinde bu maddeler süperparamanyetik özellikleri sayesinde agregasyon oluşturmazlar ve böylece damar tıkanıklığına neden olmamış olurlar (Figuerola et al., 2010).



Şekil 2.9. Ferromanyetik, süperparamanyetik, paramanyetik ve diyamanyetik nanopartiküllerin histeresiz döngüleri (Arruebo et al., 2007; Natelson et al., 2006).

2.3 Manyetik Partiküllerin Uygulama Alanları

Manyetik nano ve mikropartiküller manyetik depolama aygıtları, biyosensör uygulamaları, medikal uygulamalar gibi birçok teknolojik uygulamada sıklıkla kullanılmaktadır.

Manyetik alan ile ilaç hedefleme çalışmaları, ilaç salınım uygulamalarında kullanılan yeni bir yaklaşımdır. Bu uygulamada üretilen manyetik partiküllerin boyutu, yükü ve yüzey kimyası çok önemlidir. Vücuda verilen manyetik küreler sadece manyetik alanın uygulandığı bölgede birikerek, ilaç moleküllerini difüzyon, degradasyon yada şişme sonrası difüzyon yolu ile aşamalı olarak salmaktadır. Böylece ilacın terapik etkisi artırılarak, sağlıklı doku ve hücrelere zarar verebilecek yan etkiler elimine edilmektedir (Philippova et al., 2010; Gupta and Gupta, 2005).

Hipertermi, kanser tedavisinde kullanılması amaçlanan, hedeflenen doku veya hücrelerin 42 ila 46 dereceye kadar seçici olarak ısıtılmasını öngören bir tedavi yöntemidir. Böylece kanserli hücrelerin canlılığı azaltılarak, kemoterapi ve radyasyona karşı hassasiyetleri artırılmaktadır. Bu yöntemin en büyük zorluğu

sadece tümör bölgesinin ısıtılmasını sağlamaktır. Bu da dışarıdan uygulanan manyetik alan ile yönlendirilebilen ve sadece toplandıkları bölgede ısı artışı meydana getiren manyetik partiküller kullanılarak sağlanabilmektedir (Schmidt, 2007; Medeiros et al., 2011).

Manyetik rezonans görüntüleme (MRI), klinik tıpta, biyomedikal uygulama alanlarında ve teşhise ilgili uygulamalarda kullanılan en önemli tekniklerden biri olarak görülmektedir. Superparamanyetik demir oksit nanopartiküller, sağlıklı ve hastalıklı dokuların daha iyi ayırt edilmesi amacıyla MRI kontrast maddesi olarak kullanılmaktadır (Gupta and Gupta, 2005).

Manyetik nano- ve mikro partiküllerin bir başka önemli kullanımı ise hücrelerin veya biyomoleküllerin in vitro olarak ayırımının gerçekleştirilmesidir. Normal koşullar altında manyetik özellikte olmayan hücreler veya biyomoleküller, manyetik kürelere bağlanarak, dışarıdan uygulanan bir manyetik alan sayesinde kolaylıkla yönlendirilebilmektedirler. Manyetik ayırma süperparamanyetik maddeler kullanıldığında daha etkili olmaktadır. Bugüne kadar manyetik partiküller kullanılarak, enzimler, DNA, RNA, antibadiler ve antijenler gibi birçok makromolekülün, sıvı besi yeri veya vücut sıvısı gibi ortamlardan izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Karumanchi et al., 2002; Philippova et al., 2011).

Zharnikova ve ark. (2009) manyetik polimerik kürelerin petrol endüstrisi için, özellikle de petrol üretim kuyularında su akışını bloke etmek için çok faydalı ve önemli olabileceğini göstermiştir (Philippova et al., 2011). Yöntem temel olarak, kuru haldeki manyetik polimer jellerin öncelikle manyetik alan ile istenilen bölgeye toplanmasına ve daha sonra burada şişerek su akışını bloke etmesine dayanmaktadır.

2.3.1 Adsorpsiyon ve manyetik ayırma

Manyetik ayırma son zamanlarda hızla gelişen ve genellikle biyoayırma alanında uygulanan bir teknolojidir. Bu metot, manyetik partiküllerin, hedeflenen moleküle bağlanmasına ve oluşan bu kompleksin, dışarıdan uygulanan bir manyetik alan yardımıyla toplam çözeltiden ayrılmasına dayanmaktadır. Bu metodun uygulama

alanlarına örnek olarak, enzim immobilizasyonu (Kondo et al., 1997), hücre sınıflandırması (Molday and Molday, 1984), protein adsorpsiyonu ve saflaştırılması (Shamim et al., 2006), nükleik asit ayırması (Levison et al., 1998; Uhlen, 1989) ve ilaç salınımı (Ruuge and Rusetski, 1993) verilebilir. Manyetik ayırma yöntemi, hızı, doğruluğu ve basit oluşu gibi özellikleri sayesinde diğer klasik ayırma yöntemlerine göre daha avantajlıdır. Yoon ve ark. (1998) protein ayrımı yapmak için, manyetik partikülleri, bir ligand bağlamadan kullanmışlardır ve hidrojen bağı veya hidrofobik etkileşim gibi etkilerin de adsorpsiyonu artırabileceğini belirtmişlerdir. Safarik ve Safarikova (1993) lizozomun manyetik kitinden desorpsiyonu için hidroklorik asit çözeltisi kullanmışlardır. Khng ve arkadaşları (1998), tripsinin manyetik partiküllerden desorpsiyonu için, tuz içeren asetik asit çözeltisinin, hidroklorik asit çözeltisinden daha verimli olduğunu bulmuştur (Peng et al., 2004).

Protein adsorpsiyonu, proteinlerin çeşitli yüzeyler üzerine adsorplanması (adhezyonu veya yapışması) olarak tanımlanabilir. Bu tutunan taneciklerin yüzeyden ayrılması olayına ise desorpsiyon denir. Adsorpsiyon olayında yüzeyde tutunan moleküle adsorbat, üzerinde adsorblayan katıya adsorban adı verilmektedir. Protein adsorpsiyonunda adsorbat protein, adsorban ise polimer partikülleridir. Serum proteinleri, enzimler, antibodiler, yabancı antijenler proteinler kategorisine verilebilecek örneklerdir. Genler (polinükleoitler) de gerçekte protein olmamalarına rağmen bazen bu kategori içine dahil edilmektedirler. Protein adsorpsiyonu katı-sıvı ara yüzeyinde gerçekleşmektedir. Polimerik materyalin yüzeyinde bulunan hidroksil, karboksil, amino gibi fonksiyonel gruplar, biyolojik molekül ile adsorban materyali arasındaki iyonik ve/veya elektrostatik etkileşimin sağlanacağı bölgeleri oluşturmaktadır.

In vivo ve in vitro olarak gerçekleşebilen, polimerik partiküllerin protein adsorpsiyonunun, biyomedikal uygulamalardaki önemi büyüktür. Polimerik partiküllerin "in vitro" olarak gerçekleşen protein adsorpsiyonuna örnek olarak aşağıdaki uygulamalar verilebilir.

- Polimerik partiküller kullanılarak, kromatografik protein ayrımı veya saflaştırılması
- Katı faz immunolojik analiz
- Polimerik partiküller üzerine enzim immobilizasyonu

In vivo protein adsorpsiyonuna örnek olarak ise aşağıdaki uygulamalar verilebilir.

- Sinoviyal sıvı ve suni kıkırdaklar için dolgu implantı olarak kullanılan polimerik partiküller
- Tümör hücresi ayrılmasında kullanılan manyetik polimer taşıyıcılar, immünomanyetik hücre ayrımı.
- Kanın saflaştırılmasında kullanılan hemoperfüzyon taşıyıcılar
- Kontrollü salınım ve hedeflemede kullanılan terapötik taşıyıcılar (Kim and Yoon, 2004).

In vivo uygulamalar in vitro uygulamalara göre daha karmaşıktır. Örneğin fibrinojen tarafından tetiklenen kanın pıhtılaşması önemli bir problem oluştururken, hücrelerin büyüklüğü de bu olayın analizini zorlaştırmaktadır. Bazı hücreler, örneğin makrofajlar, partikülleri birer yabancı madde olarak algılayarak onlara saldırırlar. Adsorpsiyonda, polimerle protein arasında oluşan etkileşimler, hidrofobik etkileşim, iyonik (elektrostatik) bağlanma, hidrojen bağı oluşumu ve Van der Waals etkileşimleri olarak sınıflandırılabilir. Adsorpsiyon, adsorbantın yüzeyde tutulmasını sağlayan kuvvet çeşitine göre fiziksel adsorpsiyon, kimyasal adsorpsiyon ve iyonik adsorpsiyon olmak üzere üç türe ayrılmaktadır.

a)Fiziksel Adsorpsiyon

Fiziksel adsorpsiyonda, adsorplanan madde, adsorban yüzeyine zayıf Van der Waals bağları ile tutulmaktadır. Van der Waals etkileşimleri, kısa mesafelerde, suyun olmadığı bir ortamda ve iki nonpolar grubun yaklaşması durumunda gerçekleşmektedir. Adsorpsiyon işlemi tersinirdir ve işlem şartlarının (derişim, sıcaklık vb.) değiştirilmesi ile adsorbe edilen madde kolaylıkla yüzeyden uzaklaştırılabilir. Fiziksel adsorpsiyon ekzotermik bir olaydır ve bu yüzden sıcaklık artışı ile desorpsiyon gerçekleşebilir.

Hidrofobik etkileşimde, stiren gibi monomerler, hidrofobik yüzeyler oluşturarak, protein moleküllerinin bu yüzeye adsorplanmasını sağlamaktadır. Hidrojen bağları, genellikle hidroksil-karbonil veya amit- karbonil radikalleri arasında oluşurken, hidroksil-hidroksil, amit-hidroksil arasında da yine hidrojen bağları oluşabilmektedir. Protein adsorpsiyonunda, hidrojen bağı oluşturabilen karboksil radikalleri de oldukça önemlidir.

b) Kimyasal Adsorpsiyon

Kimyasal adsorpsiyonda, adsorplanan madde, adsorban yüzeyine kuvvetli kimyasal bağlar ile tutulmaktadır. Bu adsorpsiyon çeşidinde oluşan bağlar fiziksel adsorpsiyondaki bağlardan daha kuvvetlidir. Kimyasal adsorpsiyonda kuvvetli bağ oluşumu gerçekleştiği için adsorpsiyon işlemi tersinmezdir.

c) İyonik adsorpsiyon

İyonik adsorpsiyonda, iyonik özelliklere sahip adsorbatlar, elektrostatik çekim kuvvetlerinin etkisiyle yüzeydeki yüklü bölgelere tutunmaktadır. Örneğin, negatif yüklü polimer partikülleri, yüzeylerinde sülfat veya karboksil radikalleri gibi anyonik fonksiyonel gruplar taşımakta ve iyonik bağlar da partiküllerin bu negatif yükleri ile protein moleküllerinin bölgesel pozitif yükleri arasında oluşmaktadır. Bu adsorpsiyon türünde, adsorbat ile adsorbanın iyonik güçleri ve moleküler büyüklükleri önemlidir. Fiziksel, kimyasal ve iyonik adsorpsiyon arasında keskin bir ayırım yapmak zordur; çünkü üç adsorpsiyon türünün de aynı anda ya da peşpeşe görülebilme olasılığı vardır.

Adsorpsiyonu etkileyen faktörler aşağıda sıralanmıştır.

- Adsorbanın yüzey alanı: Geniş yüzey alanına sahip adsorbanlar daha yüksek adsorplama kapasitesine sahiptir.
- Adsorpsiyon için etkileşim süresi: Etkileşim için verilen süre adsorpsiyonun tamamlanması için yeterli olmalıdır.
- Adsorbatın sıvı içerisindeki çözünürlüğü: Su içerisinde az çözünen maddelerin sudan uzaklaştırılması daha kolay olmaktadır. Ayrıca non-polar maddelerin suya olan ilgisi polar maddelere göre daha az olduğundan, bu maddeler sudan daha rahat uzaklaştırılabilir.
- Adsorbentin gözenek boyutuna göre adsorbatın büyüklüğü: Moleküllerin boyutu, bazen adsorbentin gözeneklerine göre daha büyük olmaktadır. Bu da moleküllerin, gözenekler içerisine girmesini zorlaştırarak, adsorpsiyonu azaltmaktadır.
- Adsorbat molekülünün iyonlaşma derecesi: Büyük ölçüde iyonlaşmış moleküller, nötr moleküllere göre daha az derecede adsorplanır.

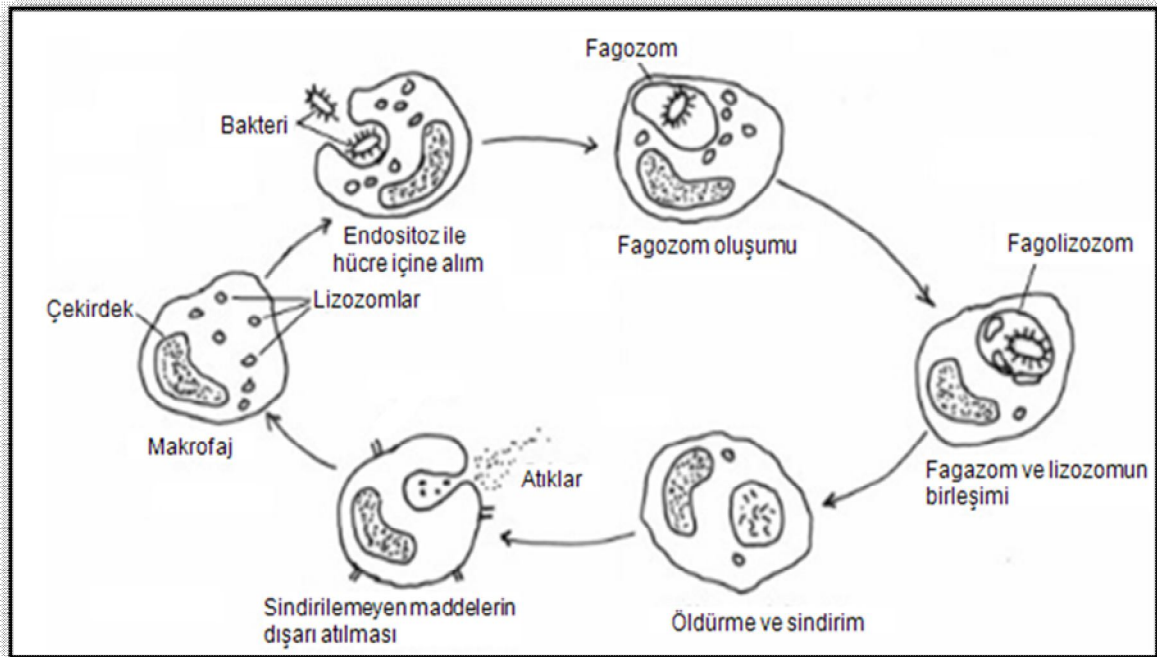
- pH: Moleküllerin iyonlaşma derecesi, buna bağlı olarak da adsorpsiyonu pH' tan etkilenmektedir (Fang and Szleifer, 2001).

2.3.2 Fagositoz

Hücreler, partikülleri ve çözünmüş olan maddeleri özümlemek için pinositoz, reseptör aracılı endositoz ve fagositoz gibi çeşitli stratejiler geliştirmişlerdir. Reseptör aracılı endositoz ile yakından ilişkili olan pinositoz olayı genellikle, akışkan ve çözünmüş maddelerin alınımını içermektedir. Endositoz olayı ise makromoleküllerin, virüslerin ve küçük partiküllerin hücre içerisine girmesini içeren spesifik bir prosestir.

Canlılarda bulunan bazı hücrelerin (özel immün sistem hücreleri), hücre yada doku parçaları, vücuda giren yabancı moleküller veya mikroorganizmalar gibi çeşitli parçacıkları yakalayarak yutması ve tahrip etmesi olayına fagositoz denmektedir.

Fagositoz genel olarak aşağıda sıralanan basamaklardan oluşmaktadır (Şekil 2.10.).



Şekil 2.10. Makrofaj fagositozu.

a) Fagositik hücrelerin, enfeksiyonun olduğu bölgeye ulaşımı: Bu olay iki farklı şekilde gerçekleşmektedir. Bunlardan ilki kan hücrelerinin damar çeperlerinden dokulara sızması (diyapedez) olayıdır. Canlı dokularda çeşitli faktörlerin (biyolojik, fiziksel, kimyasal, mekanik, vs.) etkisi ile oluşan bir zedelenmeye karşı, vücudun gösterdiği reaksiyonların tümü yangısal olguyu meydana getirmektedir. Yangısal olgu sonrası hedef bölgede bulunan çeşitli hücrelerin uyarılması ve aktivasyonu sonucu meydana gelen vazoaktif maddeler (lökotrien, histamin, prostaglandin, çeşitli sitokinler, anafilatoksin, kinin, bradikinin, vs.), damarlarda genişlemelere, damar geçirgenliğinin artmasına ve bunun sonucu olarak da damarlardan hücresel ve sıvısal bileşenlerin dışarı çıkmasına yol açmaktadır. Diğer bir yol olan kemotaksis ise bir kimyasal uyarı ile hücrelerin hareketinin sağlanması olayıdır. Kemotatik faktörlere örnek olarak bakteriyel ürünler, hücre ve doku atıkları verilebilir.

b) Hedeflenen maddeye yapışma-bağlanma: Fagositoz olayı, hücre membranının veya fagositin yüzeyine, partikülün tutunmasıyla başlamaktadır. Katı ortamlarda yabancı partikülün, katı doku hücreleri arasında sıkışması durumunda, fagosit ona direkt bağlanmakta ve böylece yüzey fagositozu gerçekleşmektedir. Fagositoz olayı vücut sıvıları içinde gerçekleşiyorsa bu bağlanma kendiliğinden olmaz. Çünkü vücut sıvılarındaki nötrofillerin ve mikroorganizmaların yüzeyi negatif yüklenmiştir. Nötrofillerin mikroorganizmalara bağlanmasına engel olan bu duruma zeta potansiyeli adı verilmektedir. Bağlanmanın gerçekleşmesi için mikroorganizmanın yüzey elektrik yükünün nötrleştirilmesi gerekmektedir. Bu olaya opsonizasyon denir. Yabancı partikülün yüzeyi pozitif yüklü olan antikorlar veya komplementin C3b (kompleman fragmanı) parçaları ile kaplandığında, partikülün yükü azalmaktadır. Yabancı partikülleri kaplayarak bağlanmayı gerçekleştiren böyle maddelere opsonin adı verilmektedir.

c) Hedeflenen parçacığın hücre içerisine alınması: Fagositin hedef parçacığa tutunmasının ardından bazı sinyaller oluşmaktadır. Bu uyarılar da parçacık yutma olayını tetikleyen bazı fiziksel veya kimyasal değişimlerin hücre içinde oluşmasını sağlamaktadır. Parçacığın hücre içine alınma prosesi, partikülün etrafını saracak şekilde, hücre membranının içe katlanmasıyla gerçekleşmektedir. Böylece partikül,

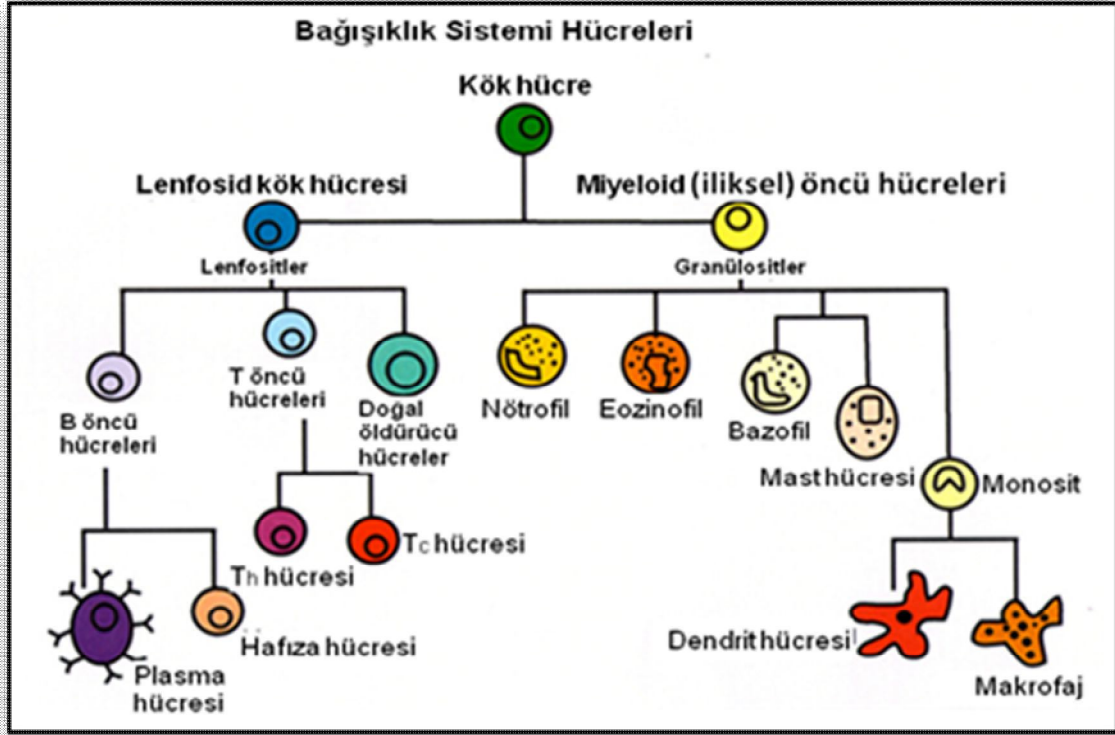
hücre plazma membranından oluşmuş bir membran keseciğın içerisinde, hücre stoplazmasına alınmış olmaktadır. Bu oluşın keseciğē fagozom adı verilmektedir.

d) Fagolizozom oluşumu: Fagozom hücre stoplazmasının içine girdikten sonra lizozomal granüller ile çarpışmaktadır. Bu çarpışmalar sonucunda, granüller patlayarak içerdikleri bileşimi membranla çevrili vesikülün içerisine aktarmaktadır. Fagozom ve lizozomun membranları birleşerek fagolizozom adı verilen sindirici kofulu oluşturmaktadır. Hücre içine alınan mikrobun öldürülmesi ve sindirimi bu oluşın fagolizozomun içerisinde gerçekleşmektedir. Nötrofil ve makrofajların lizozomları içerisinde yer alan, mikropları yok eden bileşenlere örnek olarak, lizozim, katyonik proteinler, çeşitli proteaz ve hidrolaz enzimleri ve peroksidaz enzimleri verilebilir.

e) Hücre içi öldürme ve sindirim (makrofaj fagositozu durumunda ek olarak sindirilemeyen maddelerin dışarı atılması): Bakteri fagositozundaki en son basamak, yutulan materyelin öldürülmesi ve parçalanmasıdır. Fagolizozom oluşumunun ardından, partikülün hücre içine alınmasından itibaren birkaç dakika sonra, bakteri fizyolojisinde gözlenen ilk etki yaşama (çoğalma) yeteneğinin kaybedilmesidir. Fagositlerin mikropları yok etmek için yaptıkları aktiviteler karmaşık ve çok çeşitlidir. Bakteriyel öldürme olayı iki temel mikrop öldürücü sistem kanalıyla gerçekleşmektedir. Birinci sistem olan oksijene bağımlı öldürme şeklinde, oksidatif patlama sonucu ortaya çıkan, oksijen türevi ürünler (serbest radikaller) bakterileri öldürmektedir. İkinci sistem olan oksijenden bağımsız öldürme ise lizozomal granül içeriğinin açığa çıkmasıyla oluşın ölümdür. Oksidatif patlama olmaksızın da lökosit hücre içi granülleri (lizozomlar) içerdikleri çeşitli aktif enzimler vasıtasıyla bakterileri ve diğē enfeksiyöz ajanları öldürebilmektedir (mikrobiyal öldürme gerçekleşebilmektedir).

Doğuşın ve sonradan kazanılan bağışıklık sisteminde görevli, hücresel savunma adı altında birçok doku hücresi bulunmaktadır. Bu hücrelerden makrofajlar ve nötrofiller fagositoz olayında, bazofil ve mast hücreleri inflamasyonda (iltihaplanma), B ve T hücreleri sırasıyla antikor aracılı bağışıklık ve hücre aracılı bağışıklıkta görev almaktadır. Bu hücrelerin hepsi kemik iliğinden türemiştir (Şekil 2.11.). Çeşitli hücrelerde (nötrofiller, eozinofiller) fagosit etkinliğı görülebilirse de bu

işlev mononükleer fagositlerin temel özelliğidir. Bunlar, kandaki monositler ve çeşitli histiyositlerden (makrofaj) oluşmaktadır.



Şekil 2.11. Bağışıklık sisteminde görev alan hücrelerin gelişimi.

Monosit ve makrofaj gibi büyük lökositler bağışıklık sistemimizin en önemli hücreleridir. Beyaz kan hücrelerinin %3-7 kadarını Monositler oluşturmaktadır. Kemik iliğinde yapıлып kan dolaşımına geçen monositler 12 saat içinde dokulara girerler ve burada makrofajlara dönüşürler. Makrofajlar, endotel dokusu bulunan bölgelerde, karaciğerde (Kupffer hücreleri), dalak ve kemik iliği sinüzoidlerinde ve lenf düğümleri sinüslerinde bulunur. Akciğerlerde alveol boşluğunda yer alan makrofajlar solunumla akciğerlere ulaşan toz parçacıklarının uzaklaştırılmasıyla görevlidir. Makrofajlar, organizmanın başlıca savunma sistemlerinden birini oluşturur ve yaşamları boyunca sürekli fagositoz yapabilme yeteneğine sahiptir. Büyük boyutlu hücreler olan makrofajlar, bütün bir eritrosit ya da sıtma parazitini içlerine alabilir. Makrofaj yüzeyinde bulunan integrinler, ölü veya hasarlı doku hücrelerine, kollejen ve fibronektin gibi hücresel moleküllere ve bazı bakteri proteinlerine direkt bağlanmayı sağlamaktadır. Fagositoz yeteneklerine ek olarak,

makrofajlar sitoplazmalarındaki çeşitli maddeleri dışarı vererek tümör hücrelerini de öldürebilirler (Kenneth Todar, 2004).

Manyetik partiküllerin canlı dokulardaki (in vivo) uygulamalarında, önemli sorunlar ile karşı karşıya kalınmaktadır. Manyetik partiküller hedeflenen hücreye ulaşmadan retiküloendoteryal sistem tarafından tanılıp yok edilmektedir. Böylece bu partikül sistemlerinin etkisi engellenmektedir. Karşılan sorunlara bir başka örnek olarak ise partiküllerin vasküler endotelyum veya kan beyin bariyeri gibi biyolojik bariyerleri aşamaması verilebilir. Damar içinden verilen manyetik partiküllerin bu sorunları aşma derecesi partiküllerin boyutu, morfolojisi, yükü ve yüzey kimyası ile yakından ilgilidir. Hedeflenen dokuya ulaşabilme olasılığının maksimuma çıkarılabilmesi amacıyla, manyetik partiküllerin retiküloendoteryal sistemden kaçabilmesi ve kan dolaşımı sisteminde uzun süre kalabilmesi (uzun yarı ömre sahip olma) için çeşitli teknikler kullanılmıştır. Partikül boyutunun ayarlanması veya bozulmaya uğramayan polimerler ile bağlama gibi teknikler kullanılarak partiküllerin etkinliği artırılmaya çalışılmıştır (Sun et al., 2008; Thiele et al., 2001).

Manyetik partiküllere, dekstran veya PEG (poli etilen glikol) gibi biyouyumlu polimerlerin birleşimi ile yüzey kaplaması yapıldığında, bu manyetik partiküllerin agregasyonu, opsonizasyonu ve retiküloendoteryal sistem tarafından yakalanması önlenmektedir. Bu kaplamalar sayesinde ayrıca partiküllerin fiziksel çözeltilerdeki kolloidal kararlılığı ve kan dolaşımında kalma süresi arttırılabilmektedir. Manyetik partiküllerin retiküloendoteryal sistemden kaçırılması ve istenilen yerde spesifik olarak biriktirilmesi proseslerinde sürekli olarak ilerleme kaydedilmesine rağmen bu nanopartikülleri in vivo çalışmalardaki davranış mekanizmalarının tam olarak anlaşılabilmesi için daha çok çalışmaya gerek duyulmaktadır.

2.4 Hidrojel

Hidrojeller, suda çözünen polimerlerin çapraz bağlanması sonucu oluşan, içerdiği bu çapraz bağları sayesinde suda çözünmeyen, üç boyutlu, hidrofilik polimerik ağlardır. Bu yapılar, sulu ortama koyulduğunda şişme ve önemli miktarda su veya biyolojik sıvıları içine alma yeteneğine sahiptir. Hidrojellere suyu absorblama

eğilimlerini veren, yapılarında bulunan $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{CONH-}$, $-\text{CONH}_2$ ve $-\text{SO}_3\text{H}$ gibi hidrofilik gruplardır.

Hidrojellerin şişme yeteneği ve şişme derecesi temel olarak polimer zincirlerinin hidrofilikliği ve çapraz bağ yoğunluğuna bağlı olmaktadır. Hidrofilik grup sayısı arttıkça su taşıma kapasitesi de artmaktadır. (Bazen ağırlıkça %20, bazen de %90'dan fazla, %95ten daha fazla su içeren hidrojeller ise süperabsorban olarak adlandırılmaktadır). Yapıdaki çapraz bağ yoğunluğu arttıkça, hidrofilik grupların sayısındaki azalmaya bağlı olarak şişme özelliği azalmaktadır. (Hamidi et al., 2008; Deligkaris et al., 2010; Pal et al., 2009; Benomer et al., 2006).

Hidrojellerin biyomedikal alanda kullanımı 1960'lara dayanmaktadır. Wichterle ve Lim bu yıllarda çapraz bağlı poli(2-hidroksietil metakrilat) P(HEMA) bazlı hidrojinin biyouyumlu bir sentetik malzeme olabileceğini ileri sürmüştür. Bu yapılan ilk çalışmadan sonra hidrojeller çok çeşitli biyomedikal uygulamalar için araştırılmıştır. Hidrojellerin ilk uygulama alanı kontakt lens olarak kullanımlarıdır. Diğer uygulamalara örnek olarak ise yapay tendon materyalleri, yara iyileşmesinde kullanılan biyoadeziv madde, yapay böbrek membranları, yapay deri materyalleri ve yapay kas yapımı, moleküler ayırma sistemlerinde, jel bazlı hareketlendiricilerde, sensörlerde (Ph sensörü, kimyasal sensör), ilaç ve diğer maddelerin kontrollü salım sistemlerinde, doku mühendisliğinde, gen aktarımında kullanımları verilebilir (Pal et al.,2009; Mathur et al., 1996).

Hidrojeller sahip oldukları özellikleri sayesinde tüm sentetik biyomalzemeler içinde canlı dokulara en çok benzeyen yapılardır. Bu özellikler:

- Hidrojeller, moleküler seviyedeki biyolojik etkileşimler için uygun ve üç boyutlu ortamlar sağlamaktadır.
- Çoğu hidrojinler inert yüzeyleri sayesinde nonspesifik protein adsorpsiyonunu önlemektedirler. Hidrojellerin hidrofilik yüzeyleri vücut sıvıları ile temasında düşük arayüzey serbest enerjisine sahiptir. Bu özellikleri sayesinde protein ve hücrelerin bu yüzeylere yapışma eğilimleri azalmaktadır (Hennink and Nostrum, 2002).
- Biyolojik moleküller hidrojin yapılarının içine kovalent olarak katılabilmektedir.

- Hidrojellerin mekanik özellikleri kolaylıkla ayarlanabilmektedir. Örneğin çapraz bağ yoğunluğu değiştirilerek hidrojin elastikliği ayarlanabilmektedir.
- Hidrojeller dışarıdan uygulanan bir uyarıya karşı (pH, sıcaklık, iyonik güç, çözücü polaritesi, elektrik/manyetik alan, ışık veya küçük moleküller) cevap verecek şekilde (Şişme, çökme, büzüşme, çözücüden jelle geçme) dizayn edilebilmektedir. Bu tip hidrojellere akıllı jel (uyarı-cevap polimerleri, akıllı polimerler) denir (Ulijn et al., 2007).
- Vücut sıvılarına, ilaçlara, suda çözünen maddelere, besinlere ve oksijen gibi yararlı maddelere karşı geçirgendirler.
- Yumuşak ve lastiksi bir yapıya sahiptirler. Bu özellikleri sayesinde hidrojellerin çevredeki hücre ve dokulara sürtünmesi ve bu hücrelerin tahriş olması en aza indirilmektedir.
- Mukoza zarı ve dokularla düşük yapışma gösterirler .
- Yüksek biyouyumluluğa sahiptirler (Hennink and Nostrum, 2002).

2.4.1 Hidrojellerin sınıflandırılması

Hidrojeller , farklı özellikler temel alınarak çeşitli gruplara ayrılabilir.

a) Fiziksel yapılarına göre:

Amorf hidrojeller: Makromolekül zincirleri gelişigüzel yerleşmiştir.

Kısmi kristal hidrojeller: Yapı içerisinde makromolekül zincirlerinin düzenli yerleştiği yoğun kısımlar (kristalit) mevcuttur.

Hidrojen bağlı yapılar: Üç boyutlu yapı hidrojen bağlarıyla oluşmuştur.

b) Elektrik yüküne göre: İyonik (yükü) veya nötr hidrojeller

c) Çapraz bağ yapısına göre: Fiziksel veya kimyasal çapraz bağlı hidrojeller. Kovalent bağla çapraz bağlı olan hidrojellere kimyasal jeller denirken, kovalent bağlı olmayan hidrojellere fiziksel jel adı verilir. Kimyasal hidrojeller iyi bir mekanik güce sahip olmakla birlikte birçok da yan etkiye sahiptir (Deligkaris et al., 2010; Hennink and Nostrum, 2001).

Hidrofobik etkileşim, yük etkileşimi veya hidrojen bağı oluşumu fiziksel çapraz bağ oluşumunun örnekleridir. Kimyasal çapraz bağlanma metotlarına örnek olarak ise radikal polimerizasyonu, bütünleyici gruplarla kimyasal reaksiyon (örneğin aldehitler ile çapraz bağlanma), yüksek enerji ışınlaması veya enzim kullanımı verilebilir (Hoffman, 2002).

d) Dış etkilere karşı verdiği cevaba göre: Uyarıya (pH, iyonik güç, sıcaklık, elektro manyetik radyasyon vb.) karşı duyarlı veya duyarsız (Hamidi et al., 2008).

e) Orijinlerine göre: Sentetik (poliesterler, polivinilasetat/polivinilalkol) veya doğal (karragenan,pektin, dekstran, kollajen, kitosan).

f) Hazırlanma metoduna göre:

- Homopolimer hidrojeller: Tek bir hidrofilik monomerin çapraz bağlanmasıyla oluşmuş yapılar
- Kopolimer hidrojeller: İki monomerin çapraz bağlanmasıyla oluşur. Ancak monomerden biri hidrofilik yapıda olması gerekir.
- İç içe geçmiş ağ yapılı hidrojeller: Çapraz bağlı iki polimerik örgünün fiziksel olarak birleşmesiyle oluşur (Pal et al., 2009).

2.4.2 Hidrojellerden ilaç salınım mekanizmaları

- Difüzyon kontrollü salınım: Hidrojelden ilaç salınımını tanımlamak için en çok uygulanan mekanizmadır (Amsden, 1998). İlaç difüzyonu ilk olarak hidrojin gözenek boyutuna bağlıdır. Gözcük sayısı ise çapraz bağ yoğunluğu, kullanılan monomerlerin kimyasal yapısı gibi birçok parametreden etkilenmektedir. Biyomedikal hidrojellerin şişmiş halindeki tipik gözenek boyutları 5 ile 100 nm arasında değişebilmektedir (Mason et al., 2001). 5-100 nm, bir çok küçük molekülle ilaçtan daha büyük bir boyuttur. Bu yüzden küçük moleküllerin difüzyonu, şişmiş durumda kayda değer ölçüde yavaşlatılamamaktadır. Ancak oligonükleotidler, peptitler ve proteinler hidrodinamik boyutları itibariyle büyüktürler. Şişmiş durumdaki hidrojellerin gözenek boyutu ayarlandığı taktirde bu büyük yapılı moleküller ile istenilen hızlarda sürekli bir difüzyon elde edilebilmektedir.

- Şişme kontrollü salınım: İlaç difüzyonunun hidrojel şişmesinden çok daha hızlı olduğu durumlarda, şişme, salınım davranışını kontrol eden olarak kabul edilir.
- Kimyasal kontrollü salınım: Bu mekanizmada ise hidrojel matrisinde gerçekleşen, polimer zincir kırılması, polimer ağı ile salınan ilaç arasında oluşan tersinir veya tersinmez reaksiyonlar gibi kimyasal reaksiyonlar ele alınır.
- Pasif difüzyon: Çeşitli boyutlarda ve karakteristik özelliklerdeki moleküller hidrojel matrisinin içine ve matristen dışarı serbest olarak difüze olabilmektedir (Hamidi et al., 2008).

3 DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Manyetik Monodispers Polimerik Partiküllerin Üretimi

3.1.1 Çıkış lateksinin üretimi

3.1.1.1 Materyal

Çıkış lateksinin üretimi amacıyla kullanılan dispersiyon polimerizasyonu yönteminde, monomer olarak glisidil metakrilat (GMA, Aldrich, ABD), dağıtma ortamı olarak ise mutlak etil alkol (Et-OH, Merck, Almaya) kullanılmıştır. Sentezde başlatıcı olarak monomer fazında çözünen, etil alkolden kristalize edilen 2-2'-azobisisobütironitril (AIBN, BDH Chemicals Ltd., İngiltere) kullanılmıştır. Stabilizör olarak seçilen polivinil piroidon K-30 (PVP K-30, Sigma Chemical Co., ABD) bir işleme tabi tutulmadan alındığı şekliyle kullanılmıştır.

3.1.1.2 Polimerizasyon yöntemi

Bir akrilik monomer olan GMA kullanılarak, dispersiyon polimerizasyonu ile poli(glisidil metakrilat) çıkış lateksi elde edilmiştir. Çıkış lateksinin sentez koşulları Çizelge 3.1.'de görülmektedir. Bu yöntemde ilk olarak 0,45 g PVP K-30, 30 mL Et-OH içerisinde çözülerek polimerizasyon için dağıtma ortamı hazırlanmıştır. Sonrasında, hazırlanan bu dağıtma ortamı içerisine 3 mL GMA ve 0,06 g AIBN eklenmiştir. Eklenen AIBN'nin tam olarak çözünmesi ve böylece homojen bir karışım elde edilebilmesi amacıyla, ortam 5 dakika boyunca oda sıcaklığında, 200W gücünde bir sonikatörde (Branson 200, İngiltere) bekletilmiştir. Elde edilen homojen ortam, 260 mL hacmindeki ağzi sızdırmaz şekilde kapatılan cam polimerizasyon reaktörüne alınmıştır. Başlangıçta oda sıcaklığında olan çalkalamalı su banyosuna (Gallenkamp, ABD), cam reaktör yerleştirilerek, ortam, 100 cpm karıştırma hızı ile polimerizasyon sıcaklığı olan 70⁰C'a ısıtılmıştır. Polimerizasyon işlemi, belirtilen bu koşullarda 24 saat süre ile gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyon sona erdikten sonra elde edilen ürün oda sıcaklığına soğutularak,

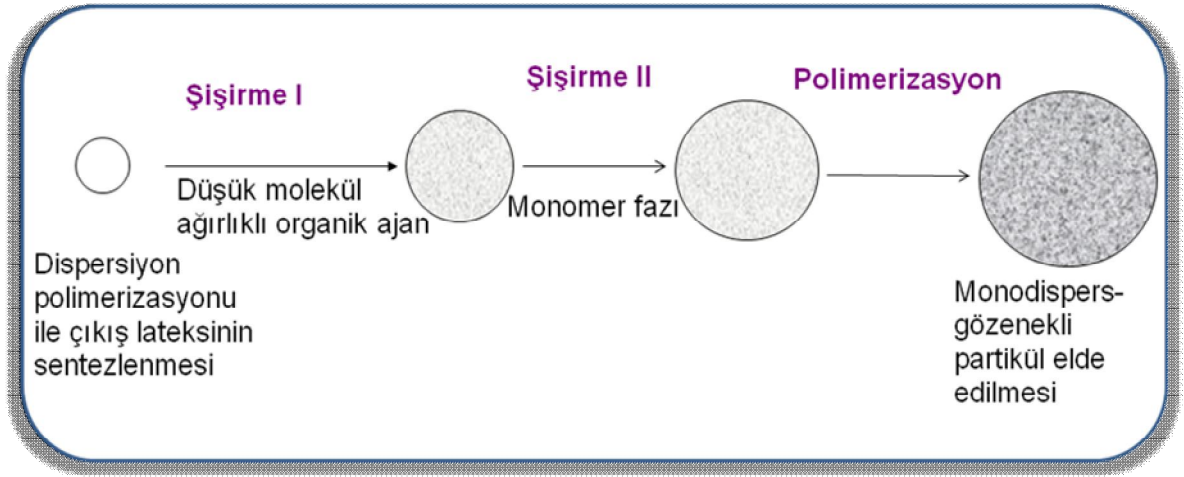
5000 rpm'de, 10 mL'lik santrifuj tüpleriyle, yaklaşık 5 dakika süre ile santrifujlenmiştir (nüve, NF200, Belçika). Santrifuj sonrasında, süpernatant atılarak, çöken partiküller üzerine etanol eklenmiştir. Ortam bir baget yardımıyla karıştırılarak, partiküllerin etanol ortamında dağılması sağlanmış ve tekrar santrifujlenmiştir. Bu santrifüleme-dekantasyon işlemi 2 kez etanol, 3 kez de distile su ile tekrarlanmıştır. Son santrifüleme işlemi bittikten sonra partiküller distile su içerisine alınarak 1-2 dakika süreyle sonikasyon ile dağıtılmıştır. Bu işlemler sonunda, eş boyut dağılımlı poli(glisidil metakrilat) çıkış lateksi elde edilmiştir.

Çizelge 3.1. Çıkış lateksin sentez koşulları.

| Kimyasal Malzeme | Miktar |
|---------------------------------|---------------|
| Glisidil metakrilat (monomer) | 3 mL |
| PVP K-30 (stabilizör) | 0,45 g |
| AIBN (başlatıcı) | 0,06 g |
| Etanol (dağıtma ortamı) | 30 mL |
| Polimerizasyon Koşulları | |
| Sıcaklık | 70°C |
| Çalkalama hızı | 100 cpm |
| Polimerizasyon süresi | 24 saat |

3.1.2 Çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyon yöntemi ile manyetik partiküllerin sentezi

Polimer bazlı monodispers-manyetik partiküllerin sentezi için çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu yöntemi kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu

3.1.2.1 Materyal

İki basamaklı şişirme işlemi içeren mikrosüspansiyon polimerizasyonunun ilk şişirme basamağında, diluent olarak sikloheksanol (Cyc-OH, Sigma Aldrich, ABD) ve dibütilftalat (DBP, Fluka, ABD) karışımı kullanılmıştır. Şişirme işleminin ikinci basamağında monomer olarak hidrofilik özelliğe sahip gliserol dimetakrilat (GDMA, %85, Sigma Aldrich, Almanya) ve gliserol-1,3-digliserol diakrilat (GDGDA, Sigma Aldrich, ABD) kullanılmıştır. Polimerizasyon sisteminde emülsiyon yapıcı madde olarak sodyum dodesil sülfat (SDS, Sigma, USA, Almanya) kullanılmıştır. İzoamil alkol (IAA), monomer fazı içeren ortama eklenmiştir. Başlatıcı olarak ise monomer fazında çözünen benzoil peroksit (BPO, Fluka Chemika, İsviçre) kullanılmıştır. Stabilizör olarak polivinil alkol (PVA, Aldrich, ABD) reaksiyon ortamına eklenmiştir. Elde edilen partiküllerin yıkanması aşamasında tetrahidrofuran (THF, Aldrich Chemicals Co., ABD) kullanılmıştır.

3.1.2.2 Polimerizasyon yöntem

a) Partiküllerin diluent ortamı ile şişirilmesi

Çok basamaklı mikrosüspansiyon yönteminin ilk basamağında, dispersiyon polimerizasyonu ile elde edilen poli(glisidil metakrilat) çıkış lateksi, diluent ortamı

kullanılarak şişirilmiştir. 3,1 mL sikloheksanol (CycOH) ile 1,8 mL dibutilftalat (DBP) karıştırılarak diluent ortamı elde edilmiştir. Hazırlanan bu karışım, 60 mL distile su ve 0,15 g sodyum dodesil sülfat'tan (SDS) oluşan çözeltiye eklenmiştir. 8 dakika boyunca sonikatörde (Bandelin Sonopuls, Almanya) tutulan toplam karışıma elde edilen poli(glisidil metakrilat) lateks partikülü eklenmiştir. Son olarak karışım 4 dakika daha sonikatörde tutularak, oda sıcaklığında, manyetik karıştırıcıda (IKA-Werke, Almanya) 250 rpm hızda, 24 saat karıştırılmıştır.

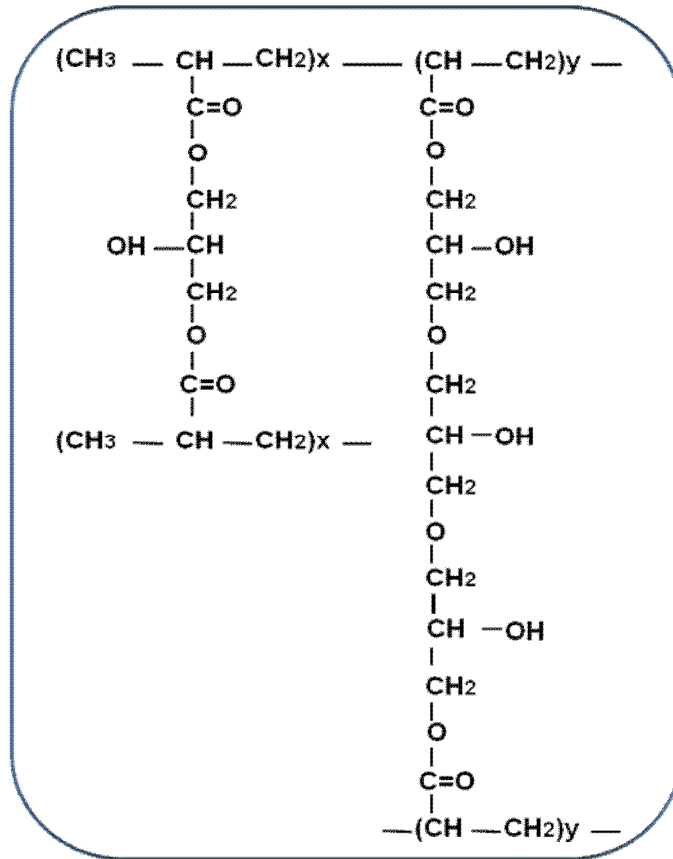
b) Partiküllerin monomer fazı ile şişirilmesi

Şişirme işleminin ikinci kısmında monomer olarak hidrofilik özelliğe sahip gliserol dimetakrilat (GDMA) ve gliserol-1,3-digliserol diakrilat (GDGDA) kullanılmıştır. Monomer fazı ile çıkış partiküllerinin monodispersite korunarak şişirilmesi işlemi sulu emülsiyon ortamında gerçekleştirilmiştir. 3.1 mL GDMA, 2.1 mL GDGDA, 0.25 g izoamil alkol ve 0,12 g benzoil peroksit'ten oluşan karışım hazırlanarak, 60 mL distile su ve 0,15 g SDS içeren çözeltiye eklenmiştir ve 12 dakika süreyle soniklenmiştir. Bu ortam, polimerizasyonun ilk basamağında hazırlanıp 24 saatlik sürenin sonunda alınan karışıma eklenmiştir. Toplam karışım, 24 saat süreyle, 250 rpm hızda manyetik olarak karıştırılmıştır.

c) Repolimerizasyon

Monodispers ve gözenekli formda poli(GDMA-co-GDGDA) partiküller, monomer fazının çıkış lateks partikülleri içerisinde polimerizasyonu ile elde edilmiştir. Elde edilen polimerik partikülün kimyasal yapısı Şekil 3.2'de verilmiştir. Makrogözenekli partiküllerdeki bloklaşmanın engellenmesi için polimerizasyon öncesi ortama 10 mL distile su ve 0,8 g polimerik bir stabilizör olan polivinil alkol'den (PVA) oluşan çözelti eklenmiştir. Polimerizasyonun gerçekleşmesi amacıyla, monomer fazı ile şişirme işlemini takiben, partiküllerin bulunduğu sulu emülsiyon ortamının sıcaklığı 80°C değerine yükseltilmiş ve ortam bu sıcaklıkta, 24 saat tutulmuştur. Bu işlem için 100 cpm karıştırma hızına ayarlanan çalkalamalı su banyosu (Gallenkamp, ABD) kullanılmıştır.

Son olarak, elde edilen partiküllere, diluent fazı ve dönüşmeyen monomerin uzaklaştırılması amacıyla uygun çözücüler kullanılarak yıkama işlemi uygulanmıştır. Reaktörden alınarak 10 mL'lik santrifüj tüplerine aktarılan dispersiyon, 5000 rpm'de 4 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Oluşan süpernatant dekantasyon yoluyla atılarak, çöken partiküllerin üzerine etanol eklenmiştir. Partiküller etanol içerisinde dispers edildikten sonra tekrar çöktürülmek üzere santrifüj cihazına konulmuştur. Bu santrifüjleme-dekantasyon işlemi 2 kez etanol, 2 kez tetrahidrofuran, tekrar 2 kez etanol ve son olarak 3 kez de distile su ile tekrarlanmıştır. Polimerizasyon koşulları Çizelge 3.2.'de özetlenmiştir.



Şekil 3.2. Poli(GDMA-co-GDGDMA) partikülünün kimyasal yapısı.

Çizelge 3.2. Çok basamaklı mikrosüspansiyon polimerizasyonu çalışma koşulları

| Kimyasal Malzeme | | Miktar |
|---|-------------------|----------------|
| Sikloheksanol (CycOH) | | 3,1 mL |
| Dibütilftalat (DBP) | | 1,8 mL |
| Soydum dodesil sülfat (SDS) | | 0,3 g (toplam) |
| Gliserol dimetakrilat (GDMA) | | 3,1 mL |
| Gliserol-1,3-digliserol diakrilat (GDGDA) | | 2,1 g |
| İzoamil alkol (IAA) | | 0,25 mL |
| Benzoil peroksit (BPO) | | 0,12 g |
| Polivinil alkol (PVA) | | 0,8 g |
| Polimerizasyon Koşulları | | |
| Sıcaklık | 80 ⁰ C | |
| Çalkalama hızı | 100 cpm | |
| Polimerizasyon süresi | 24 saat | |

3.1.3 Manyetizasyon

Demir oksit nanopartiküllerin, monodispers polimerik mikrokürelerin gözenekleri içerisine çöktürülmesi ve elde edilen bu partiküllerin ince bir polimerik film ile kaplanmasıyla, kompozit formdaki manyetik polimerik mikroküreler elde edilmiştir. Bu sentez için iki farklı metot kullanılmıştır.

3.1.3.1 Mikrosüspansiyon polimerizasyonu sırasında manyetikleştirme

3.1.3.1.1 Materyal

Mikrosüspansiyon polimerizasyonu sırasında yapılan manyetikleştirme metodunda, manyetik demir tozlarının elde edilmesi amacıyla demir (III) klorür heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Alfa Aesar, Almanya) ve demir (II) sülfat (FeSO_4 , %98, Alfa Aesar, Almanya) tuzları kullanılmıştır. Demir oksit elde edilmesi amacıyla ortama amonyak (NH_3 , %25, Merck, Almanya) eklenmiştir. Yüzey kaplaması için

yapılan polimerizasyonda monomer olarak gliserol dimetakrilat (GDMA, %85, Sigma Aldrich, Almanya), 2-hidroksietil metakrilat (HEMA, Fluka Chemika, İsviçre), metakrilik asit (MAA, Merck, Almanya) kullanılmıştır. Yüzey polimerizasyonunda başlatıcı olarak ise potasyum persülfat (KPS, Aldrich, ABD) kullanılmıştır. Manyetikleştirme prosedüründe emülsiyon yapıcı olarak ise sodyum dodesil sülfat (SDS, Sigma, ABD/Almanya) kullanılmıştır.

3.1.3.1.2 Yöntem

Mikrosüspansiyon polimerizasyonunun son basamağında, partikülleri içeren sulu emülsiyon ortamı 80°C'ye ayarlı çalkalamalı su banyosuna konulmuştur. Sıcaklık 80°C'ye geldikten sonra bu sıcaklıkta 4 saat geçmesi beklenmiştir. Bu süre sonunda ortama, 10 mL distile su, 0.525 g demir (III) klorür hekza hidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ve 0,19 g demir (II) sülfat'tan (FeSO_4) oluşan çözelti eklenmiştir. 5 dakika süre ile azot gazı geçirilen ortam, 1 saat daha 80°C'de 100cpm hızında karışmak üzere çalkalamalı su banyosunda bekletilmiştir. Süre sonunda ortama amonyak (NH_3) eklenerek yarım saat daha çalkalamaya devam edilmiştir. Böylece, manyetik demir (II,III) oksit (Fe_3O_4) nanopartikülleri elde edilmiş, sulu emülsiyon ortamında, mikrosüspansiyon ile elde edilen partiküllerin gözenekleri içerisine çöktürülmüştür. Hazırlanan hidroklorik asit (HCL) çözeltisi, ortamın pH'ı 3 olana dek ortama eklenmiştir. Dengeye gelmesi için 15 dakika beklenen polimerizasyon karışımına, monomer ve sodyum dodesil sülfat'tan (SDS) oluşan karışım eklenmiştir.

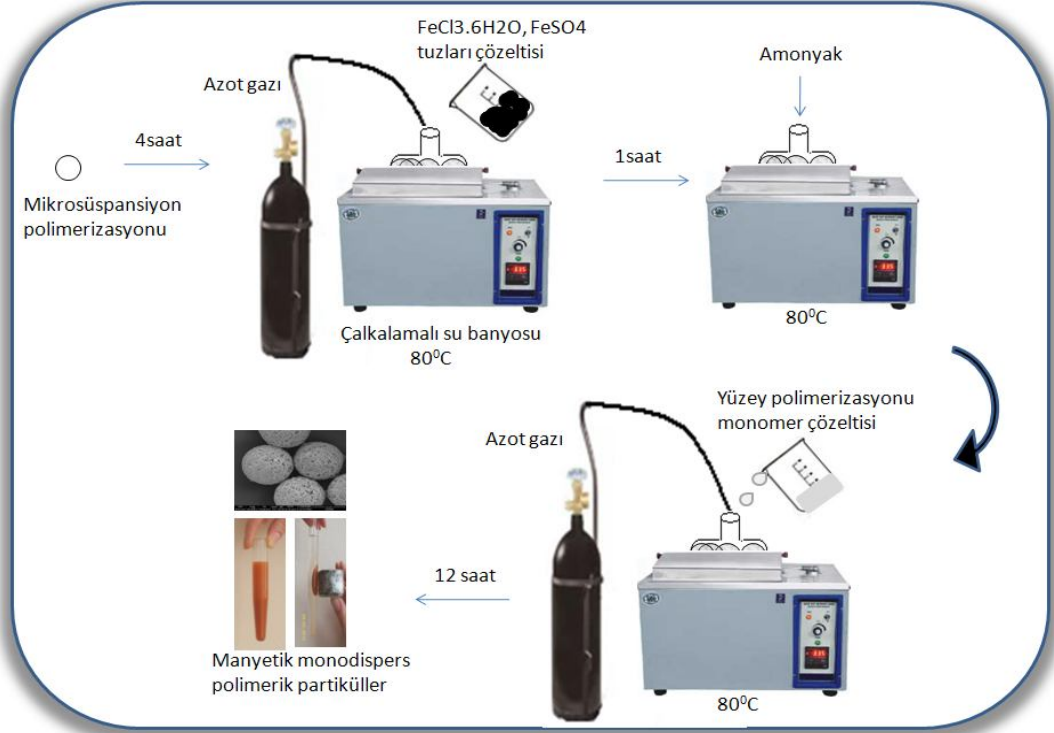
Son olarak da başlatıcı olarak 0,03 g potasyum persülfat (KPS), distile su içerisinde çözülerek karışıma eklenmiştir. 5 dakika boyunca azot geçirilen emülsiyon ortamı 18 saat boyunca, 100 cpm karıştırma hızında, 80°C'de çalkalamalı su banyosunda karıştırılmak üzere bırakılmıştır. Gözenekleri içerisinde manyetik nanopartikülleri içeren polimerik mikrokürelerin bulunduğu emülsiyon ortamına monomer ve başlatıcı eklenerek, polimerizasyon koşullarının ayarlanması ile sonuç partiküller etrafında çapraz bağlı ince bir polimerik filmin oluşumu sağlanmıştır. Kaplamada kullanılan fonksiyonel akrilik monomerlerin türü ve sentez sırasında kullanılan amonyak miktarı değiştirilerek farklı türde manyetik

partiküller elde edilmiştir. Bu deney koşulları Çizelge 3.3.'te gösterilmiştir. Yöntemin şematik gösterimi ise Şekil 3.3.'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Mikrosüspansiyon polimerizasyonu sırasında manyetikleştirme metodu ile sentezlenen partiküllerin çalışma koşulları.

| Kod | Demir Çözeltisi | | | NH ₄ OH (%) [*] | Yüzey Polimerizasyonu | | |
|-----|-----------------|--|-----------------------|-------------------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| | Distile su (mL) | Demir tuzları (g) | | | Monomer türü | | |
| | | FeCl ₃ .6H ₂ O (g) | FeSO ₄ (g) | | GDMA (%) [*] | HEMA (%) [*] | MAA (%) [*] |
| MY1 | 10 | 0.525 | 0.19 | 1.38 | 0.46 | - | - |
| MY2 | 10 | 0.525 | 0.19 | 1.38 | 0.92 | - | - |
| MY3 | 10 | 0.525 | 0.19 | 1.38 | 0.46 | 0.46 | - |
| MY4 | 10 | 0.525 | 0.19 | 2.77 | 0.62 | - | 0.31 |
| MY5 | 10 | 0.525 | 0.19 | 2.77 | 0.92 | - | - |
| MY6 | 10 | 0.525 | 0.19 | 2.77 | 0.46 | 0.46 | - |
| MY7 | 20 | 0.525 | 0.19 | 2.77 | 0.92 | - | - |

* Veriler, poli (GDMA-co-GDGDA) sentezi sırasında kullanılan toplam distile su miktarına oranlanarak hesaplanmıştır



Şekil 3.3. Mikrosüspansiyon Polimerizasyonu sırasında manyetikleştirme yönteminin şematik gösterimi.

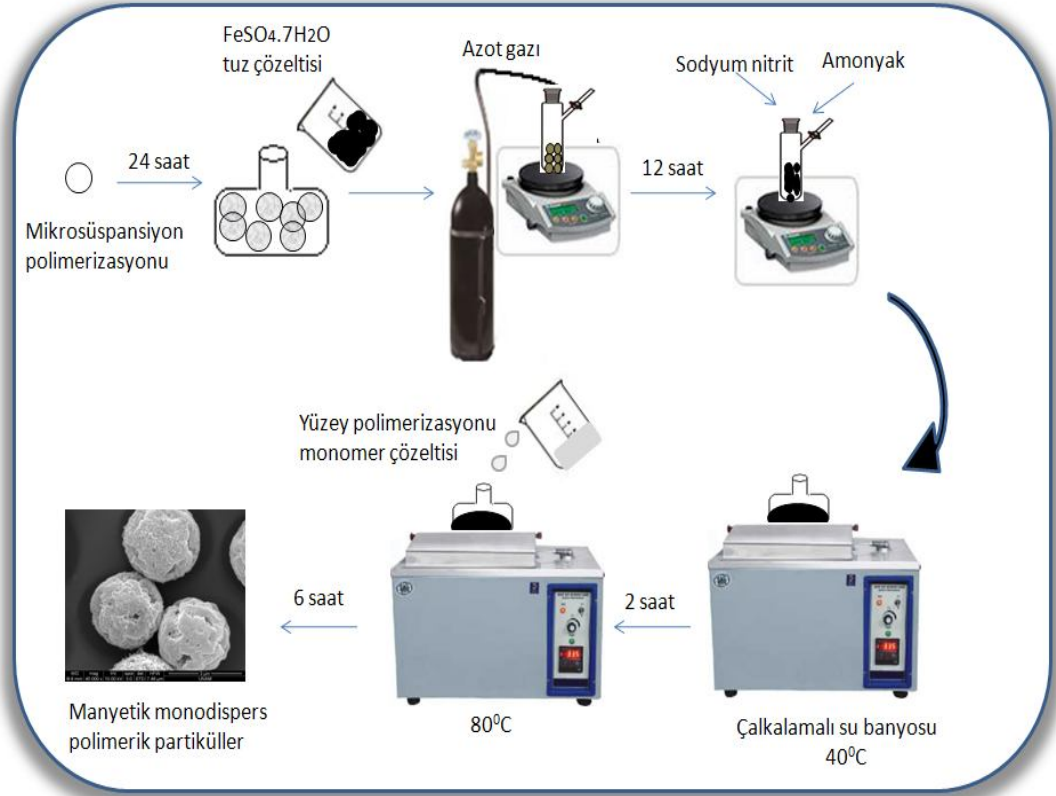
3.1.3.2 Mikrosüspansiyon polimerizasyonu sonrası manyetikleştirme

3.1.3.2.1 Materyal

Mikrosüspansiyon polimerizasyonu sonrası yapılan manyetikleştirme metodunda, manyetik demir tozlarını elde etmek için demir (II) sülfat heptahidrat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, %98, Alfa Aesar, Almanya) tuzu ve amonyak çözeltisi (NH_3 , %25, Merck, Almanya) kullanılmıştır. Bu ortama, yükseltgen madde olarak sodyum nitrit (NaNO_2 , Merck, Almanya) eklenmiştir. Emülsiyon yapıcı madde olarak ise sodyum dodesil sülfat (SDS, Sigma, ABD/Almanya) kullanılmıştır. Yüzey polimerizasyonu işleminde, monomer olarak gliserol dimetakrilat (GDMA, %85, Sigma Aldrich, Almanya), metakrilik asit (MAA, Merck, Almanya) ve 2-dimetil amino etil metakrilat (DMAEM, %98, Aldrich, ABD), başlatıcı olarak ise potasyum persülfat (KPS, Aldrich, ABD) kullanılmıştır.

3.1.3.2.2 Yöntem

Mikrosüspansiyon polimerizasyonu sonunda elde edilen monodispers ve makrogözenekli formdaki poli(GDMA-co-GDGA) partikülleri bir seri yıkama işleminden geçtikten sonra bu partiküllerden 1 g alınarak 20 mL distile su içerisinde dağıtılmıştır. 6mL/L derişimindeki HCl çözeltisiyle pH'ı 3'e ayarlanan bu ortama, 5 mL distile su içerisinde çözünmüş 0.42 g FeSO₄.7H₂O eklenmiştir. Schlenk tüpüne alınan ortamdan 15 dakika süreyle azot gazı geçirilerek, 12 saat dönmek üzere, oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıya yerleştirilmiştir. Süre sonunda ortama önce 0.05 g sodyum nitrit (NaNO₂), sonra da 5 mL amonyak eklenmiştir. 40⁰C'a ayarlı çalkalamalı su banyosunda 2 saat süreyle 100cpm karıştırma hızında karıştırılmıştır. 2 saatin sonunda alınan süspansiyon ortamı sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisiyle yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Bir kaç kez tekrarlanan santrifujleme-dekantasyon işleminden sonra çöktürülen manyetik partiküller 80 mL SDS çözeltisinin içerisine dağıtılmıştır. Bu basamaktan sonra pH'ın ayarlanması üretilen manyetik partikül çeşidine göre değişiklik göstermektedir. Örneğin kodu MYA olan partikül sentezlenirken, bu basamakta pH değiştirilmezken, kodu MYB olan partikül sentezinde, bu basamakta hidroklorik asit çözeltisi kullanılarak pH 3'e ayarlanmıştır (NeoMet, pH-240L, Kore). Bu basamaktan sonra ortama, yüzeyde ince bir polimerik film tabakası oluşturmak amacıyla SDS çözeltisi içerisinde dağıtılmış olan monomer karışımı ve ardından suda çözülmüş halde olan KPS çözeltisi eklenmiştir. Çalkalamalı su banyosuna yerleştirilen bu ortam, 6 saat boyunca, 80⁰C'de, 100 cpm hızında karıştırılmıştır. Süre sonunda alınan süspansiyon ortamı, 10 mL'lik santrifuj tüplerine alınarak çöktürülmüş ve SDS çözeltisi ile 6 kez yıkanmıştır (Şekil 3.4.).

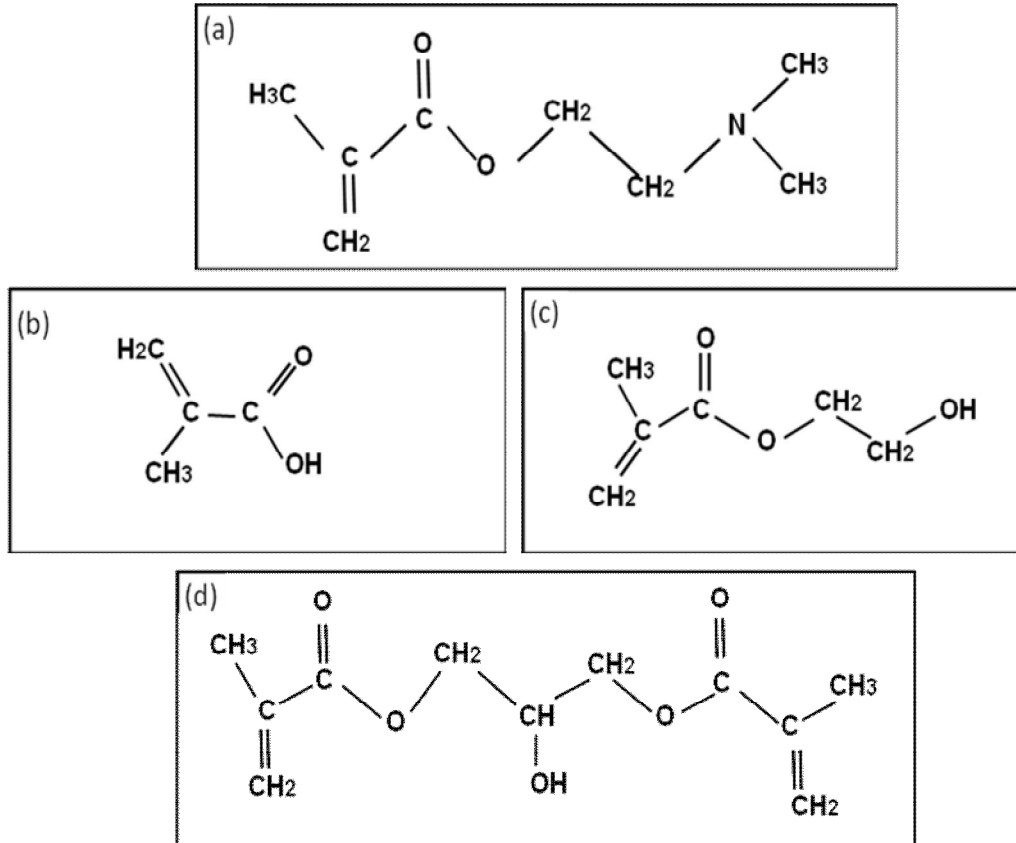


Şekil 3.4. Mikrosüspansiyon Polimerizasyonu sonrasında manyetikleştirme yönteminin şematik gösterimi

Yüzeysel polimerizasyonu ile polimerik mikrokürelerin etrafında film oluşumu amacıyla kullanılacak akrilik komonomer türü değiştirilerek partikül yüzeyinde nötral (hidroksil), katyonik (dimetilamino) veya anyonik (karboksil) fonksiyonel grupların oluşumu sağlanmıştır. Bu amaçla yüzey kaplanması sırasında 2-hidroksietil metakrilat (HEMA), 2-dimetilamino etil metakrilat (DMAEM) ve metakrilik asit (MAA) monomerleri kullanılmıştır. Bu monomerler ile hidrofilik özelliğe sahip çapraz bağlayıcının (gliserol dimetakrilat, GDMA) yüzey polimerizasyonu sayesinde, yüzeyinde istenilen fonksiyonel grubu içeren manyetik partiküller elde edilmiştir. Polimerik film kaplaması için uygulanan çalışma koşulları Çizelge 3.4.'te, film sentezinde kullanılan monomerlerin kimyasal yapıları ise Şekil 3.5.'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. Mikrosüspansiyon polimerizasyonu sonrası manyetikleştirme yöntemi ile sentezlenen manyetik polimerik partiküller için uygulanan yüzey polimerizasyon koşulları.

| Kod | Poli(GDMA-co-GDGA) partikülleri (g) | SDS çözelti ortamı (mL) | Yüzey polimerizasyonu | | | |
|-----|-------------------------------------|-------------------------|-----------------------|------------------|--------------------|----|
| | | | Monomer türü | | | pH |
| | | | GDMA / g partikül | MAA / g partikül | DMAEM / g partikül | |
| MYA | 1 | 80 | 1.2 | - | - | 9 |
| MYC | 1 | 80 | 1.2 | - | - | 3 |
| MYD | 1 | 80 | 0.8 | 0.4 | - | 9 |
| MYE | 1 | 80 | 0.8 | - | 0.4 | 9 |



Şekil 3.5. Manyetik polimerik partiküllerin yüzey kaplamasında kullanılan monomer çeşitleri. (a) 2-(Dimetilamino) etil metakrilat (b) Metakrilik asit (c) 2-hidroksietil metakrilat (d) Gliserol dimetakrilat

3.2 Manyetik Monodispers Polimerik Partiküllerin Karakterizasyonu

3.2.1 Morfolojik özelliklerinin belirlenmesi

3.2.1.1 Elektron mikroskopu

Elde edilen monodispers ve makrogözenekli partiküllerin ortalama boyu, boy dağılımı ve yüzey morfolojisinin belirlenmesi amacıyla taramalı elektron mikroskopu (Scanning Electron Microscope, SEM, Jeol JEM 1200EX, Tokyo, Japonya) kullanılmıştır. Su içerisinde dağıtılan manyetik partiküllerin sulu dispersiyonundan alınarak, bakır disk üzerine damlatılmış ve oda sıcaklığında içerisindeki su buharlaştırılmıştır. Görüntüleme yapılmadan önce kurutulan örnekler, vakum altında ince bir tabaka halinde altın ile kaplanmıştır.

3.2.1.2 Yüzey alanı ve gözeneklilik ölçüm cihazı

Partiküllerin toplam yüzey alanını ölçmek amacıyla Brunauer- Emmet-Teller (BET) cihazı (Quantachrome, Nova 2200E, İngiltere) kullanılmıştır. Bu metot genel olarak gözenekli malzemelerdeki adsorpsiyon özelliği kullanılarak yüzey alanının bulunmasına dayanmaktadır. Partiküller öncelikle 90⁰C'de etüvde 12 saat süre boyunca kurutulmaktadır. Süre sonunda alınan partiküller cihaz hücresine yerleştirildikten sonra 90⁰C'de 3 saat vakumlanmaktadır. Böylece kalan nem de tamamen uzaklaştırılmaktadır. Her bir analiz için yaklaşık 0.1 g partikül gerekmektedir. Ölçümler sıvı azot içerisinde yerleştirilen örnek hücrelerinde gerçekleşmiştir. Gerçekleşen işlem temel olarak, partiküller üzerinden azot gazının geçirilmesi, gazın partiküller üzerine adsorplanması ve azot gaz basıncı kullanılarak adsorplanan miktarın hesaplanmasından oluşmaktadır.

3.2.2 Kimyasal özelliklerin belirlenmesi

3.2.2.1 FTIR spektroskopisi

Çeşitli fonksiyonel gruplara (-NH₂, -COOH, -OH) sahip manyetik partiküllerin kimyasal yapılarını belirlemek amacıyla FTIR (FTIR-8101, Shimadzu, Japonya) analizi yapılmıştır.

3.2.2.2 Elementel analiz

Elementel analiz cihazı (LECO, CHNS-932) ile, etüvde kurutulmuş katı toz haline getirilen manyetik partiküllerden yaklaşık 2 mg ağırlığında örnek kullanılarak karbon, hidrojen, azot ve kükürt elementleri eş zamanlı analiz edilmiştir.

3.2.2.3 Potansiyometrik titrasyon

Potansiyometrik titrasyon deneyi öncelikle karboksil grubu tayini için MYD kodlu manyetik partiküle uygulanmıştır. Bu deneyin ilk basamağında 0.2 g manyetik partikül çöktürülerek, 20 mL 0.1 N NaOH çözelti içerisine alınmıştır. Yarım saat boyunca manyetik karıştırıcıda dönmeye bırakılan çözelti, süre sonunda 10 mL'lik santrifüj tüplerine alınarak 5000 rpm hızında 5 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonucunda oluşan süpernatanttan 10 mL alınarak bir behere aktarılmıştır. Manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilen ve süpernatantı içeren behere, pH metrenin elektrodu daldırılmıştır. Bu çözelti 0.1 N HCL çözeltisiyle titre edilmiştir. Her defasında beherdeki çözeltiye, 0.1 N HCl çözeltisinden 0.5 mL eklenmiştir ve pH metrede okunan değer kaydedilmiştir. Bu işlem pH sabitlenip, ortam dengeye gelinceye kadar devam etmiştir.

İkinci basamakta ise 10 mL 0.1 N NaOH çözeltisini içeren beher manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirilerek 0.1 N HCl ile titre edilmiştir. Her iki basamak sonunda elde edilen veriler, eklenen titrant hacmine karşı pH değerleri çizilerek grafiğe geçirilmiştir. İki basamakta eklenen titrant hacmi farkından yola çıkarak partikülün içerdiği karboksil grubu miktarı hesaplanmıştır.

3.2.3 Manyetik özelliklerinin belirlenmesi

3.2.3.1 VSM analizleri

Hazırlanan manyetik partikül örneklerinin manyetik özellikleri titreşimli örnek manyetometresi (VSM-PPMS Quantum Design) ile incelenmiştir. Bu deneylerde, etüvde kurutulmuş olan örneklerin -2.0 ve +2.0 Tesla aralığında uygulanan bir manyetik alandaki mıknatıslanma değerleri, 300K sıcaklığında ölçülmüştür. Partiküllerin bu manyetik alan aralığındaki manyetik özellikleri, birim kütle başına manyetik moment (emu/g) şeklinde gösterilmiştir.

3.2.3.2 UV spektrofotometresi ile optik izleme

Sentezlenen manyetik polimerik partiküllerin manyetik özelliklerinin incelenmesine yardımcı olan bir diğer yöntem ise optik izleme yöntemi olmuştur. Bu yöntemde bir mıknatıs üzerine yerleştirilen manyetik partiküllerin sulu süspansiyonu içeren cam şişeden, belirli zaman aralıklarında (30sn, 1 dk) örnekler alınarak absorbansları okunmuştur. Bu işlem için, 280 nm dalga boyuna ayarlanmış UV spektrofotometresi (Shimadzu, UV-1601, Japonya) kullanılmıştır. Her sürenin sonunda alınan örnek, kuvvet olarak adlandırılan quartz tüpe alınarak absorbans değeri okunmuştur. Çalışma sonunda okunan absorbans değerleri başlangıçtaki absorbans değerine bölünerek (A/A_0) zamana karşı grafiğe geçirilmiştir.

3.3 Protein adsorpsiyonu

Sığır serum albumin (BSA) proteinin adsorplanması deneyi, seçilen üç çeşit manyetik partikül türü üzerinde yapılmıştır.

3.3.1 Materyal

Protein adsorpsiyonunda tampon çözeltiler hazırlamak için sodyum asetat trihidrat ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Riedel de Haén, Almanya), sodyum dihidrojen fosfat dihidrat

($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Riedel de Haén, Almanya), 4-(2-hidroksietil)-1-piperazin etan sülfonik asit (HEPES, Fluka, Biochemika, ABD), disodyum tetraborat dekahidrat ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) kullanılmıştır. Tampon çözeltilerinin pH'ı, hidroklorik asit (%37, Merck, Almanya) ve sodyum hidroksit (NaOH, Riedel de Haén, Almanya) çözeltileri ile ayarlanmıştır. Adsorpsiyon deneyinde protein olarak sığır serum albümin (BSA, Sigma Aldrich, Kanada) kullanılmıştır.

3.3.2 Yöntem

3.3.2.1 pH etkisinin incelenmesi

Manyetik polimerik partiküllerin protein adsorpsiyonu prosesine pH etkisi, pH3 ile pH10 aralığında çalışılarak incelenmiştir. Deneyler için 4 farklı tampon çözeltisi hazırlanmıştır. İlk tampon çeşidi olan 0.05 M sodyum asetat tamponunu hazırlamak için 1.7 g sodyum asetat trihidrat ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), 250 mL distile su içerisinde çözülmüştür. Hazırlanan asetik asit çözeltisi ile pH'ı 3'e ayarlanmıştır. Aynı prosedür pH'ı 4 ve 5 olacak şekilde tekrarlanmıştır. Böylece pH değeri 3,4 ve 5 olan üç asetat tamponu elde edilmiştir. İkinci tampon çeşidi olan 0.05 M fosfat tamponunu elde edebilmek için 1.95 g sodyum dihidrojen fosfat dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 250 mL distile su içerisinde dağıtılmıştır. 5 M NaOH çözeltisi hazırlanarak tamponun pH'ı 6'ya ayarlanmıştır. Ph7 değeri için aynı işlemler tekrarlanarak pH7 fosfat tamponu elde edilmiştir. Üçüncü tampon çeşidi olan HEPES tamponu, 2.98 g HEPES'in 250 mL distile suda çözünmesiyle hazırlanmıştır. HCl asit ve NaOH çözeltileri kullanılarak tamponun pH'ı 8'e ayarlanmıştır. Dördüncü tampon çeşidi olan 0.05 M borat tamponunu hazırlamak için 4.76 g disodyum tetraborat dekahidrat 250 mL distile su içerisinde çözülmüştür. Hazırlanan HCl asit ve NaOH çözeltileri kullanılarak tamponun pH'ı ayarlanmış, pH değeri 9 ve 10 olan borat tamponları elde edilmiştir.

10 mL'lik 8 ayrı santrifüj tüpünün herbirine 0.05 g manyetik partikül koyulmuştur. İçerisine manyetik partiküller aktarılan her tüp, pH'ı ve içeriği birbirinden ayrı olan, farklı tampon çözeltileri ile yıkanmıştır. Santrifüj sonrası oluşan süpernatantın 280 nm'de UV spektrofotometrede ölçülen absorbans değeri 0.05'in altına düşüne dek

yıkama işlemine devam edilmiştir. 8 farklı 20 mL'lik cam adsorpsiyon şişesinin herbirine 0.12 g BSA tartılıp koyularak, her şişeye 10 mL, farklı bir tampon çözeltisi eklenmiştir. BSA'ların tampon çözeltileri içinde çözünmesini sağlamak amacıyla, şişeler manyetik karıştırıcıya yerleştirilerek yaklaşık 15 dakika burada bekletilmiştir. Süre sonunda pH değerleri tekrar kontrol edilen her bir şişedeki çözülden 5'er mL alınarak UV spektrofotometresinde 280 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür (A_{0-pH3} , A_{0-pH4} , A_{0-pH5} , A_{0-pH6} , A_{0-pH7} , A_{0-pH8} , A_{0-pH9} , A_{0-pH10}). Şişelerde kalan 5'er mL BSA çözeltisi, yıkanarak üzerlerindeki süpernatantları atılan manyetik partiküller ile etkileştirilmiştir. Bu işlem sonunda da tekrar pH kontrolü yapılarak, pH değerlerinde bir farklılık olan örneklerin pH'ı, içerdiği tampon çözeltisine göre asetik asit, HCl veya NaOH kullanılarak ayarlanmıştır. Her birinde manyetik partikül ve farklı pH'larda tampon ortamları bulunan bu karışımlar 2 saat süreyle manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Süre sonunda alınan karışım santrifüjlenerek, süpernatantlarının absorbans değerleri 280 nm dalga boyunda, UV spektrofotometresinde okunmuştur (A_{f-pH3} , A_{f-pH4} , A_{f-pH5} , A_{f-pH6} , A_{f-pH7} , A_{f-pH8} , A_{f-pH9} , A_{f-pH10}). Okunan değerlerin 2'nin üzerinde çıkması durumunda örnekler seyreltilerek tekrar okuma yapılmıştır.

Aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanan Q (mg BSA adsorplanan / g partikül) değerlerine karşı pH değerleri grafiğe geçirilmiştir. Eş.3.1.'deki C, BSA konsantrasyonunu (12 mg / mL); V, toplam hacmi (5 mL); m ise manyetik partikül miktarını (0.05 g) göstermektedir.

$$Q = ((A_0 - A_f) / A_0) * (C * V / m) \quad (3.1)$$

3.3.2.2 Başlangıç protein derişim etkisinin incelenmesi

8 adet 10 mL'lik santrifüj tüpüne 0.05'er g manyetik partikül koyularak, partiküller santrifüjlenmiştir. pH taraması deneyinde pH 5 değerinde maksimum absorbans değeri gözleendiğinden diğer faktörlerin etkileri incelenirken pH 5 sodyum asetat tamponu kullanılmıştır. 1.7 g sodyum asetat trihidrat, 250 mL distile su içerisinde çözülerek 0.05 M'lık tampon hazırlanmıştır. Çöktürülen örneklerin üzerine pH 5 sodyum asetat tamponu eklenerek, süpernatantın 280 nm dalga boyunda, UV

spektrofotometresindeki değeri 0.05'in altına düşüne dek yıkama işlemi yapılmıştır. 20 mL'lik 8 adet cam şişe içerisine sırasıyla 2.5 mg, 5 mg, 10 mg, 20 mg, 40 mg, 80 mg, 120 mg, 160 mg BSA tartılarak eklenmiştir. Her bir şişedeki BSA'nın üzerine 10'ar mL ortam çözeltisi (pH 5 sodyum asetat tamponu) eklenerek çözünmesi için manyetik karıştırıcıya yerleştirilmiştir. Böylece derişimleri 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 16 mg BSA/ mL ortam olan 8 farklı çözelti hazırlanmıştır. Ph metre kullanılarak pH'larında bir değışiklik olup olmadığı kontrol edilmiştir. Her şişeden 5'er mL çekilerek UV spektrofotometresinde absorbans değeri ölçülmüştür ($A_0-C:0.25$, $A_0-C:0.5$, $A_0-C:1$, $A_0-C:2$, $A_0-C:4$, $A_0-C:8$, $A_0-C:12$, $A_0-C:16$). Şişelerde kalan 5'er mL BSA çözeltileri ile, ortam çözeltileriyle yıkanarak çöktürülen 0.05'er g'lık manyetik partiküller, etkileştirilmiştir. Şişelere alınan her karışımın pH değeri pH metre kullanılarak kontrol edilmiştir. pH değerinde değışiklik gözlenen karışımların pH değeri asetik asit veya NaOH çözeltileri kullanılarak ayarlanmıştır. Şişeler, 2 saat boyunca karışmaları ve BSA adsorpsiyonunun gerçekleşmesi için manyetik karıştırıcıya yerleştirilmiştir. Süre sonunda alınan her şişedeki manyetik partiküllerin süspansiyonu 8 farklı santrifüj tüpüne alınarak santrifüjlenmiştir. Süpernatantlar quartz tüplere koyularak 280 nm dalga boyunda, UV spektrofotometresinde okunan absorbans değeri kaydedilmiştir ($A_f-C:0.25$, $A_f-C:0.5$, $A_f-C:1$, $A_f-C:2$, $A_f-C:4$, $A_f-C:8$, $A_f-C:12$, $A_f-C:16$). Okunan değeri 2'nin üzerinde çıkması durumunda seyreltme yapılmıştır. Konsantrasyon değeri karşı, hesaplanan Q değeri grafiğe geçirilmiştir. Bu partiküller daha sonra desorpsiyon deneyi için kullanılmıştır.

3.3.2.3 Sorbent derişim etkisinin incelenmesi

Sorbent derişim etkisinin incelenmesi için, pH taramasında maksimum adsorpsiyonun gözleendiği pH 5 sodyum asetat tamponu kullanılmıştır. 0.0125, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1 ve 0.125 g alınan manyetik partiküller 10 mL'lik santrifüj tüplerine koyularak çöktürülmüştür. Süpernatantlar atıldıktan sonra her tüp, hazırlanan 0.05 M, pH 5 sodyum asetat tamponu ile doldurularak yıkama işlemi yapılmıştır. Tampon, 1.7 g sodyum asetat trihidratın 250 mL distile su içerisinde çözülmesiyle elde edilmiştir. Santrifüjleme-dekantasyon işlemi, süpernatantın UV spektrofotometresinde, 280 nm dalga boyundaki absorbans değeri 0.05'in altına

düşene dek tekrarlanmıştır. 6 tane 20 mL'lik cam şişenin her birine 120 mg BSA tartılarak koyulmuştur. Üzerlerine 10'ar mL 0.05 M pH5 sodyum asetat tamponu eklenen çözeltiler 15 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. pH metrenin elektrodu şişeler içerisine daldırılarak her karışımın pH değeri kontrol edilmiştir. pH 5 değerinden fazla sapma gösteren BSA çözeltilerinin pH'ı, asetik asit çözeltisi ve NaOH çözeltisi ile pH 5'e ayarlanmıştır. Her çözeltilerden 5'er mL alınarak UV spektrofotometresinde absorbans değerleri ölçülmüştür ($A_0-S:0.0125$, $A_0-S:0.025$, $A_0-S:0.05$, $A_0-S:0.075$, $A_0-S:0.1$, $A_0-S:0.125$). Şişelerde kalan 5 mL ile önceden tampon çözeltisiyle yıkanarak çöktürülen manyetik partiküller etkileştirilmiştir. Etkileştirme sonrası pH metre kullanarak pH değerleri kontrol edilmiştir. pH değerinde değişiklik gözlenen örneklerin pH'ı asetik asit çözeltisi ve NaOH çözeltisi kullanılarak 5'e ayarlanmıştır. Manyetik partiküllerin BSA adsorpsiyonunun gerçekleşmesi için, şişeler manyetik karıştırıcıya yerleştirilerek 2 saat süreyle karışmaları sağlanmıştır. Süre sonunda alınan manyetik partikül dispersiyonları, 8 dakika süreyle 5000 rpm hızda santrifüjlenmiştir. Süpernatantlar alınarak quartz tüplere aktarılmış ve UV spektrofotometresinde, 280 nm dalga boyunda ölçümleri yapılmıştır ($A_f S:0.0125$, $A_f S:0.025$, $A_f S:0.05$, $A_f S:0.075$, $A_f S:0.1$, $A_f S:0.125$). Okunan değerlerin 2'nin üzerinde çıkması durumunda seyreltme yapılarak, değerler tekrar okunmuştur. Q (mg BSA adsorplanan/ g partikül) hesaplanarak, Q değerlerine karşılık gelen manyetik partikül miktar değerleri (g) grafiğe geçirilmiştir.

3.3.2.4 Adsorpsiyon kinetiği

Adsorpsiyon kinetiği çalışmasında, manyetik partiküllerde BSA adsorpsiyonunun, zamanla değişimi gözlenmiştir. 60 mL'lik cam şişe içerisindeki 45 mL pH5 asetat tamponu içerisine, 0,54 g BSA tartılıp eklenmiştir. Böylece derişimi 0,012 mg BSA/mL tampon olan çözelti elde edilmiştir. pH'ı kontrol edilen bu ortamın pH değeri, asetik asit ve sodyum hidroksit çözeltileri kullanılarak 5'e ayarlanmıştır. pH'ı ayarlanan ortamdan 5 mL alınarak UV spektrofotometresinde absorbans değeri ölçülmüştür (A_0). Kalan 40 mL'lik ortam üzerine 0,4 g manyetik partikül eklenerek tekrar pH kontrolü yapılmıştır. 3 saat boyunca karışması amacıyla manyetik karıştırıcıya yerleştirilen süspansiyon ortamının yüzeyinden 5., 10., 15.,

20., 30., 45., 60., 90., 120. ve 180. dakika zaman aralıklarında örnekler alınarak santrifuj cihazı ile çöktürülmüştür. Çöktürülen partiküllerin süpernatantlarının absorbens değerleri UV spektrofotometresinde ölçülmüştür (A_f).

3.3.2.5 Desorpsiyon

pH taraması deneyinde pH 9'daki adsorpsiyonun 0 olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle desorpsiyon deneyi pH 9 borat tamponu ile yapılmıştır. 4.76 g disodyum tetraborat dekahidrat, 250 mL distile su içerisinde çözülerek 0.05 M borat tamponu hazırlanmıştır. Hidroklorik asit ve NaOH çözeltileri ile de pH değeri 9'a ayarlanmıştır. Başlangıç BSA derişimi etkisi deneyinden kalan, belli miktar BSA'yı adsorplamış manyetik partiküllerin sulu süspansiyonları (A_f -C:0.25, A_f -C:0.5, A_f -C:1, A_f -C:2, A_f -C:4, A_f -C:8, A_f -C:12, A_f -C:16), 5000 rpm'de 8 dakika santrifüjlenek çöktürülmüştür. Oluşan süpernatant atılarak, çöken manyetik partiküllerin üzerine desorpsiyon ortamı olan pH 9 borat tamponundan 5'er mL eklenmiştir. Bir baget yardımıyla partiküller tampon içerisinde dağıtılarak her farklı BSA konsantrasyonu içeren süspansiyon ayrı şişeye alınmıştır. Manyetik karıştırıcıya yerleştirilen şişeler 1 saat sonra karıştırıcıdan alınmıştır. 10mL'lik santrifüj tüplerine alınan örnekler 5000 rpm'de 8 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatantların absorbens değerleri 280 nm dalga boyunda, UV spektrofotometresinde okunmuştur (A_{des} -C:0.25, A_{des} -C:0.5, A_{des} -C:1, A_{des} -C:2, A_{des} -C:4, A_{des} -C:8, A_{des} -C:12, A_{des} -C:16).

Protein derişim etkisi deneyinde bulunan A_0 değerleri (A_0 -C:0.25, A_0 -C:0.5, A_0 -C:1, A_0 -C:2, A_0 -C:4, A_0 -C:8, A_0 -C:12, A_0 -C:16) ile bu değerlere karşılık gelen BSA konsantrasyonları grafiğe geçirilmiştir. Grafikte A_{des} değerlerine karşılık gelen BSA konsantrasyon değerleri bulunmuştur (C). 5'er mL tampon ortamı kullanıldığı için Eş.3.2.'de verilen formül kullanılarak kaç mg BSA'nın manyetik partiküllerden desorplandığı hesaplanmıştır.

$$C = \frac{\text{Desorplanan BSA (mg)}}{\text{Kullanılan tampon ortamı miktarı (ml)}} \quad (3.2)$$

Protein derişim etkisi çalışmasında bulunan Q değerleri (mg BSA adsorplanan/ g manyetik partikül) hesaplamada kullanılmıştır. Her BSA konsantrasyonuna karşılık gelen Q değeri, 0.05 g partikül kullanıldığı için 0.05 değeriyle çarpılarak adsorplanan BSA mg cinsinden bulunmuştur.

Desorpsiyon yzdzeleri Eş.3.3.'te verilen formül kullanılarak, desorplanan BSA miktarının adsorplanan BSA miktarına bölünüp 100 ile çarpılmasıyla hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Desorpsiyon} = \frac{\text{Desorplanan BSA miktarı (mg)}}{\text{Adsorplanan BSA miktarı (mg)}} * 100 \quad (3.3)$$

Desorpsiyon ortamı olarak 14.625 g NaCl tuzu içeren 0.05 M, pH 8 HEPES tamponu kullanılarak aynı işlemler tekrarlanmıştır. Na⁺ ve Cl⁻ iyonları protein ve adsorban arasındaki hidrofobik etkileşimi bozabildiğinden, NaCl tuzu, protein desorpsiyonu çalışmalarında desorpsiyon ajanı olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca NaCl tuzu iyonik gücü arttırarak elektrostatik etkileşimi azaltmakta böylece protein desorpsiyonunu da kolaylaştırmaktadır.

3.4 Hücre Etkileşim alışmaları

Mikrosüspansiyon polimerizasyonu sonrası başlatılan manyetizasyon yöntemi ile sentezlenen partiküllerin, polimerizasyon sırasında sentezlenenlere göre daha iyi manyetik özellik kazandığı görölmüştür. Partiküllere ait SEM görüntüleri ile de bu partiküllerde monodispers, makrogözenekli yapının elde edilebildiği görölmüştür. Bu nedenle, SEM fotoğrafları ve manyetik doygunluk değerleri dikkate alınarak seçilen MYA, MYC, MYD ve MYE kodlu manyetik partiküller ile hücre etkileşim çalışmaları yapılmıştır.

Çalışmalarda kullanılmak üzere öncelikle, sentezlenen manyetik partiküllerin sayımları yapılmıştır. Bu işlem için optik mikroskop (Olympus, IX70 inverted mikroskop, Japonya) ve Thoma lamı (C.A. Hausser& Son, Phila., U.S.A.) kullanılmıştır. Thoma lamının üzerinde alanı 1mm² olan sayma alanı vardır. Sayım

için Thoma lamının üzerine bir lamel kapatılmış ve kapatılan lam ile lamel arasındaki 1/10 mm yüksekliğindeki hacime giren partiküller mikroskopta sayılarak, hacim başına düşen partiküllerin hesaplaması yapılmıştır.

Hücre etkileşimleri için normal hücre olarak L929 fare fibroblast hücreleri, aktif fagositik aktiviteyi gözlemek üzere alveolar makrofaj hücreleri ve model kanser hücresi olarak HeLa (insan servikal karsinoma hücre hattı) kullanılmıştır. Hücre kültüründe kullanılan koşullar Çizelge 3.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.5. Hücre kültür çalışmalarında kullanılan deney koşulları

| | |
|------------------------------------|---|
| Hücre türü | L929 fibroblast hücreleri, makrofaj hücreleri ve HeLa kanser hücreleri |
| Kültür vasatı (Besi ortamı) | %10 FBS (fetal sığır serumu), %0.8 penisilin-streptomisin içeren DMEM/F12 |
| Kültür kabı | 96 kuyucuklu polistren plakalar |
| Kültür Özelliği | Monolayer |
| Sıcaklık | 37°C |
| İnkübasyon ortamı | % 5'lik CO ₂ etüv |
| İnkübasyon Süresi | 24 saat |
| pH | 7.2-7.5 |

3.4.1 Materyal

Manyetik partiküller ile etkileştirilen fare fibroblast hücreleri (L929) ve HeLa hücre hattı Şap Enstitüsü Hücre Kültürü Bankasından temin edilmiştir.

Makrofajlarla manyetik partiküllerin etkileşim çalışmalarında sıçana antibiyotik olarak Deposilin 6.3.3 (İ.E Ulagay, İstanbul); anestezi amacıyla ise ketasol %10 (Richter-Pharma, Avusturya) ve Alfazyn %2 (Alfasan International, AB, Hollanda) verilmiştir. %8 Penisilin-streptomisin (İ.E Ulagay, İstanbul) ve fosfat tamponu (Biochrom AG, Berlin) ile makrofajlar sıçandan alınmıştır. Makrofajlar kültür kabına, DMEM/F12 (Dulbecco'nun modifiye Eagle medyumunu, Biochrom AG, Berlin), %8 penisilin-streptomisin (Biochrom AG, Almanya) ve %10 FBS (Fetal

sığır serumu, Sigma Aldrich, Almanya) çözültisi içinde eklenmiştir. Manyetik partiküllerin boyanmasında kullanılan Giemsa boyası Merck firmasından temin edilmiştir.

3.4.2 Yöntem

3.4.2.1 Fibroblastlar ile etkileşim

Sayımları yapılan her manyetik partikülden, elde edilmek istenen derişim değerine göre gerekli miktarlar alınıp 5µl fosfat tamponu içerisinde dağıtılmıştır. Böylece derişimleri 1600 partikül/µl tampon, 3200 partikül/µl tampon, 6400 partikül/µl tampon, 12800 partikül/µl tampon olan sulu süspansiyonlar elde edilmiştir. Hazırlanan partiküllerin sterilizasyonu 121°C ve 1 atm çalışma koşullarındaki otoklav (All-American Electronic Steam Sterilizer 25X) cihazı ile sağlanmıştır. Bu çalışmada yapılan işlem basamakları aşağıda özetlenmiştir:

- Besi ortamına alınan fibroblast hücreleri, herbir kuyucuğa 200 µl (2000 hücre) olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür kabına ekilmiştir.
- Kap, 24 saat boyunca, 37⁰C'de CO₂ etüvünde hücrelerin kuyucuklara yapışması için bekletilmiştir.
- Süre sonunda her bir kuyucuğa 5 µl manyetik partikül eklenmiştir. Bu işlem, dört farklı manyetik partikül türü (MYA, MYC, MYD ve MYE kodlu partiküller) ve her türün dört farklı derişiminden (1600 partikül/µl tampon, 3200 partikül/µl tampon, 6400 partikül/µl tampon, 12800 partikül/µl tampon) 5'er µl örnek alınarak yapılmıştır.
- Kültür kabı etüve konarak başlangıçta ve 12. saat, 24. saat, 48. saat ve 72. saatin sonunda kuyucuk üzerindeki besiyeri ortamdaki uzaklaştırılmış ve ortam üç kere taze besiyeri ile yıkanmıştır.
- Besiyerinin ortamdaki uzaklaştırılması ile 4000 büyütmede optik mikroskopta görüntüleri alınmıştır.

3.4.2.2 Makrofajlar ile etkileşim

Sıçan akciğerinden izole edilen makrofaj hücreleri ile etkileştirilecek manyetik partiküllerin sayısı için fibroblastlarla etkileştirilen sayı ve oranlar kullanılmıştır (bkz 3.4.2.1). Bu çalışmada gerçekleştirilen işlem basamakları sırasıyla aşağıda özetlenmiştir:

- Öncelikle, bakteri kontaminasyonunu engellemek amacıyla sıçana, alveolar sıvı toplanmadan bir saat öncesinde, antibiyotik olarak Deposilin 6.3.3 verilmiştir (1 g penisilin/ kg sıçan).
- Operasyondan önce sıçan, ketasol %10 ve Alfazyn %2 ile anesteziye alınmıştır.
- Trake üzerindeki cilt kesilerek açılmış, kaslar kesilmeden disekte edilmiş ve trake askıya alınmıştır. Trake irrite edilmeden 3 mm uzunluğunda kesi ile açılmış (11032 göz makası, CEATEC GmbG & Co.KG) ve 3 mm çap 12 mm uzunluğundaki silikon boru ile kanüle edilmiştir. Kanülasyon ipek iplik 3/0 (Doğsan, Trabzon) ile sabitlenmiştir.
- Kanül 5 mL hacimli enjektöre bağlanarak akciğer içerisine 10 mL %8 Penisilin-streptomisinli PBS (Fosfat tampon solüsyonu) verilmiş ve sıvı nazikçe tekrar geri toplanmıştır. Bu işlem beş kez tekrarlanmıştır.
- Alınan örnekler 2000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme sonrası oluşan süpernatant atılmıştır.
- Çöktürülen makrofajlar PBS ile karıştırılarak, 2000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Yıkama sonundaki süpernatant atılmıştır.
- Makrofajlar, 96 kuyucuklu kültür kabına, DMEM/F12, %10 FBS ve %8 penisilin-streptomisin çözeltisi içinde eklenmiştir.
- Kültür kabına koyulan makrofajların bulunduğu ortam 37°C'de 24 saat süre ile inkübe edilmiştir.
- 24 saatlik inkübasyonun sonunda her kuyucuğa, farklı yüzey kimyasına ve farklı derişime sahip manyetik partiküller eklenmiştir.

- Kültür kabı etüve konarak, 10., 20., 30., 60. ve 120. dakika sonlarında kuyucuk üzerindeki besiyeri nazikçe ortamdan uzaklaştırılmış ve her bir kuyucuğa ayrı ayrı 0.5 mL metanol eklenerek hücreler 4 dakika boyunca fiksasyon için bekletilmiştir.
- Süre sonlarında metanol ortamdan uzaklaştırılarak kuyucuklar kurutulmuş ve Giemsa boyası ile 40 dakika boyunca etkileştirilmiştir.
- 40 dakika sonunda kuyuların üzerine distile su eklenerek boya artıklarının uzaklaştırılması sağlanmıştır. Partiküller ve boyanan hücreler optik mikroskop kullanılarak sayılmıştır.

3.4.2.3 Kanser hücreleri ile etkileşim

Yapılan çalışmalarda, model kanser hücresi olarak kanser araştırmalarında çok sıklıkla kullanılan, ölümsüz kanser hücreleri olan HeLa (insan serviks epitel kanser hücresi) hücre hattı kullanılmıştır. Hücreler ile etkileştirilecek manyetik partikül konsantrasyonları (partikül/ μ l), fibroblastlarla etkileştirilen oranlar ile aynıdır (bkz 3.4.2.1). Bu deneyde yapılan işlemler aşağıda özetlenmiştir:

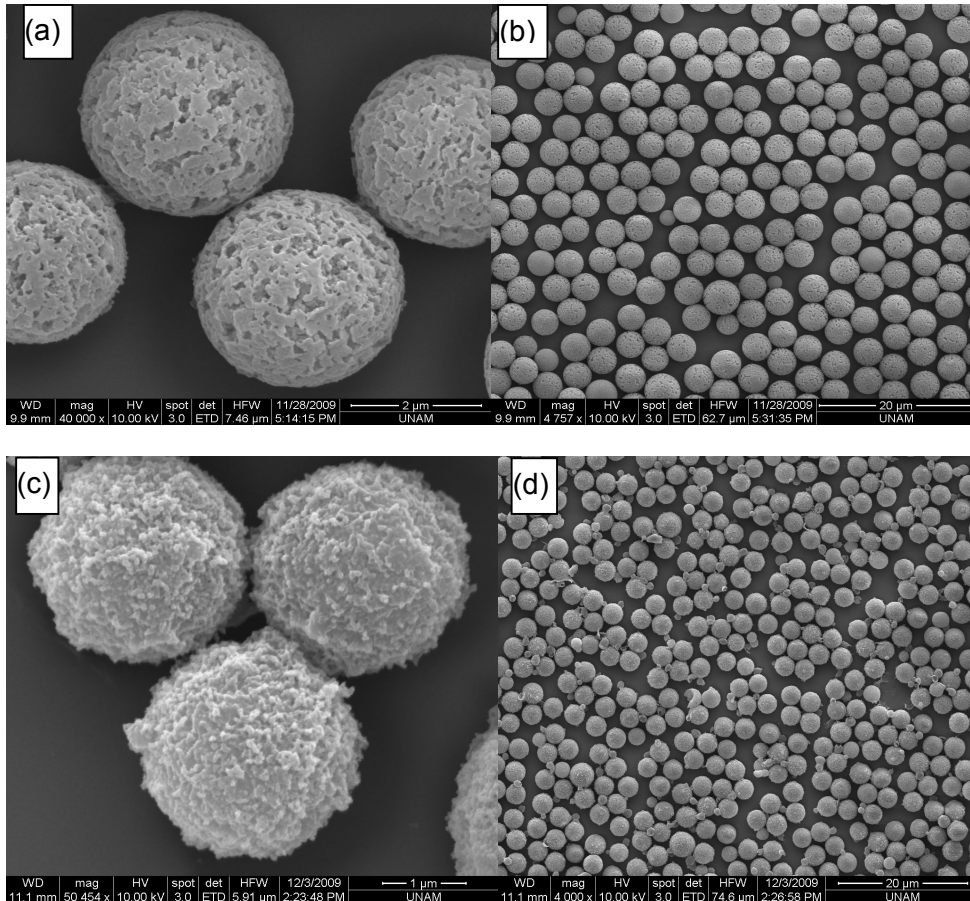
- Besi ortamı içerisindeki HeLa hücreleri, her bir kuyucuğa 200 μ l koyulacak şekilde 96 kuyucuklu kültür kabına eklenmiştir. 200 μ l besi ortamı (DMEM/F12, %10 FBS, %8 penisilin-streptomisin) içerisinde yaklaşık 2000 kanser hücresi bulunmaktadır.
- Kültür kabına yerleştirilen kanser hücreleri 37⁰C'de, CO₂ etüvünde, 24 saat boyunca inkübe edilmiştir.
- 24 saatlik inkübasyonun sonunda her bir kuyucuğa manyetik partikül örneklerinden 5 μ l eklenmiştir. 4 farklı partikül (MYA, MYC, MYD ve MYE kodlu partiküller) ve her partikülün 4 farklı derişimi için ekleme işlemi yapılmıştır.
- Kültür kabı etüve konarak, başlangıçta ve 12.saat, 24. saat, 48. Saat ve 72. saat sonunda hücrelerin üzerindeki besiyeri toplanarak fotoğrafları optik mikroskop (4000 büyütmede) ile çekilmiştir.

4 DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Mikrosüspansiyon Polimerizasyonu Sırasında Yapılan Manyetizasyon ile Sentezlenen Monodispers-Gözenekli Partiküllerin Karakterizasyonu

4.1.1 GDMA derişimi etkisi

İlk deney setinde manyetik partiküllerin hazırlanmasında kullanılan kaplama koşulları değiştirilmiştir. Bu sette GDMA derişimi etkisi çalışılmıştır. Monodispers, makrogözenekli ve manyetik formdaki polimerik mikrokürelerden MY1 ve MY2 kodlu olan partiküllerin SEM fotoğrafları Şekil 4.1.'de verilmektedir. Bu fotoğraflar yardımıyla hesaplanan ortalama partikül boyu ve değişim katsayısı değerleri Çizelge 4.1.'de verilmektedir.



Şekil 4.1.Farklı kaplama koşulları ile üretilen Manyetik polimerik partiküllerin SEM fotoğrafları. MY1 kodlu partikül, büyütme: (a) 40000X, (b) 4757X. MY2 kodlu partikül, büyütme: (c) 50454X, (d) 4000X.

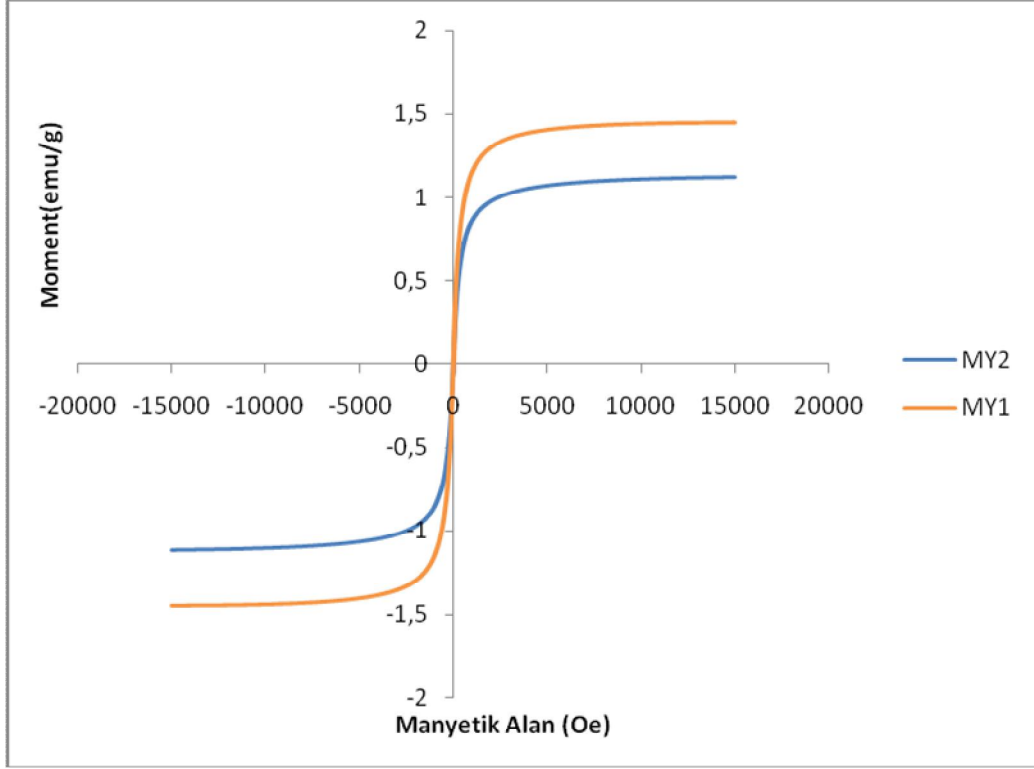
Çizelge 4.1. Farklı kaplama koşulları ile hazırlanan manyetik partiküllerin ortalama partikül boyu (Dp) ve değişim katsayısı (CV) değerleri.

| Kod | Demir çözeltisi (mL) | NH ₄ OH (%) [*] | Yüzey polimerizasyonu | Dp (µm) | CV (%) |
|-----|----------------------|-------------------------------------|-----------------------|---------|--------|
| | | | GDMA (%) [*] | | |
| MY1 | 10 | 1.38 | 0.46 | 3,73 | 3,33 |
| MY2 | 10 | 1.38 | 0.92 | 3,05 | 4,31 |

* % değerleri, verilerin poli (GDMA-co-GDGDA) sentezi sırasında kullanılan distile su miktarlarına oranlanmasıyla elde edilmiştir.

Çizelge 4.1'den görüldüğü gibi MY1 ve MY2 kodlu deneylerde değiştirilen kaplama koşulu GDMA derişimidir. MY1'de kullanılan GDMA derişimi % 0.46 iken MY2'de bu değer % 0.92'ye yükseltilmiştir. Diğer bütün kaplama koşulları aynıdır. Polimerik kaplama esnasında, seçilen monomerin fazla kullanılmasının, yüzeyin gözeneklerinin kaybolmasına ve pürüzlü bir yüzeyin oluşmasına neden olduğu gözlenmiştir.

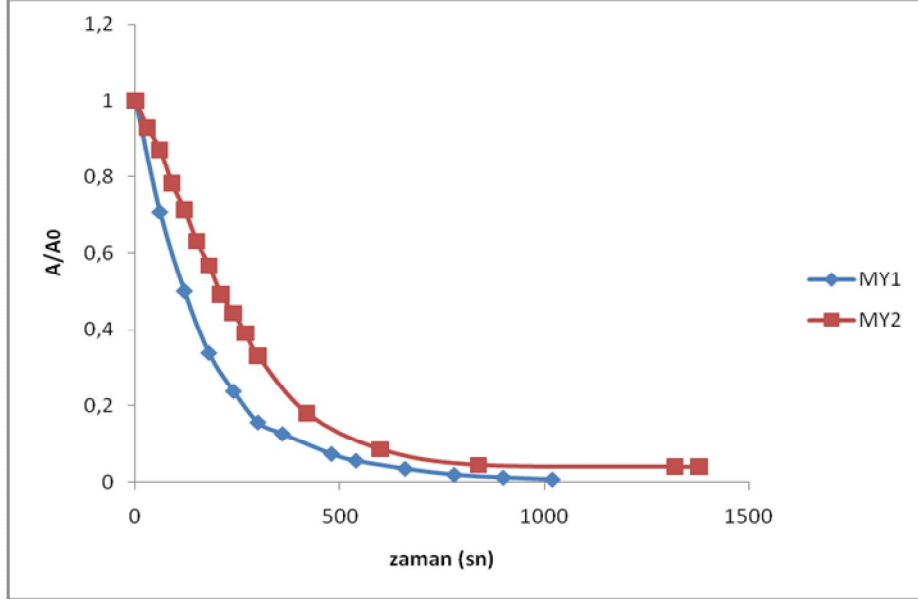
Mikrosüspanisyon polimerizasyonu tamamlanmadan başlatılan manyetizasyon prosedürü ile sentezlenen, GDMA film tabakasına sahip MY1 ve MY2 kodlu manyetik polimerik partiküllerin histeresis eğrileri Şekil 4.2.'de verilmiştir. MY2 kodlu partikülün yüzey polimerizasyonu sırasında kullanılan monomer miktarının MY1 partikülüne oranla daha fazla olması, bu partikül üzerinde daha kalın bir film tabakası oluşturduğundan, manyetik doygunluk değerini bir miktar azaltmıştır.



Şekil 4.2. Farklı kaplama koşulları ile hazırlanan MY1 ve MY2 kodlu manyetik partiküllerin VSM analizi.

Her manyetik partikül çeşidinin manyetik özelliklerinin incelenmesi amacıyla, histerisis eğrilerine yardımcı olarak UV spektrofotometresi ile optik izleme yöntemi kullanılmıştır. Yüzey polimerizasyonunda kullanılan monomer miktarı değiştirilerek elde edilen MY1 ve MY2 kodlu partiküllerin manyetik davranışları Şekil 4.3.'te incelenmiştir.

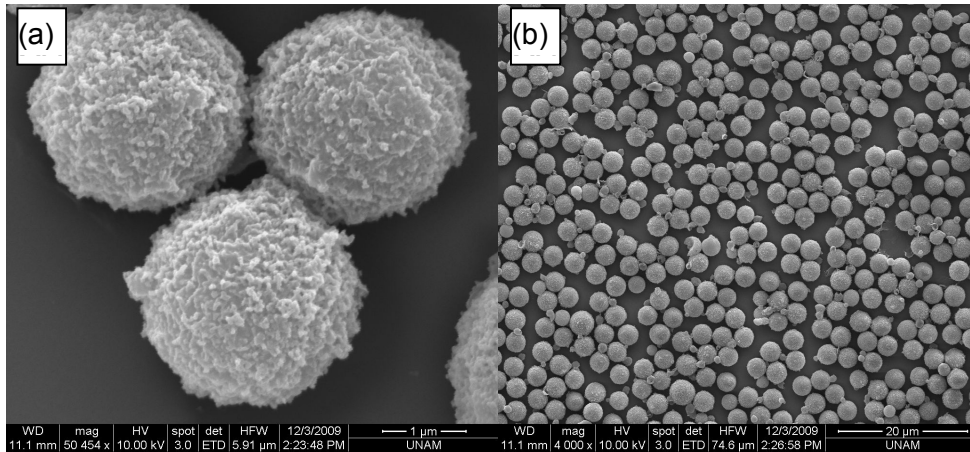
Şekil 4.3.'te, MY2 kodlu manyetik partiküle göre daha ince bir polimerik film tabakasıyla kaplanan MY1 kodlu manyetik partikülün, oluşturulan manyetik alanın yönüne doğru daha hızlı bir toplanma davranışı sergilediği görülmüştür. Optik izleme yöntemiyle elde edilen verilerin, histerisis eğrilerinden elde edilen sonuçlar ile uyduğu görülmüştür.



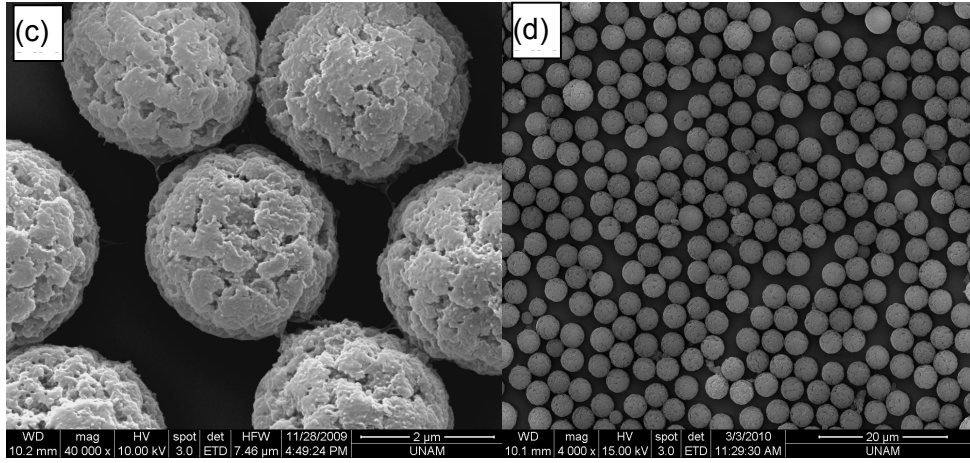
Şekil 4.3. Farklı kaplama koşulları ile hazırlanan MY1 ve MY2 kodlu manyetik partiküllerin manyetik davranışının UV spektrofotometresi ile izlenmesi.

4.1.2 Manyetik partikül yükleme etkisi

Bu sette sabit kaplama koşullarında manyetik partikül yüklemesinin etkisi incelenmiştir. Monodispers, makrogözenekli ve manyetik formdaki polimerik mikrokürelerden MY2 ve MY7 kodlu olan partiküllerin SEM fotoğrafları Şekil 4.4.'te verilmektedir. Bu fotoğraflar yardımıyla hesaplanan ortalama partikül boyu ve değişim katsayısı değerleri Çizelge 4.2.'de verilmektedir.



Şekil 4.4. devam ediyor.



Şekil 4.4. Farklı manyetik yükleme ile üretilen manyetik polimerik partiküllerin SEM fotoğrafları. MY2 kodlu partikül, büyütme: (a) 50454X, (b) 4000X. MY7 kodlu partikül, büyütme: (c) 40000X, (d) 4000X.

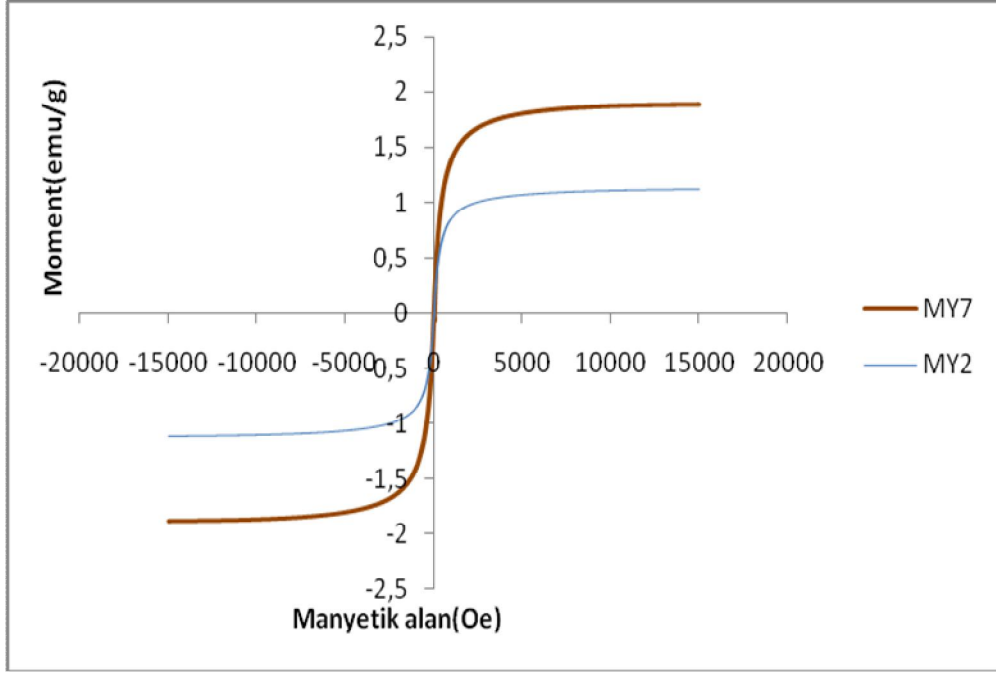
Çizelge 4.2. Farklı manyetik yükleme ile üretilen manyetik partiküllerin ortalama partikül boyu (D_p) ve değişim katsayısı (CV) değerleri.

| Kod | Demir çözeltisi (mL) | NH ₄ OH (%)* | Yüzey polimerizasyonu | D _p (µm) | CV (%) |
|-----|----------------------|-------------------------|-----------------------|---------------------|--------|
| | | | GDMA (%)* | | |
| MY2 | 10 | 1.38 | 0.92 | 3,05 | 4,31 |
| MY7 | 20 | 2.77 | 0.92 | 3,39 | 5.79 |

* Veriler, poli (GDMA-co-GDGA) partikülü sentezinde kullanılan distile su miktarlarına bölünerek hesaplanmıştır.

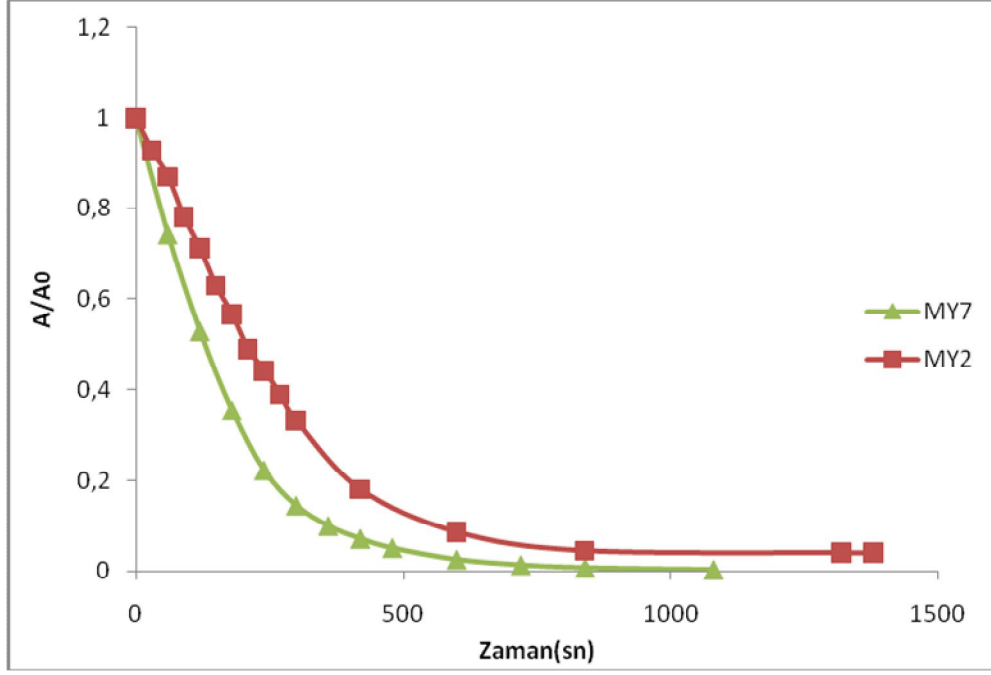
Çizelge 4.2.'den görüldüğü gibi, MY2 ve MY7 kodlu deneylerde kaplama için kullanılan GDMA miktarı sabit tutularak, NH₄OH derişimi ve buna bağlı olarak oluşturulan manyetik partikül derişimi 2 katına çıkarılmıştır. Bu değişim ile yüzeyde ortalama gözenek boyutunun arttığı ve süngerimsi formdaki gözeneklerden, krater tipi gözeneklere geçildiği gözlenmiştir.

Şekil 4.5.'te verilen MY7 ve MY2 kodlu manyetik partiküllerin histeresis eğrilerinden, gram partikül başına düşen demir oksit miktarının artırılması ile partikülün manyetik özelliğinin arttığı görülmüştür.



Şekil 4.5. Farklı manyetik yükleme ile üretilen MY2 ve MY7 kodlu manyetik partiküllerin VSM analizi.

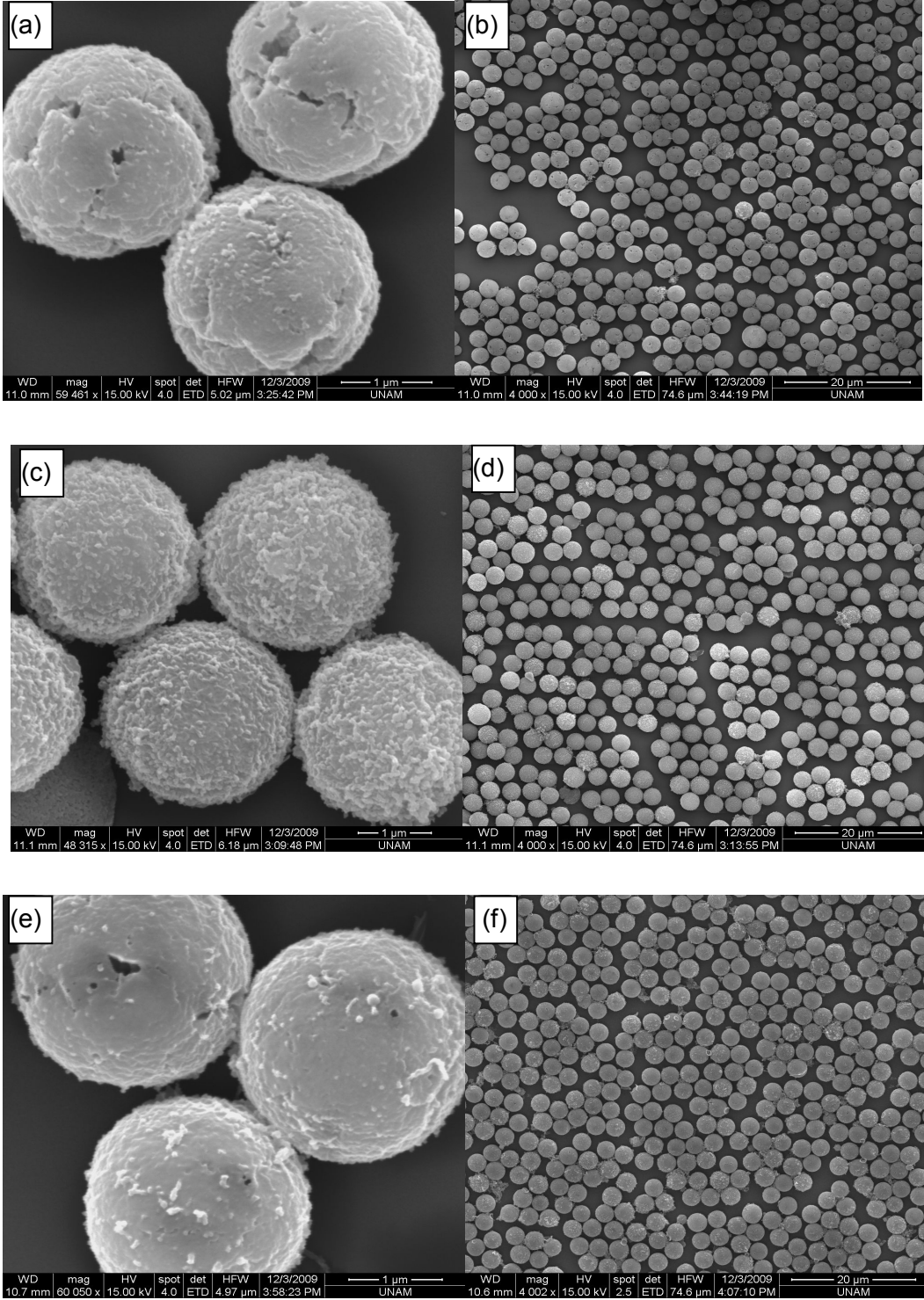
Şekil 4.6.'da görüldüğü gibi, MY2 ve MY7 kodlu partiküller için manyetizasyon eğrisine ek olarak UV spektrofotometresi ile optik izleme yöntemi kullanılmıştır. MY7 kodlu partikülün gözeneklerinde, MY2 kodlu partiküle göre daha fazla miktarda demir oksit nanopartiküllerinin çöktürülmesi, bu partikülün bir manyetik alan varlığında daha hızla şekilde toplanmasını sağlamıştır.



Şekil 4.6. Farklı manyetik yükleme ile üretilen MY2 ve MY7 kodlu manyetik partiküllerin manyetik davranışının UV spektrofotometresi ile izlenmesi.

4.1.3 Kaplamada fonksiyonel grup etkisi

Çizelge 4.3.'ten görüldüğü gibi, bu deney setinde yüzey polimerizasyonu ile polimerik mikrokürelerin etrafında film oluşumu amacıyla kullanılan akrilik komonomer türü değiştirilerek partikül yüzeyinde nötral (hidroksil), katyonik (dimetilamino) veya anyonik (karboksil) fonksiyonel grupların oluşumu sağlanmıştır. Mikrosüspansiyon polimerizasyonu sırasında yapılan manyetikleştirme prosedürü kullanılarak elde edilen MY4, MY5 ve MY6 kodlu polimerik mikrokürelerin SEM görüntüleri Şekil 4.7.'de verilmiştir. Bu manyetik partiküller, yüzey kaplamasında kullanılan monomer türleri değiştirilerek elde edilmiştir. MY6 kodlu partikül için kullanılan 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) ve MY4 kodlu partikül için kullanılan metakrilik asit (MAA) monomerlerinin, manyetik mikrokürelerin yüzeyinde gözenekliliğin azalmasına neden olduğu görülmüştür. SEM fotoğrafları yardımıyla hesaplanan ortalama partikül boyu ve değişim katsayısı değerleri Çizelge 4.3.'te verilmiştir. Bu çizelgeden görüldüğü gibi yüzey film tabakasında kullanılan monomer türünün farklı olması partikül boyutunda ve değişim katsayısı değerlerinde önemli bir değişikliğe neden olmamıştır.



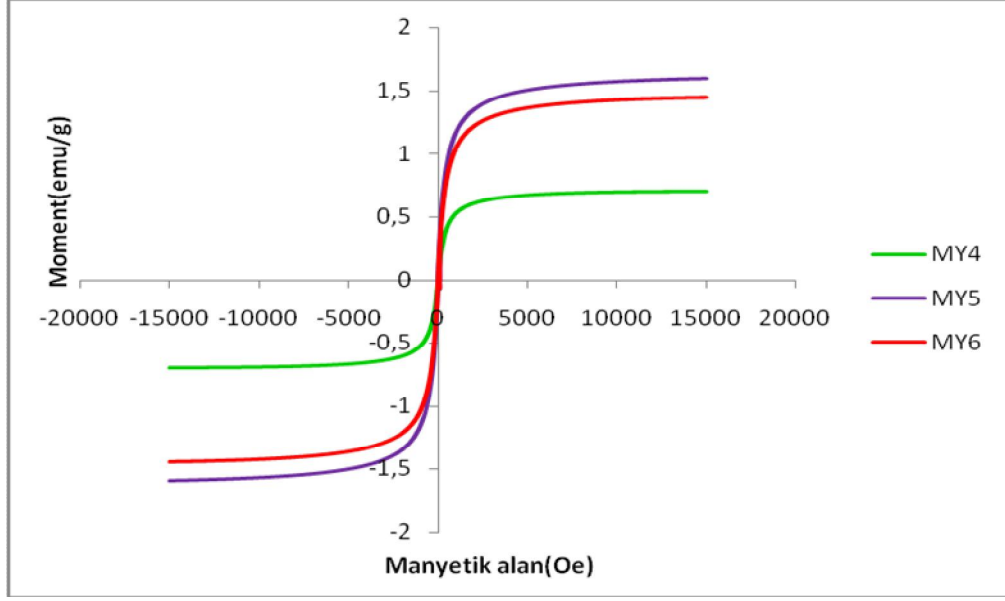
Şekil 4.7. Farklı monomer türleri ile hazırlanan manyetik polimerik partiküllerin SEM fotoğrafları. MY4 kodlu partikül, büyütme: (a) 59461X, (b) 4000X. MY5 kodlu partikül, büyütme: (c) 48315X, (d) 4000X. MY6 kodlu partikül, büyütme: (e) 60050X, (f) 4000X.

Çizelge 4.3. Farklı monomer türleri ile hazırlanan manyetik partiküllerin ortalama partikül boyu ve değişim katsayısı değerleri.

| Kod | Demir çözeltisi (mL) | NH ₄ OH (%) | Yüzey polimerizasyonu | | | Dp (µm) | CV (%) |
|-----|----------------------|------------------------|-----------------------|---------|----------|---------|--------|
| | | | Monomer türü | | | | |
| | | | GDMA (%) | MAA (%) | HEMA (%) | | |
| MY4 | 10 | 2.77 | 0.62 | 0.31 | - | 3.05 | 3.46 |
| MY5 | 10 | 2.77 | 0.92 | - | - | 3.05 | 3.40 |
| MY6 | 10 | 2.77 | 0.46 | - | 0.46 | 3.05 | 2.92 |

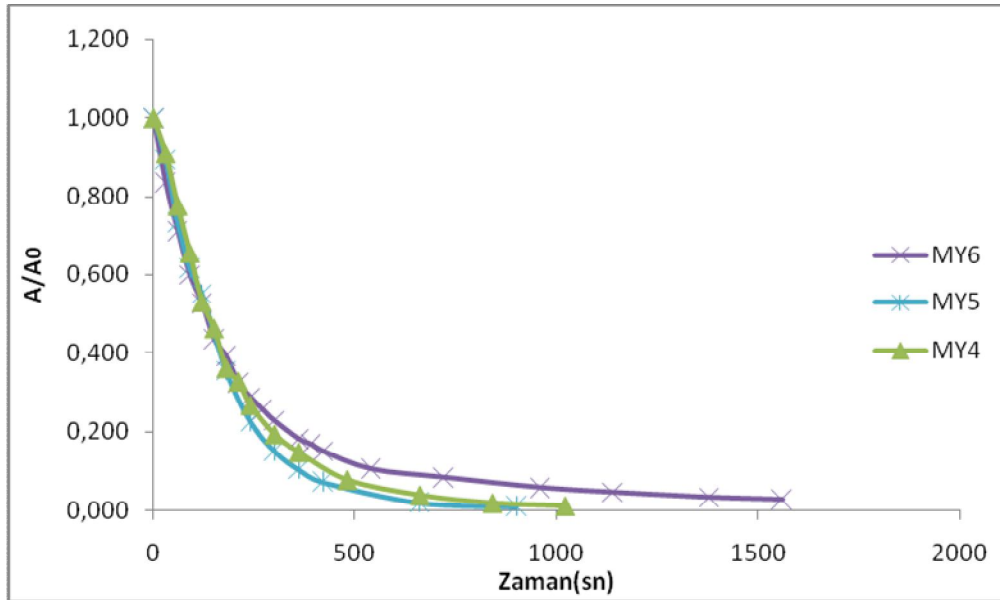
* % değerleri, verilerin, poli (GDMA-co-GDGDGA) sentezi sırasında kullanılan distile su miktarlarına oranlanmasıyla elde edilmiştir.

Yüzey polimerizasyonu sırasında, sırasıyla MAA, GDMA ve HEMA monomerleri kullanılarak sentezlenen MY4, MY5 ve MY6 nolu partiküllerin manyetik doygunluk eğrileri Şekil 4.8.'te verilmiştir. Bu partiküller arasında yüzey monomeri olarak GDMA kullanılan MY5 kodlu partikülün en yüksek manyetik doygunluk değeri verdiği görülmüştür. Hidrofilik monomerler varlığında oluşabilecek oligomerik yapıların manyetik partiküllerin sürekli fazda dispers olma özelliğini arttırabilme olasılığı vardır. Yani bu yapılar bir stabilizör gibi davranarak manyetik partiküllerin bir bölümünün partikül fazı dışında- sulu faz içerisinde- dispers olmasını sağlayabilirler. HEMA ve MAA varlığında oluşan magnetizasyon kaybının bu faktörden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.8. Farklı monomer türleri ile hazırlanan MY4, MY5 ve MY6 kodlu manyetik partiküllerin VSM analizi.

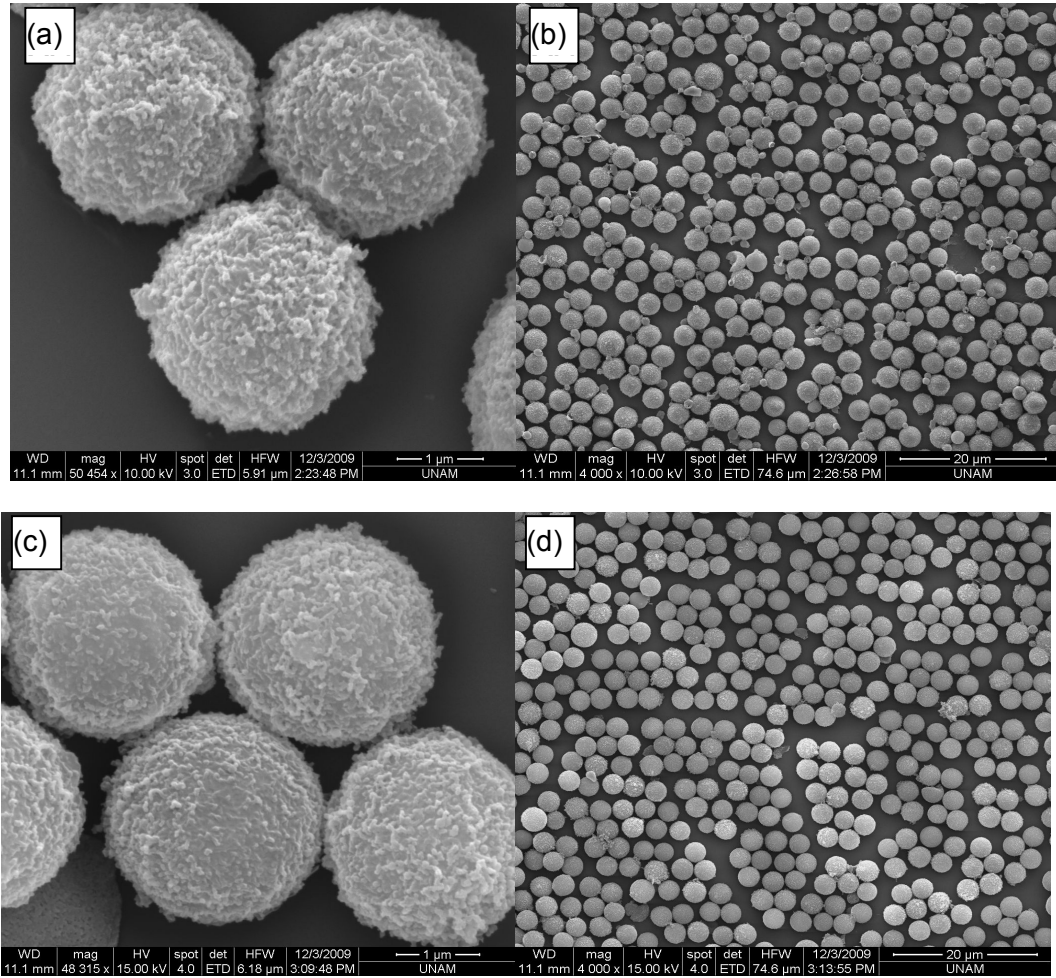
UV spektrofotometresi kullanılarak elde edilen eğriler ile MY4, MY5 ve MY6 kodlu partiküllerin manyetikliklerinin karşılaştırılması Şekil 4.9.'da verilmiştir. Farklı fonksiyonel gruplara sahip MY4, MY5 ve MY6 kodlu manyetik partiküllerden hidroksil fonksiyonel gruplu MY5 kodlu partikülün en hızlı mıknatıslanma davranışı gösterdiği görülmüştür.



Şekil 4.9. Farklı monomer türleri ile hazırlanan MY4, MY5 ve MY6 kodlu manyetik partiküllerin manyetik davranışının UV spektrofotometresi ile izlenmesi.

4.1.4 NH₄OH derişimi etkisi

Bu deney setinde kaplama koşulları sabit tutularak iki farklı NH₄OH derişimi ile çalışılmıştır. Hazırlanan manyetik polimerik mikrokürelerin SEM görüntüleri Şekil 4.10.'da gösterilmiştir. MY2 ve MY5 numaralı manyetik partiküllerin sentezi sırasında, demir tozları elde etmek amacıyla kullanılan amonyak miktarlarının farklı olmasının, bu partiküllerin yüzey ve gözenek yapısı üzerinde önemli bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür. Elde edilen partiküllerin ortalama partikül boyu ve değişim katsayısı değerleri izelge 4.4.'te verilmektedir. Buradan görüldüğü gibi NH₄OH derişimi değişimin aynı zamanda ortalama boy ve boy dağılımı üzerinde de etkili olmadığı görülmektedir.

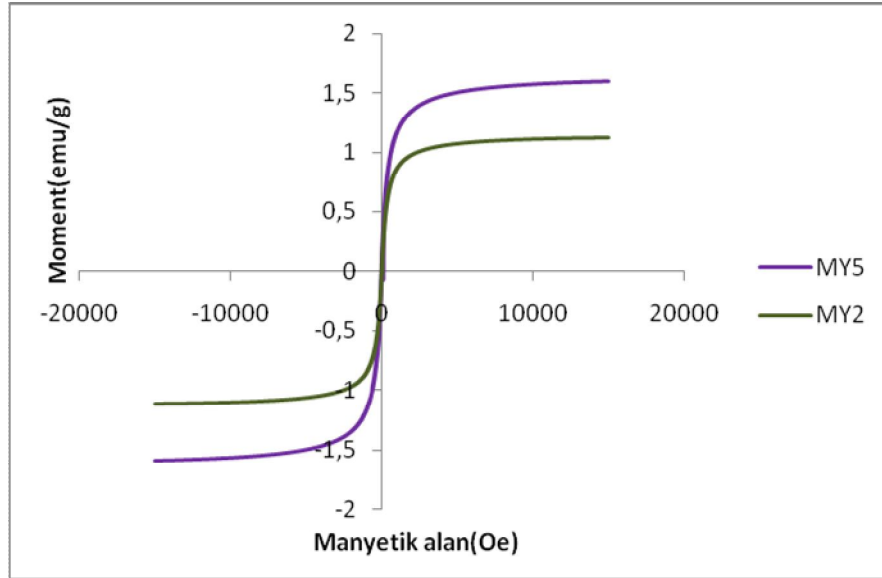


Şekil 4.10. Farklı NH₄OH derişimi ile hazırlanan manyetik polimerik partiküllerin gözenek yapısı ve boy dağılımını gösteren SEM fotoğrafları. MY2 kodlu partikül, büyütme: (c) 50454X, (d) 4000X. MY5 kodlu partikül, büyütme: (c) 48315X, (d) 4000X.

Çizelge 4.4. Farklı NH₄OH derişimi ile hazırlanan manyetik partiküllerin ortalama partikül boyu ve değişim katsayısı değerleri.

| Kod | Demir çözeltisi (mL) | NH ₄ OH (%) | Monomer türü | Dp (µm) | CV (%) |
|-----|----------------------|------------------------|--------------|---------|--------|
| | | | GDMA (%) | | |
| MY2 | 10 | 1.38 | 100 | 3.05 | 4.31 |
| MY5 | 10 | 2.77 | 100 | 3.05 | 3.40 |

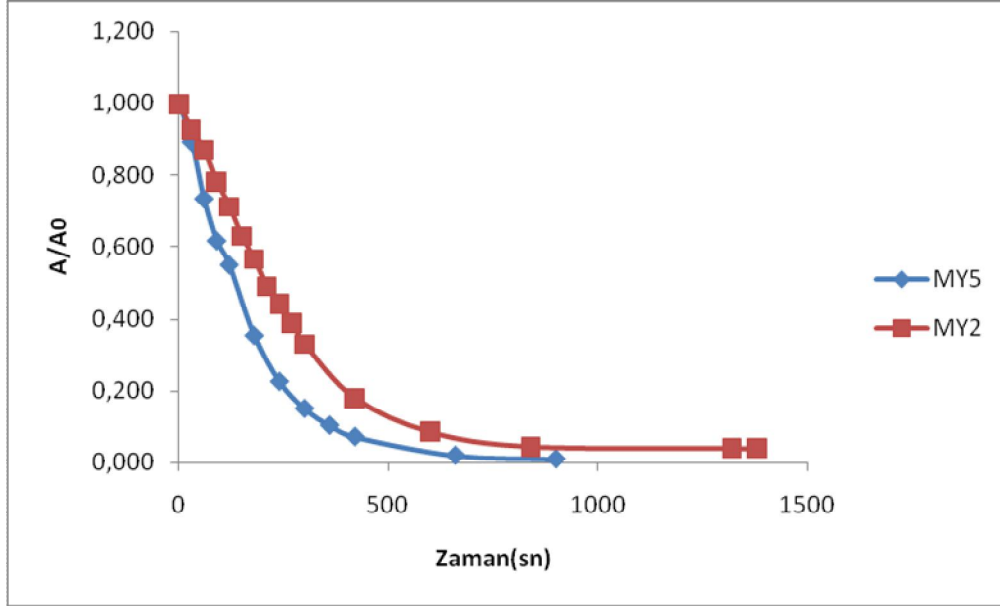
Kullanılan demir tuzları miktarı dahil tüm parametreler sabit tutulup sadece demir tuzlarını elde etmek amacıyla kullanılan amonyak miktarı değiştirilerek sentezlenen MY5 ve MY2 kodlu partiküllerin histeresis eğrileri Şekil 4.11'de verilmiştir. MY5 kodlu partikülün sentezinde MY2 partikülüne göre iki kat fazla amonyak kullanılması bu partikülün manyetiklik özelliğini bir miktar arttırmıştır.



Şekil 4.11. Farklı NH₄OH derişimi ile hazırlanan MY2 ve MY5 kodlu manyetik partiküllerin VSM analizi.

MY2 ve MY5 kodlu partiküller için UV spektrofotometresi ile optik izleme yöntemi kullanılarak elde edilen veriler Şekil 4.12'de verilmiştir. Kullanılan demir tuzlarının miktarı sabit tutulup sadece eklenen amonyak miktarı artırıldığında, demir tuzları daha fazla oranda demir oksite dönüştüğünden, MY5 kodlu partikül MY2 kodlu

partiküle göre mıknatıslanmaya daha hızlı cevap verdiği görülmüştür. Elde edilen sonuç, manyetizasyondan elde edilen verileri doğrulamaktadır.

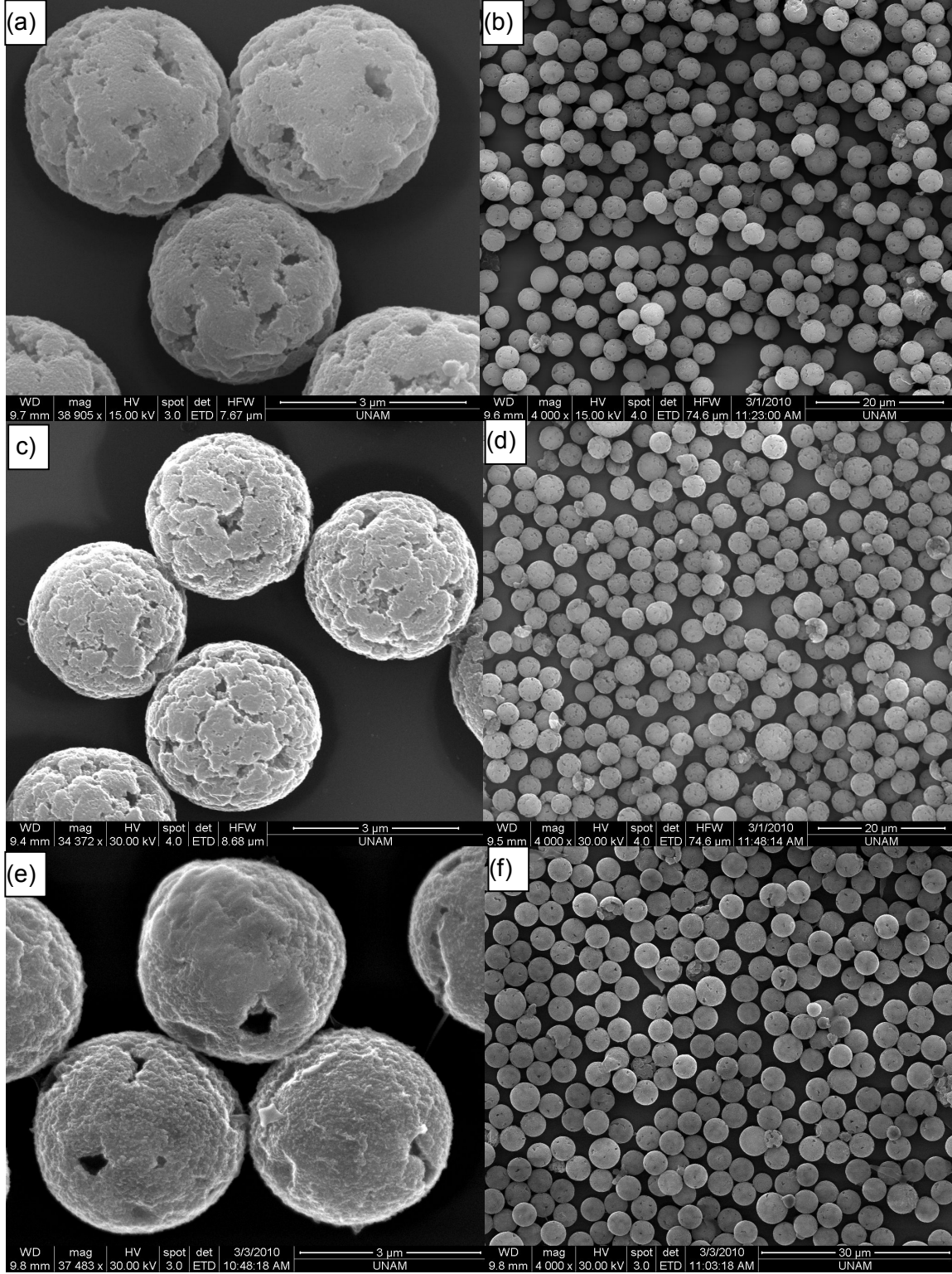


Şekil 4.12. Farklı NH_4OH derişimi ile hazırlanan MY2 ve MY5 kodlu manyetik partiküllerin manyetik davranışının UV spektrofotometresi ile izlenmesi.

4.2 Mikrosüspansiyon polimerizasyonu sonrasında yapılan manyetizasyon ile Sentezlenen monodispers-gözenekli partiküllerin Karakterizasyonu

4.2.1 Fonksiyonel monomer etkisi

Çok basamaklı mikrosüspansiyon yöntemiyle, monodispers ve gözenekli formda poli(GDMA-co-GDGDGA) partikülleri sentezlendikten sonra yapılan manyetizasyon işlemi ile elde edilen MYA, MYD ve MYE kodlu partiküllerin SEM görüntüleri Şekil 4.13.'de verilmektedir.



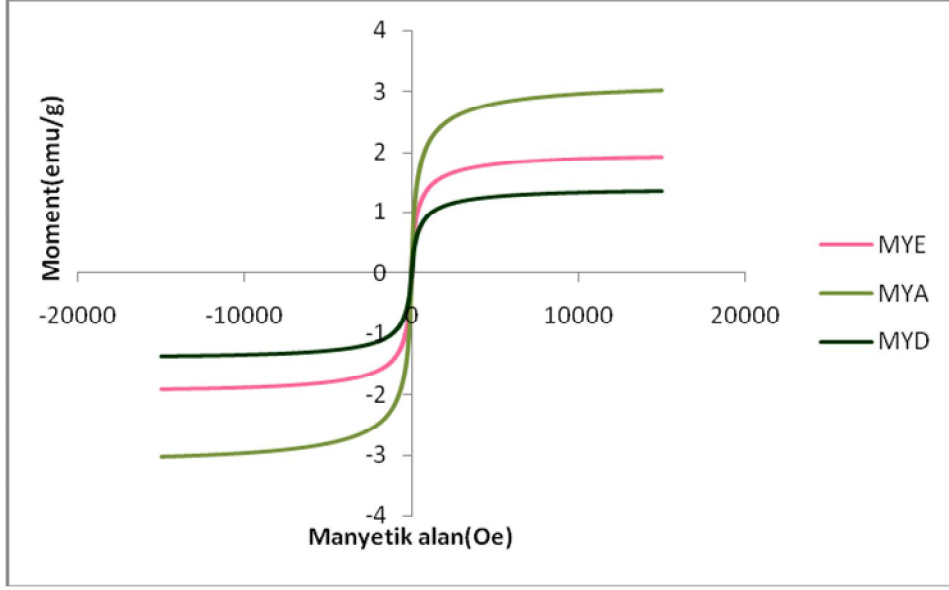
Şekil 4.13. Farklı monomer türleri ile hazırlanan manyetik polimerik partiküllerin SEM fotoğrafları. MYA kodlu partikül, büyütme: (a) 38905X, (b) 4000X. MYD kodlu partikül, büyütme: (c) 34372X, (d) 4000X. MYE kodlu partikül, büyütme: (e) 37483X, (f) 4000X.

Yüzey polimerizasyonu sırasında farklı monomer türleri kullanılarak hazırlanan manyetik partiküllerin ortalama partikül boyu ve değişim katsayısı değerleri Çizelge 4.5.'te verilmektedir. Bu değerlerden, kaplamada kullanılan monomer türlerinin değiştirilmesinin partikül boyutu üzerinde etkili olmadığı anlaşılmıştır.

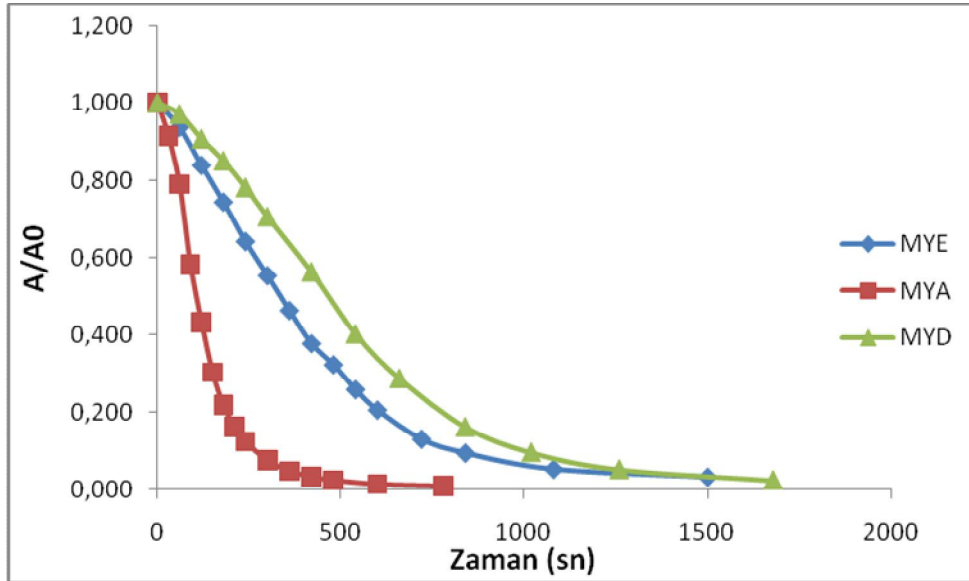
Çizelge 4.5. Farklı monomer türleri ile hazırlanan manyetik partiküllerin ortalama partikül boyu ve değişim katsayısı değerleri.

| Kod | Yüzey polimerizasyonu | | | pH | Dp (μm) | CV (%) |
|-----|-------------------------|-----------------------|--------------------------|----|-------------------------|-----------|
| | Monomer türü | | | | | |
| | mL GDMA / g partikül | mL MAA/ g partikül | mL DMAEM / g partikül | | | |
| MYA | 1.2 | - | - | 9 | 3.73 | 5.83 |
| MYD | 0.8 | 0.4 | - | 9 | 3.73 | 6.91 |
| MYE | 0.8 | - | 0.4 | 9 | 3.73 | 6.51 |

Çizelge 4.5.'te görüldüğü gibi farklı monomer türleri ile hazırlanan MYA, MYD ve MYE kodlu manyetik polimerik partiküllere ait manyetizasyon eğrileri Şekil 4.14.'de verilmiştir. Bu partiküller için UV spektrofotometresi ile optik izleme yöntemi kullanılarak elde edilen veriler ise Şekil 4.15.'de verilmiştir. Her iki şekilden de yüzey polimerizasyonunda GDMA monomeri kullanılan MYA kodlu partikülün en iyi manyetik özelliğe sahip olduğu görülmüştür. Karboksil fonksiyonel grubuna sahip olan MYD kodlu partikülün en düşük manyetik doyumluk değerine sahip olduğu Şekil 4.14.'de görülmektedir. Şekil 4.15.'de MYD kodlu partikülün bir manyetik alan varlığında, alanın olduğu yere en geç toplanan partikül olduğu görülmüştür. Bu sonuç manyetizasyon eğrisinden çıkarılan sonucu doğrular niteliktedir.



Şekil 4.14. Farklı monomer türleri ile hazırlanan MYA, MYD ve MYE kodlu manyetik partiküllerin VSM analizi.



Şekil 4.15. Farklı monomer türleri ile hazırlanan MYA, MYD ve MYE kodlu partiküllerin manyetik davranışının UV spektrofotometresi ile izlenmesi.

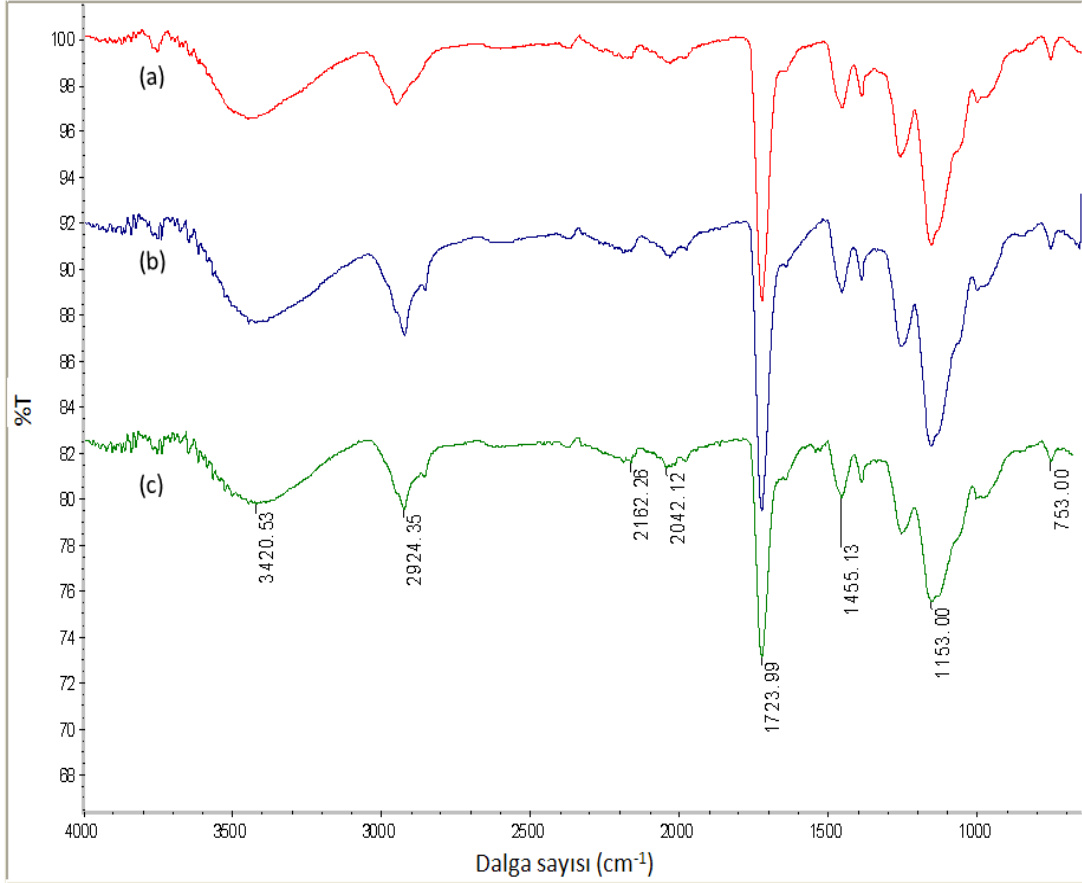
Adsorpsiyon ve hücre ile etkileşim çalışmalarında kullanılan, farklı monomer türleri ile hazırlanan MYA, MYD VE MYE kodlu manyetik partiküllerin yüzey alanı ve mikrogözenek yapısının belirlenmesi amacıyla BET azot adsorpsiyon sistemi

kullanılmıştır. MYA, MYD VE MYE kodlu manyetik partiküller için BET sistemi kullanılarak elde edilen yüzey alanları Çizelge 4.6.'da verilmiştir. Manyetik partiküllerin SEM fotoğraflarından MYD ve MYE kodlu partiküllerdeki MAA ve DMAEM fonksiyonel gruplarının yüzey gözenekliliğini azaltıcı yönde etki yaptığı gözlenmişti (Şekil 4.13.). BET sistemi ile elde edilen sonuçlar önceki gözlemleri doğrulamaktadır. MYD ve MYE kodlu partiküllerin gözenekliliğinin azalması bu partiküllerdeki yüzey alanının MYA kodlu partiküle göre daha az çıkmasına neden olmuştur.

Çizelge 4.6. Farklı monomer türleri ile hazırlanan MYA, MYD VE MYE kodlu manyetik partiküllerin yüzey alanı değerleri.

| Kod | Yüzey alanı (m ² /g) |
|-----|---------------------------------|
| MYA | 97.16 |
| MYD | 87.10 |
| MYE | 30.52 |

Sentezlenen manyetik partiküller içerisinde, adsorpsiyon ve hücre etkileşim çalışmalarında kullanılmak üzere seçilen MYA, MYD ve MYE kodlu manyetik partiküllerin yüzey ve yığın FTIR spektrumları çekilmiştir. Yüzey ve yığın FTIR spektrumlarından çıkarılabilecek sonuç yüzeyin OH yönünden yığın yapıya göre daha zengin olduğudur. Bu durum, yüzeyde GDGDA birimlerinin tercihli olarak yerleşimi ile açıklanabilir. Bu partiküller için elde edilen yüzey FTIR spektrumları Şekil 4.16.'da, spektrumlarda görülen karakteristik pikler ise Çizelge 4.7.'de verilmiştir.



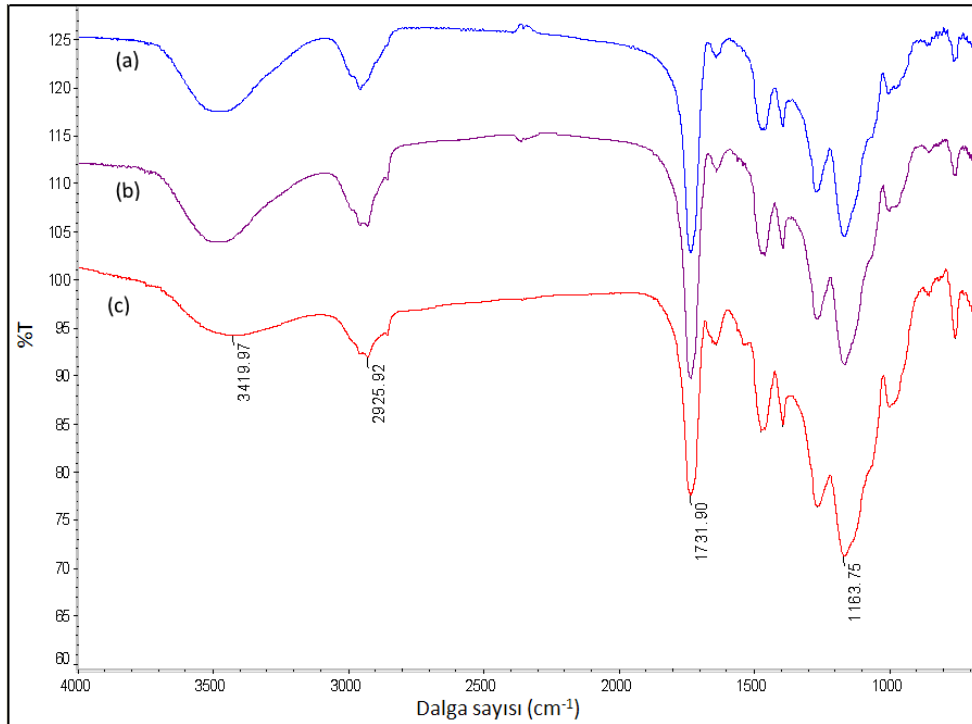
Şekil 4.16. Farklı monomer türleri ile hazırlanan (a) MYA, (b) MYD, (c) MYE kodlu manyetik partiküllerin yüzey FTIR spektrumları.

Çizelge 4.7. Farklı monomer türleri ile hazırlanan MYA, MYD ve MYE kodlu partiküllerin yüzey FTIR spektrumundaki karakteristik pikleri.

| Karakteristik Pik | Dalga Sayısı (cm ⁻¹) | | |
|-------------------|----------------------------------|---------|---------|
| | MYA | MYD | MYE |
| -OH gerilimi | 3446.99 | 3445.54 | 3420.53 |
| -C=O gerilimi | 1723.53 | 1724.10 | 1723.99 |
| -C-H gerilimi | 2948.73 | 2922.60 | 2924.35 |
| -C-O- gerilimi | 1154.17 | 1154.32 | 1153.00 |

MYA kodlu manyetik partiküllerin yüzey yapısında gözlenen -OH, -C=O, -C-H ve -C-O- gerilimleri, GDMA partikülünün yüzeydeki varlığını göstermiştir. MYD kodlu manyetik partikülün spektrumunda gözlenen bu pikler MAA ve GDMA'nın yapısından gelmektedir. MYE kodlu partikülün spektrumunda gözlenen -C=O, -C-H ve -C-O- gerilimleri, bu partikülün yüzeyindeki GDMA VE DMAEM partiküllerinin varlığını göstermektedir. Spektrumda gözlenen -OH piki ise GDMA'nın varlığından gelmektedir. Literatürde verilen değerlere göre MAA partikülünün yapısında bulunan tersiyer amin (R_3N) grubu $3300-3500\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında pik göstermektedir. Ancak MYE kodlu partikülün yüzey yapısında bulunan -OH grubu aynı dalga sayısı aralığında pik verdiği için amin grubunun verdiği pik gözlenmemektedir. Bu nedenle, MYE kodlu manyetik partiküldeki amin varlığını göstermek amacıyla bu partiküle elementel analiz yöntemi uygulanmıştır.

MYA, MYD ve MYE kodlu manyetik partiküller için elde edilen yığın FTIR spektrumları Şekil 4.17.'de, spektrumlarda görülen karakteristik pikler ise Çizelge 4.8'de gösterilmiştir.



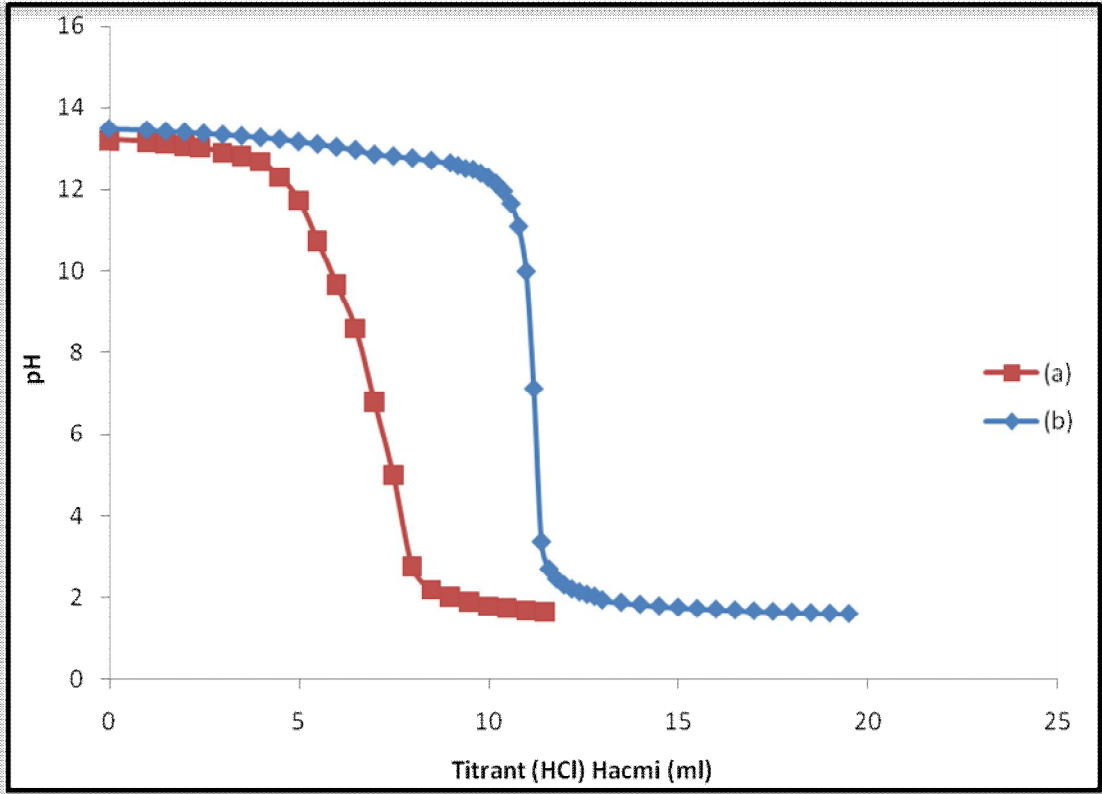
Şekil 4.17. Farklı monomer türleri ile hazırlanan (a) MYA, (b) MYD, (c) MYE kodlu manyetik partiküllerin yığın FTIR spektrumları.

Çizelge 4.8. Farklı monomer türleri ile hazırlanan MYA MYD ve MYE kodlu partiküllerin yığın FTIR spektrumundaki karakteristik pikleri.

| Karakteristik Pik | Dalga Sayısı (cm ⁻¹) | | |
|-------------------|----------------------------------|---------|---------|
| | MYA | MYD | MYE |
| -OH gerilimi | 3448.68 | 3462.26 | 3419.97 |
| -C=O gerilimi | 1731.94 | 1732.63 | 1731.90 |
| -C-H gerilimi | 2955.07 | 2927.39 | 2925.92 |
| -C-O- gerilimi | 1163.07 | 1163.19 | 1163.75 |

MYA, MYD ve MYE kodlu partiküllerin FTIR spektrumunda gözlenen -OH, -C=O, -C-H ve -C-O- gerilimlerine ait pikler, partiküllerin yüzey filminde bulunan monomerlere ek olarak yapılarında bulunan GDMA ve GDGDA partiküllerinden de kaynaklanmaktadır. Bu nedenle manyetik partiküllerin yığın FTIR spektrumlarından elde edilen piklerin şiddeti, yüzey FTIR spektrumlarından elde edilenlerin şiddetinden daha fazladır.

Potansiyometrik titrasyon çalışması, 'mikrosüspansiyon polimerizasyonu sonrası manyetikleştirme' prosedürü ile sentezlenen ve yüzeyinde anyonik (karboksil) fonksiyonel grubu taşıyan MYD kodlu partikül için yapılmıştır. Partikülün sahip olduğu karboksil gruplarının tayin edilmesi amacıyla çizilen potansiyometrik titrasyon eğrileri Şekil 4.18.'de verilmiştir. Elde edilen grafikler yardımıyla yapılan hesaplamalar sonunda 1 g partikül içerisinde 2.16 mmol MAA bulunduğu, dolayısıyla 1 g partikül başına 2.16 mmol karboksil grubu bağlandığı görülmüştür.



Şekil 4.18. (a) 0.1 M NaOH çözeltisi içerisinde dispers edilen karboksil fonksiyonel grubuna sahip MYD kodlu manyetik polimerik partikülün 0.1 M HCl çözeltisi ile, (b) 0.1 M NaOH çözeltisinin 0.1 M HCl çözeltisi ile titrasyonundan elde edilen potansiyometrik titrasyon eğrileri.

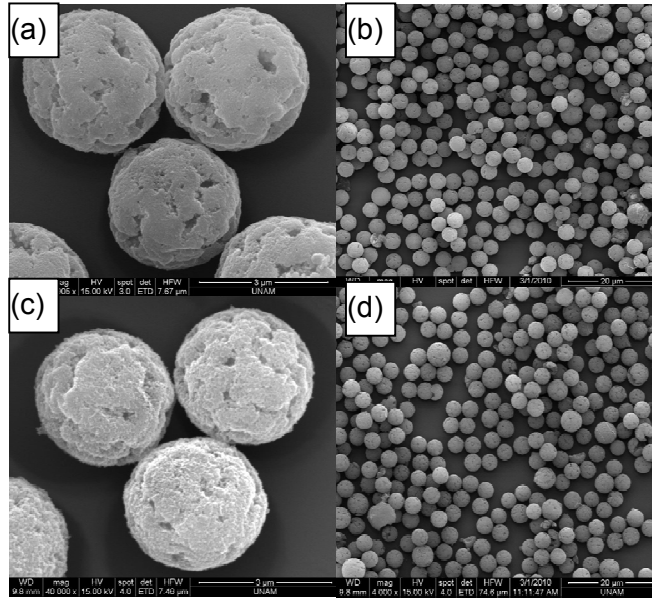
MYE kodlu partikülün yüzey polimerizasyonu sırasında, DMAEM, monomer olarak kullanılmıştır. Partikülün sahip olduğu bu fonksiyonel grubun varlığının gösterilmesi amacıyla elemental analiz yapılmıştır. Değerlendirmenin daha net yapılabilmesi için sentezlenen tüm manyetik partiküllerin çıkış maddesi olan poli(GDMA-co-GDGDA) partikülü için de elemental analiz yapılmıştır. Alınan sonuçlar Çizelge 4.9.'da gösterilmiştir. Poli(GDMA-co-GDGDA) partikülünde amin ve kükürt gözlenmezken, MYE kodlu partikülde FeSO_4 tuzundan gelen kükürt ve DMAEM fonksiyonel grubundan gelen azot gözlenmiştir. Elde edilen veriler kullanılarak, 1 gram partikül içerisinde 147,1 mg DMAEM bulunduğu hesaplanmıştır.

Çizelge 4.9. MYE kodlu manyetik polimerik partikül ve poli(GDMA-co-GDGDA) partikülü için elemental analiz sonuçları.

| Örnek Adı | % C (karbon) | %H (Hidrojen) | %N (Azot) | %S (Kükürt) |
|---------------------|--------------|---------------|-----------|-------------|
| MYE kodlu partikül | 51.13 | 7.34 | 1.31 | 1.21 |
| Poli(GDMA-co-GDGDA) | 52.03 | 6.76 | - | - |

4.2.2 pH etkisi

Tüm çalışma koşulları sabit tutulup, polimerik film kaplaması sırasındaki pH değeri değiştirilerek elde edilen MYA ve MYC kodlu manyetik partiküllerin SEM fotoğrafları Şekil 4.19.'de verilmiştir. Şekil 4.22.'de görüldüğü gibi yüzey polimerizasyonu sırasındaki ortam pH'ının MYA kodlu partikülde 9 iken, MYC kodlu partikülde 3 olması, bu partiküllerin yüzey morfolojisi üzerinde önemli bir değişime neden olmamıştır.



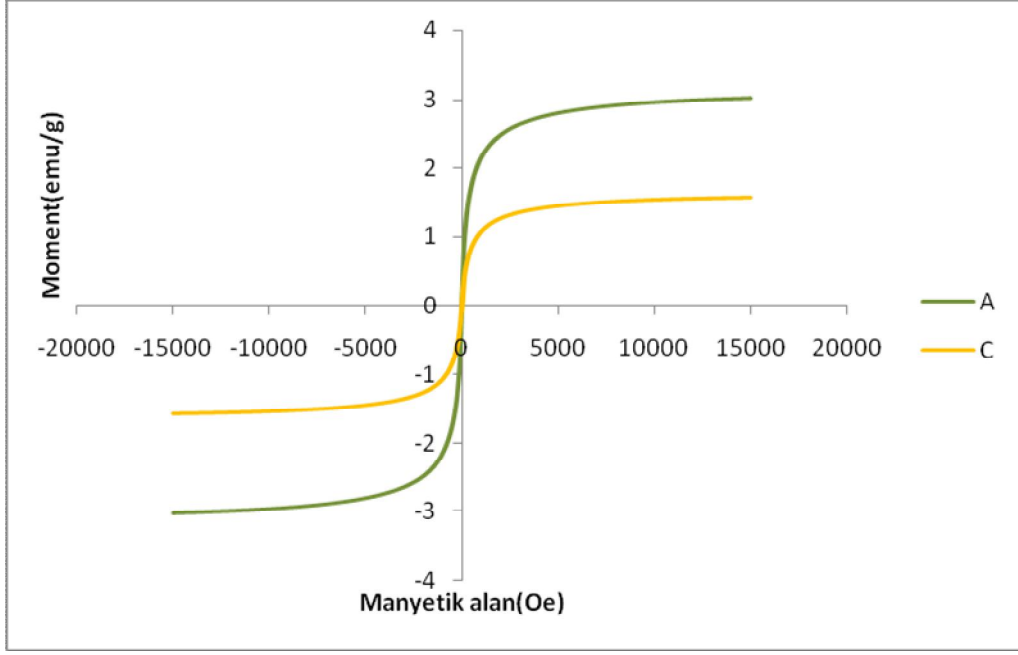
Şekil 4.19. Farklı pH değerlerinde sentezlenen manyetik polimerik partiküllerin SEM fotoğrafları. MYA kodlu partikül, büyütme: (a) 38905X, (b) 4000X. MYC kodlu partikül, büyütme: (c) 40000X, (d) 4000X.

SEM fotoğrafları yardımıyla MYA VE MYC kodlu manyetik partiküller için hesaplanan ortalama partikül boyu ve değişim katsayısı değerleri Çizelge 4.10.'da verilmiştir. Bütün çalışma koşulları sabit alınıp yalnızca polimerik film kaplaması sırasındaki ortam pH'ının değiştirilmesinin, partikül boyu ve boy dağılımı üzerinde bir etkisi olmadığı görülmüştür.

Çizelge 4.10. Farklı pH değerlerinde hazırlanan MYA ve MYC kodlu manyetik partiküllerin ortalama partikül boyu (Dp) ve boy dağılım değişim katsayısı (CV) değerleri.

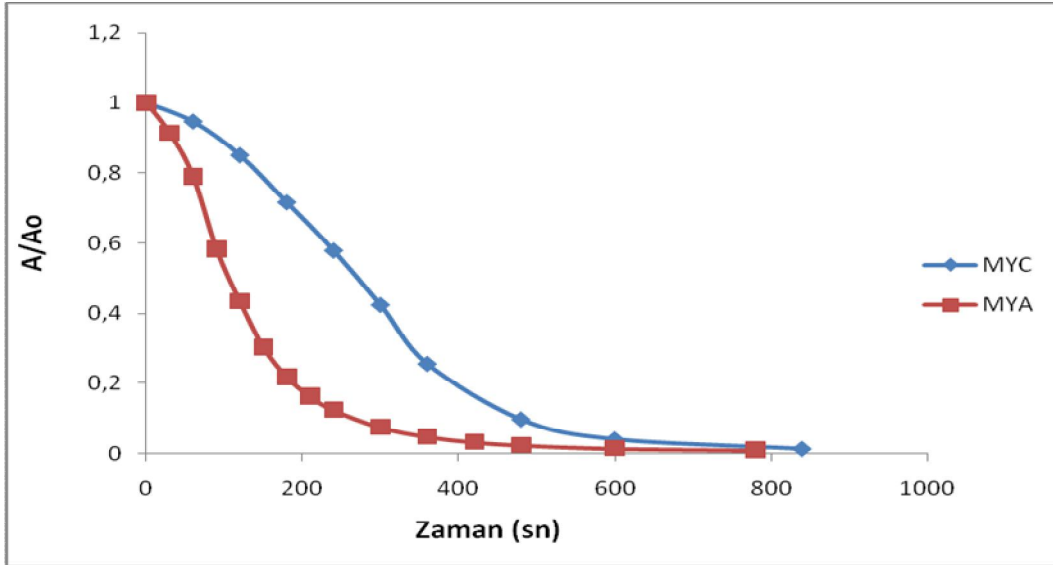
| Kod | Yüzey Polimerizasyonu | | Dp (µm) | CV(%) |
|-----|-----------------------|----|---------|-------|
| | Monomer türü | pH | | |
| | mL GDMA/ g partikül | | | |
| MYA | 1.2 | 9 | 3.73 | 5.83 |
| MYC | 1.2 | 3 | 3.73 | 6.18 |

Yüzey polimerizasyonu pH 9 değerinde gerçekleştirilen MYA kodlu manyetik partikül ile pH 3 değerinde gerçekleştirilen MYC kodlu partikül için elde edilen manyetizasyon eğrileri Şekil 4.20.'de verilmiştir. pH değeri 3'e ayarlanan MYC nolu partikülde manyetik doygunluk değerinin MYA kodlu partiküle göre azaldığı görülmüştür. Bu nedenle diğer partikül türlerinde yüzey polimerizasyonu sırasındaki pH değiştirilmeden pH9 değerinde çalışılmıştır.



Şekil 4.20. Farklı pH değerlerinde hazırlanan MYA ve MYC kodlu manyetik partiküllerin VSM analizi.

Şekil 4.21.'de görüldüğü gibi, yüzey polimerizasyonu ortamındaki pH değeri değişiminin manyetiklik üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla MYA ve MYC kodlu partiküllerin manyetik davranışları UV spektrofotometresi ile izlenmiştir. pH 9 değerinde çalışılan MYA kodlu partikülün bir manyetik alan varlığında, manyetik alan yönüne doğru daha hızlı toplandığı görülmüştür.

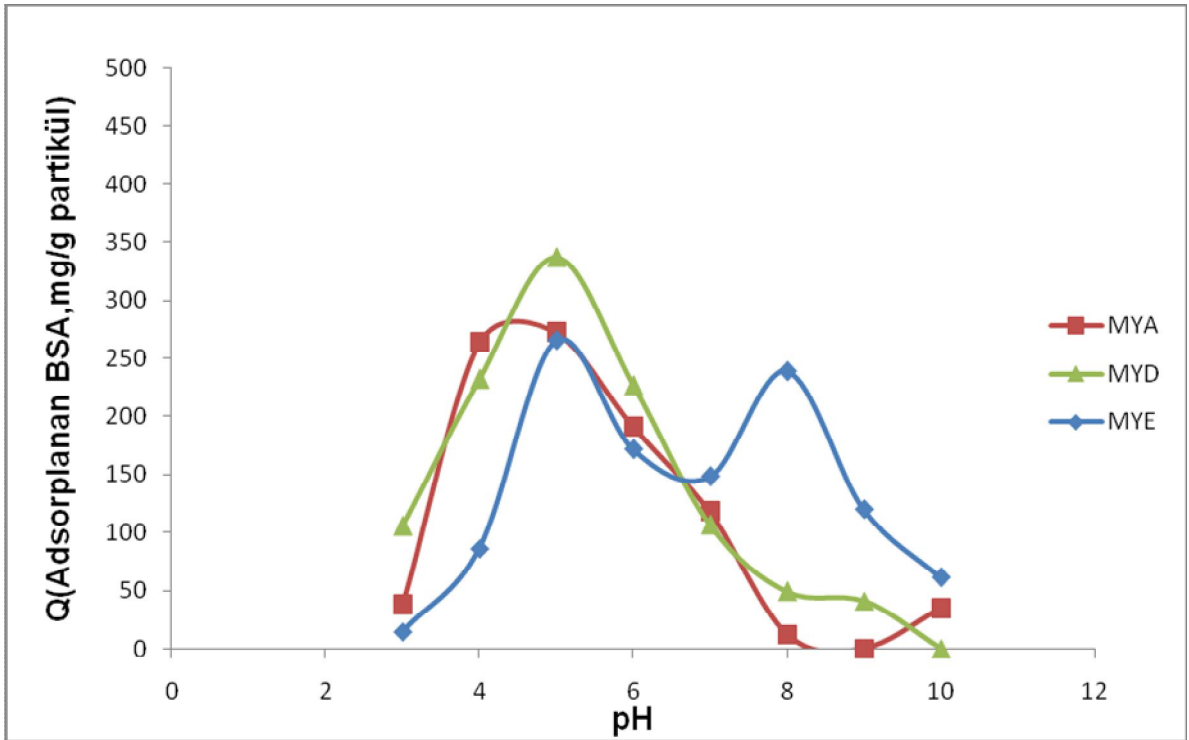


Şekil 4.21. Farklı pH değerlerinde hazırlanan MYA ve MYC kodlu manyetik partiküllerin manyetik davranışının UV spektrofotometresi ile izlenmesi.

4.3 Manyetik partiküllerin Protein Adsorpsiyon Özellikleri

4.3.1 pH etkisi

Farklı monomer türleri ile hazırlanan MYA, MYD ve MYE kodlu manyetik partiküller ile yapılan BSA adsorpsiyon deneylerinde pH'ın protein adsorpsiyonuna etkisi incelenmiştir. Farklı yüzey fonksiyonalitesine sahip manyetik partiküller için denge albumin adsorpsiyonun pH ile değişimi Şekil 4.22.'de verilmektedir. pH değeri 3'ten 10'a kadar değiştirilerek yapılan çalışmalarda, pH değişiminin BSA adsorpsiyonuna çok önemli etkisi olduğu görülmüştür. Her üç manyetik polimerik partikül türünde de BSA'nın izoelektrik noktası olan pH 5'te maksimum BSA adsorpsiyonu gözlenmiştir. Diğer pH değerlerinde ise protein yüklü haldedir ve yüklenmiş proteinin hidrasyonu ve buna bağlı olarak çözünürlüğü daha yüksektir. Bu nedenle diğer pH değerlerindeki BSA adsorpsiyonu pH5'teki değerden daha düşük çıkmıştır.



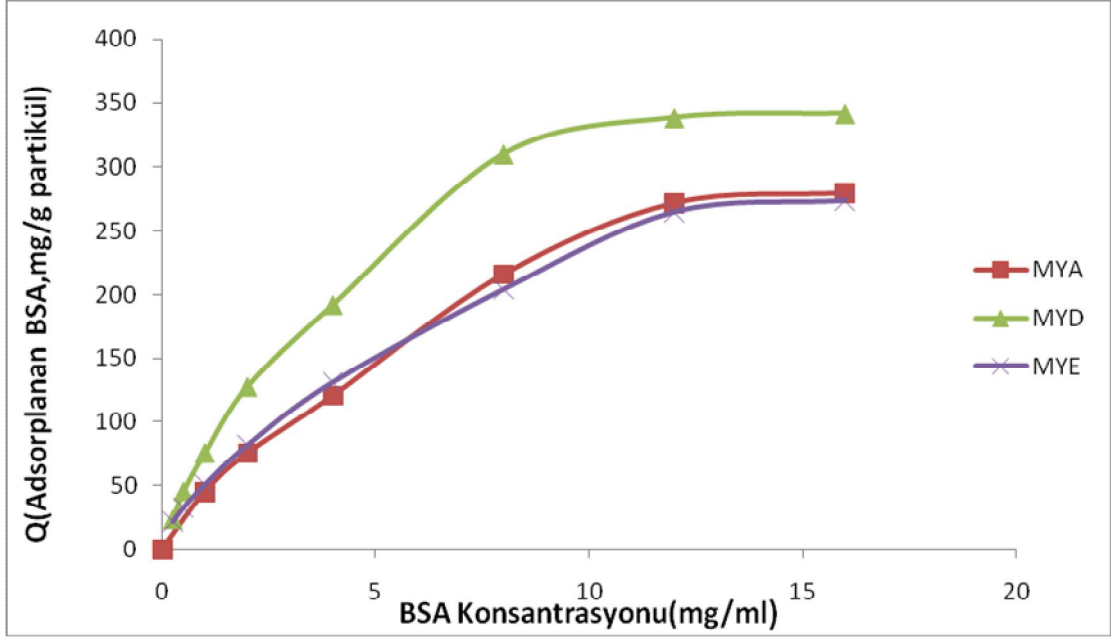
Şekil 4.22. Farklı monomer türleri ile hazırlanan MYA, MYD VE MYE kodlu partiküller üzerine BSA adsorpsiyonunda pH etkisi. BSA konsantrasyonu: 12mg/mL.

pH 5'e kadarki pH değerlerinde BSA'nın yükü pozitif, MYD kodlu partikülün yükü ise negatif olduğundan bu moleküller arasında elektrostatik etkileşim vardır ve adsorpsiyon gerçekleşmektedir. Fakat BSA, izoelektrik noktası olan pH 5 değerinde yüksüzdür ve bu pH'ta çözünürlüğü çok azdır. Çözünürlüğü çok az olan BSA molekülü sulu fazdan kaçarak hidrofobik yüzeyle daha fazla etkileşmiştir ve buna bağlı olarak da yüksek adsorpsiyon meydana gelmiştir. pH 5 değerinden yüksek pH değerlerinde ise BSA'nın yükü negatif, manyetik polimerin yükü de negatif olduğundan aralarında elektrostatik itme gerçekleşerek düşük adsorpsiyon gözlenmiştir.

Düşük pH değerlerinde hem MYE kodlu manyetik partikül hem de BSA molekülü pozitif yüklü olduğundan elektrostatik itme etkisiyle daha az miktarda adsorpsiyon gerçekleşmektedir. 5'ten yüksek pH değerlerinde MYE kodlu partikülde oluşan hidrofobisite büyük olasılıkla pH 8 değerinde gözlenen ve hidrofobik etkileşim yoluyla gerçekleşen adsorpsiyon maksimumunu açıklamaktadır.

4.3.2 Başlangıç protein derişimi etkisi

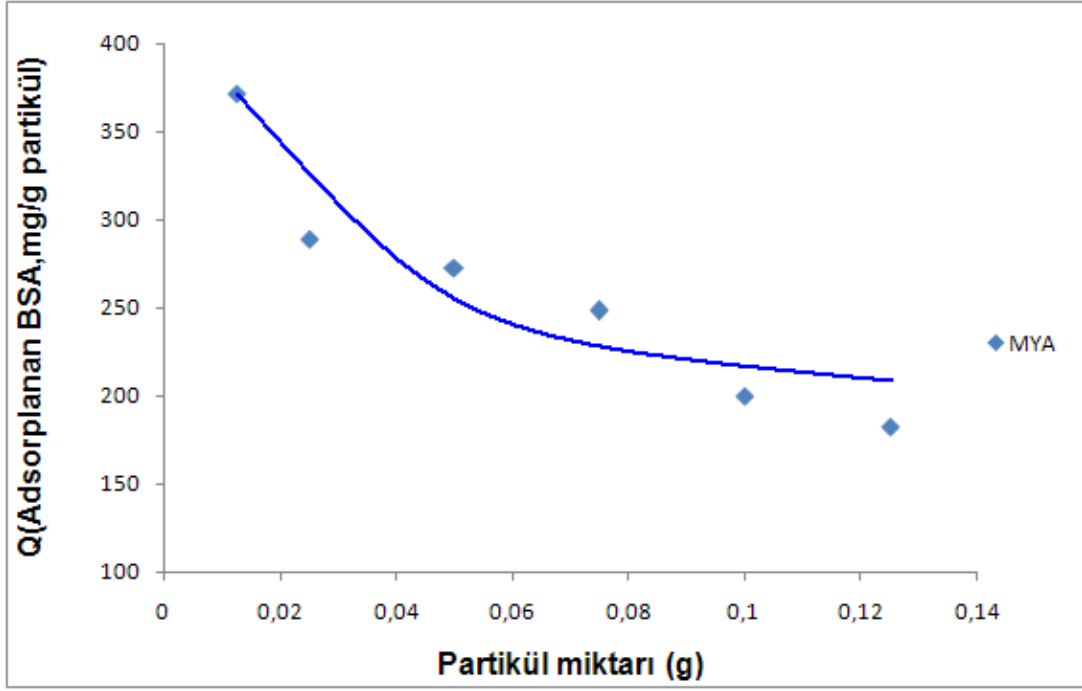
MYA, MYD ve MYE kodlu manyetik partiküller ile yapılan BSA adsorpsiyon deneylerinde, pH değeri sabit tutulup, BSA konsantrasyonundaki değişimin adsorpsiyona etkisi incelemiştir. BSA adsorpsiyon değerlerinin farklı maddeler ve farklı BSA konsantrasyonlarıyla değişimi Şekil 4.23.'da verilmiştir. Her üç manyetik polimerik partikülde de başlangıç BSA derişimi arttıkça, gram partikül başına adsorplanan BSA miktarı artmakta, belli bir derişimden (12mg BSA/mL) sonra ise sabit kalmaktadır.



Şekil 4.23. Farklı monomer türleri ile hazırlanan MYA, MYD VE MYE kodlu partiküllerin BSA adsorpsiyonuna BSA konsantrasyonu etkisi. pH: 5, tampon çözeltisi: sodyum asetat tamponu.

4.3.3 Partikül derişimi etkisi

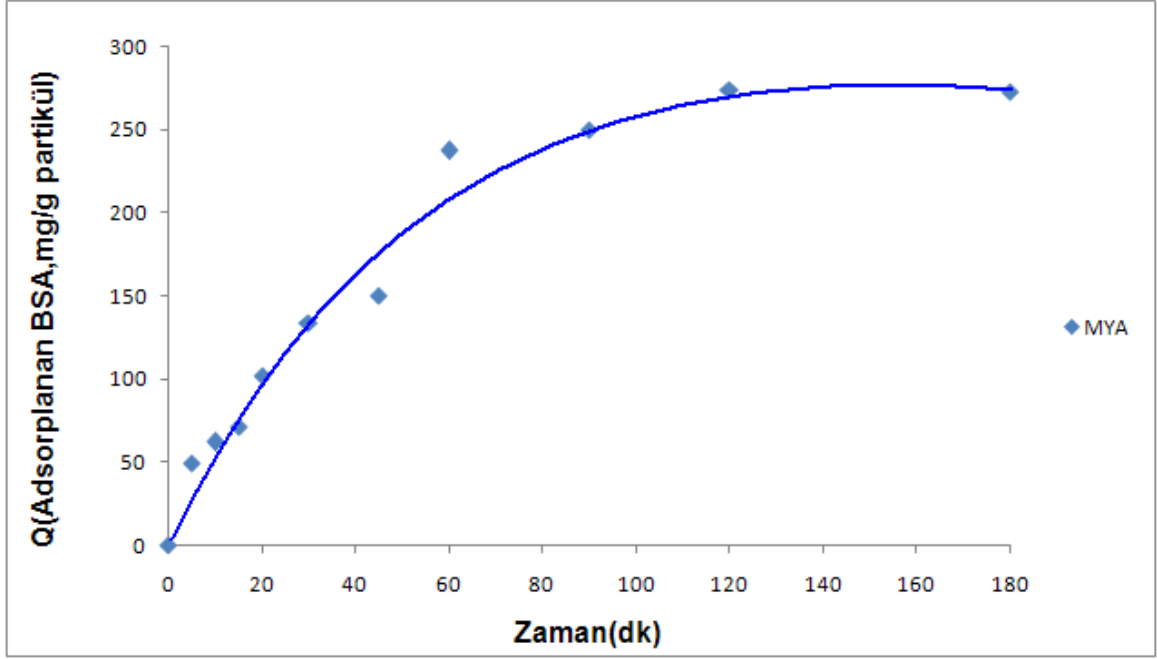
Partikül derişiminin BSA adsorpsiyonuna etkisi, örnek olarak seçilen MYA kodlu manyetik partikül için incelenmiştir (Şekil 4.24.). Partikül derişim etkisi incelenirken, BSA derişimi olarak 12mg/mL alınmıştır. Bu konsantrasyon değeri BSA konsantrasyon taramasında bulunan denge konsantrasyon değeridir. Şekil 4.24.'de görüldüğü gibi BSA çözeltisi ile etkileştirilen partikül miktarı arttıkça partikül başına adsorplanan BSA miktarında azalma olmuştur.



Şekil 4.24. Partikül miktarı değişiminin MYA kodlu partikülün BSA adsorpsiyonuna etkisi. pH: 5, tampon çözeltisi: sodyum asetat tamponu

4.3.4 Adsorpsiyon kinetiği

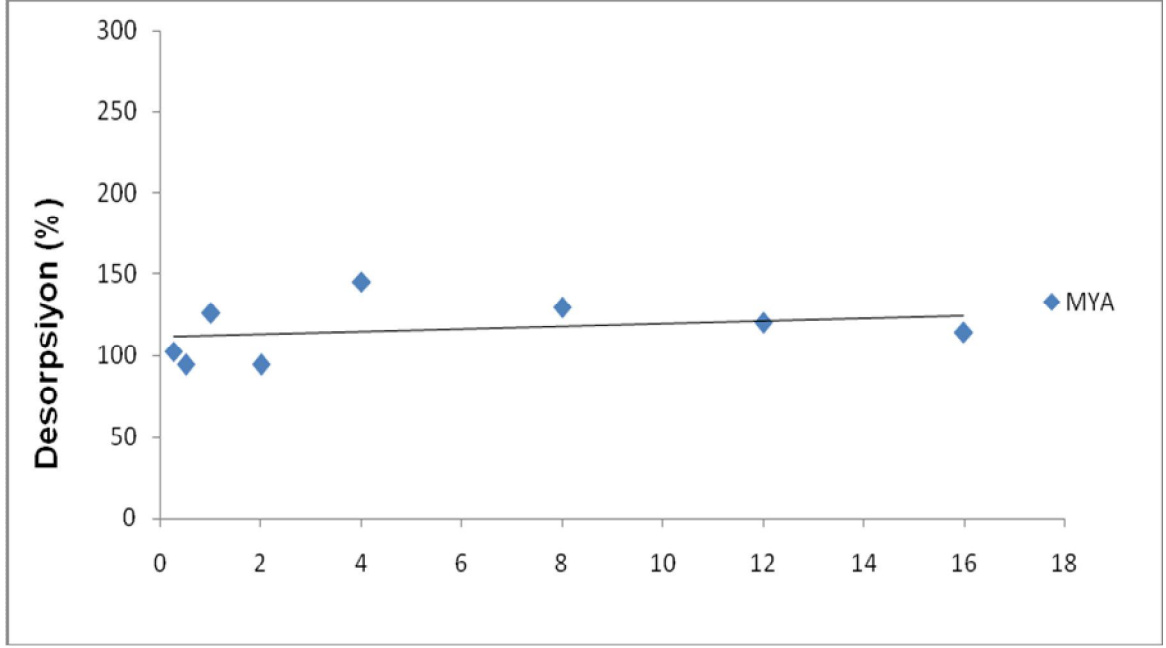
Belli süre aralıklarında MYA kodlu partikülden örnekler alınarak partikülün adsorpladığı BSA miktarları kontrol edilmiştir. Ortamın konsantrasyonu, denge konsantrasyonu olarak bulunan 12 mg/mL 'ye ayarlanmıştır. Şekil 4.25.'de görüldüğü gibi adsorplanan BSA miktarı her geçen süre sonunda artış göstermiş ve yaklaşık olarak 2. saatin sonunda adsorplanan miktar sabitlenerek dengeye gelmiştir. Adsorplanan BSA miktarının 2.saatin sonunda dengeye gelmesi, partikülün adsorplama kapasitesini doldurduğunu, adsorpsiyonun tamamlandığını ve süre arttırılsa dahi adsorpsiyon miktarında bir değişme gözlenmeyeceğini göstermiştir.



Şekil 4.25. MYA kodlu partikül üzerine BSA adsorpsiyonunun zamana bağlı değişimi. pH: 5, Tampon çözeltisi: Sodyum asetat tamponu, BSA konsantrasyonu: 12mg/mL.

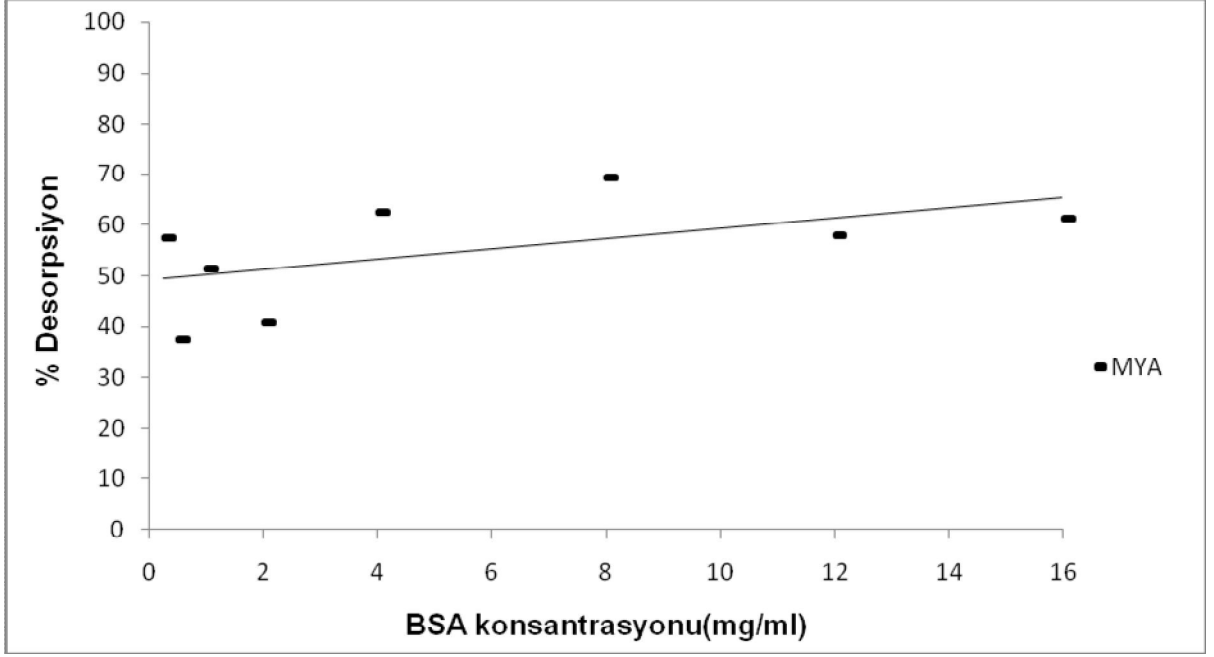
4.3.5 Desorpsiyon

MYA kodlu manyetik partikül için pH 9 değerindeki borat tamponu kullanılarak desorpsiyon çalışması yapılmıştır. Bu pH değerinde yapılan çalışmada BSA konsantrasyonları değiştirilerek, farklı BSA derişimlerdeki desorpsiyon oranları incelenmiştir. Elde edilen veriler Şekil 4.26.'da gösterilmektedir. Her BSA derişiminde gözlenen desorplanma oranı incelendiğinde, pH 9 değerinde BSA'nın manyetik partiküllerden desorpsiyonunun kantitatif olduğu görülmüştür.



Şekil 4.26. Başlangıç protein derişiminin, BSA desorpsiyon değerlerine etkisi. pH: 9, tampon çözeltisi: Borat tamponu.

BSA'nın MYA kodlu manyetik partikülden daha ılımlı koşullarda desorpsiyon davranışının incelenmesi amacıyla, 1M sodyum klorür tuzu (NaCl) içeren pH 8 HEPES tamponu kullanılarak desorpsiyon çalışması yapılmıştır. Farklı BSA derişimleri için elde edilen desorpsiyon değerleri Şekil 4.27.'de verilmiştir. Buradan görüldüğü gibi pH değerinin nötrale yaklaştırılması, BSA desorpsiyonunu zorlaştırmaktadır. Bu durum pH 8 değerinde hidrofobik etkileşimin tam olarak önlenemediğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.27. Başlangıç protein derişiminin, BSA desorpsiyon değerlerine etkisi. pH: 8, Tampon çözeltisi: 1M sodyum klorür tuzu (NaCl) içeren pH 8 HEPES tamponu.

4.4 Partikül Hücre Etkileşim Çalışmaları

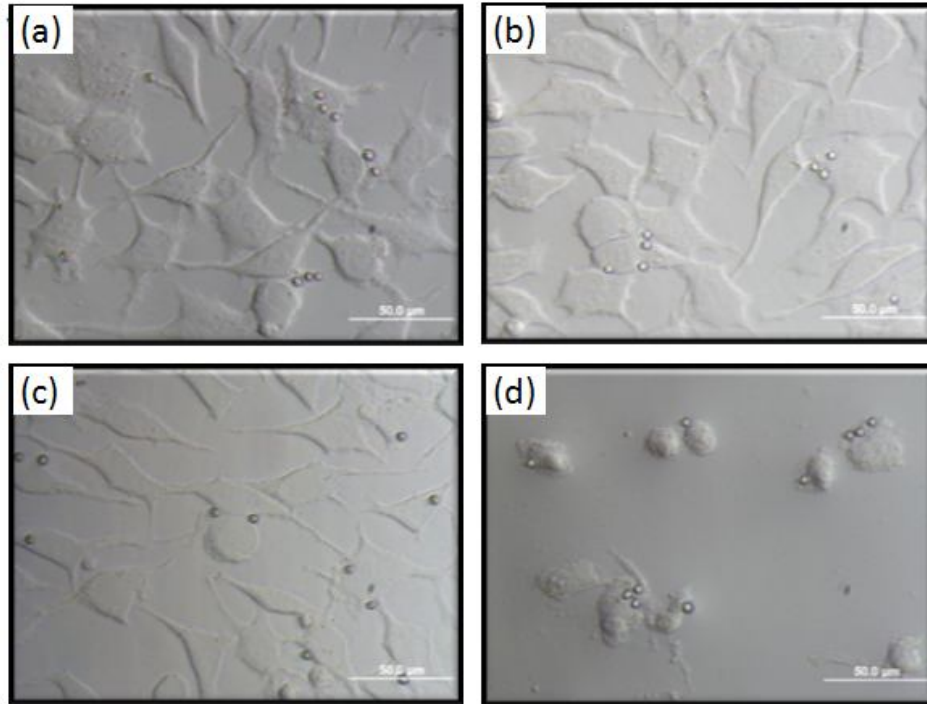
Sharma ve ark. mikro ve nano polimerik partiküllerin şeklinin, fagositozda gerçekleşen yapışma ve içine alma evrelerini nasıl etkilediğini incelemiştir. Çalışma kapsamında, fare makrofaj hücre hattı kullanılarak 100 hücre/µl derişimdeki hücreler 8 kuyucuklu kültür kabına koyularak, 24 saat boyunca inkübe edilmiştir (Sharma et al., 2010). Sunulan çalışmada dört farklı manyetik partikülün, dört farklı derişiminin farklı zaman aralıklarında incelenebilmesi amacıyla 96 kuyucuklu kültür kabı kullanılmıştır. İnkübasyon süresi olarak ise 24 saat alınmıştır.

Hücrelerle etkileştirilen partiküllerin sterilizasyonu için literatürde, ultraviyole ışınları ile sterilizasyon (Karakeçili et al., 2007), otoklav kullanılarak sterilizasyon (Werb and Reynolds, 1974) gibi çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Tez çalışması kapsamında sentezlenen manyetik partiküllerin sterilizasyonu otoklav ile sağlanmıştır. Ancak, makrofaj hücreleri ile partikül etkileşiminde, 60.dakikanın sonunda, iki kez hücre kontaminasyonu olduğu için, etkileşim çalışmasının üç kez tekrarlanması gerekmiştir.

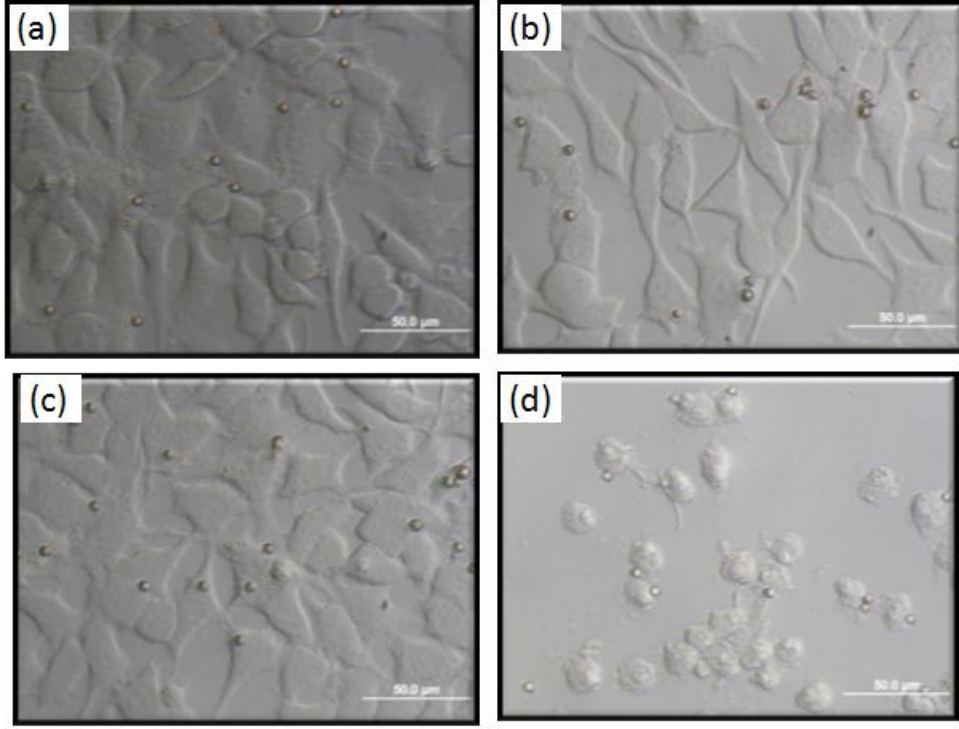
4.4.1 Fibroblastlar ile etkileşim

MYA, MYC, MYD ve MYE kodlu partiküller, derişimleri 1600 partikül/ μ l tampon, 3200 partikül/ μ l tampon, 6400 partikül/ μ l tampon, 12800 partikül/ μ l tampon olacak şekilde fosfat tamponu ile hazırlanmıştır. Her manyetik partikül türünün her ayrı derişim değeri için belli zaman aralıklarında optik mikroskopta görüntüler alınmıştır. 3200 partikül/ μ l tampon derişimine sahip manyetik partiküller ile etkileştirilen hücrelerin 12. (Şekil 4.28.), 24. (Şekil 4.29.), 48. (Şekil 4.30.) ve 72.saatin (Şekil 4.31.) sonundaki görüntüleri alınmıştır.

Tüm zaman aralıklarından görüldüğü gibi MYA, MYC VE MYD kodlu manyetik partiküller, fibroblast hücrelerinin morfolojisinde herhangi bir bozulmaya neden olmamıştır. MYE kodlu manyetik partikül fibroblast hücreleri ile etkileştirildiğinde ise, fibroblast morfolojisi olarak gözlenen içsi uzantıların oluşmadığı ve hücrelerin yüzeye tutunamadığı gözlenmiştir. Şekil 4.28.'de görüldüğü gibi ortama eklenen partiküller hücrelerin üzerlerine çökmüştür.

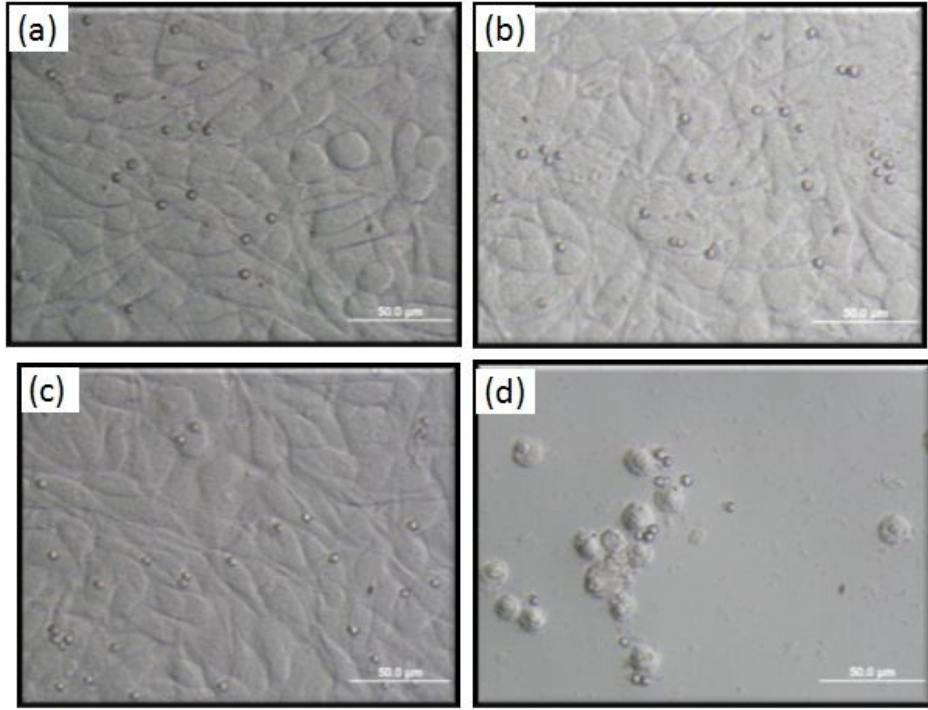


Şekil 4.28. 3200 partikül/ μ l tampon derişimdeki manyetik partiküller ile etkileştirilen L929 hücrelerinin 12.saatin sonunda optik mikroskop altında alınan fotoğrafları. (a) MYA, (b) MYC, (c)MYD, (d) MYE. Büyütme: X400.

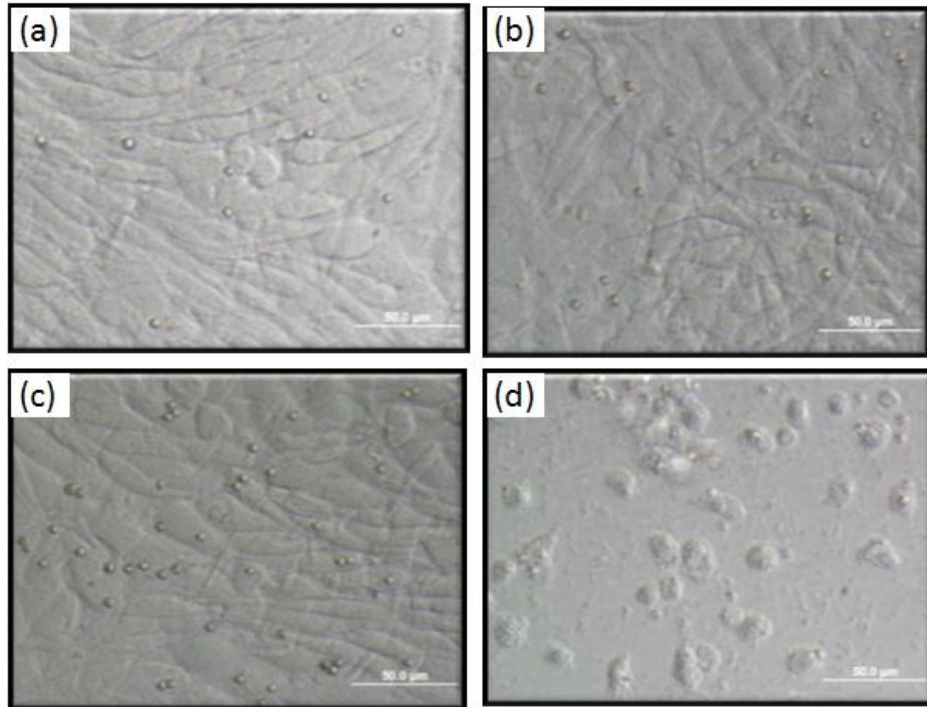


Şekil 4.29. 3200 partikül/µl tampon derişimdeki manyetik partiküller ile etkileştirilen L929 hücrelerinin 24.saatın sonunda optik mikroskop altında alınan fotoğrafları. (a) MYA, (b) MYC, (c)MYD, (d) MYE. Büyütme: X400.

24. saat gözlemlerinde ortama konan partiküller seçici olarak hücre membranlarına yapışmaktadır (Şekil 4.29.). Serbest olarak hücre kültür kabının yüzeyinde partikül gözlenmemektedir. MYE Kodlu partiküllerde de bu davranış devam etmekte, fibroblast hücreleri yüzeye tutunamazken, manyetik partiküller hücre membranına tutunabilmektedir.

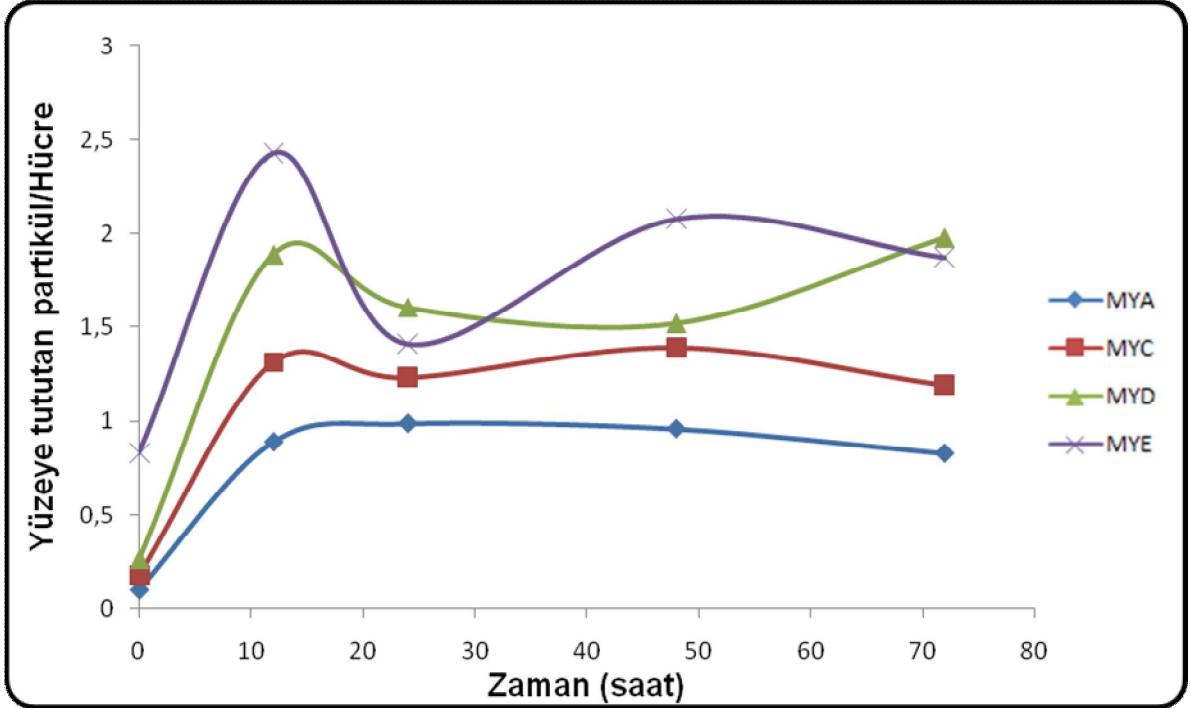


Şekil 4.30. 16000 partikül/5µl tampon derişimdeki manyetik partiküller ile etkileştirilen L929 hücrelerin 48.saatin sonunda optik mikroskop altında alınan fotoğrafları. (a) MYA, (b) MYC, (c)MYD, (d) MYE. Büyütme: X400.



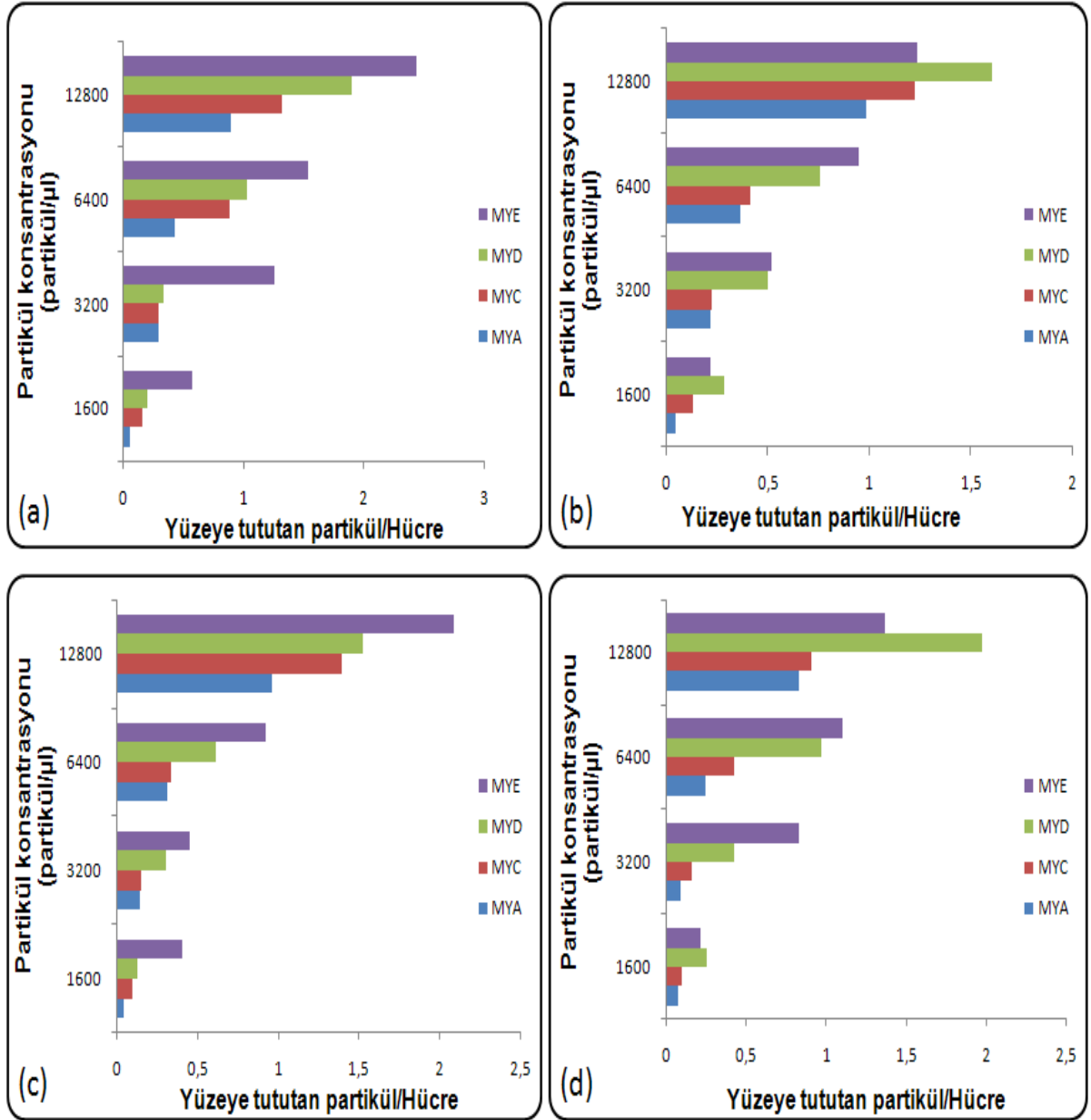
Şekil 4.31. 16000 partikül/5µl tampon derişimdeki manyetik partiküller ile etkileştirilen L929 hücrelerin 72.saatin sonunda optik mikroskop altında alınan fotoğrafları. (a) MYA, (b) MYC, (c)MYD, (d) MYE. Büyütme: X400.

Hızlı çoğalma özelliğine sahip olan fibroblast hücrelerinin sayısının, zamanla birlikte artışı Şekil 4.30. ve Şekil 4.31.'te net olarak görülmüştür. MYE kodlu manyetik partikülün ise, etkileştirildiği L929 hücrelerinin yüzeye tutunma özelliklerini etkilediği ancak 72. saatin sonuna varıldığı zaman halen bir hücre membran bütünlüğünün korunduğu rahatlıkla gözlenmektedir.



Şekil 4.32. 12800 partikül/ μ l tampon derişimdeki MYA, MYC, MYD ve MYE kodlu manyetik partiküllerin fibroblast hücreleri üzerine tutunma davranışının zamana bağlı değişimi.

Şekil 4.32'te manyetik partikül derişimi sabit tutularak, hücre yüzeyine tutunan partiküllerin zamana bağlı değişimi incelenmiştir. Optik mikroskopta alınan görüntülerden de anlaşıldığı gibi fibroblast hücreleri zamanla hızlı bir şekilde çoğalmaktadır. Yine zamana bağlı olarak yüzeye tutunan manyetik partikül miktarında da artış gözlenmektedir. Ancak iki parametre de aynı anda değişim gösterdiği için elde edilen zamana karşı yüzeye tutunan partikül miktarı grafiklerinden, zamanla tutunan partikül miktarındaki artış net olarak gözlenememektedir.



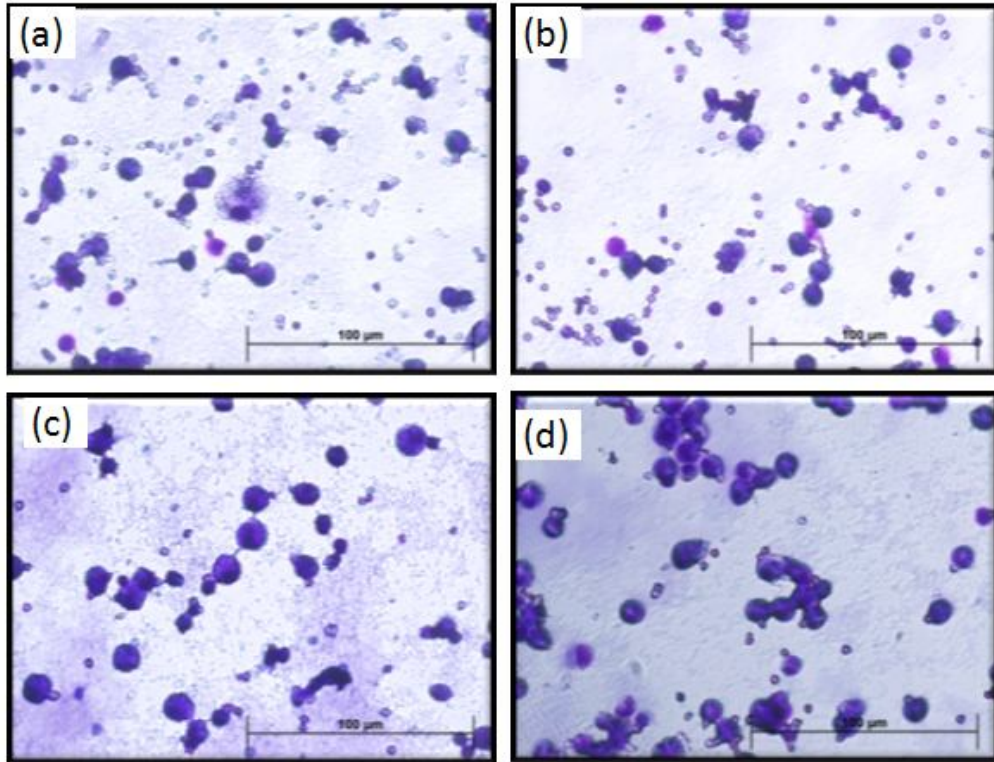
Şekil 4.33. MYA, MYC, MYD ve MYE kodlu manyetik partiküllerin (a) 12., (b) 24., (c) 48., (d) 72. saat sonunda hücre yüzeyine tutunan miktarlarının, etkileştirilen partikül konsantrasyonuna bağlı olarak değişimi.

Şekil 4.33.'den görüldüğü gibi her zaman aralığı için, fibroblast hücreleri ile etkileştirilen partikül miktarı değiştirilmiştir. Hücre ile etkileştirilen manyetik partiküllerin konsantrasyon değeri arttıkça, hücre yüzeyine tutunan partikül miktarı da artmaktadır. Bu durum her zaman aralığı için geçerlidir. Manyetik partiküllerin polimerik filmlerinin içerdiği fonksiyonel gruplar birbirinden farklı olduğundan, partiküllerin hücre yüzeyine tutunma davranışları da farklılık göstermektedir. MYE kodlu manyetik partikülün film tabakası sentezinde dimetil amino etil metakrilat gibi

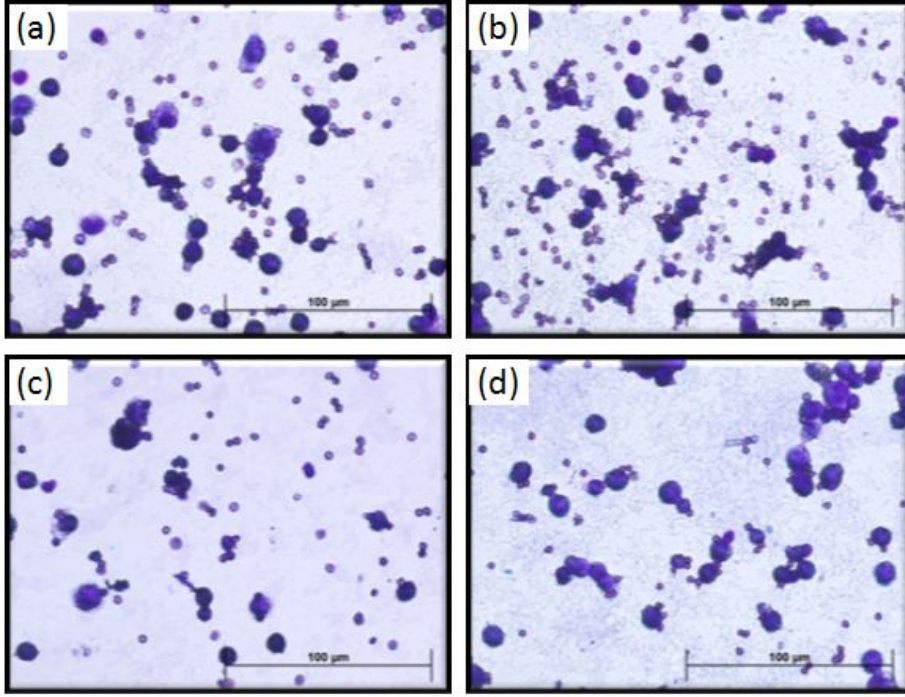
fagositozu arttıran monomer kullanıldığından bu partikülde görülen hücre yüzeyine tutunma davranışı diğer partikül türlerine göre daha fazladır. MYA ve MYC kodlu manyetik partiküllerin film tabakasında fagositozu azaltıcı hidroksil grubu bulunduğundan bu partikül türlerinde gözlenen hücre yüzeyine tutunma miktarı daha az olmuştur.

4.4.2 Makrofajlar ile etkileşim

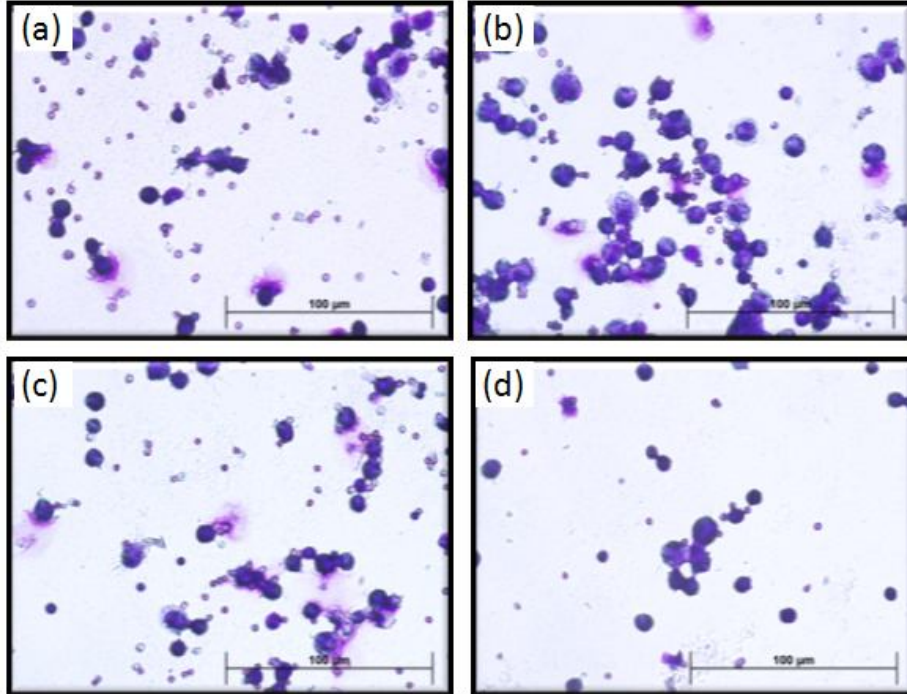
1600 partikül/μl tampon, 3200 partikül/μl tampon, 6400 partikül/μl tampon, 12800 partikül/μl tampon derişimlerinde hazırlanan MYA, MYC, MYD ve MYE kodlu manyetik partiküllerin belli zaman aralıklarında optik mikroskopta görüntüleri alınmıştır. 3200 partikül/μl tampon derişimine sahip manyetik partiküller ile etkileştirilen makrofaj hücrelerinin 10. (Şekil 4.34.), 20. (Şekil 4.35.), 30. (Şekil 4.36.), 60. (Şekil 4.37.) ve 120.dakikanın (Şekil 4.38.) sonundaki görüntüleri alınmıştır.



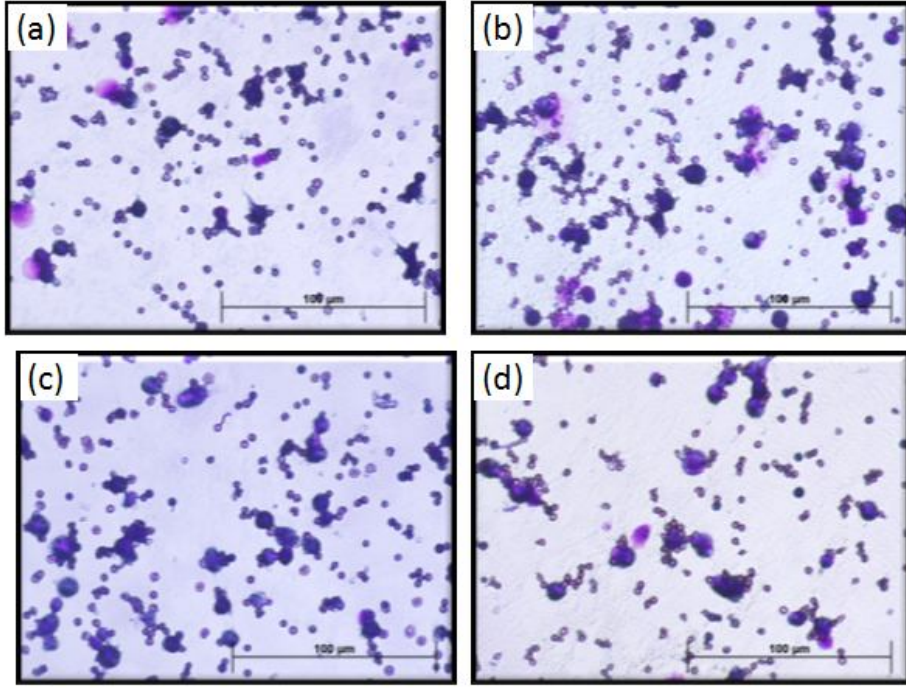
Şekil 4.34. 3200 partikül/μl tampon derişimdeki manyetik partiküller ile etkileştirilen makrofaj hücrelerin 10.dakikanın sonunda optik mikroskop altında alınan fotoğrafları. (a) MYA, (b) MYC, (c)MYD, (d) MYE. Büyütme: X400.



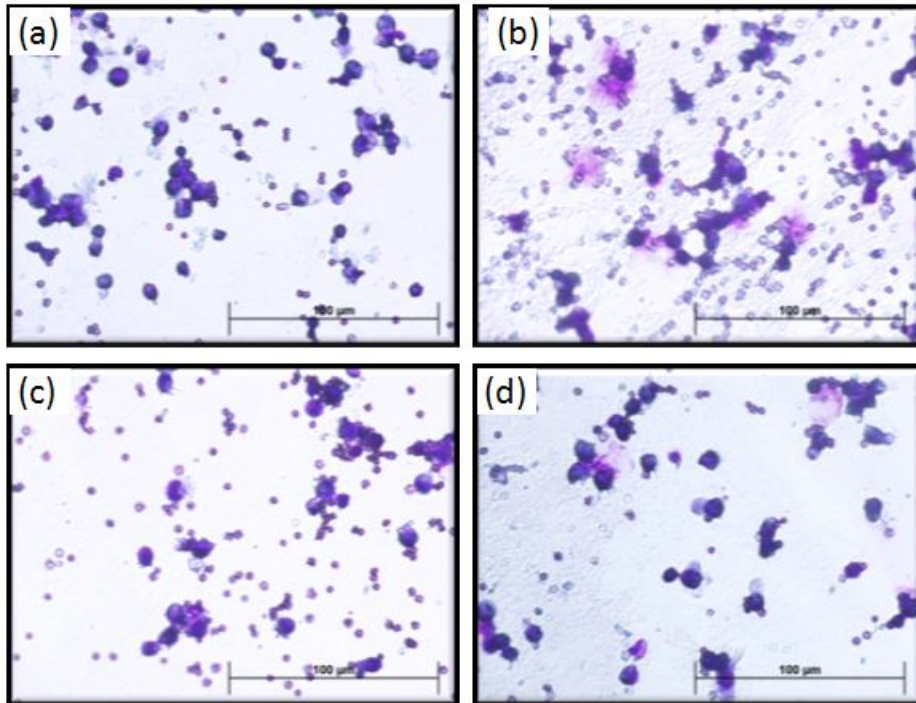
Şekil 4.35. 3200 partikül/µl tampon derişimdeki manyetik partiküller ile etkileştirilen makrofaj hücrelerin 20.dakikanın sonunda optik mikroskop altında alınan fotoğrafları. (a) MYA, (b) MYC, (c)MYD, (d) MYE. Büyütme: X400.



Şekil 4.36. 3200 partikül/µl tampon derişimdeki manyetik partiküller ile etkileştirilen makrofaj hücrelerin 30.dakikanın sonunda optik mikroskop altında alınan fotoğrafları. (a) MYA, (b) MYC, (c)MYD, (d) MYE. Büyütme: X400.



Şekil 4.37. 3200 partikül/µl tampon derişimdeki manyetik partiküller ile etkileştirilen makrofaj hücrelerin 60.dakikanın sonunda optik mikroskop altında alınan fotoğrafları. (a) MYA, (b) MYC, (c)MYD, (d) MYE. Büyütme: X400.

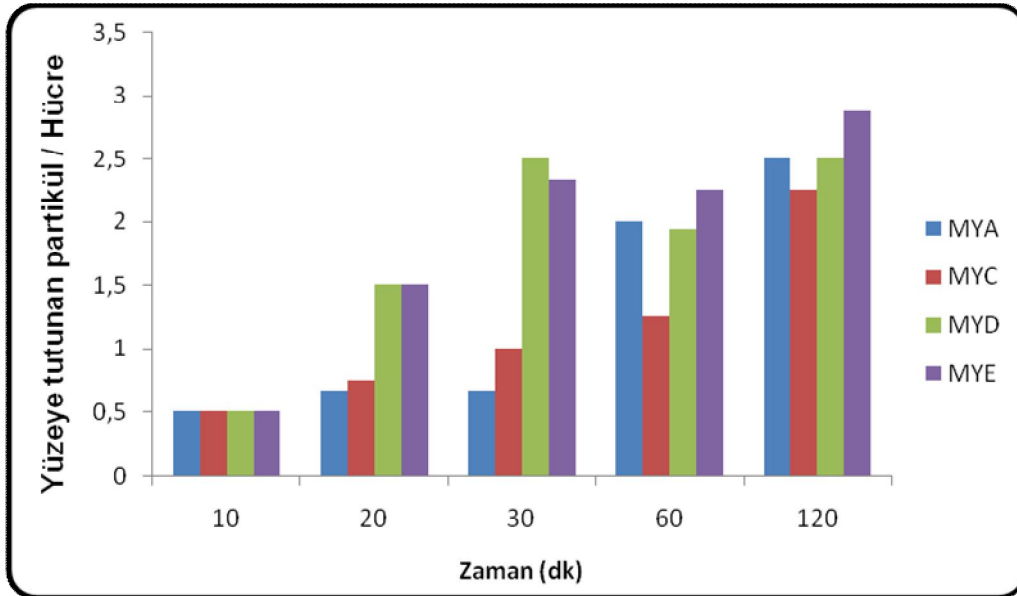


Şekil 4.38. 3200 partikül/µl tampon derişimdeki manyetik partiküller ile etkileştirilen makrofaj hücrelerin 120.dakikanın sonunda optik mikroskop altında alınan fotoğrafları. (a) MYA, (b) MYC, (c)MYD, (d) MYE. Büyütme: X400.

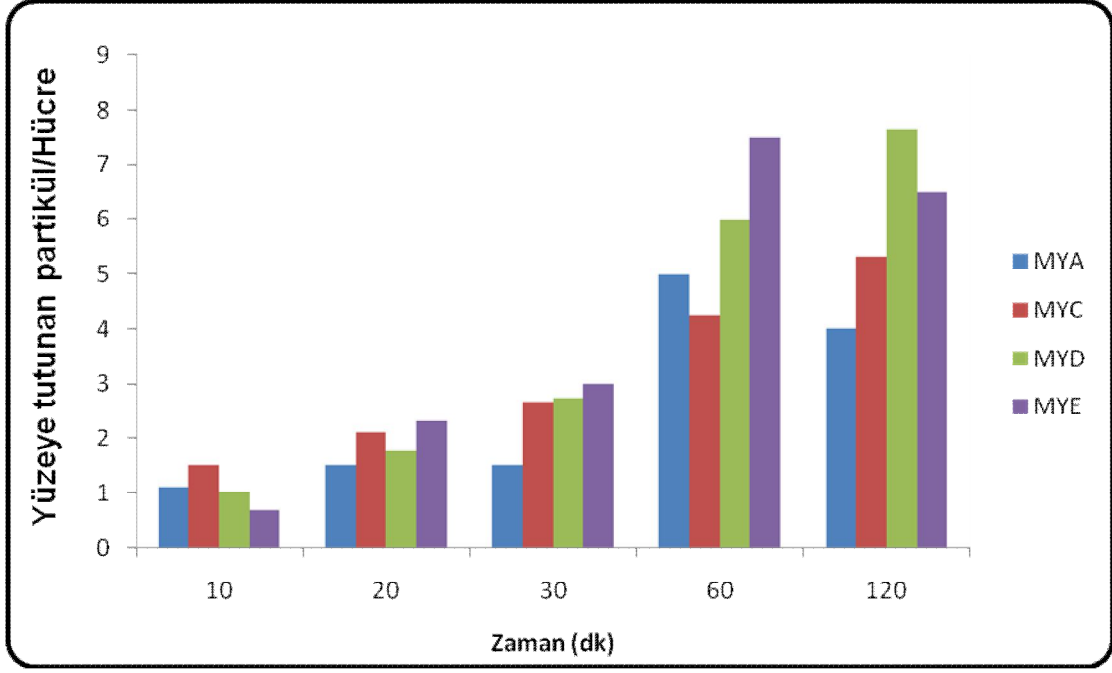
Tüm zaman aralıklarında görüldüğü gibi makrofaj hücrelerinin sayısında zamanla birlikte bir değişim olmadığı ve makrofaj hücrelerinin manyetik polimerik partikülleri fagosite etmediği gözlenmiştir. MYA, MYC, MYD ve MYE kodlu manyetik partiküllerin makrofaj hücrelerinin morfolojisinde bir bozulma ya da değişmeye neden olmadığı görülmüştür.

Genel olarak tüm zaman dilimlerinde kültür kabının yüzeyinde serbest olarak bulunan partiküller gözlenmektedir. Bunun nedeni makrofaj hücrelerinin sabit olmayıp, hareketli hücreler olması ve dolayısıyla partiküllerin bu makrofaj hücre yüzeylerine tutunmasının zorlaşmasıdır. Fibroblast hücreleri ise hareketsiz hücreler olduğundan hücreler üzerine tutunan manyetik partiküller sabit olarak orada kalmıştır.

Şekil 4.39. ve Şekil 4.40.'te manyetik partikül derişimi sabit tutularak, hücre yüzeyine tutunan partiküllerin zamana bağlı değişimi incelenmiştir. Tüm manyetik partikül türlerinde, zamanla birlikte hücre yüzeyine tutunan partikül miktarında artış gözlenmiştir. MYE ve MYD kodlu manyetik partiküldeki tutunma oranının MYA ve MYC kodlu partiküllere göre daha fazla olduğu görülmüştür. Bunun nedeni bu partiküllerin yüzeyinde fagositozu artırıcı grupların yer almasıdır.

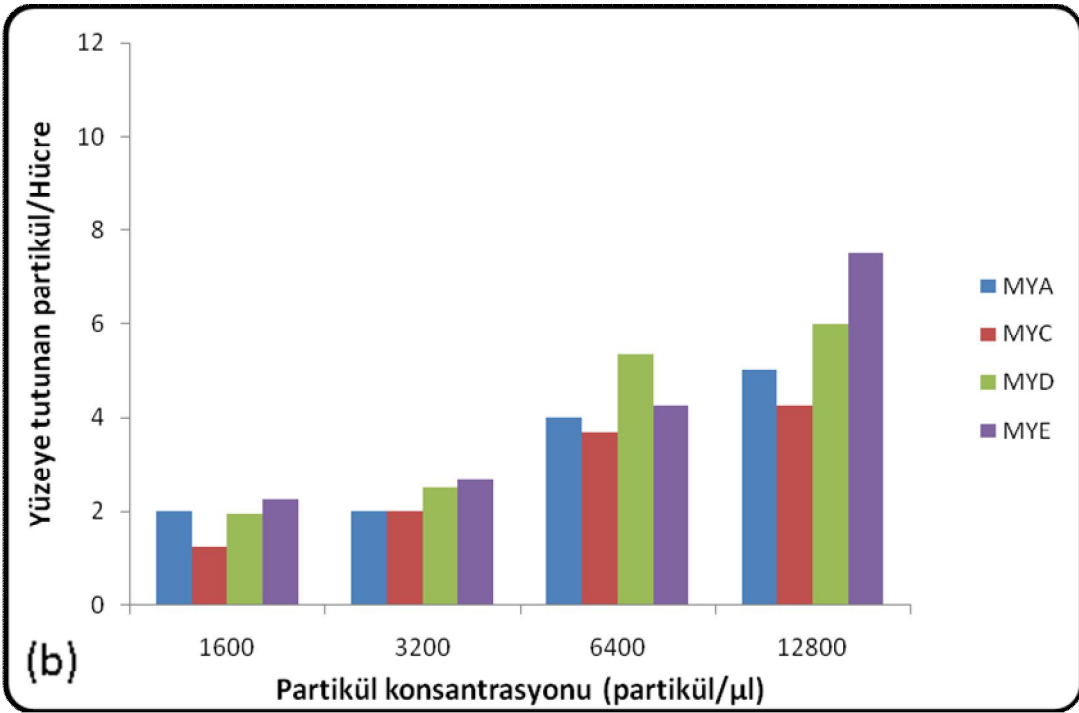
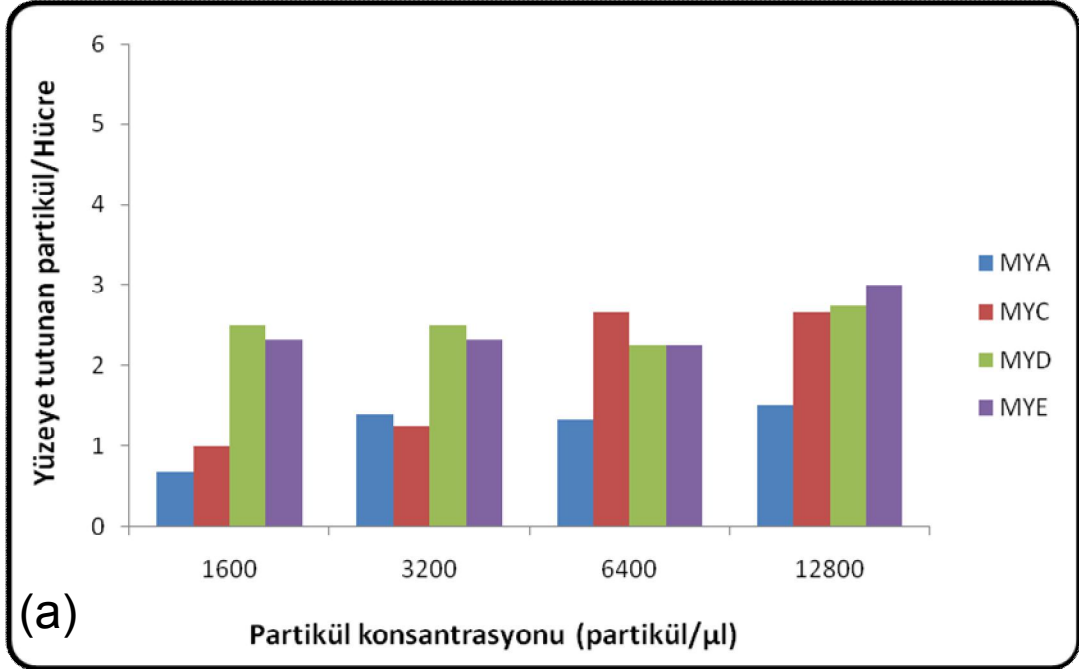


Şekil 4.39. 1600 partikül/µl tampon derişimdeki MYA, MYC, MYD ve MYE kodlu manyetik partiküllerin fibroblast hücreleri üzerine tutunma davranışının zamana bağlı değişimi.



Şekil 4.40. 12800 partikül/ μ l tampon derişimdeki MYA, MYC, MYD ve MYE kodlu manyetik partiküllerin fibroblast hücreleri üzerine tutunma davranışının zamana bağlı değişimi.

Şekil 4.41.'de makrofaj hücreleri ile etkileştirilen manyetik partiküllerin farklı konsantrasyon değerleri için hücre yüzeyine yapışma davranışı incelenmiştir. Etkileştirilen partiküllerin derişim değeri arttıkça, hücre yüzeyine tutunan partikül miktarlarında çok fazla olmamakla birlikte bir artış gözlenmiştir.

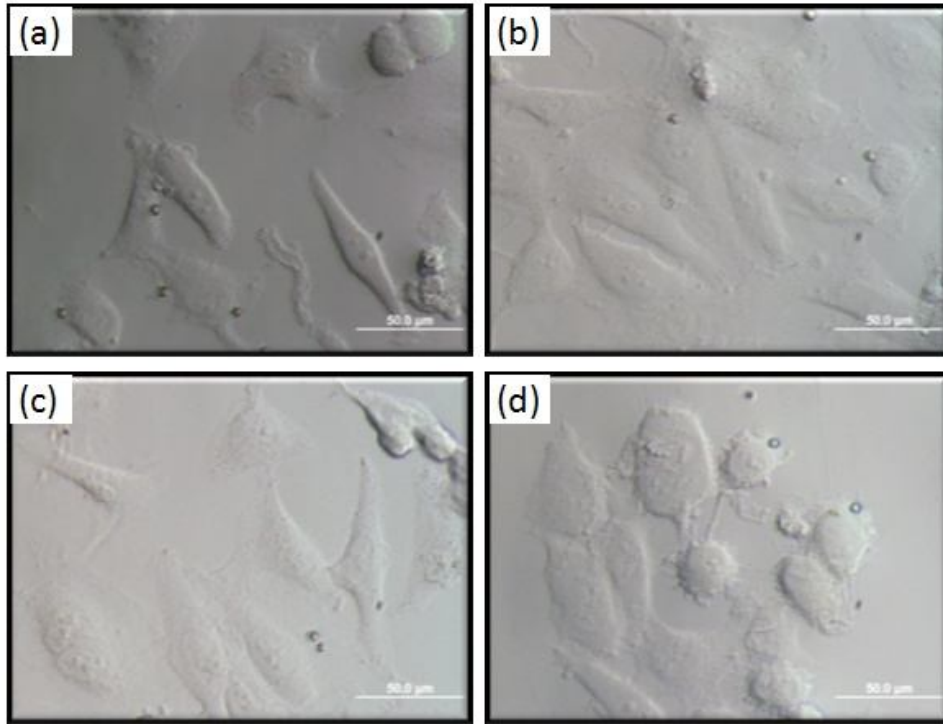


Şekil 4.41. MYA, MYC, MYD ve MYE kodlu manyetik partiküllerin (a) 30., (b) 60. dakikanın sonunda hücre yüzeyine tutunan miktarlarının etkileştirilen partikül konsantrasyonuna bağlı olarak değişimi.

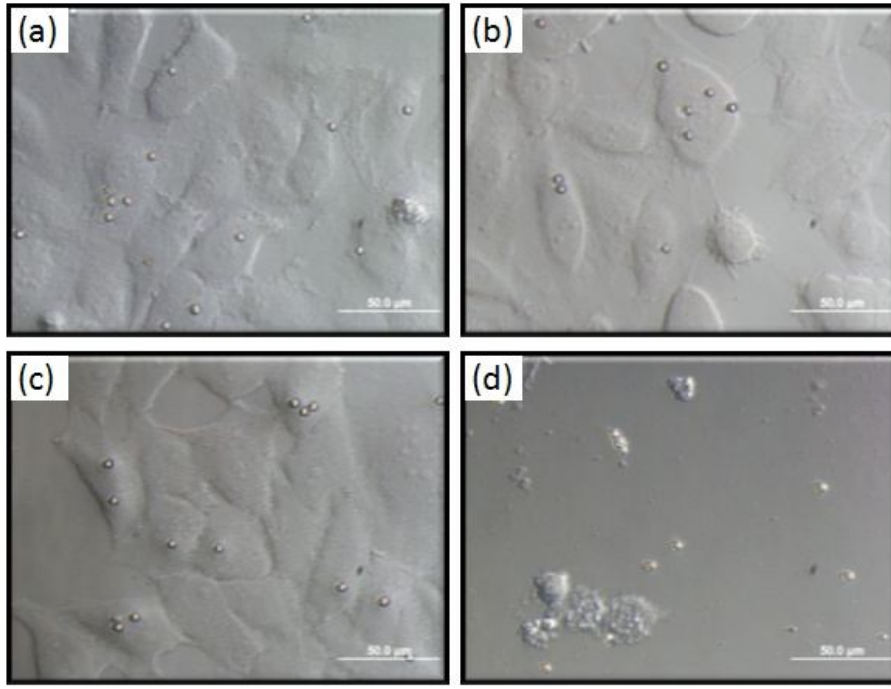
4.4.3 HeLa hücreleri ile etkileşim

3200 partikül/μl tampon derişimine sahip olan manyetik partiküller ile etkileştirilen HeLa hücrelerinin başlangıçtaki (Şekil 4.42.) ve 12. (Şekil 4.43.), 24. (Şekil 4.44.), 48. (Şekil 4.45.) ve 72. (Şekil 4.46.) saatin sonundaki görüntüleri alınmıştır.

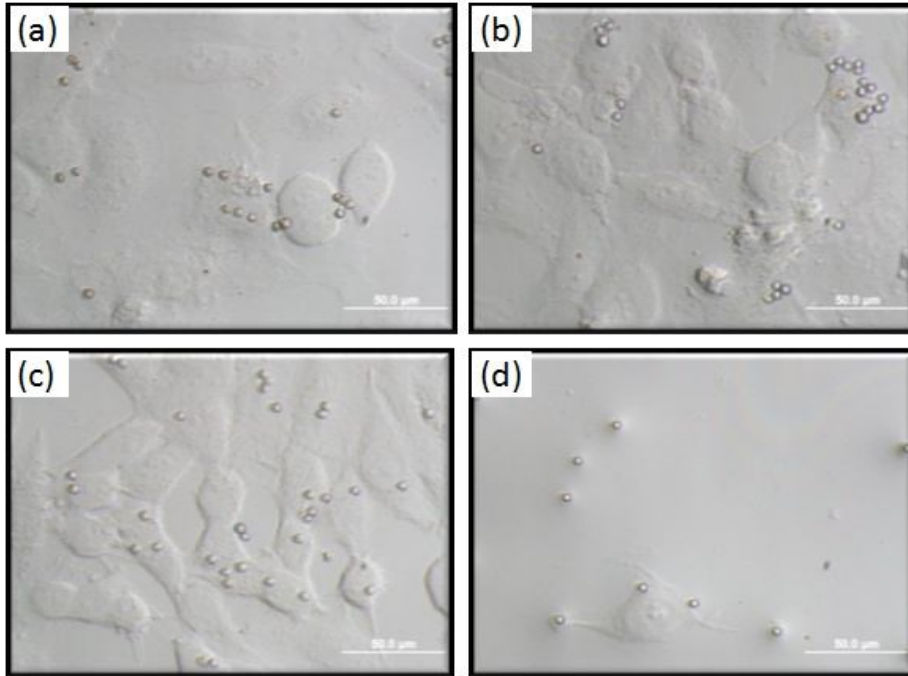
MYA, MYC VE MYD kodlu manyetik partiküllerin HeLa hücrelerinin morfolojisinde herhangi bir bozulmaya neden olmadığı tüm zaman aralıklarında net olarak görülebilmektedir. MYE kodlu manyetik partiküllerin ise HeLa hücrelerinin yüzeye tutunmasını engellediği görülmüştür. Başlangıçta eklenen partiküllerin hücrelerin yüzeyine tutunduğu Şekil 4.42.'te görülmektedir. Şekil 4.43. ve Şekil 4.44.'de manyetik partiküllerin hücrelere doğru seçici olarak gittiği ve hücre üzerine tutunan partikül miktarının arttığı net olarak görülmektedir.



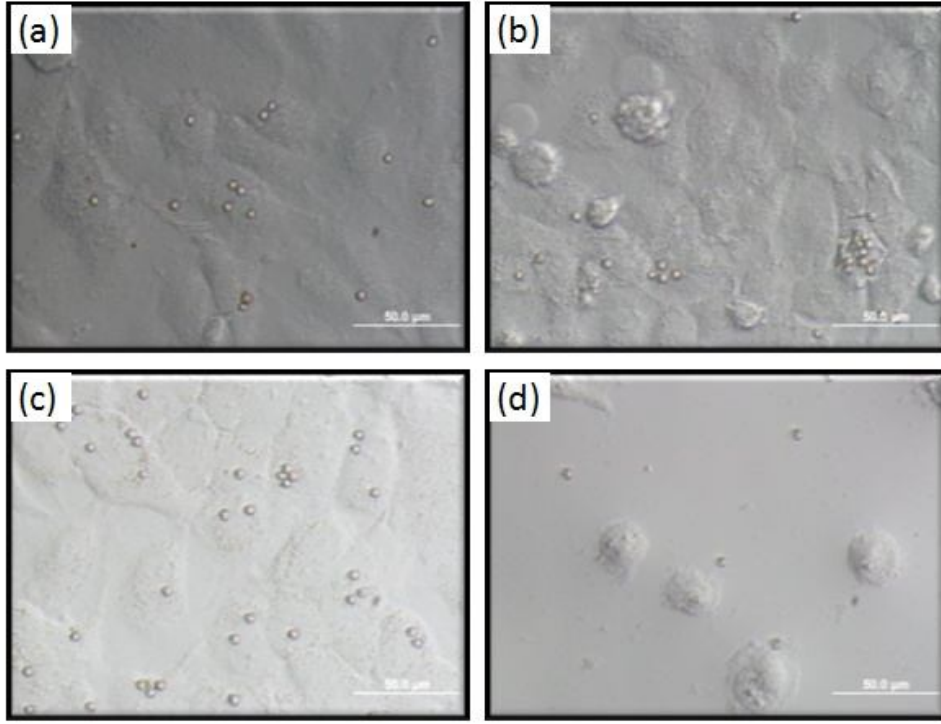
Şekil 4.42. 3200 partikül/μl tampon tampon derişimdeki manyetik partiküller ile etkileştirilen HeLa hücrelerinin başlangıçta optik mikroskop altında alınan fotoğrafları. (a) MYA, (b) MYC, (c)MYD, (d) MYE. Büyütme: X400.



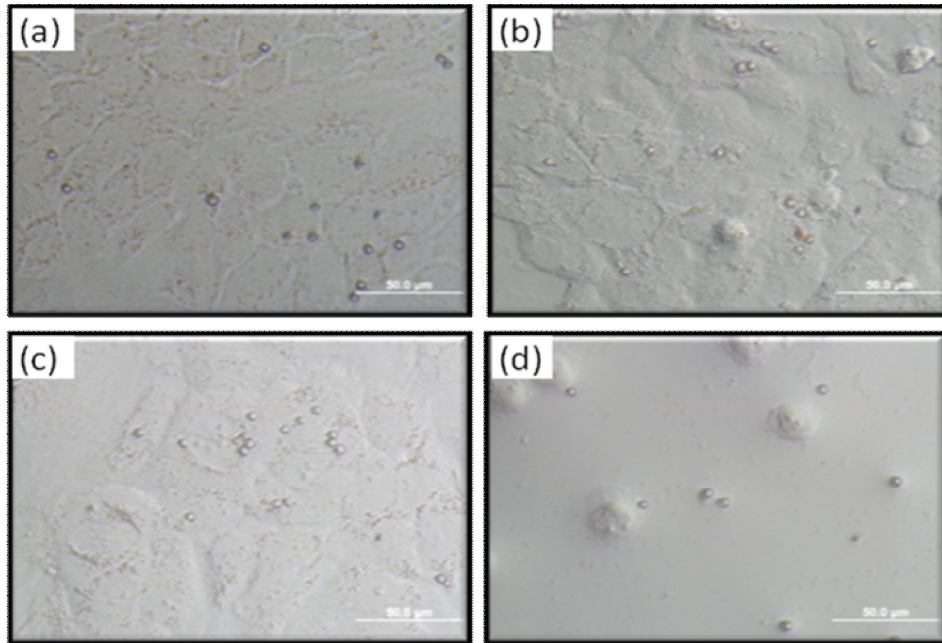
Şekil 4.43. 3200 partikül/µl tampon derişimdeki manyetik partiküller ile etkileştirilen HeLa hücrelerinin 12.saatin sonunda optik mikroskop altında alınan fotoğrafları. (a) MYA, (b) MYC, (c)MYD, (d) MYE. Büyütme: X400.



Şekil 4.44. 3200 partikül/µl tampon derişimdeki manyetik partiküller ile etkileştirilen HeLa hücrelerinin 24.saatin sonunda optik mikroskop altında alınan fotoğrafları. (a) MYA, (b) MYC, (c)MYD, (d) MYE. Büyütme: X400.



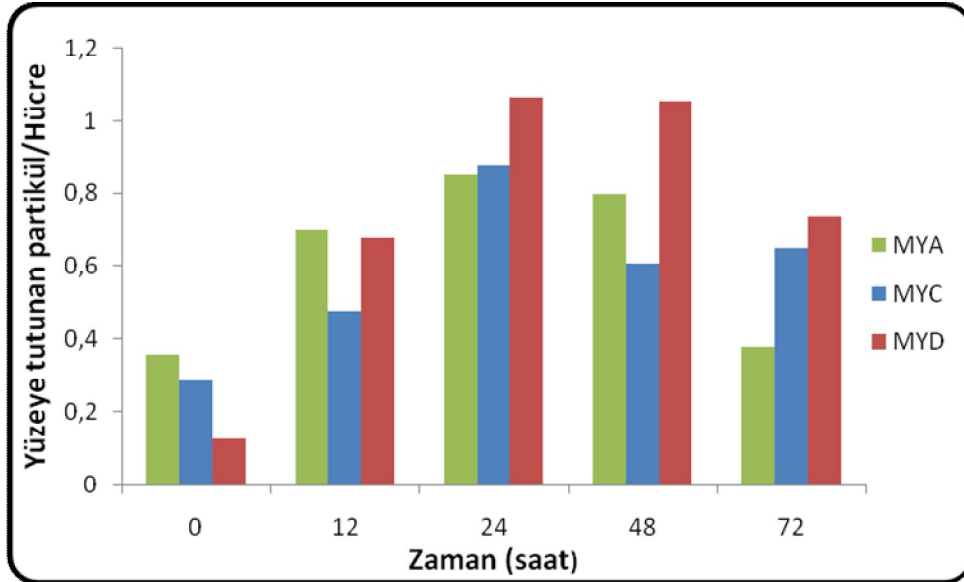
Şekil 4.45. 3200 partikül/µl tampon derişimdeki manyetik partiküller ile etkileştirilen HeLa hücrelerinin 48.saatin sonunda optik mikroskop altında alınan fotoğrafları. (a) MYA, (b) MYC, (c)MYD, (d) MYE. Büyütme: X400.



Şekil 4.46. 3200 partikül/µl tampon derişimdeki manyetik partiküller ile etkileştirilen HeLa hücrelerinin 72.saatin sonunda optik mikroskop altında alınan fotoğrafları. (a) MYA, (b) MYC, (c)MYD, (d) MYE. Büyütme: X400.

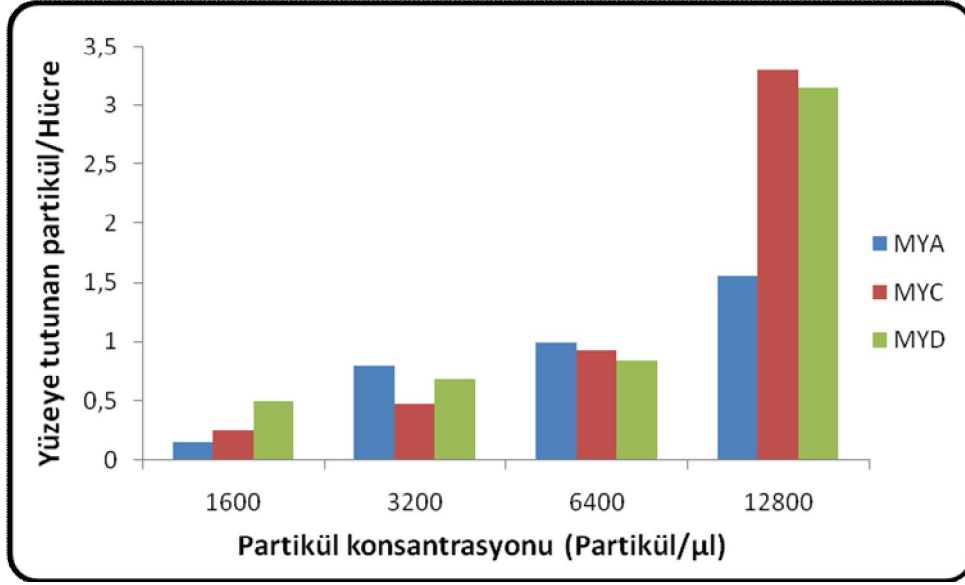
HeLa hücrelerinin sayısının zamanla birlikte artışı Şekil 4.45. ve Şekil 4.46.'dan rahatça görülmektedir. MYE kodlu manyetik partikül dışındaki partikül türleri için tüm zaman aralıklarında alınan görüntülerde hücre yüzeyine tutunmayıp serbest halde bulunan partikül gözlenmemektedir.

Şekil 4.47.'de manyetik partiküllerin zamanla birlikte HeLa hücre yüzeylerine tutunma davranışını göstermektedir. Zaman içerisinde hücre yüzeyine tutunan partikül miktarının artmasına rağmen, HeLa hücreleri de zamanla çoğaldığı için Şekil 4.47.'de net bir artış gözlenmemiştir. Bu nedenle hücre yüzeyine tutunan partikül miktarının partikül konsantrasyonu ile değişimi incelenmiştir.



Şekil 4.47. 3200 partikül/ μ l tampon derişimdeki MYA, MYC ve MYD kodlu manyetik partiküllerin HeLa hücreleri üzerine tutunma davranışının zamana bağlı değişimi.

Şekil 4.48.'de 12.saatın sonunda farklı partikül derişimleri için elde edilen veriler gösterilmiştir. Hücre ile etkileştirilen partikül konsantrasyonu arttıkça, tutunma davranışında meydana gelen artış da rahatça gözlenebilmiştir.



Şekil 4.48. MYA, MYC ve MYD kodlu manyetik partiküllerin 12.saatin sonunda hücre yüzeyine tutunan miktarlarının etkileştirilen partikül konsantrasyonuna bağlı olarak değişimi.

5 SONUÇLAR

- ✓ Çalışmada ilk olarak mikrosüspansiyon polimerizasyonu metodu kullanılarak küresel formda, monodispers ve makrogözenekli poli(GDMA-co-GDGA) partikülleri sentezlenmiştir.
- ✓ Sentezlenen partiküllerin manyetizasyonu için iki farklı yöntem kullanılmıştır.
- ✓ Mikrosüspansiyon polimerizasyonu sırasında gerçekleştirilen manyetizasyon işlemi, kullanılan ilk manyetikleştirme yöntemidir. Sentezlenen manyetik polimerik partiküllerin SEM fotoğraflarından değişim katsayısı değerleri hesaplanarak, bu partiküllerin dar bir boy dağılımına sahip olduğu yani monodispers yapıda oldukları görülmüştür.
- ✓ Sentezlenen manyetik partiküllerin manyetik özelliklerinin incelenmesi amacıyla VSM ile karakterize edilmiştir. Elde edilen manyetizasyon eğrilerinden, partiküllerin süperparamanyetik formda olduğu gözlenmiştir. UV spektrofotometresi ile optik izleme metodu kullanılarak elde edilen verilerin, VSM analizinden elde edilen manyetizasyon eğrileri ile uyduğu gözlenmiştir.
- ✓ Yüzey polimerizasyonunda kullanılan GDMA derişimi etkisi incelenerek, artan GDMA derişimi ile partikül gözenekliliğinin kaybolduğu gözlenmiştir. Ayrıca, artan GDMA derişiminin maddenin manyetik özelliğini azaltıcı yönde etki yaptığı görülmüştür.
- ✓ Farklı manyetik yükleme ile üretilen manyetik partiküllerin SEM fotoğraflarından, yüzeyde ortalama gözenek boyutunun arttığı ve süngerimsi formdaki gözeneklerden, krater tipi gözeneklere geçildiği gözlenmiştir.
- ✓ Manyetik yüklemenin daha fazla olduğu partiküllerin daha yüksek manyetik doygunluk değerine sahip olduğu manyetizasyon eğrilerinden gözlenmiştir.
- ✓ Gliserol dimetakrilat (GDMA), 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) ve metakrilik asit (MAA) monomerleri kullanılarak farklı yüzey fonksiyonel gruplarına sahip manyetik partiküller elde edilmiştir. HEMA ve MAA monomerlerinin, manyetik mikrokürelerin yüzeyinde gözenekliliğin azalmasına ve manyetik özelliklerinin bir miktar azalmasına neden olduğu görülmüştür.

- ✓ Tüm kaplama koşulları sabit tutularak iki farklı NH_4OH derişimi ile manyetik partikül sentezi gerçekleştirilmiştir. NH_4OH derişimi değişiminin partikül ortalama boy ve boy dağılımı üzerinde etkili olmadığı görölrken, NH_4OH derişimi arttırıldığında, demir tuzları daha fazla oranda demir oksite dönuştüğünden partikülün manyetik özelliklerinde bir artış gözlenmiştir.
- ✓ Mikrosüspanسیون polimerizasyonu tamamlandıktan sonra gerçekleştirilen manyetizasyon prosedürü, kullanılan ikinci manyetikleştirme yöntemidir. Bu yöntemle sentezlenen manyetik polimerik partiküllerin SEM fotoğraflarından değişim katsayısı değerleri hesaplanarak, dar bir boy dağılımına sahip olduğu yani monodispers yapıda oldukları görölmüştür. Yine SEM fotoğrafları kullanılarak, sentezlenen manyetik polimerik partiküllerin ortalama çap değerinin $3.73 \mu\text{m}$ olduğu hesaplanmıştır.
- ✓ Sentezlenen manyetik partiküllerin manyetik özelliklerinin incelenmesi amacıyla VSM ile karakterize edilmiştir. Elde edilen manyetizasyon eğrilerinden, partiküllerin süperparamanyetik formda olduğu gözlenmiştir. UV spektrofotometresi ile optik izleme metodu kullanılarak elde edilen verilerin, VSM analizinden elde edilen manyetizasyon eğrileri ile uyuştuğu gözlenmiştir.
- ✓ Yüzey polimerizasyonu sırasında farklı monomer türleri kullanılarak manyetik polimerik partiküller sentezlenmiştir. Kaplamada kullanılan monomer türlerinin değiştirilmesinin partikül boyutu üzerinde etkili olmadığı anlaşılmıştır. Yüzey polimerizasyonunda GDMA monomeri kullanılan MYA kodlu partikülün en iyi manyetik özelliğe sahipken, karboksil fonksiyonel grubuna sahip olan MYD kodlu partikülün en düşük manyetik doygunluk değerine sahip olduğu görölmüştür.
- ✓ BET azot adsorpsiyon sistemi kullanılarak elde edilen yüzey alanı verilerinden, yüzey polimerizasyonunda kullanılan monomer çeşidinin DMAEM olduğu manyetik partikül türünün en düşük yüzey alanına sahip olduğu görölmüştür. GDMA monomeri ile kaplanan manyetik partikül türünün ise en geniş yüzey alanına sahip olduğu görölmüştür.
- ✓ Karboksil fonksiyonel grubuna sahip olan MYD kodlu manyetik partikül türü için potansiyometrik titrasyon çalışması yapılarak 1 g partikül içerisinde 2.16 mmol MAA ve buna bağlı olarak da 2.16 mmol karboksil grubu bağlandığı görölmüştür.

- ✓ Yüzey polimerizasyonu monomeri olarak DMAEM monomeri kullanılan MYE kodlu manyetik partikül türünün içerdiği DMAEM miktarının tayin edilmesi amacıyla elemental analiz yapılmıştır. Analiz sonucunda 1 gram manyetik partikül içerisinde 147,1 mg DMAEM bulunduğu hesaplanmıştır.
- ✓ Tüm polimerizasyon koşulları sabit tutulup sadece polimerik film kaplaması sırasındaki pH değerinin değiştirilmesinin, partiküllerin ortalama partikül çapı ve yüzey morfolojisi üzerinde önemli bir değişikliğe neden olmadığı MYA ve MYC kodlu manyetik partiküllerin SEM fotoğraflarından görülmüştür.
- ✓ Farklı monomer türleri ile hazırlanan MYA, MYD ve MYE kodlu manyetik partiküller ile yapılan BSA adsorpsiyon deneylerinde pH'ın protein adsorpsiyonu üzerindeki etkisi incelenmiş ve pH değişiminin BSA adsorpsiyonuna çok önemli etkisi olduğu görülmüştür. Üç manyetik polimerik partikül türünde de BSA'nın izoelektrik noktası olan pH 5'te maksimum BSA adsorpsiyonu gözlenmiştir. Diğer pH değerlerinde ise protein yüklü halde olduğundan ve çözünürlüğü yüksek olduğundan adsorpsiyon değerleri daha düşük çıkmıştır.
- ✓ BSA konsantrasyonundaki değişimin adsorpsiyona etkisi incelenmiş, başlangıç BSA derişimi arttıkça gram partikül başına adsorplanan BSA miktarının arttığı, 12mg BSA/mL derişiminden sonra ise sabit kaldığı görülmüştür.
- ✓ BSA çözeltisi ile etkileştirilen partikül miktarı değişiminin BSA adsorpsiyonuna etkisi incelenerek, etkileştirilen partikül miktarı arttıkça partikül başına adsorplanan BSA miktarında azalma olduğu görülmüştür.
- ✓ Adsorpsiyon kinetiği çalışmasında zamanla adsorplanan BSA miktarı değişimi incelenmiş, adsorplanan miktarın zamanla artış gösterdiği ancak 2. Saatin sonunda sabitlenerek dengeye geldiği görülmüştür.
- ✓ pH 9 borat tamponu ile yapılan desorpsiyon çalışmasında BSA'nın manyetik partiküllerden desorpsiyonunun kantitatif olduğu, pH 8 HEPES tamponu ile yapılan adsorpsiyon çalışmasında ise BSA desorpsiyonunun zorlaştığı görülmüştür.
- ✓ L929 ve HeLa hücre etkileşimlerinde, zaman içerisinde hücre yüzeyine tutunan partikül miktarının artmasına rağmen, L929 ve HeLa hücreleri de

zamanla çoğaldığı için zamana bağlı olarak yüzeye tutulan partikül miktarının arttığı net olarak gözlenememiştir.

- ✓ Belli bir zaman aralığında, hücre ile etkileştirilen manyetik partiküllerin konsantrasyon değeri arttıkça, hücre yüzeyine tutunan partikül miktarının da arttığı görülmüştür.
- ✓ Partiküllere yapışma ve aktif olarak fagosite etme yeteneği bulunan makrofaj hücreleri, manyetik partiküller ile etkileştirilerek, partiküllere karşı olan davranışı incelenmiştir. Zamana bağlı olarak tüm guruplarda fagosite edilen/yüzeye tutulan partikül miktarının arttığı görülmüştür.
- ✓ L929 ve HeLa hücre etkileşimlerinde ortamda serbest partikül gözlenmezken (partiküler hücrelerin yüzeyinde görülürken), alveolar makrofajlarda ortamda serbest halde partiküller gözlenmiştir. Bu serbest haldeki partiküllerden dolayı hücreye aktif olarak partiküllerin yönelmedikleri, ancak zamana bağlı olarak tutulan partikül sayılarındaki artışın, hücrenin partiküllere doğru yönelmesinden kaynaklandığı şeklinde yorumlanmıştır.
- ✓ L929 ve HeLa hücre çalışmalarında, DMAEM fonksiyonel gruplarını içeren MYE kodlu partikülün bu hücrelerin membranına tutunabildiği ancak, bu hücrelerin yüzeye tutunmasını engellediği gözlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Amsden, B., 1998, Solute Diffusion within Hydrogels: Mechanisms and Models, *Macromolecules*, 31, 8382-8395.
- Arruebo, M., Fernández-Pacheco, R., Ibarra, M.R., Santamaría, J., 2007, Magnetic nanoparticles for drug delivery, *nanotoday*, 2, 22-32.
- Benamer, S., Mahlous, M. , Boukrif, A. , Mansouri, B. , Youcef, S. L., 2006, Synthesis and characterisation of hydrogels based on poly(vinyl pyrrolidone), *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 248, 284–290.
- Breulmann, M., Cölfen, H., Hentze, H.P., Antonietti M., Walsh, D., Mann, S., 1998, Elastic magnets: Template-controlled mineralization of iron oxide colloids in a sponge-like gel matrix, *Advanced Materials*, 10, 237-241.
- Camli, S. T., Unsal, E., Senel, S., Tuncel A., 2004, Chromatographic Performance of Monodisperse Macroporous Particles Produced by Modified Seeded Polymerization. II. The Effect of the Diluent/Seed-Latex Ratio, *Journal of Applied Polymer Science*, 92, 3685-3696.
- Deligkaris, K., Tadele T.S., Olthuis, W., van den Berg, A., 2010, Hydrogel-based devices for biomedical applications, *Sensors and Actuators B*, 147, 765–774.
- Denkbas, E.B., Kilicay, E., Birlikseven, C., Ozturk, E., 2002, Magnetic chitosan microspheres: preparation and characterization, *Reactive and Functional Polymers*, 50, 225-232.
- Elaissari, A., Sauzedde, F., Montagne, F., Pichot, C., 2003, Preparation of Magnetic Latices. *Colloidal Polymers Synthesis and characterization*. Elaissari A., (ed.), *Surfactant Science Series*, New York. 285-318.
- Fang, F., Szleifer, I., 2001, Kinetics and Thermodynamics of Protein Adsorption: A Generalized Molecular Theoretical Approach, *Biophysical Journal*, 80, 2568-2589.
- Figuerola, A., Di Corato, R., Manna, L., Pellegrino, T., 2010, From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications, *Pharmacological Research*, 62, 126-143.
- Galia, M., Svec, F., Fréchet, J.M.J., 1994, Monodisperse Polymer Beads as Packing Material for High-performance Liquid Chromatography. Effect of Divinylbenzene Content on the Porous and Chromatographic Properties of Poly(styrene-co-divinylbenzene) Beads Prepared in Presence of Linear Polystyrene as a Porogen, *Journal of Polymer Science-Polymer Chemistry Edition.*, 32, 2169-2175.

- Gruttner, C., Teller, J., Schutt, W., Westphal, F., Schumichen, C., Paulke, B. R., 1997, Preparation and characterization of magnetic nanospheres for in vivo application. Scientific and clinical applications of magnetic carriers. Häfeli, U., Schütt, W., Teller, J., Zborowski, M. (eds.), Plenum Press, New York. 53-68.
- Gupta, A.K., Gupta, M., 2005, Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications, *Biomaterials*, 26, 3995–4021.
- Hamidi, M., Azadi, A., Rafiei, P., 2008, Hydrogel nanoparticles in drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, 1638–1649.
- Hennink, W.E., van Nostrum, C.F., 2002, Novel crosslinking methods to design hydrogels, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 13–36.
- Hoffman, A.S., Hydrogels for biomedical applications, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 43, 3–12.
- Indira, T.K., Lakshmi, P.K., 2010, Magnetic nanoparticles – A Review, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*, 3, 1035-1042.
- Internet: Todar K., 2004, Online Textbook of Bacteriology, <http://www.textbookofbacteriology.net/index.html>.
- Jiang, D., Long, S., Huang, J., Xiao, H., Zhou, J., 2005, Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase on magnetic chitosan microspheres, *Biochemical Engineering Journal*, 25, 15–23.
- Jose, A.J., Ogawa, S., Bradley, M., 2005, Tuning the pore size and surface area of monodisperse Poly(Methyl Acrylate) beads via parallel seeded polymerisation, *Polymer*, 46, 2880–2888.
- Karumanchi, R.S.M.S., Doddamane, S.N., Sampangi, C., Todd, P.W., 2002, Field-assisted extraction of cells, particles and macromolecules, *Trends in Biotechnology*, 20, 72–78.
- 5.1.1 Khng, H.P., Cunliffe, D., Davies, S., Turner, N.A., Vulfson, E.N., 1998, The synthesis of sub-micron magnetic particles and their use for preparative purification of proteins, *Biotechnology and Bioengineering*, 60, 419-424.
- Kim, J.H., Yoon, J.Y., 2004, Protein adsorption on polymer particles. *Encyclopedia of Surface and Colloid Science*. Somasundaran, P., Dekker, M. (eds.), New York, 1-5.
- Kim, J.W., Suh, K.D., 2000, Monodisperse micron-sized polystyrene particles by seeded polymerization: effect of seed crosslinking on monomer swelling and particle morphology, *Polymer*, 41, 6181-6188.
- Kondo, A., Fukuda, H., 1997, Preparation of Thermo-Sensitive Magnetic Hydrogel Microspheres and Application to Enzyme Immobilization, *Journal of fermentation and bioengineering*, 84, 337-341.

- Lin, W., Biegler, L.T., Jacobson A.M., 2010, Modeling and optimization of a seeded suspension polymerization process, *Chemical Engineering Science*, 65, 4350–4362.
- Ma, Z., Liu, H., 2007, Synthesis and surface modification of magnetic particles for application in biotechnology and biomedicine, *China Particuology*, 5, 1-10.
- Mahmoudi, M., Sant, S., Wang, B., Laurent, S., Sen, T., 2011, Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, 24-46.
- Mason, M.N., Metters, A.T., Bowman, C.N., Anseth, K.S., 2001, Predicting Controlled-Release Behavior of Degradable PLA-b-PEG-b-PLA Hydrogels, *Macromolecules*, 34, 4630-4635.
- Massart, R., 1981, Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media, *IEEE Transactions on Magnetics*, 17, 1247–1248.
- Mathur, A.M., Moorjani, S.K. , Scranton, A.B., 1996, Methods for Synthesis of Hydrogel Networks: A Review, *Journal of Macromolecular Science-Reviews in Macromolecular Chemistry and Physics*, 36, 405-430.
- Medeiros, S.F., Santos, A.M., Fessi H., Elaissari, A., 2011, Stimuli-responsive magnetic particles for biomedical applications, *International Journal of Pharmaceutics*, 403, 139–161.
- Molday, R.S., Molday, L.L., 1984, Separation of cells labeled with immunospecific iron dextran microspheres using high gradient magnetic chromatography, *Federation of European Biochemical Societies*, 170, 232-238.
- Müller-Schulte, D., Fussl, F., de Cuyper, M., 1997, Novel magnetic microcarriers on the basis of poly(vinyl alcohol) for biomedical analysis. Scientific and clinical applications of magnetic carriers. Häfeli, U., Schütt, W., Teller, J., Zborowski, M. (eds.), Plenum Press, New York. 94-108.
- Natelson, D., Yu, L.H., Ciszek, J.W., Keane, Z.K., Tour, J.M., 2006, Single-molecule transistors: Electron transfer in the solid state, *Chemical Physics*, 324, 267-275.
- Okubo M., Yamashita T., Suzuki T. , Shimizu T., 1997, Production of micron-sized monodispersed composite polymer particles by seeded polymerization utilizing the dynamic swelling method, *Colloid and Polymer Science* , 275, 288-292.
- Pal, K., Banthia, A. K., Majumdar, D.K., 2009, Polymeric Hydrogels: Characterization and Biomedical Applications, *Designed Monomers and Polymers*, 12, 197–220.

- Park, J.I., Saffari, A., Kumar, S., Gunther, A., Kumacheva, E., 2010, Microfluidic synthesis of polymer and inorganic particulate materials, *Annual Review of Materials Research*, 40, 415-443.
- 5.1.2 Peng, Z.G., Hidajat, K., Uddin, M.S., 2004, Adsorption of bovine serum albumin on nanosized magnetic particles, *Journal of Colloid and Interface Science*, 271, 277–283.
- Philippova, O., Barabanova A., Molchanov V., Khokhlov A., 2011, Magnetic polymer beads: Recent trends and developments in synthetic design and applications, *European Polymer Journal*, 47, 542-559.
- Prestvik, W. S., Berge, A., Mørk, P. C., Stenstad, P. M., Ugelstad, J., 1997, Preparation and application of monosized magnetic particles in selective cell separation. *Scientific and clinical applications of magnetic carriers*. Häfeli, U., Schütt, W., Teller, J., Zborowski, M. (eds.), Plenum Press, New York. 11–36.
- Qu, S., Yang, H., Ren, D., Kan, S., Zou, G., Li, D., Li, M., 1999, Magnetite nanoparticles prepared by precipitation from partially reduced ferric chloride aqueous solutions, *Journal of Colloid and Interface Science*, 215, 190-192.
- Ruuge, E.K., Rusetski, A.N., 1993, Magnetic fluids as drug carriers: Targeted transport of drugs by a magnetic field, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 122, 335-339.
- Safarik, I., Safarikova, M., 1993, Batch isolation of hen egg white lysozyme with magnetic chitin, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 27, 327-330.
- Saravanan, M., Bhaskar, K., Maharajan, G., Pillai, K. S., 2004, Ultrasonically controlled release and targeted delivery of diclofenac sodium via gelatin magnetic microspheres, *International Journal of Pharmaceutics*, 283, 71–82.
- Schmidt, A.M., 2007, Thermoresponsive magnetic colloids, *Colloid and Polymer Science*, 285, 953-66.
- Shamim, N., Hong, L., Hidajat, K., Uddin, M.S., 2006, Thermosensitive-polymer-coated magnetic nanoparticles: Adsorption and desorption of Bovine Serum Albumin, *Journal of Colloid and Interface Science*, 304, 1–8.
- Srisopa, A., Ali, A. M. I., Mayes A.G., 2011, Understanding and Preventing the Formation of Deformed Polymer Particles during Synthesis by a Seeded Polymerization Method, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 49, 2070-2080.

- Sugimoto, T., Matijevic, E., 1980, Formation of uniform spherical magnetite particles by crystallization from ferrous hydroxide gels, *Journal of Colloid and Interface Science*, 74, 227–243.
- Sun C., Lee J.S.H., Zhang M., 2008, Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, 1252–1265.
- Thiele, L., Rutishauser, B.R., Jilek, S., Allenspach, H.W., Merkle, H.P., Walter E., 2001, Evaluation of particle uptake in human blood monocyte-derived cells in vitro. Does phagocytosis activity of dendritic cells measure up with macrophages?, *Journal of Controlled Release*, 76, 59–71.
- Tuncel A., Tuncel M., Ergun B., Alagöz C., Bahar T., 2002, Carboxyl carrying-large uniform latex particles, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 197, 79–94.
- Ugelstad, J., Ellingsen, T., Berge, A., Helgee, B., 1983, Magnetic polymer particles., WO Pat., 8,303,920.
- Ugelstad, J., Mørk, P.C., Kaggerud, K.H., Ellingsen, T., Berge, A., 1980, Swelling of oligomer-polymer particles. New methods of preparation of emulsions and polymer dispersions, *Advances in Colloid and Interface Science*, 13, 101-140.
- Ulijn, R.V., Bibi, N., Jayawarna, V., Thornton, P.D., Todd, S.J., Mart, R.J., Smith, A.M., Gough, J.E., 2007, *Materials Today*, 10, 40-48.
- Unsal, E., Camlı, S.T., Tuncel M., Senel S., Tuncel A., 2004, Monodisperse-porous particles with different polarities by“modified seeded polymerization” and their use as chromatographic packing in HPLC, *Reactive and Functional Polymers*, 61, 353–368.
- Wang, Q.C., Hosoya, K., Svec, F., Fréchet, J.M.J., 1992, Polymeric Porogens Used in the Preparation of Novel Monodispersed Macroporous Polymeric Separation Media for High-Performance Liquid Chromatography, *Analytical Chemistry*, 64, 1232-1238.
- Yoon, J.Y., Kim, J.H., Kim, W.S., 1998, Interpretation of protein adsorption phenomena onto functional microspheres, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 12, 15-22.
- Yuan, Q., Williams, R.A., 2007, Large scale manufacture of magnetic polymer particles using membranes and microfluidic devices, *China Particuology*, 5, 26–42.
- Zhang, J., Xu, S., Kumacheva, E., 2004, Polymer microgels reactors for semiconductor, metal, and magnetic nanoparticles, *Journal of the American chemical society*, 126, 7908–7914.

Zhang, Q., Han, Y., Wang, W., Song, T., Chang J., 2010, A theoretical and experimental investigation of the size distribution of polystyrene microspheres by seeded polymerization, *Journal of Colloid and Interface Science*, 342, 62–67.

Zharnikova, A.V., Thiercelin, M., Grinberg, V.Y., Grinberg, N.V., Barabanova, A.I., Vasilieva, O.V., Filippova, O.E., Khokhlov, A.R., 2009, Magnetic polymer granules and a method for forming a locking gel plug, Patent Application, WO/088319.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Selin SAĞLAM

Doğum Yeri : Trabzon-TÜRKİYE

Doğum Yılı : 1984

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu :

Lise : 1999-2003 Kanuni Anadolu Lisesi

Lisans : 2003-2005 Hacettepe Üniversitesi, Kimya
2005-2008 Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği

Yüksek Lisans : 2008-2011 Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,
Kimya Mühendisliği Anabilimdalı

Yabancı Dil : İngilizce, Almanca

İş Tecrubesi :

01/07/2006-01/08/2006 Türkiye Petrolleri Anonim Ortaklığı/ ANKARA