



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOUYUMLU AKILLI POLİMERİK NANOPARÇACIK GELİŞTİRİLMESİ VE KONTROLLÜ İLAÇ SALINIM UYGULAMALARI

Mehmet ULAŞAN

DOKTORA TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Haziran-2014
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

DOKTORA TEZİ

BİYOUYUMLU AKILLI POLİMERİK NANOPARÇACIK GELİŞTİRİLMESİ VE KONTROLLÜ İLAÇ SALINIM UYGULAMALARI

Mehmet ULAŞAN

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

1. Danışman: Prof. Dr. Yunus ÇENGELOĞLU
2. Danışman: Doç. Dr. Mustafa Selman YAVUZ

2014, 115 Sayfa

Jüri
Prof. Dr. Yunus ÇENGELOĞLU
Prof. Dr. Nihat TINKILIÇ
Prof. Dr. Erol PEHLİVAN
Doç Dr. Gülşin ARSLAN
Doç Dr. Yasemin ÖZTEKİN

Sıcaklık, pH, manyetik alan, indirgenlik gibi çevresel değişikliklere hızlı tepki veren akıllı polimerler son yıllarda büyük ilgi görmektedir. Bu çalışmada sıcaklık değişimine hassas özellikte olan poli(etilen glikol) metil eter metakrilat (PEGMA)-ko-N-vinil prolidon (NVP) polimer nanoparçacıkları elde edildi. Disülfit bağı içeren çapraz bağlayıcı kullanılarak sentezlenen PEGMA nanoparçacıkları, dinamik ışık saçılımı (DLS) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterize edildi. Polimerleşme kinetiği, çapraz bağlayıcı ve başlatıcı derişiminin nanoparçacık ortalama hidrodinamik çapı ile polidispersite indeksi üzerindeki etkisi araştırıldı. Sıcaklık değişimine hassa olduğu tespit edilen PEGMA nanoparçacıklarının 22-40 ^{o}C arası termal kararlılığı incelendi. Parçacıkların ilaç salım sistemi olarak kullanılabilir özellikte olup olmadığını araştırmak amacıyla, birisi ilaç etkin maddesi, diğeri protein benzeri uzun zincir yapılı olmak üzere iki farklı boyar madde nanoparçacık ortamına hapsedildi. Birinci boyar madde olarak rhodamine B (λmax= 554 nm), ikinci olarak PEG (MW= 4000)-Alizarin sarısı (λmax= 372 nm) kullanıldı. Aynı nanokapsül içine her iki boyar madde aynı anda hapsedildi. İkili boyar madde taşıyan nanokapsül, ilk olarak oda sıcaklığında daha sonra 37 ^{o}C'de ve devamında ditiyotreitol (DTT) indirgen maddesi ile etkileştirilerek içindeki boya salımı UV-Vis cihazı ile takip edildi. Sonuç olarak, boya yüklü nanokapsüllerin oda sıcaklığında salım yapmadığı, 37 ^{o}C'nin biraz üzerinde rhodamine B boyar maddesinin büyük oranda salım olduğu ancak PEG-Alizarin sarısının bu sıcaklıkta hiç salım yapmadığı ölçüldü. Devamında, DTT ile etkileştirilen nanopapsüller çapraz bağın kırılması ile PEG-Alizarin sarısı boyanın ortama salım yaptığı tespit edildi. PEGMA nanoparçacıklarının biyouyumlu oldukları 24 ve 48 saatlik hücre uygulaması ile belirlendi. Çalışmanın neticesinde, ilk olarak, disülfit çapraz bağlı PEGMA nanoparçacıklarının ikili ilaç/boyar madde salımına yönelik biyouyumlu polimerik nanoparçacık olarak kullanılabilir olduğu belirlendi.

Çalışmanın 2. aşamasında biyouyumlu bir malzeme olan hidroksietil metakrilat (HEMA) monomerinin hidrojel olarak üretilmesi için uygun koşullar araştırıldı. Kendi kütlesinin beş katı su absorblama kapasitesinin olduğu saptanan PHEMA hidrojelinin, jel formunda sentezinin ancak belirli çözücü karışım limitleri içerisinde mümkün olduğu tespit edildi.

Çalışmanın 3. aşamasında metil metakrilat-ko-vinilfenil boronik asit (PMMA-ko-VFBA) polimerik nanoparçacıkları sentezlendi. Tek aşamada, yüzey aktif maddeye gereksinim olmaksızın,

emülsiyon polimerizasyonu ile sentezlenen, PMMA-ko-VFBA nanoparçacıkları dinamik ışık saçılımı (DLS) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterize edildi. Nanoparçacıklardaki boron içeriği, enerji dağılımı X-ışını (EDX) spektrası ile tespit edildi. Boronik asit fonksiyonel grupları ile diol duyarlı bir nanomateryal olarak geliştirilen nanoparçacıklar, ilk olarak, doğal bir antioksidan bileşik olan kafeik asit için uygun bir taşıyıcı sistem olarak öngörüldü. Kafeik asit ile etkileştirilen nanoparçacıklardan, glukoz ya da fruktoz gibi şeker moleküllerine duyarlı olarak kafeik asit salımı gerçekleştiği, UV-Vis spektral değişim ile takip edildi. PMMA-ko-VFBA nanoparçacıklarının biyouyumlu oldukları 24 ve 48 saatlik hücre uygulaması ile belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Biyouyumlu polimer, disülfit bazlı çapraz bağlayıcı, dual salım sistemi, hidrojel, ilaç taşıyan akıllı polimerler, kafeik asit, PEGMA, uyarı hassasiyetli nanoparçacık

ABSTRACT

Ph.D THESIS

DEVELOPMENT OF BIOCOMPATIBLE SMART POLYMERIC NANOPARTICLES FOR CONTROLLED DRUG RELASE APPLICATIONS

Mehmet ULAŞAN

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
SELÇUK UNIVERSITY
DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN CHEMISTRY

Advisor: Prof. Yunus ÇENGELOĞLU
Co-advisor: Assoc. Prof. Mustafa Selman YAVUZ

2014, 115 Pages

Jury
Prof. Yunus ÇENGELOĞLU
Prof. Nihat TINKILIÇ
Prof. Erol PEHLİVAN
Assoc. Prof. Gülşin ARSLAN
Assoc. Prof. Yasemin ÖZTEKİN

Smart materials which responds to environmental changes such as temperature, pH, magnetic field and reduction potential have been attracting much attention in recent years. We have synthesized biocompatible thermoresponsive poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate (PEGMA)-*co*-vinyl pyrrolidone nanoparticles (PEGMA NPs) with disulfide based crosslinker by surfactant free emulsion polymerization (SFEP) method. Particle characterization studies were carried out by dynamic light scattering (DLS) and scanning electron microscopy (SEM). Polymerization kinetics, effect of crosslinker and initiator concentrations on average hydrodynamic diameter and polydispersity index were investigated. Reversible thermal responses of PEGMA NPs between 22 ^{o}C and 40 ^{o}C were also examined. Average hydrodynamic diameter of PEGMA NPs decreases with increasing temperature. As a dual delivery system, rhodamine B, a model of small drug molecule (dye with λmax= 554 nm), and PEG (MW= 4000)-Alizarin yellow (dye with λmax= 372 nm), a model of large drug molecule, were loaded into PEGMA NPs. At room temperature, there was no dye released from PEGMA NPs. Most of rhodamine B content was released just over 37 ^{o}C, which is close to body temperature. Below or above 37 ^{o}C there was no PEG-Alizarin yellow dye released from the PEGMA NPs. Furthermore, the PEGMA NPs were treated with dithiothreitol (DTT) which reduces disulfide bonds of PEGMA NPs. Due to reduction of disulfide bonds to thiols, PEGMA NPs were decomposed and then all remaining PEG-Alizarin yellow content inside the PEGMA NPs was released. PEGMA NPs are not cytotoxic according to cytotoxicity test. As a result, for the first time, we showed that, PEGMA nanoparticles crosslinked with disulfide based crosslinker can be used as a controlled dual drug carrier system.

In the second stage of work, suitable conditions for fabrication of biocompatible poly(hydroxyethyl) methacrylate (PHEMA) hydrogel were investigated. Water embedded by PHEMA hydrogel was recorded as five times of its original weight. We stated that the product PHEMA hydrogel is produced in the gel form only under certain limits of solvent mixture. We presented with this study, the procedure for fabrication of PHEMA gel to science literature.

In the third stage of work, methyl methacrylate-*co*-vinyl phenylboronic acid (PMMA-*co*-VPBA) polymeric nanoparticles were successfully synthesized. The nanoparticles were characterized by dynamic light scattering (DLS) and scanning electron microscopy (SEM). The boron content in the nanoparticle structure was confirmed by energy dispersive X-ray (EDX) spectra. The nanoparticles combined with caffeic acid which is a natural antioxidant. It is shown for the first time that caffeic acid is released from NPs by glucose or fructose addition. The release of caffeic acid from NPs was monitored by UV-Vis spectral change. Glucose sensitive PMMA-*co*-VPBA NPs were stated as biocompatible according to cytotoxicity test.

Keywords: Biocompatible polymers, caffeic acid, disulfide based crosslinker, dual release systems, hydrogel, PEGMA, smart polymers for drug delivery, stimuli responsive nanoparticles

ÖNSÖZ

Tez çalışmamda emeği geçen herkese öncelikle teşekkür etmek isterim. Yüksek deneyimi ile her zaman rehberim olan tez danışmanım değerli hocam Prof. Dr. Yunus Çengeloğlu'na bu süreçteki desteklerinden dolayı içten teşekkür ederim. Çalışmanın, fikir aşamasından başlayarak, tasarlanması, deneylerin yorumlanması ve yaratıcı fikirlerin gelişimi açılarından kendisinden istifade ettiğim tez 2. danışman hocam, Doç. Dr. Mustafa Selman Yavuz, uluslararası birikimi ile bana ve çalışma grubumuzdaki diğer arkadaşlara büyük katkı sağlamıştır. Bilimsel kongrelere gerek sözlü, gerekse poster katılımlarımızı destekledi. Gelecekte farklı ve yenilikçi projelerde birlikte çalışmayı umduğum değerli hocalarıma sonsuz teşekkür ederim.

Tez izleme Komitesi üyeleri değerli hocalarımız, Prof. Dr. Erol Pehlivan'a ve Doç. Dr. Gülşin Arslan'a, yapıcı ve destekleyici fikir ve yaklaşımları ile tez çalışmasına katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Çalışmanın yürütülmesinde her türlü laboratuvar ve altyapı imkânlarını sağlayan Fen Fakültesi Dekanlığı'na, Kimya Bölümü Başkanlığı'na ve çalışanlarına aynı zamanda İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi Müdürlüğü ve çalışanlarına içten teşekkür ederim. Bu süre içinde Fen Fakültesi Kimya Bölümü ve Merkez çalışanları ile güzel arkadaşlıklar kazandım. SEM uzmanı Fatih Özcan'a, Uzm. Emine Yavuz'a, Uzm. Reyhan Kara'ya, Uzm. Meryem Bozkurt'a, Dr. Pembegül Uyar'a ve ismini sayamadığım diğer tüm çalışanlara teşekkür ederim.

Çalışma grubumuz yüksek enerjisi ve araştırma gayreti ile takdire şayan olmuştur. Kendileriyle her zaman dayanışma içerisinde olduk. Zaman oldu, geceleri geç saatlere kadar çalıştık. Grubumuzda bulunan; araştırma görevlisi Zeynep Katırcıoğlu'na, araştırma görevlisi Halit Çavuşoğlu'na, değerli arkadaşlarım Hüseyin Şakalak ve Burak Büyükbekar'a sağladıkları bu güzel dayanışma ve dostluk ortamından dolayı hususi teşekkür ederim.

Çalışma, Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir. Bu desteklerinden dolayı BAP'a teşekkür ederim.

Bu çalışmamda araştırdığımız alan, nanoteknolojinin biyomedikal ve biyoeczacılık alanlarda uygulamasına yönelik akıllı nanomateryallerdir. Bu alanda, ilk olarak, Selçuk Üniversitesi kütüphanesine eser sağlamış olmam, beni ayrıca mutlu etmektedir.

Son olarak, destekleriyle her zaman yanımda olan arkadaşlarım Uğur Örgerim'e, Mahmut Kurt'a ve aileme, en yoğun zamanlarımda bana moral ve motivasyon kaynağı olan kızım Nigar'a teşekkür ederim.

Mehmet ULAŞAN
KONYA-2014

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **vi**

ÖNSÖZ ..... **viii**

İÇİNDEKİLER ..... **ix**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **xi**

1. GİRİŞ VE KAYNAK ARAŞTIRMASI **1**

1.1. Sıcaklık Duyarlı Polimerler 2
1.1.1. Negatif sıcaklık duyarlı polimerler 2
1.1.2. Pozitif sıcaklık duyarlı polimerler 6
1.2. pH Duyarlı Polimerler 7
1.2.1. Katyonik hidrojel polimerler 11
1.2.2. Anyonik hidrojel polimerler 12
1.3. Manyetik Duyarlı Polimerler 15
1.4. Elektrik Duyarlı Polimerler 17
1.5. Diol Duyarlı Polimerler 18
1.6. Işık Duyarlı Polimerler 19
1.7. Polimer Zincirinin Çapraz Bağlayıcı ile Bağlanması 22
1.7.1. Radikal polimerizasyonu ile çapraz bağlanma 23
1.7.2. Tamamlayıcı bir grubun kimyasal reaksiyonu ile çapraz bağlanma 24
1.7.3. Yüksek enerji irritasyonu ile çapraz bağlanma 26
1.7.4. Enzim kullanımı ile çapraz bağlanma 26
1.7.5. İyonik etkileşim ile çapraz bağlanma 26
1.7.6. Kristallenme ile çapraz bağlanma 27
1.7.7. Hidrojen bağı ile çapraz bağlanma 27
1.7.8. Protein etkileşimi ile çapraz bağlanma 27
1.8. Emülsiyon Polimerizasyonu 30
1.9. Akıllı Polimer Hazırlanmasındaki Güçlükler ve Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar 33

2. MATERYAL VE YÖNTEM **36**

2.1. Materyal 36
2.2. Biyouyumlu ve Sıcaklık Duyarlı PEGMA Nanoparçacıkları ile İkili Salım Uygulaması 37
2.2.1. PEG-Alizarin sarısı makroboya sentezi 37
2.2.2 Disülfit bazlı çapraz bağlayıcı sentezi [bis(2-akriloloksietil) disülfit, (DSDA)] 38
2.2.3. Emülsiyon polimerizasyonu ile çapraz bağlı poli(PEGMA-*ko*-vinil prolidon) polimer nanoparçacık sentezi (NP3) 39
2.2.4. PEGMA nanoparçacıklarına PEG-Alizarin sarısı ve rhodamine B boyalarının yüklenmesi 39

2.2.5. Çapraz bağlı PEGMA nanoparçacıklarının 1,4- ditiyotreitol (DTT) ile degredasyonu....39
2.2.6. Sıcaklık ve DTT degredasyonu ile ikili boya salım ölçümleri....40
2.2.7. *In-vitro* hücresel toksisite ölçüm deneyleri....40
2.2.8. PEGMA nanoparçacıklarının karakterizasyonu....41
2.3. Biyouyumlu Hidrojel Sentezlenmesi, Su Tutma Kapasitesi ve Jelleşme Üzerinde Çözücü Etkisi....42
2.3.1. Polihidroksietil metkarilat (PHEMA) hidrojel sentezi....42
2.3.2. PHEMA hidrojelinin su absorblama kapasitesinin ölçümü....42
2.3.3. Jelleşme üzerine çözücü etkisi....43
2.4. Glukoz Duyarlı PMMA Nanoparçacıkları Sentezi ve Kafeik Asit Salımında Kullanılması....43
2.4.1. Polimetil metakrilat-*ko*-vinilfenil boronik asit (PMMA-*ko*-VFBA) nanoparçacık sentezi....43
2.4.2. PMMA-*ko*-VFBA nanoparçacıklarına kafeik asit bağlanması....44
2.4.3. Glukoz ile kafeik asit salımı....44
2.4.4. *In-vitro* hücresel toksisite ölçüm deneyleri....45

3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA....46

3.1. Disüfit Çapraz bağlı PEGMA Nanoparçacıkları....46
3.1.1. PEGMA nanoparçacıkları sentezi ve karakterizasyonu....46
3.1.2. PEGMA nanoparçacıklarının ditiyotreitol (DTT) ile degredasyonu....53
3.1.3. PEGMA nanoparçacıklarının sıcaklık değişimine tepkisi....56
3.1.4. PEGMA nanoparçacıklarının ikili salım sistemi olarak kullanılması....57
3.1.5. PEGMA nanoparçacıklarının biyouyumluluğunun test edilmesi....60
3.1.6. PEGMA nanoparçacıklarının florasans spektrofotometrik ölçümleri....61
3.2. PHEMA Hidrojeli....63
3.2.1. PHEMA sentezi ve su absorblama kapasitesi....63
3.2.2. PHEMA jel oluşumunda çözücü etkisi....64
3.3. Glukoz Duyarlı PMMA-*ko*-VFBA Nanoparçacıkları....66
3.3.1. PMMA-*ko*-VFBA nanoparçacık sentezi ve karakterizasyonu....66
3.3.2. PMMA-*ko*-VFBA nanoparçacıkları ile kafeik asit taşınması ve salımı....75
3.3.3. KA-NP ile glukoz titrasyonu ile kafeik asit salımı....77
3.3.4. PMMA-*ko*-VFBA nanoparçacıklarının *in-vitro* hücresel toksisitesi....82

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER....84

4.1 Sonuçlar....84
4.1.1. PEGMA nanoparçacıkları ve dual duyarlı ilaç salım sistemi....84
4.1.2. PHEMA hidrojeli....85
4.1.3. PMMA-*ko*-VFBA nanoparçacıkları ile glukoz duyarlı kafeik asit salım sistemi....85
4.2 Öneriler....86

KAYNAKLAR....87

ÖZGEÇMİŞ....102

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar

AMPDH: 2,2'-azobis(2-metilpropionamidin) dihidroklorür (2,2′-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride)
ARS: Alizarin kırmızısı tuzu (Alizarin red salt)
DCC: Disiklohekzilkarbodiimin (Dicyclohexylcarbodiimide)
DLS: Dinamik ışık saçılımı (Dynamic light scattering)
DMAP: 4-(dimetilamino) piridin (4-(Dimethylamino)pyridine)
DSDA: Disülfit diakrilat (Disulfide diacrylate)
DTT: Ditiyotreitol (Dithiothreitol)
EDX: Enerji dağılımı X-ışını spektroskopi (Energy dispersive X-ray spectroscopy)
EGDMA: Etilen glikol dimekrilat (Ethylene glycol dimethacrylate)
FITC: Florasan isotiyosiyanat (Fluorescein isothiocyanate)
GSH: Glutatyon (Gluthathione)
HEMA: 2-Hidroksietil metakrilat (2-Hydroxyethyl methacrylate)
İLTEK: İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi
LCST: En düşük kritik çözelti sıcaklığı (Lowest critical solution temperature)
MAA: Metakrilik asit (Methacrylic acid)
MMA: Metil metakrilat (Methyl methacrylate)
NIPAM: N-izopropil akrilamit (N-Isopropylacrylamide)
NP: Nanoparçacık (Nanoparticle)
NVP: N-vinil prolidon (N-vinyl pyrrlodione)
OEGMA: Oligo(etilenglikol) metakrilat (Oligo(ethyleneglycol) methacrylate)
PAA: Poliakrilik asit (poly(acrylic acid))
PBMA: Poli(n-butil metakrilat) (poly(n-butyl methacrylate))
PEG: Polietilenglikol (poly(ethylene glycol))
PEGMA: Poli(etilenglikol) metil eter metakrilat (Poly(ethyleneglycol)) methyleter methacrylate]
PHPMA: Polihidroksi propil metakrilat (Poly(hydroxypropyl methacrylate)
PLGA: D,L-laktik asit-*ko*-glikolik asit (D,L-lactic acid-*co*-glycolic acid)
PMAA: Polimetakrilik asit (Polymethacrylic acid)
PMMA: Polimetil metakrilat (Polymethyl methacrylate)
PNIPAM: Poli(N-izopropil akrilamit) (Poly(N-Isopropylacrylamide)
PVA: Polivinil alkol (Polyvinyl alcohol)
SEM: Taramalı elektron mikroskobu (Scanning electron microscopy)
UCST: Üst kritik çözelti sıcaklığı (Upper critical solution temperature)
VFBA: Vinilfenil boronik asit (Vinylphenyl boronic acid)

1. GİRİŞ VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

Son yılarda akıllı polimerik kapsüllerin ilaç taşınım sistemi olarak kullanılmasına büyük bir ilgi vardır. Bu tür ilaç taşıyan sistemlere "akıllı polimerler" denmesinin sebebi, polimerik sistemin bir dış uyarıcıya tepki vermesi ve bu tepki ile içinde bulunan ilaç etkin maddesinin ortama salımının sağlanmasıdır. Bu sayede ilaç etkin maddesinin diğer sağlıklı hücrelere temas etmeksizin hedef hücrelere yönlendirilmesi ve hedef hücre-doku sistemine etkimesi hedeflenmektedir. Bu uygulamaya verilebilecek en yaygın örnek kemoterapidir. Kemoterapi sürecinde kullanılan ilaçların başta gelen sorunları; istenmeyen yan etkilerinin olması, yarı ömürlerinin az olması ve toksik özellik gösterip, sağlıklı dokulara zarar vermesi şeklinde sıralanabilir (Allen ve Cullis, 2004). Anti kanser ilaçlar vücuda genel olarak verildiğinde kanserli hücreleri yok etmesinin yanısıra, sağlıklı hücrelere de zarar vermesinden ve olumsuz yan etkilerinden dolayı, ilaç etkin moleküllerini kanserli dokuya taşıyacak yeni tekniklere gereksinim duyulmaktadır.

Dış uyarıya tepki veren uyarı hassas polimerik yapılar misel, nanoparçacık veya nanojel formundaki yapılardır. Bu formdaki yapılar taşıyıcı moleküller olarak taşınan (misafir) molekülü yapı içinde tutmakta ve dış uyarıya bağlı olarak misafir molekül ortama salınmaktadır. Polimerik yapının dış uyarı olarak tepki verdiği faktörler; sıcaklık (Berndt ve ark., 2005; Zhang ve ark., 2008a; Li ve Liu, 2010), pH (Na ve Bae, 2002; Murthy ve ark., 2003; Shi ve ark., 2008; Argentiere ve ark., 2011), indirgenlik (Lee ve ark., 2007; Oh ve ark., 2007; Groll ve ark., 2009), iyonik gerilim (Duracher ve ark., 1998; Ferreira ve ark., 2010) ve manyetik alan (Kim ve ark., 2005; Park ve ark., 2008) gibi etkenlerdir.

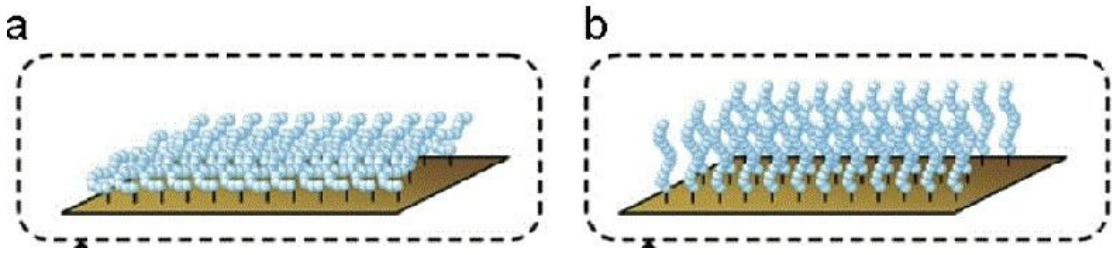
Bütün bu üstün yanları ile akıllı polimerik taşıyıcı sistemlere olan gereksinimden dolayı bu tez çalışması akıllı polimerik yapıların geliştirilmesi konusu üzerine kurulmuştur. Literatürde genel olarak tek etkiye duyarlı polimerik sistemler üzerinde pek çok çalışma olmasına karşın ikili etkiye duyarlı nanoparçacık çalışması daha az sayıdadır. Bundan dolayı, tezin deneysel araştırması iki farklı dış etkiye duyarlı nano boyutlu parçacık geliştirilmesi ve bu parçacıkların ilaç etkin molekülleri ile gen/protein taşınımına imkan tanıması özelliklerini içeren kriterler esas alınmıştır.

1.1. Sıcaklık Duyarlı Polimerler

Dış uyarıcı olarak üzerinde en yaygın çalışılan etkenlerden birisi sıcaklık etkisidir. Fizyolojik vücut sıcaklığı olan, 37 ^{o}C ilaç salımı için uygun bir tetikleyici olabileceği düşüncesinden hareketle terapik ajanların vücut sıcaklığında salımına imkân tanıyan polimerik nanokapsüller uygun birer taşıyıcı ortam olarak görülmektedir. Bu tür ısı duyarlı yapılar sıcaklık ile değişen faz değişimi, su tutma kapasitesi gibi özelliklere sahiptir (Anal, 2007).

1.1.1. Negatif sıcaklık duyarlı polimerler

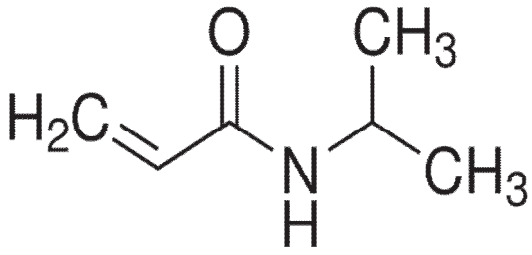
Negatif sıcaklık duyarlı hidrojel yapılar limit bir sıcaklık derecesinin altında su tutma (şişme) özelliği gösterir. Bu limit sıcaklığın üzerinde ise su ile hidrofobik özellik gösterip su moleküllerini itmektedir. Diğer bir ifade ile limit sıcaklığın altında polimerik yapı, su içinde çözünür halde iken limit sıcaklığın üzerinde su içinde çözünmez hale geçmektedir. Literatürde termal geçişin olduğu en düşük limit sıcaklık değeri "en düşük kritik çözelti sıcaklığı (lowest critical solution temperature, LCST)" olarak tanımlanmaktadır. Daha detaylı incelendiğinde LCST değerinin altında polimer branşları ile su molekülleri arasında hidrojen bağının baskın olduğu, LCST değerinin üzerinde ise hidrojen bağının bozularak hidrofobik özelliğin baskın olduğu tespit edilmiştir (Peppas ve ark., 2000; Heiko ve ark., 2003, Şekil 1.1.).



Şekil 1.1. Polimer branşlarının sulu ortamda moleküler gösterimi a) LCST üzerinde b) LCST altında

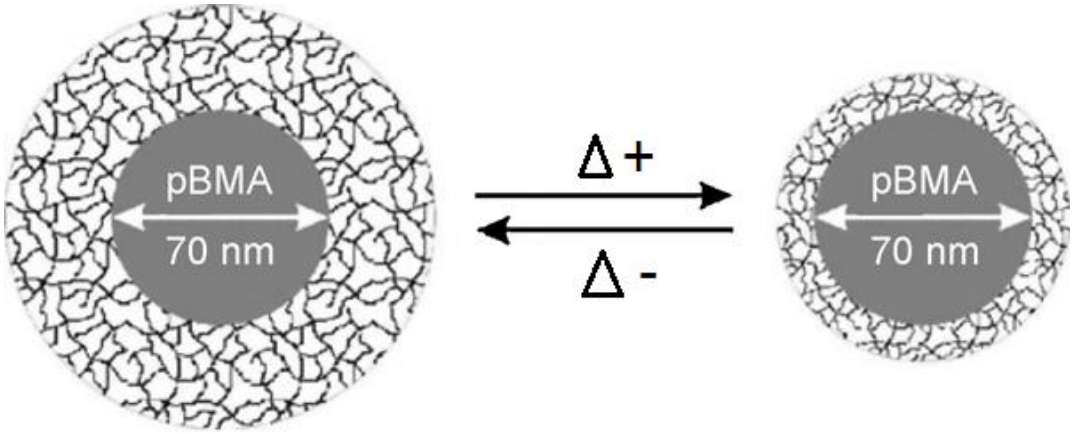
Negatif ısı duyarlı polimer olarak bilinen ve üzerinde yaygın çalışmalar yapılan polimerlerin başında, N-izopropil akrilamit monomeri (Şekil 1.2.) ile elde edilen poli(N-izopropil akrilamit) (PNIPAM) gelmektedir. PNIPAM'ın LCST değeri 32 ^{o}C'dir. Polimer ana zincirine bağlı branşlar LCST değerinin altında AÇIK, üzerinde KAPALI

konumdadır. Böylelikle PNIPAM, sıcaklık osilasyonuna bağlı olarak AÇIK-KAPALI fazda değişim göstermektedir (Sopinath ve ark., 2002).



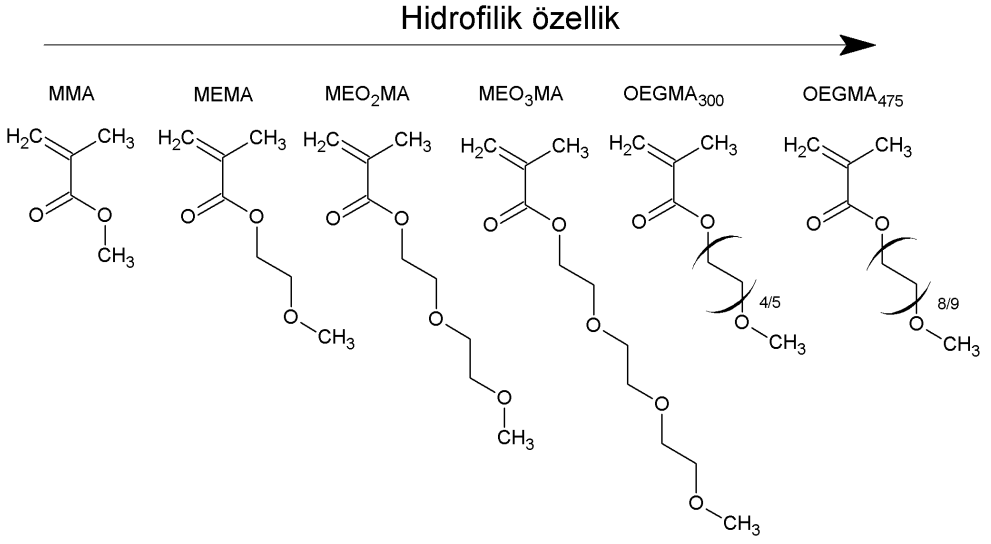
Şekil 1.2. Sıcaklık duyarlı N-izopropilakrilamit molekülü (NIPAM)

PNIPAM homopolimerin LCST değeri olan 32 ^{o}C'yi manipüle etmek için polimer zincirine hidrofilik veya hidrofobik branşlar eklenmesi genel bir metot olarak uygulanmaktadır. Örneğin NIPAM'ın hidrofilik bir monomer olan akrilamitle kopolimerizasyonu (akrilamit oranı: % 18) sonucu LCST değeri 45 ^{o}C'ye kadar çıkmaktadır. Diğer taraftan, hidrofobik olan N-t-butil akrilamit'in (% 40 oranında) NIPAM ile *ko*-polimer olarak eklenmesiyle, LCST değeri 10 ^{o}C olmaktadır (Hoffman ve ark., 2000). NIPAM ile farklı LCST değerleri elde edilen diğer polimerler ve LCST değerleri şu şekildedir; poli(N-N'-dietil akrilamit) (LCST= 26-35 ^{o}C, Qui ve Park, 2001), poli(dimetilaminoetil metakrilat) (LCST= 50 ^{o}C, Cho ve ark., 1997), poli(N-CL-1-hidroksimetil propilmetakrilat) (LCST= 30 ^{o}C, Aoki ve ark., 2001). Literatürde, LCST sistemleri özellikle kontrollü ilaç etkin maddesi ve protein salımı ile ilgilidir (Bromberg ve Ron, 1998). Sıcaklık duyarlı polimerler lipozom zarı üzerinde sabitlenebilir ve bu durumda lipozom, polimerin içindeki maddenin salımını kontrol özelliği gösterir (Kono, 2001). Gan ve Lyon (2003)'un yaptığı çalışmada hidrofobik poli(n-butil metakrilat, PBMA) çekirdek üzerine PNIPAM kabuk eklenmiştir. Şekil 1.3.'de şematik gösterimi yapılan PNIPAM'ın LCST değeri olan 32 ^{o}C'nin altında, kabuk polimer olan PNIPAM su içerisinde şişmekte ve parçacık boyutu büyümektedir. Sıcaklık LCST değerinin üzerine çıkarıldığında çekirdek polimer aynı kalırken kabuk polimer büzüşmekte ve parçacık boyutu küçülmektedir.



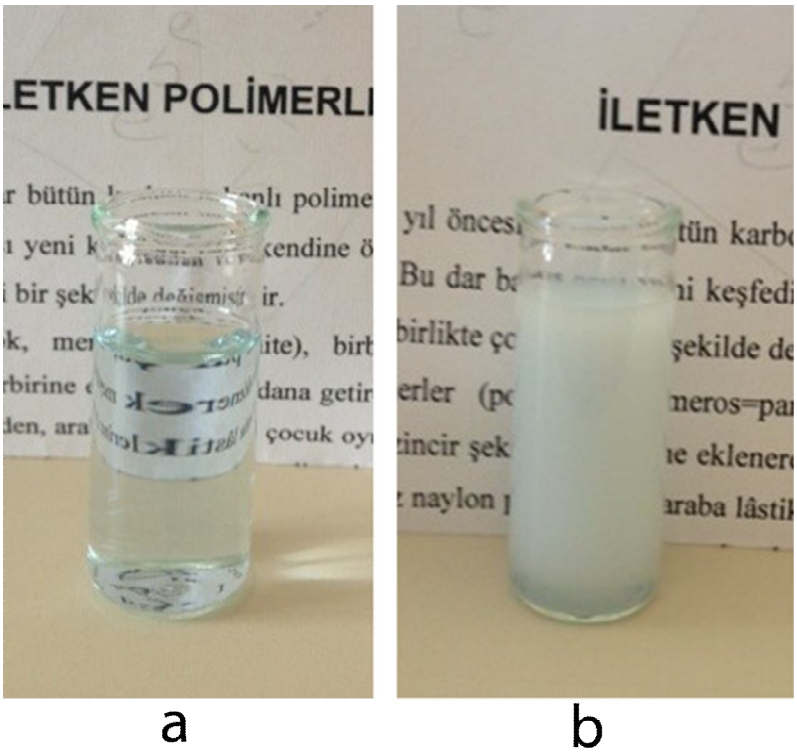
Şekil 1.3. Çekirdek PBMA ve kabuk PNIPAM polimerlerlerinin sulu ortamda sıcaklığa bağlı hacimsel değişimi

Sıcaklık duyarlı biyomateryal üretiminde PNIPAM yaygın olarak kullanılmakla birlikte, PNIPAM'ın doğası bazı dezavantajlar içermektedir. Faz geçişlerinin tersinir olmaması (Schild, 1992), molekül yapısında bulunan sekonder amin gruplarının diğer amin grupları ya da proteinler ile hidrojen bağı yapması (Wu ve ark., 2005; Keerl ve ark., 2008) PNIPAM'ın termal özelliğini olumsuz etkilemektedir. Lutz ve ark. (2006)'nın çalışmasında, poli(etilenglikol) metil eter metakrilat (PEGMA) makromonomerinin sıcaklık duyarlı polimer fabrikasyonunda üstün özellikleri olduğu rapor edilmiştir. Şekil 1.4.'de çeşitli uzunlukta PEG birimi ihtiva eden PEGMA yapıları gösterilmektedir.



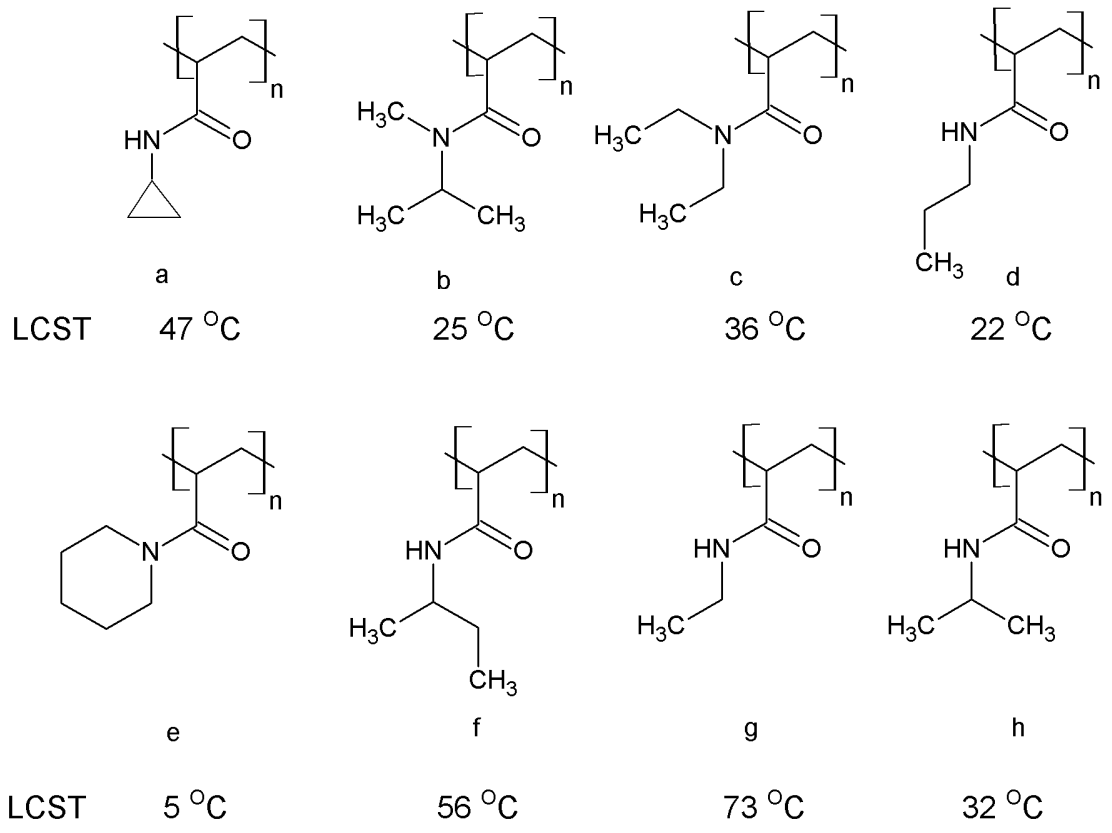
Şekil 1.4. Çeşitli oligo(etilen glikol) metakrilat moleküler yapıları (MMA: metil metakrilat, MEMA: metoksi etil metakrilat, MEO_2MA: (di) metoksi etil metakrilat, MEO_3MA: (tri) metoksi etil metakrilat, $OEGMA_{300}$: oligo etilenglikol metakrilat (MW= 300), $OEGMA_{475}$: oligo etilenglikol metakrilat (MW= 475)

Yapıdaki PEG birim sayısı arttıkça hidrofilik özellik artmakta ve daha yüksek derecede LCST değerleri elde edilmektedir. Kısa PEG branşları içeren polimerler (MMA, MEMA) suda çözünmez. Uzun PEG branşları içeren polimerler (PEG birim sayısı 10 ve üzeri) suda çözünür. PEG birim sayısı 2-10 arasında olan PEGMA yapıları kritik sıcaklık değişimi gösterirler. Polimer ana zincirini oluşturan -C-C- zinciri hidrofobik, yan branşlardaki PEG birimleri ise hidrofilik özellikle olması yönüyle rekabetçi bir çözünürlük hassasiyeti vardır. PEG birim sayısı 2-3 olduğunda (MEO_2MA, MEO_3MA) LCST değeri sırasıyla 26 ^oC ve 52 ^oC'dir. Daha uzun PEG birimi içeren oligo(etilenglikol) metakrilat ($OEGMA_{300}$) ve $OEGMA_{475}$ yapılarının LCST değerleri ise 60-90 ^oC olarak rapor edilmiştir (Khosravi ve ark., 2009). Bu çalışma kapsamında $OEGMA_{188}$ ve $OEGMA_{300}$ karışımından elde ettiğimiz, LCST değeri 37 ^oC olan sıcaklık duyarlı doğrusal polimerlerin fotoğrafi Şekil 1.5.'de gösterilmiştir. Şekil 1.5.-a'da polimer sulu ortamda, oda sıcaklığında (22 ^oC) çözünür haldedir. Arka plandaki yazı kolaylıkla görülebilmektedir. Sıcaklık 37 ^oC'ye çıkarıldığında, polimer sıcaklığa tepki vermekte ve çözünmez forma geçmektedir. Bu durumda, arka plan yazısı okunmamaktadır (Şekil 1.5.-b).



Şekil 1.5. Sıcaklık duyarlı OEGMA polimer çözeltisi a) LCST altında b) LCST üzerinde (LCST: 37 ^oC olarak ölçüldü)

Literatürde rapor edilen diğer bazı sıcaklık duyarlı moleküller Şekil 1.6.'da gösterilmiştir.



Şekil 1.6. Sıcaklık duyarlı bazı molekül yapıları ve bu yapılara ait LCST değerleri (LCST verileri: Cao ve ark. 2007)

1.1.2. Pozitif sıcaklık duyarlı polimerler

Pozitif sıcaklık duyarlı hidrojellerde üst kritik çözelti sıcaklık derecesi vardır (upper critical solution temperature, UCST). Polimer branşları, üst kritik sıcaklık derecesinin altına soğutulduğunda büzüşmektedir. Poli akrilikasit ve poliakrilamit polimer yapıları pozitif sıcaklık duyarlı polimerik yapılara örnektir (Gil ve Hudson, 2004).

En yaygın sıcaklık duyarlı hidrojeller, polietilenoksit-*b*-polipropilenoksit-*b*-poli etilenoksit triblok polimerinden hazırlanmıştır. Bu tür sistemler oda sıcaklığında sıvı haldeyken vücut sıcaklığında jel halindedir. Son zamanlarda yeni bir biyobozunur triblok polimer yapısı geliştirilmiştir. Polietilenglikol-*b*-poli D,L-laktik asit-*ko*-glikolik

asit-*b*-polietilenglikol PEG-PLGA-PEG (Teong ve ark., 1999) veya PLGA-PEG-PLGA (Rim ve ark., 2001) dizilerinden oluşan blok polimerler, sürekli ilaç salım sistemi olarak incelenmiştir. Sentetik sıcaklık duyarlı polimerlerin yanı sıra xyloglucan gibi doğal sıcaklık duyarlı polimerik yapılar da mevcuttur (Miyazaki ve ark., 1998).

Capello ve ark. (1998) yaptıkları çalışmada "prolastins" adıyla sol-gel tranzisyonu yapabilen yeni bir protein geliştirmişlerdir. Bu protein sıvı olarak vücuda enjekte edildiğinde, dakikalar içinde kararlı jel oluşmakta ve absorblanma süresi birkaç gün ile birkaç ay arasında değişmektedir.

Bazı durumlarda sıcaklık duyarlı polimerler içi boşluklu katı yapılara hapsedilebilir ve tersinir hacim değişimi ile AÇ-KAPA siteminde çalışan yapılar elde edilir. Bu tür sistemler literatürde "squeezing" hidrojeller olarak tanımlanmaktadır. İlaç salım hızı polimerik kapsülün açılıp-kapanma (tersinir hacim değişimi) hızı ile orantılıdır (Kim, 1997) .

Fisher (2004)'in patentli çalışmasında, biyoaktif maddeyi vücutta hedeflenen bölgeye taşıyan sıcaklık duyarlı selülozik jel yapısı tanımlanmıştır. Jel sıcaklığındaki artışa bağlı olarak, büzüşmekte ve içinde çözünmüş biyoaktif madde serbest hale geçmektedir. Böylelikle, vücut sıcaklığındaki artışın uyarıcı etkisiyle, kısa süre içinde, jel yapısı büzüşmekte ve yapı içinde bulunan etkin madde düzenli olarak ortama salım yapmaktadır.

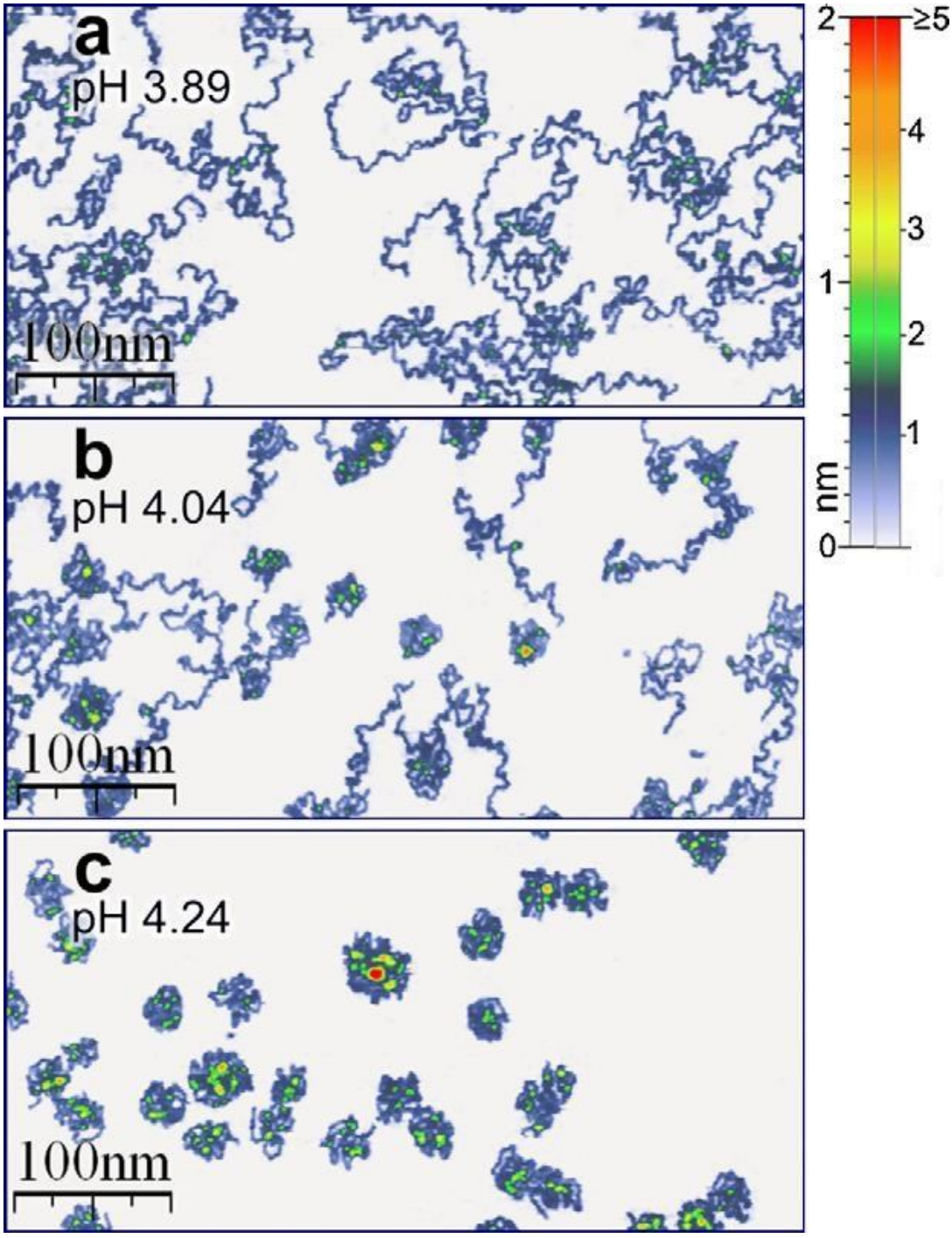
Kiser ve Thomas (2003)'ın patentli çalışmasında biyoaktif madde ile fonksiyonlanmış doğrusal polimerlerden oluşan yarı nüfuzlu polimerik yapı tanımlamıştır. Doğrusal polimer, biyoaktif uçlara fiziksel olarak bağlanmıştır. Doku mühendisliği uygulaması olarak kullanılan polimer matriksi, oda sıcaklığında akışkan sıvı olmasına karşın memeli canlıların vücut sıcaklığında yarı katı ve katı halde bulunmaktadır.

Mittur (2006)'un patentli araştırmasında ise terapik olarak etkili bir hızda salım yapan taşıyıcı sistem geliştirilmiştir. Sistem, içinde biyoaktif molekül içeren ve sıcaklık etkisi ile şişme/büzüşme özelliği gösteren bir polimerik yapıdan oluşmaktadır.

1.2. pH Duyarlı Polimerler

Polielektrolitler su veya benzeri diğer iyonlaştırıcı çözücü içinde polimerik iyonlar oluşturabilen makromoleküllerdir. Polimer, çözücü içinde iyonlaştığında, polimer zincirindeki elektrostatik yüklerin birbirini itmesi sonucu hacimsel olarak bir

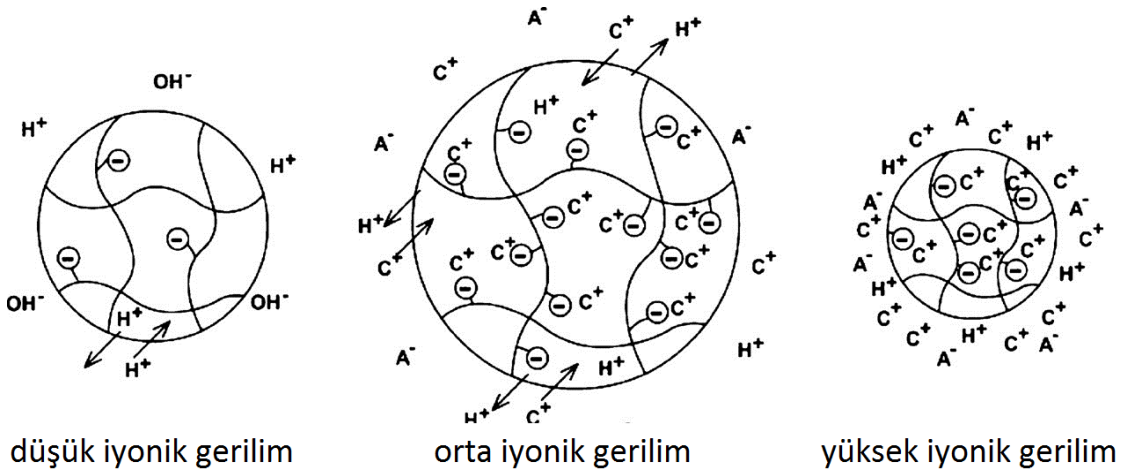
genişleme meydana gelir. Diğer taraftan çözücü polimer branşlarının iyonlaşmasını engellediği durumda ise polimer kompakt bir hal alır. Eğer polimer branşları hidrofobik ise, polimer kütle halinde çökelir. Hidrofobik yüzey enerjisi ve polimer zincirindeki yüklerin elektrostatik itme kuvvetleri polimerin çözücü içindeki davranışını belirler (Bromberg, 2003). Zayıf bir elektrolitin iyonlaşma derecesi pH ile kontrol edilebilir olmasından dolayı, akıllı polimerler keskin bir şekilde ortamın pH değerine bağlı olarak fiziksel kompozisyonunu değiştirmektedir. Tüm pH duyarlı polimerler polimer ana zincirine bağlı branşlarda, ortamın pH değerine duyarlı olarak proton yakalayan veya ortama proton salan asidik ya da bazik gruplar içerir. Polimer branşlarının zayıf asidik (anyonik) olduğu durumda; ortamın pH derecesi artırıldığında, polimerin su tutma ve hacimce genişlemesi artacaktır. Şayet polimer branşları zayıf bazik gruplar içeriyorsa, bir önceki durumun tersi olarak, pH değerinin artması ile polimer hacimce küçülecektir. Diğer bir ifadeyle; dış ortamdan gelen uyarıcıdaki değişiklik, polimerin kimyasal yapısı ve polimer ile çevresindeki moleküller arasındaki etkileşimi değiştirecektir. Bu durumda, Şekil 1.7.'de gösterildiği gibi, polimer konformasyonunu değiştirecek ya da faz geçişi sağlayacaktır (Bartil ve ark., 2007).



Şekil 1.7. pH duyarlı polimerlerin farklı pH ortamlarındaki konformasyon değişimi (Bartil ve ark., 2007)

Çözelti ortamının iyonik gerilimi artırıldığında, hidrojel ile çözelti arasında iyon değişimi olmaktadır. Bu değişimle birlikte hidrojel yük olarak nötr halini korumaktadır. Ortamın iyonik geriliminin artması sonucu, aynı zamanda, hidrojel ile çözelti arasında osmotik basınç artmaktadır. Bu artış hidrojelin şişmesine neden olmaktadır. Şayet iyonik gerilim çok fazla olursa (1-10 M), osmotik basınç dengesine ulaşmak için

hidrojelde yarılma ve çatlama olur. Şekil 1.8.'de şematik olarak gösterimi yapıldığı şekilde, hidrojel iç osmotik basıncı ile çözelti osmotik basıncı eşitlenir (Bajpai ve ark., 2008b).

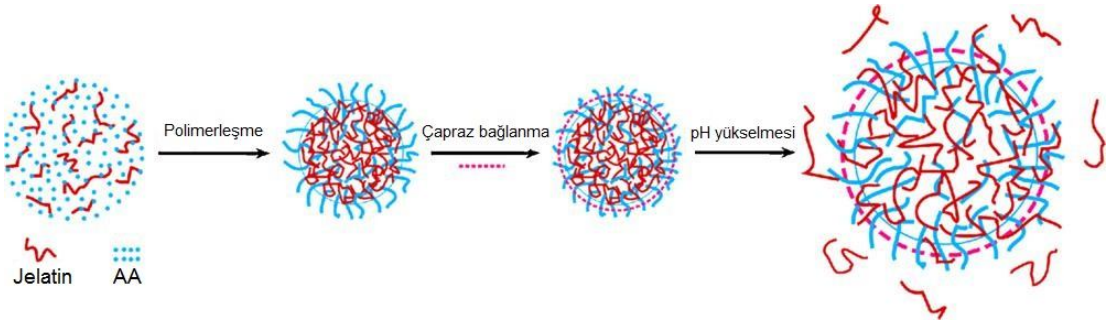


Şekil 1.8. pH duyarlı polimerlerin farklı iyonik gerilim ortamlarındaki konformasyon değişimi

Pek çok anyonik pH duyarlı polimer poliakrilik asit (PAA) ve türevlerinden oluşmaktadır. PAA'e ilave olarak polimetakrilik asit (PMAA), Polietilen ve poli L-lysine ilaç taşınım sistemi olarak araştırılmıştır (Jeong ve Gutowska, 2002). Morishita ve ark. (2002)'nın araştırmasında insülin yüklenmiş polimetakrilik asit-*g*-etilen glikol mikroparçacıklarının, pH değişimine karşı özgün özellikte olduğu gösterilmiştir. pH değeri 7.0'ın altında insülin salımının engellendiği, nötr veya bazik ortamda önemli miktarda salım gerçekleştiği gösterilmiştir. Metakrilik asit ve etilen glikol aşı polimerinin kullanıldığı diğer bir araştırma ise Peppas (2004) tarafından yapılmıştır. Bu araştırmada, polimer zincirindeki asidik branşlar ile eter grupları arasında polimer içi kompleks oluşumu esasına dayanan pH duyarlı hidrojel geliştirilmiştir.

Palasis (2003)'in patentli çalışmasında, akrilik asit türevlerine dayanan pH duyarlı polimerler geliştirmiştir. Bu çalışmada, polimer zincirine katyonik gruplar eklenmiş ve böylelikle pH değerinin pKa değerinin altında olması sağlanarak negatif yüklü terapik moleküller polimere bağlanmıştır. Ortam pH değerinin değiştirilmesiyle, pH, pKa değerinin üzerine çıktığında, polimer yüksüz olmakta ve bu durumun sonucu olarak terapik moleküller serbest kalmaktadır. Bae ve Park (2000) yaptıkları çalışmada, suflonamid grupları içeren pH duyarlı polimer tanımlamışlardır.

Şekil 1.9.'da Zhang ve ark., (2007)'nın çalışmasında elde ettikleri parçacığın pH etkisi ile parçacık yapısının şematik değişimi yer almaktadır. Buna göre, akrilik asit monomerinin jelatin ile polimerleşmesiyle kuvvetli su emen pH duyarlı malzeme geliştirilmiştir. Parçacık özhacminin 80 katı kadar şişme özelliğine sahip olduğu rapor edilmiştir.



Şekil 1.9. pH duyarlı jelatin-PAA parçacığı

pH duyarlı polimerler katyonik ve anyonik olmak üzere iki ana grupta toplanabilir.

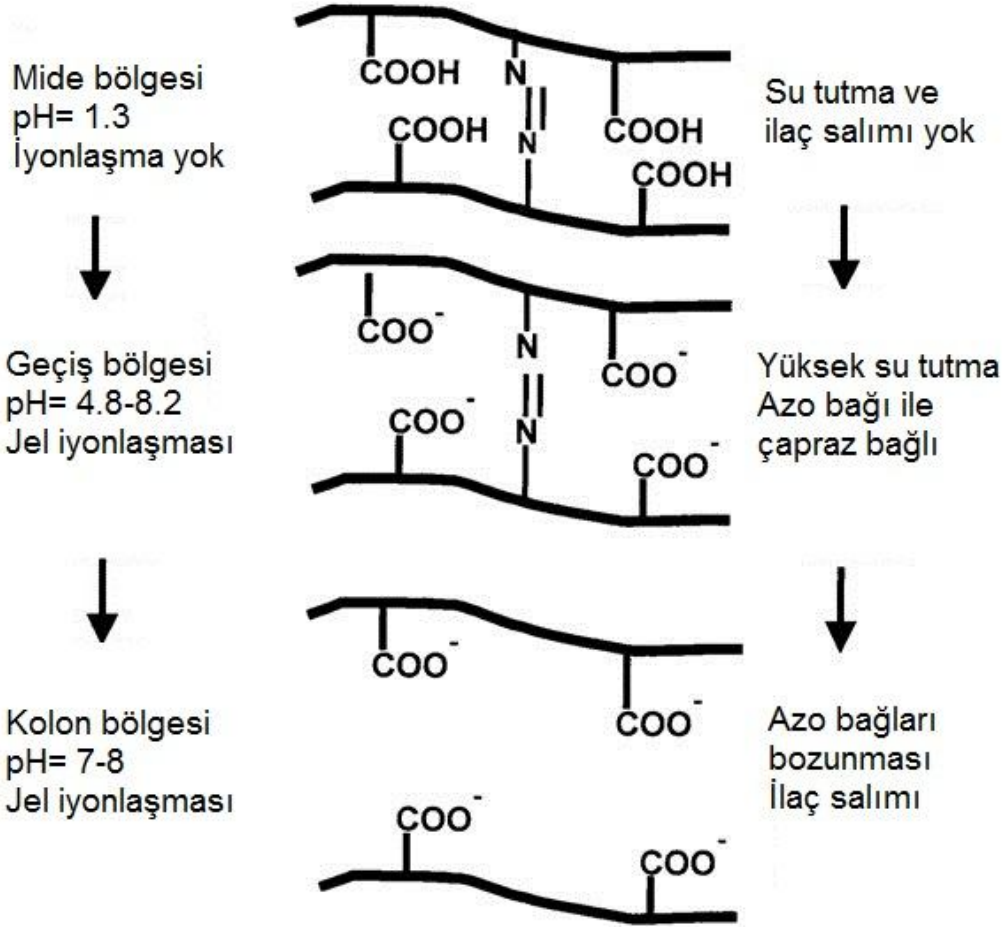
1.2.1. Katyonik hidrojel polimerler

Katyonik hidrojeller karın bölgesinin düşük pH ortamında ilaç salımı yaparlar. Risbud ve ark. (2000), pH duyarlı hava kurutmalı ve soğuk kurutmalı amoksilin salımı yapan çitosan/polivinilprolidon polimeri geliştirmiştir. Hava kurutmalı gözeneksiz numuneye göre soğuk kurutmalı gözenekli numune üstün bir pH orantılı salım göstermiştir.

Gupta ve Ravi Kumar (2000) yaptıkları çalışmada; glisin, gluteralaldehit ve çitosan'dan oluşan çapraz bağlı küresel boncuklar elde etmiş ve küresel yapıların su tutma özelliğini, farklı pH değerlerinde zamana karşı takip etmiştir. İlaç salım denemeleri, model ilaç olarak thiaminhidroklorür kullanılarak yapılmış ve çitosan küresel boncukların, ilaç salım sistemi olarak kullanılmasına imkân tanıyan, pH değişimine duyarlı salım yaptığı tespit edilmiştir.

1.2.2. Anyonik hidrojel polimerler

PAA ve PMAA nötr ortamda salım yapan sistemler olarak kullanılabilir (Brannon-Peppas ve Peppas, 1990; Khare ve Peppas, 1993). Kolon spesifik ilaç taşınımı için azo aromatik çapraz bağlayıcılar ile çapraz bağlanmış polianyon hidrojeli geliştirilmiştir (örneğin; poliakrilik asit). Hidrojelin düşük pH'dan dolayı mide içinde su tutması ve dolayısıyla ilaç salımı minimumdur. Mideden kolon bölgesine geçtiğinde, pH'daki artıştan dolayı karboksilik gruplar iyonlaşmakta ve ilaç salımı başlamaktadır. Ancak kolon bölgesinde bakteri etkisi ile azo bağları bozunmakta ve tam olarak ilaç salımı gerçekleşmektedir. Şekil 1.10.'da gösterildiği gibi bozunma hızı (ve dolayısıyla ilaç salım hızı) çapraz bağlanma oranını değiştirmekle kontrol edilebilir (Ghandehari ve ark., 1997; Akala ve ark., 1998).

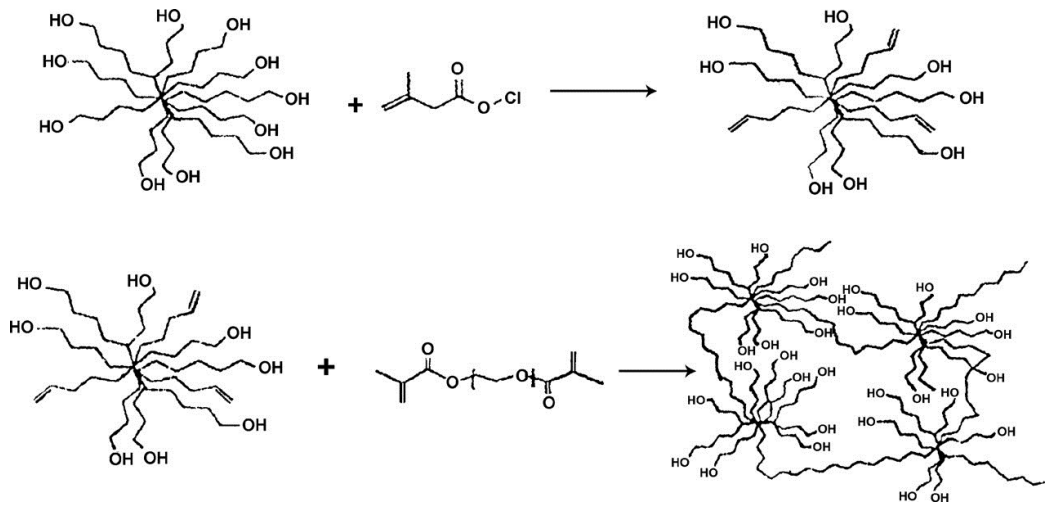


Şekil 1.10. pH duyarlı jelatin-PAA parçacığı degradasyon mekanizması (Ghandehari ve ark., 1997)

Hidrojellerin su tutması ve şişme özelliği, polimer kompozisyonunu değiştirmekle de kontrol edilebilir. Polimer branşları olarak, N-alkanol grupları (örneğin; propionyl, hekzanoyl ve lauroyl) ve açil hidroksiamin grupları, asidik ortamdan nötr ortama pH değiştiğinde, hidroliz olmaktadır. Böylelikle bu yan grupların polimerdeki oranları ile hidrojelin genişlemesi kontrol edilebilir (Kim ve Peppas, 2002). Kim ve Peppas (2002) bu çalışmasında, pH= 2.2'de büzüşük vaziyette küçük gözenek aralığı (18-35 ^{o}A), pH= 7.0'da şişkin vaziyette büyük gözenek aralığına (70-111 ^{o}A) sahip polimer geliştirmiştir. Bu sistemde, polimerdeki MAA oranı artırıldığında, gözenek aralığının pH= 2.2'de düştüğü fakat pH= 7.0'da arttığı tespit edilmiştir. Çapraz bağlanma oranı artırıldığında, her iki pH değerinde gözenek aralığı düşmektedir. Bu çalışmada, bu tür sistemlerin oral protein taşınım sistemi olarak oldukça kullanışlı olduğu rapor edilmiştir.

Geleneksel kalsiyum-alginat veya yeni geliştirilen kalsiyum pektinat sistemleri mide ve kolon bölgesinde ilaç salım sistemi olarak incelenmiştir (Pillay ve Fassihi, 1999). Diklofenak gibi zayıf asidik özellikteki ilaçların pH damlası ile önemli ölçüde tutulduğu gösterilmiştir. İlaç salımı geniş pH aralığında araştırılmış ve hızlıdan yavaşa uygulanan formülasyona bağlı olarak kontrol edilebilir ilaç salımı gözlenmiştir.

Oral ve Peppas (2004) araştırmasında, pH uyarısına duyarlı polimer olarak PEG yıldız polimerlerini incelenmiştir. Şekil 1.11.'de gösterildiği gibi, yıldız polimerde bulunan çok sayıdaki fonksiyonel gruplar, polimer çevresi ile polimer yapısı arasında etkileşim sağlamaktadır. Polimerin pH hassasiyeti, metakrilik asitin (MAA) *ko*-polimer olarak polimer yapısına girmesi ile olur. Bu tür sistemler oral ilaç salımı için uygun özelliktedir.

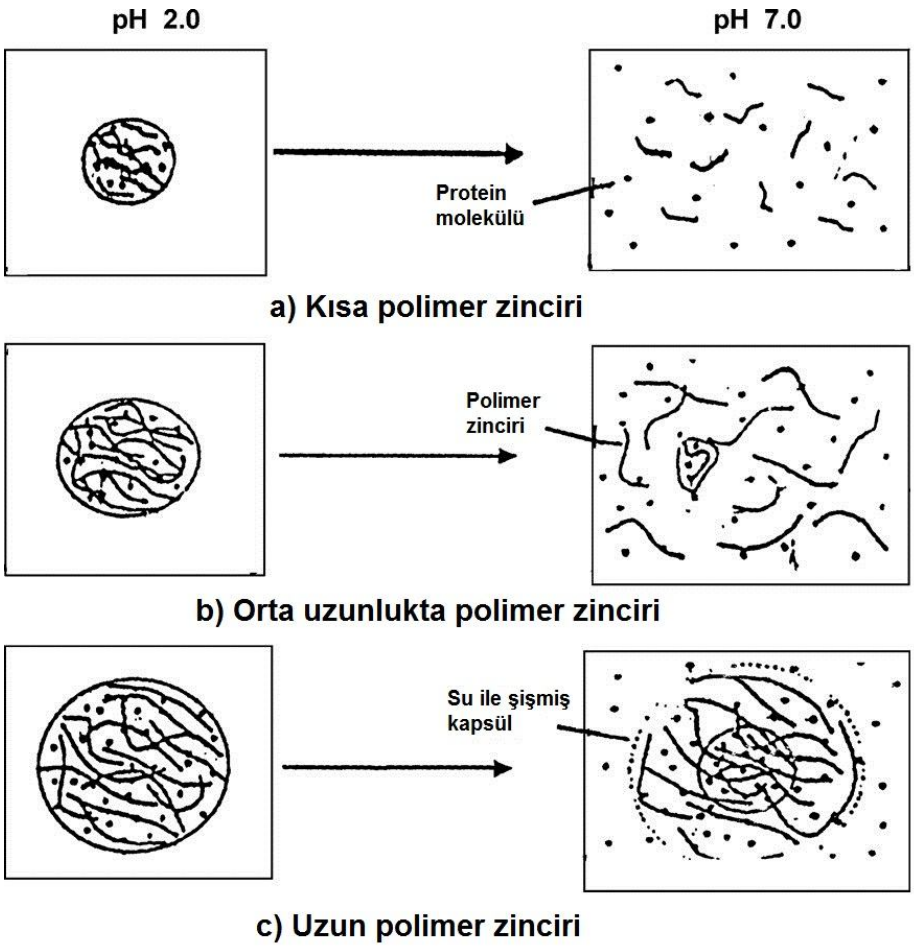


Şekil 1.11. pH duyarlı yıldız polimerler

Diğer bir araştırmada, anyonik hiyalunarat-polihidroksietil akrilat (hyalunarate-polyhidroxyethylacrylate) jeli glisidil metakrilat- hiyalunarat (glicidyl methacrylate-hyalunarate) ve hidroksietil akrilat (hidroxyethylacrylate) *ko*-polimerizasyonu ile elde edilmiştir. Katyonik model ilaç olarak kloropromazin HCl salımı su ile baskı altına alınmış, ilaç salımı pH'daki düşüş ve iyonik gerilimin artırılması ile sağlanmıştır (Inukai ve ark., 2000).

Chiu ve ark. (2002)'nın araştırmasında, metakrilik asit (MAA)-insülin ve akrilik asit (AA) *ko*-polimerizasyonu ile sulu ortamda amonyum persülfat ve tetrametil etilendiamin başlatıcı sistemi kullanılarak pH duyarlı insülin jeli elde edilmiştir. AA oranı düşük tutulduğunda hidrojelin pH= 7.4'deki şişmesi, çapraz bağlanma yoğunluğu ile önceden belirlenebilmektedir. Sonuçlar göstermiştir ki; AA oranının artması ile pH değişimine karşı polimerin şişmesi de değişmektedir. Poli akrilik asit, makrodiizosiyanat veya oligodiizosiyanat ile çapraz bağlandığında pH= 5 ve pH= 7.4'deki ilaç salım miktarları değişmektedir. Bu durum pH= 5'de PAA ile PEG birimleri arasında hidrofobik kompleks oluşumu ile açıklanır. Polimerik yapıdaki hidrofobik alan ilaç salımını engeller. Diğer taraftan, pH değeri 7.0'a çıkarıldığında PAA'da bulunan karboksilik asit branşları iyonlaşır. Bu durumda, kompakt yapı açılır, polimer şişer ve polimerde bulunan ilaç moleküllerinin salımı gerçekleşir (Dimitrov ve ark., 2003).

Literatürde, Şekil 1.12.'de şematik gösterimi yapılan, P(NIPAM-*ko*-MAA-*ko*-AA) boncuklu polimeri ile insülin salımı sağlanmıştır. Polimer asidik pH değerine sahip karın bölgesinde hidrofobik olduğundan, ilaç salımı yapmamaktadır. pH değerinin normal değerlere ulaştığı metabolik bölgede pH değerindeki artışa bağlı olarak boncuklu yapıdaki polimer açılarak içerisindeki ilaç moleküllerinin salımı gerçekleşmektedir. Bu sistem protein yapılı ilaç salım sistemi olarak önerilmektedir (Ganarkar ve ark., 1999).

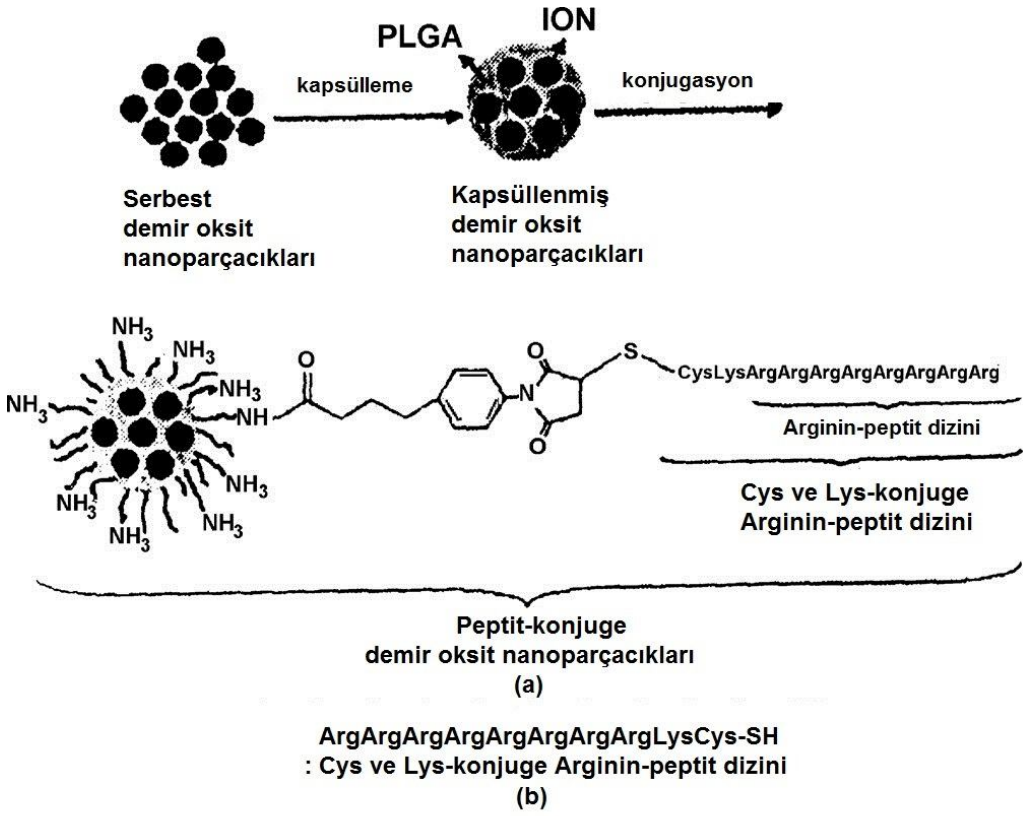


Şekil 1.12. pH duyarlı insülin jeli salım şeması

1.3. Manyetik Duyarlı Polimerler

Manyetizma, canlı organizmalar üzerinde önemli bir etkendir. Kandaki hemoglobin, demir içeren bir proteindir ve manyetik özelliktedir. Dünyanın manyetik alanına uyumlu olan manyetotik bakteriler bilinen ilk canlı organizmalardır (Blakemore ve Frankel, 1981). Bu bakteriler değişik şekillerde manyetik parçacıklar taşımaktadırlar. Son zamanlara yapılan araştırmalarda hayvanlarda ve insanlarda manyetik reseptör işlevi gören manyetik parçacıklar olduğuna dair sağlam bulgular vardır (Bahadur ve Jyotsnendu, 2003). Manyetik parçacıklar insan sağlığı ve biyolojik uygulamalarda önemli rol oynamaktadır (Jordan ve ark., 1999; Poeckler-Schoeniger ve ark., 1999; Kim ve ark., 2001; Mykhaylyk ve ark., 2001). Hücre ayrılması (Liberti ve ark., 2001; Popovic ve Sjostrand, 2001; Chatterjee ve ark., 2011), gen/ilaç taşınımı ve kanser tedavisi gibi karmaşık işlemlerin yapılmasında parçacık ve manyetizmanın birleştirilmesi son derece kullanışlıdır (Shinkai ve ark., 1999; Golui ve ark., 2001).

Şekil 1.13-a.'da Xie ve ark. (2003)'nın çalışmalarında rapor ettikleri, arginin (Arg) poli(D,L-laktid-ko-glikolid) ile konjuge peptit (RRRRR CK-FITC) ile kapsüllenmiş manyetik demir oksit nanoparçacıklarının hazırlanış prosedürü gösterilmektedir. Arg peptid hücre duvarından geçerek stoplazma ve hücre çekirdeğine ulaşan ve hücreye en iyi nüfuz eden peptid yapısıdır. Şekil 1.13.-b'de ise Arg peptid dizini gösterilmektedir. Arg peptid zincirinin florasan izotiosiyanat (FITC) ile modifiye edilmesi ilk olarak Güney Koreli Peptron firması tarafından yapılmıştır. FITC'nın florasans özelliği sayesinde peptid yapının hücreler arası geçişi takip edilebilmektedir



Şekil 1.13. a) Manyetik duyarlı nanoparçacıkların hazırlanması b) Arginin-peptit dizini

Manyetik nanoparçacıkların doğal ya da sentetik polimerle kaplanması basit ve klasik bir metottur. Konvensiyonel emülsiyon polimerizasyonu, mini ve mikro emülsiyon polimerizasyonu gibi emülsiyon polimerizasyonundaki gelişmeler yeni kapsülleyici polimerler eldesine imkân tanımıştır (Shen ve ark., 1999; Wormuth, 2001; Deng ve ark., 2003; Ramirez ve Landfester, 2003). Tipik bir emülsiyon polimerizasyonunda, manyetik nanoparçacıklar polimerleşme ortamına süspanse edilirler. Miniemülsiyon polimerizasyonu manyetik polimerik parçacık üretimi için

oldukça uygundur. Miniemülsiyon polimerizasyonunda monomer damlası manyetik nanoparçacık ile nanoreaktör olarak işlev görür. Xu ve ark. (2004) çalışmalarında nano ölçekli demir oksit parçacıkları taşıyan poliakrilamit sentezi için ters miniemülsiyon polimerizasyonunu kullanmıştır. Sentezini gerçekleştirdikleri süperparamanyetik özellikteki polimerik nanoparçacıların ortalama çapı 100 nm civarındadır.

Membran kaplanmış, ortalama çapı 45 nm olan manyetik nanoparçacıkların dış uyarı ile vücut içinde ilaç salımı için kullanılmıştır (Bauerlein ve ark., 2001). Aynı zamanda, terapik ajan taşıyan manyetik nanoparçacıklar tedavi amaçlı kullanılmıştır. Hedeflenmiş kanser veya tümör dokusuna manyetik alan uygulması ile oluşan ısı sonucu terapik ajanların salımı sağlanmıştır (Handy ve ark., 2006).

Pankhurst ve ark. (2003), manyetik nanoparçacıkların biyomedikal uygulamalarının fiziksel prensiplerini araştırmışlardır. Bu araştırmaya göre; manyetik uyarıya tepki veren manyetik materyaller 4 referans gruba ayrılmıştır. Bunlar; a) belirlenmiş hücrelerin ayrılması (cell separation), b) terapik ilaç veya gen taşınımı, c) radyo frekanslı ışın ile tümörlü hücrenin katabolize edilmesi, d) manyetik rezonans görüntüleme uygulamalarının zenginleştirilmesi.

Tertaj ve ark. (2003) yaptıkları çalışmada, biyomedikal uygulamalar için kullanışlı manyetik nanoparçacık hazırlanması için çeşitli metotlar geliştirmiştir. Robin (2002) çalışmasında kanser tedavisine yönelik elektromanyetik olarak aktive edilen "nanoısıtıcılar"ı kullanmıştır. Araştırmaya göre; büyüklükleri 5-90 nm ile ortalama bir hücrenin binde biri olan manyetik nanoparçacıklar, manyetik alan yönünün periyodik olarak değiştiği elektromanyetik alan osilasyonuna maruz bırakıldıklarında, sıcaklıkları artmakta ve çevresindeki tümör hücrelerini yok etmektedir.

1.4. Elektrik Duyarlı Polimerler

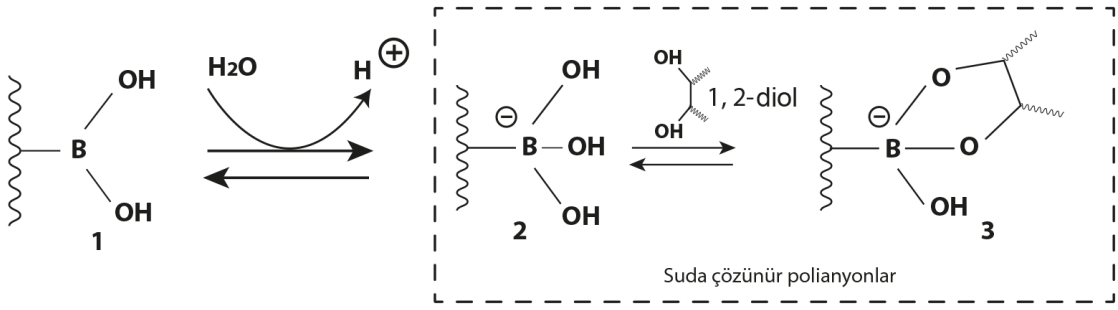
Elektrik duyarlı polimerik yapılar, polimer ana zinciri üzerinde iyonlaşabilen gruplar taşıyan polimerlerdir. Bir elektriksel alan uygulandığında bu tür polimerler genellikle büzüşürler. Hidrojelin elektrotlara paralel ya da dik konumda bulunmasına göre, polimer sterik yapısı değişmektedir (Bajpai ve ark., 2008a). Ramanathan ve Block (2001) yaptıkları çalışmada, çitosan jelinin elektrik uyarısı ile ilaç salımını incelemiştir. Araştırmada; nötral (hidrokortizon), anyonik (benzoik asit) ve katyonik (lidokain hidroklorür) ilaç moleküllerinin çitosan hidrat jelinden salımı miliamper akım uyarısı ile

takip edilmiştir. Benzer şekilde elektrik kontrollü peptit ve protein taşınımı için, Lensen ve ark. (2002), chondroitin-4-sülfat hidrojelini incelemiştir.

Elektrik duyarlı materyal olarak hem doğal hem de sentetik maddeler kullanılmıştır. Doğal elektrik duyarlı materyallere örnek olarak hiyalunorik asit (hyaluronic acid), kondroitin sülfat (chondroitin sulfate), agaroz (agarose), ksantan reçinesi (xanthan gum) ve kasiyum alginat (calcium alginate) sayılabilir. Sentetik elektrik duyarlı materyaller ise çoğunlukla metakrilat ve akrilat türevi olan materyallerdir. Bu materyallere örnek olarak kısmi hidroliz olabilen poliakrilamit, polidimetilaminopropil akrilamit ve benzerleri sayılabilir (Tanaka ve ark., 1982).

1.5. Diol Duyarlı Polimerler

Bir diğer duyarlı polimerik sistem glukoz, fruktoz gibi diol içeren şeker grubu moleküller ile boronik asit ya da boronik asit fonksiyonel grubu içeren moleküller arasında gerçekleşmektedir. Boronik asitin glukoz ile tersinir dengesi glukoz sensörü elde edilmesi için doğru bir ortam oluşturmaktadır. Sulu ortamda boronik asit iyonlaşmamış nötral hal ve iyonlaşmış anyonik hal arasında dengede bulunmaktadır. 1,2 ya da 1,3 diol grubu içeren bir molekülün varlığında, anyonik formdaki boronik asit ile diol grubu halkalı yapıda boronat esteri oluşturmaktadır. Şekil 1.14. boronik asit ile diol arasındaki tersinir denge şemasını göstermektedir. Glukoz derişimi arttığında, anyonik boronik asit oranı artmakta, nötral boronik asit oranı ise azalmaktadır (Marek, 2011).



Şekil 1.14. Boronik asit-diol etkileşimi

Boronik asit bazlı diol duyarlı polimerlerin büyük kısmı hidrojeller üzerinedir. Hisamitsu ve ark. (1997)'nın yaptıkları araştırmada 3-akrilamidofenil boronik asit, (N, N-dimatilamino) propiakrilamit ve N,N dimetilakrilamit içeren bir hidrojel sentezi rapor

etmişlerdir. Bu araştırmaya göre; t-polimer yapısı içerisinde bulunan boronik asit grupları fizyolojik pH değerinde polivinil alkol (PVA) ile kompleks oluşturmuştur. Ortama glukoz eklenmesi ile PVA ile glukoz arasında yerdeğiştirme reaksiyonu sonucu çapraz bağlanma oranında azalma görülmüştür. Bu etki sonucunda hidrojelde şişme meydana gelmektedir.

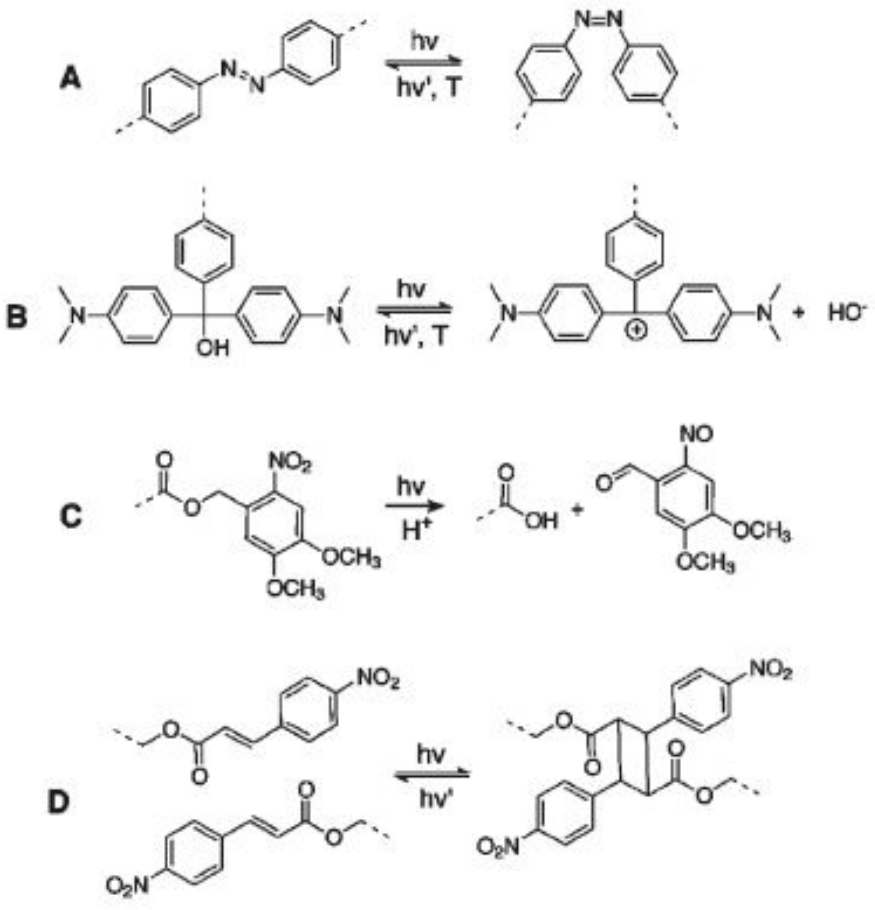
Glukoz duyarlı boronik asit polimerlerin büyük çoğunluğu konvensiyonel polimerizasyon metotları ile elde edilen ramdom *ko*-polimerler (Shiomori ve ark., 2004), jel (Ge ve ark., 2006) ve diğer çapraz bağlı polimerler olarak sentezlenmiştir (Letsinger ve Hamilton 1959; Lennarz ve Snyder 1960).

Boronik asit ile diol arasındaki bu duyarlı özellik, bilim insanlarına optik nanosensör tasarımı konusunda cesaret vermiştir. Cannizo ve ark., (2005) çalışmasında, öncelikle stiren ve vinil klorobenzen *ko*-polimerik nanoparçacıkları sentezlenmiştir. 2. aşamada, 2-amino fenil boronik asit ile fonksiyonlanma işlemi sonucu boronik asit fonksiyonel grupları içeren nanoparçacıklar elde edilmiştir. Boronik asit taşıyan nanoparçacıklar alizarin kırmızısı tuzu (ARS) ile birleştiğinde florasans özellikte portakal renginde süspansiyon elde edilmektedir. Bu süspansiyon diol içeren bir şeker molekülü (glukoz ya da fruktoz) ile titre edildiğinde nanoparçacığa bağlanan ARS boya maddesi glukoz ile yerdeğiştirmekte ve süspansiyon florasans olmayan özellikte bordo renkli olmaktadır. Araştırmada, elde edilen nanoparçacıkların, glukoz dedeksiyonu için optik bir nanosensör olarak işlev gördüğü rapor edilmiştir.

1.6. Işık Duyarlı Polimerler

Şekil 1.15.-a'da gösterildiği şekilde, azobenzen grupları UV ya da görünür bölge (Vis) ışınlarına maruz kaldıklarında tersinir cis-trans izomer geçişi yaparlar. Tao ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada sentezledikleri nanoparçacığın kabuk yapısına görünür ışığa duyarlı azo boyar molekülü yerleştirmiştir. Nanoparçacık görünür ışığa maruz kaldığında parçacık içindeki molekülleri sızdırmaktadır. Bedard ve ark. (2010) araştırmalarında, azo boyar molekülü doğrudan polielektrot ana zincirine yerleştirmiştir. Polielektrot kapsülün geçirgenliği (permeability) azobenzen grupların görünür ışığı absorblaması ile kontrol edilmektedir. Kono ve ark. (1995) trifenil metan lekohidroksit (triphenylmethane leucohydroxide) grupları içeren kapsül sentezlemişlerdir. Trifenil metan lekohidroksit UV ışığına maruz kaldığında trifenil metil katyonu oluşmaktadır (Şekil 1.15.-b). Mikro kapsülden salım hızı, polimer zincirine yerleştirilen trifenil metan

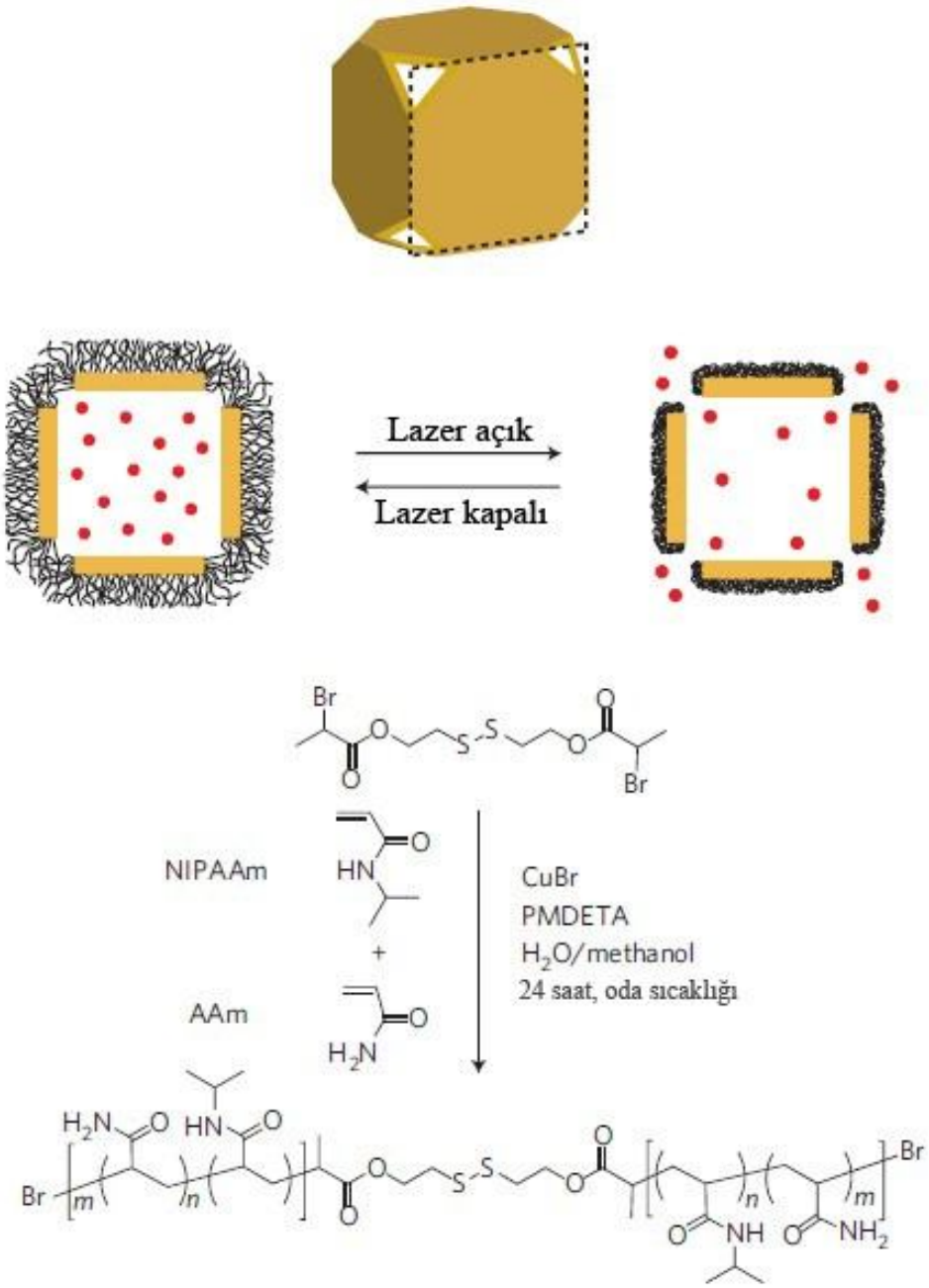
lekohidroksit oranı ile kontrol edilmektedir. Moleküler yapıda ışık duyarlı fonksiyonel grup içeren, self-immolatif polimerler de ışık duyarlı polimer olarak işlev görebilirler. Fomina ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada, kuinon methid (quinone-methide) zinciri üzerine ışık ile ayrışabilen (photo-cleavable) nitrobenzil koruyucu grupları yerleştirmiştir. Nitrobenzil koruyucu gruplarının UV ışığa maruz kaldıklarındaki değişimi, Şekil 1.15.-c'de gösterilmiştir. Araştırmada, mikrokapsüllerden UV uygulanmadığı durumda minumum seviyede salım olmasına karşın, 350 nm dalgaboyunda UV ışık uygulandığında kapsül içinde bulunan boyanın tamamen salım yaptığı rapor edilmiştir. Diğer bir ışık duyarlı mekanizma; sinnamat (cinnamate) gruplarının UV etkisi ile tersinir siklo katılma tepkimesidir. Tepkime mekanizması Şekil 1.15.-d'de gösterilmiştir. Nitro sinnamat ile fonksiyonlanmış poliorganosilaksan (polyorganosiloxane) ile foto-duyarlı nanoparçacıklar foto-kimyasal anahtar olarak kullanılmıştır (photo-chemical switches, Esser-Kahn ve ark., 2010).



Şekil 1.15. A) nitro benzil grupların ışık uyarısı ile trans-cis tersinir değişimi B) trifenil metan lekohidroksit'in ışık uyarısı ile trifenilmetil katyon iyonlaşması C) nitro benzil koruyucu grupların ışık uyarısı ile ayrılması D) sinnamat grupların ışık uyarısı ile siklo katılma tepkimesi

Metal nanoparçacıklarının fototermal özelliği de bilim insanlarının ilgisini çekmiştir. Altın nanoparçacıkları ve nanoçubukları yakın kızılötesi (NIR) ışınlarına maruz kaldıklarında sıcaklıklarında artış olmaktadır. Bu etki özelliği ile çeşitli duyarlı salım sistemleri geliştirilmiştir (Sershen ve ark., 2000; Radt ve ark., 2004; Angelatos ve ark., 2005; Skirtach ve ark., 2005; Javier ve ark., 2008; Yavuz ve ark., 2009).

Yavuz ve ark. (2009), yaptıkları çalışmada, altın nanokafesleri (gold nanocages) sıcaklık duyarlı polimerle kaplamıştır. Polimer altın yüzeyine tutunmayı sağlayan tiyol terminal grupları içermektedir. Şekil 1.16'da çalışma mekanizması gösterilen fototermal uyarıya duyarlı altın nanokafesler, NIR bölgesindeki ışınlara maruz kaldıklarında, sıcaklığı artmaktadır. Sıcaklıktaki artış, nanokafesi çevreleyen sıcaklık duyarlı PNIPAM polimerin en düşük kritik çözelti sıcaklığına ulaştığında, polmerin konformasyonunda değişikliğe sebep olmakta ve polimerler büzüşmektedir. Polimerlerdeki bu değişiklik ile altın nanokafeslerin gözenekleri açılmakta ve nanokafesin içinde bulunan ilaç molekülleri ortama salım yapmaktadır. Tersinin özellikte olan bu mekanizma NIR ışınlarının kapatılması ile ters yönlü olarak polimerin soğumasına ve nanokafesleri kapatarak ilaç salımının sonlanmasına neden olmaktadır. Böylelikle NIR ışınlarının şiddeti ile ilaç salımı kontrol edilmektedir.



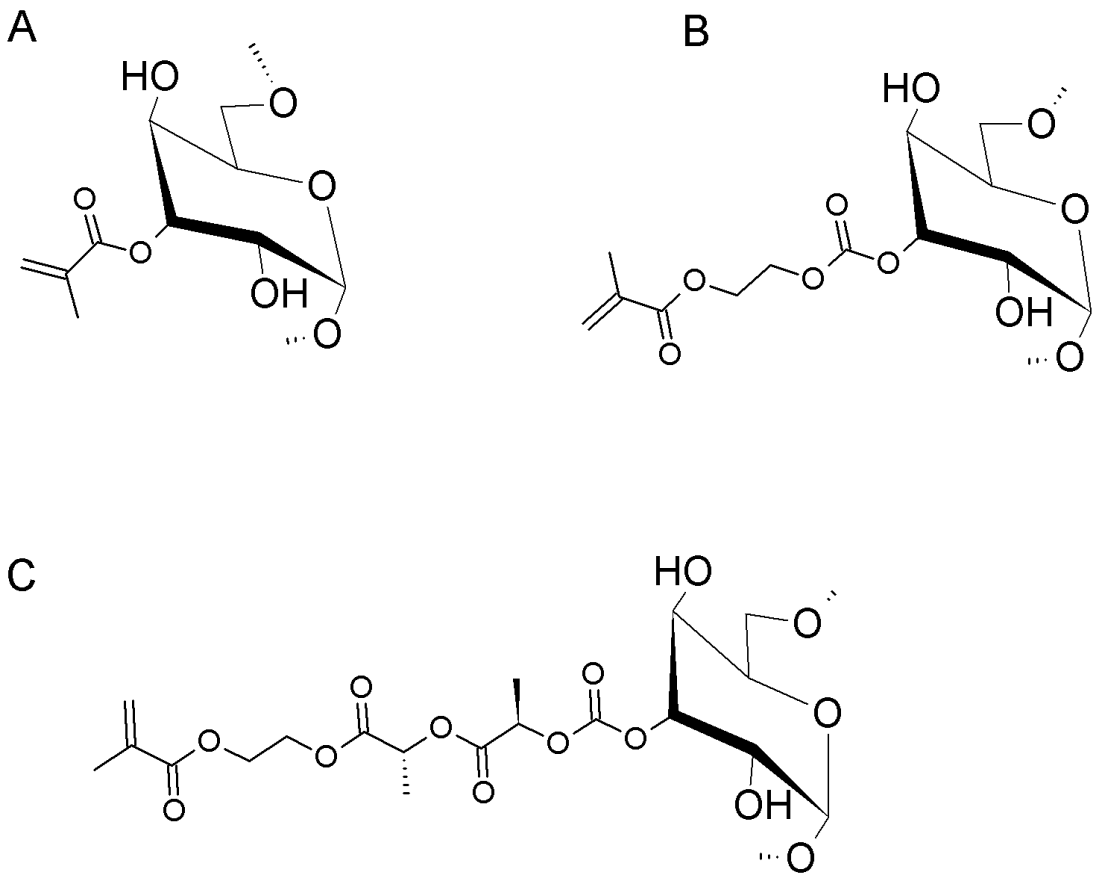
Şekil 1.16. Yakın IR ışınları ile altın nanokafeslerden kontrollü ilaç salımı (Yavuz ve ark., 2009)

1.7. Polimer Zincirinin Çapraz Bağlayıcı ile Bağlanması

Jel, hidrojel veya polimer parçacığı oluşması için doğrusal zincir olan polimerlerin çapraz bağlayıcılar ile bağlanması gerekmektedir. Polimer zincilerini çapraz bağlı örgü halini alması için çeşitli metotlar kullanımaktadır.

1.7.1. Radikal polimerizasyonu ile çapraz bağlanma

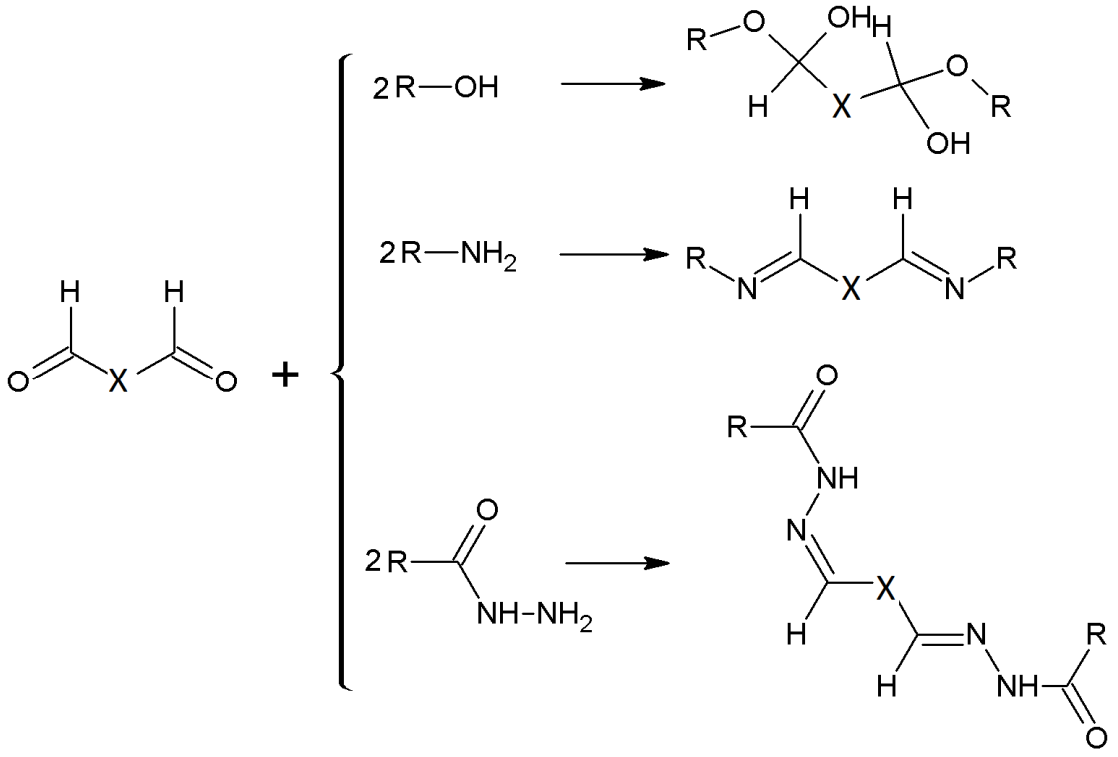
Kimyasal olarak çapraz bağlı hidrojeller düşük molekül kütlesine sahip monomerin çapraz bağlayıcı ajanın bulunduğu karışımının radikalik polimerizasyonu ile elde edilirler. Poli(2-hidroksietil metakrilat) PHEMA üzerinde sık çalışılan hidrojel sistemidir. Bu hidrojel ilk olarak Wichterle ve Lim (1960) tarafından etilen glikol dimekrilat (EGDMA) gibi uygun bir çapraz bağlayıcının kullanılmasıyla elde edilmiştir. Benzer prosedür uygulanarak geniş bir hidrojel sistemi tanımlanmıştır (Langer ve Peppas, 1981). Van Dijk-Wolthuis ve ark. (1997)'nın araştırması kimyasal olarak çapraz bağlanmaya ve çapraz bağlı hidrojel sisteminin biyolojik degradasyonu ile ilaç salımına iyi bir örnek teşkil etmektedir. Şekil 1.17.'de metakrilat-dekstran, HEMA ve dex-(laktat)-HEMA türevleri monomerler gösterilmiştir.



Şekil 1.17. (A) Dex-MAA (B) Dex-HEMA (C) Dex-$(lactate)_2$-HEMA moleküler yapıları

1.7.2. Tamamlayıcı bir grubun kimyasal reaksiyonu ile çapraz bağlanma

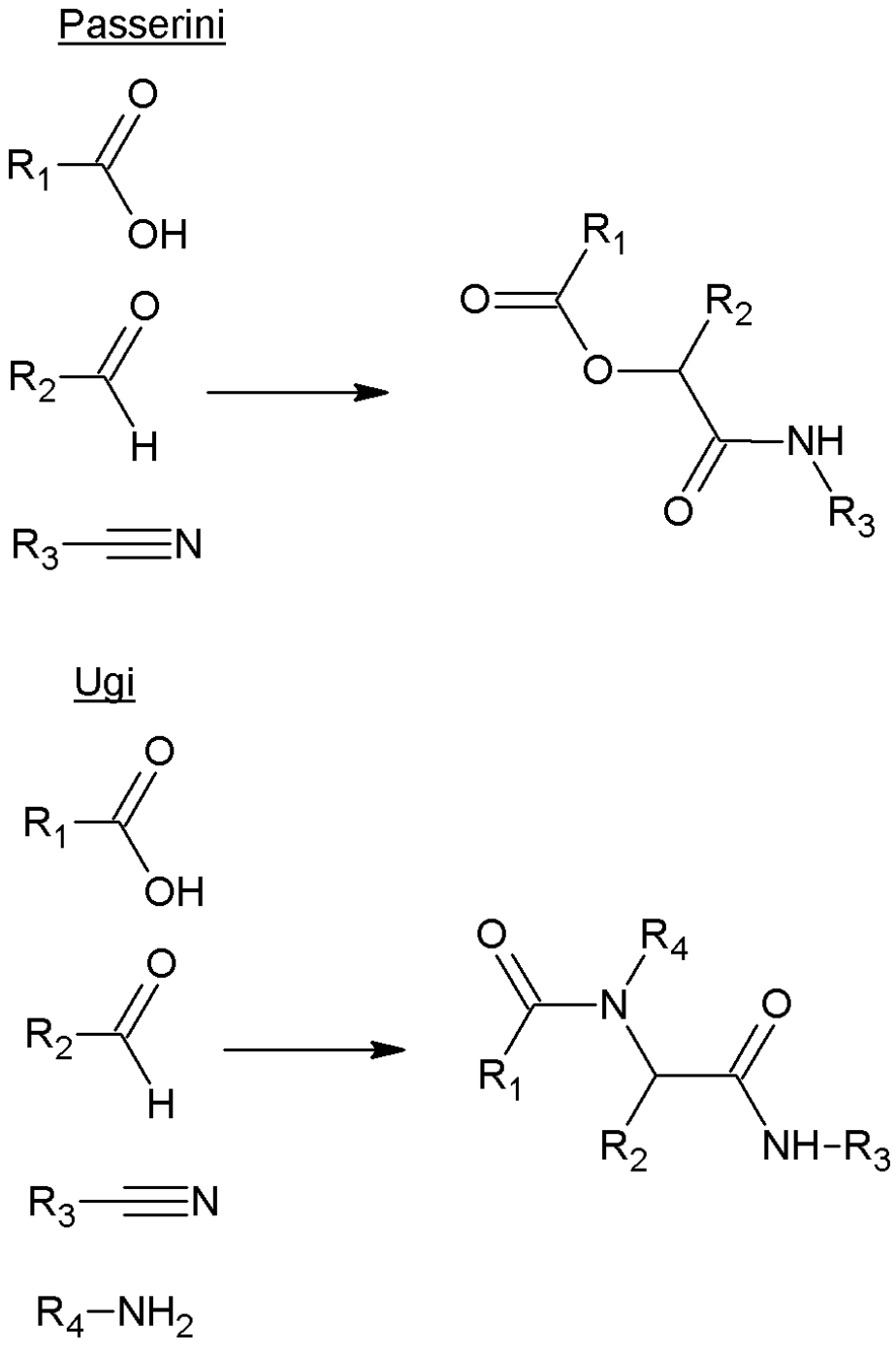
Polimer ana zincirine bağlı –OH, -COOH ve NH_2 grupları bulunan, suda çözünebilen polimerler, hidrojel elde edilmesinde kullanılabilir. Bahsi geçen fonksiyonel gruplar ile tamamlayıcı gruplar arasında kovalent bağ köprüsü ile çapraz bağlanma sağlanabilir. Amin-karboksil grupları, izosiyanat-OH/NH_2 veya schiff bazı oluşumu örnek olarak gösterilebilir. Şekil 1.18.'de gösterildiği şekilde, polivinil alkol gibi yapısında hidroksil grupları bulunan polimerler, gluteral aldehit ile çapraz bağlanabilir (Peppas ve Benner, 1980; Dai ve Barbari, 1999).



Şekil 1.18. Aldehit ortamında alkol, amin veya hidrozin grupları içeren polimerlerlerin çapraz bağanması (R polimer zincirini, X kısa karbon zincirini göstermektedir)

Çapraz bağlanmanın olabilmesi için düşük pH, yüksek sıcaklık ve metanole gereksinim vardır. Yapısında amin grubu bulunan polimerlerde ise bu durumun tersine yumuşak koşullarda çapraz bağlanma sağlanabilir. Bu reaksiyon tipi özellikle çapraz bağlı protein (örneğin albümin, Willmott ve ark., 1984), jelatin (Tabata ve Ikada, 1989) ve amin içeren polisakkarit (Jameela ve Jayakrishnan, 1995) eldesinde kullanılmaktadır. Diğer tamamlayıcı grup reaksiyon tipleri ise ekleme ve polikondenzasyon reaksiyon

tipleridir. Bu tip reaksiyonlara örnek olarak; polisakkaritler 1,6-hekzametilendiizosiyanat (Brondsted ve ark., 1995), divinil sulfon (Gehrke ve ark., 1998), veya 1,6-hekzandibromür (Coviello ve ark., 1999) sayılabilir. Ayrıca literatürde, Şekil 1.19'da şeması gösterilen, Passerini ve Ugi multikompanant kondenzasyon ismi ile bir kondenzasyon reaksiyonu tanımlanmıştır (de Nooy ve ark., 1999; de Nooy ve ark., 2000).



Şekil 1.19. Passerini ve Ugi kondenzasyon reaksiyonları

1.7.3. Yüksek enerji irritasyonu ile çapraz bağlanma

Gama ışınları veya elektron bombardımanı gibi yüksek enerjili radyasyona maruz kalan doymamış sistemler bu etki ile polimerleşirler. Diğer bir ifade ile suda çözünebilen vinil türevi polimerler yüksek enerjili ışınlara maruz kaldıklarında, hidrojel oluşturabilirler (Giammona ve ark., 1999). Ayrıca, vinil türevi olmaksızın da yüksek enerjiye etkisi ile polimerleşme olabilir. Gama ışını ya da elektron bombardımanı ile polimerdeki C-H bağı homolitik olarak radikal oluşturur. Aynı zamanda su molekülü hidroksil radikali oluşturur. Bu radikallerin polimer zincirini etkilemesi ile makroradikaller üretilir. Makroradikallerin birleşmesi sonucu, çapraz bağlı hidrojel sistemleri elde edilir (Peppas ve Mikos, 1986).

1.7.4. Enzim kullanımı ile çapraz bağlanma

Sperinde ve Griffith (1997) PEG bazlı hidrojel eldesinde enzim kullanımını içeren ilgi çekici bir araştırma yayınlamıştır. Bu araştırmada, tetrahidroksi PEG polimeri glutaminil grupları ile fonksiyonlanmıştır (PEG-Q). Glutamil fonksiyonel grupları içeren PEG polimeri ile trans glutaminas ile network yapısı oluşturmaktadır. Bu karışıma bir tür enzim olan poli(lysine-*co*-phenylalaline) eklendiğinde, enzim karboksamid grubu ile PEG-Q polimerini amit köprüsü oluşturmak suretiyle katalizler. Sonuçta çapraz bağlı PEG türevi hidrojel oluşur.

1.7.5. İyonik etkileşim ile çapraz bağlanma

Algin (algine), iyonik etkileşim ile çapraz bağlanmaya iyi bir örnek teşkil etmektedir. Algin, kalsiyum iyonları ile çapraz bağlanabilen manurolik (mannurolic) ve glukoronik (glucoronoc) asit içeren bir poli sakkarittir (Gacesa, 1988). Çapraz bağlanma işlemi oda sıcaklığında ve fizyolojik pH seviyesinde gerçekleşmektedir. Dolayısıyla, alginat daha çok canlı hücrelerin kapsüllenmesinde (Goosen ve ark., 1985) ve protein salımında kullanılmaktadır (Gombotz ve Wee, 1998).

1.7.6. Kristallenme ile çapraz bağlanma

Polivinil alkol (PVA) suda çözünebilen bir polimerdir. PVA polimerinin sudaki çözeltisi, zaman içinde, oda sıcalığında yumuşak ve kolay deforme olan bir jel oluşturmaktadır. PVA polimerinin sulu çözeltisi freze-thawing işlemine tabi tutulduğunda ise, ilginç bir şekilde, mekanik olarak son derece dayanıklı ve yüksek derecede elastik özellik gösteren bir jel oluşmaktadır. Oluşan jelin fiziksel özellikleri, PVA polimerinin molekül kütlesine, konsantrasyonuna, sıcaklığa, donma süresine ve kaç tekrar yapıldığına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Yokoyama ve ark., 1986).

1.7.7. Hidrojen bağı ile çapraz bağlanma

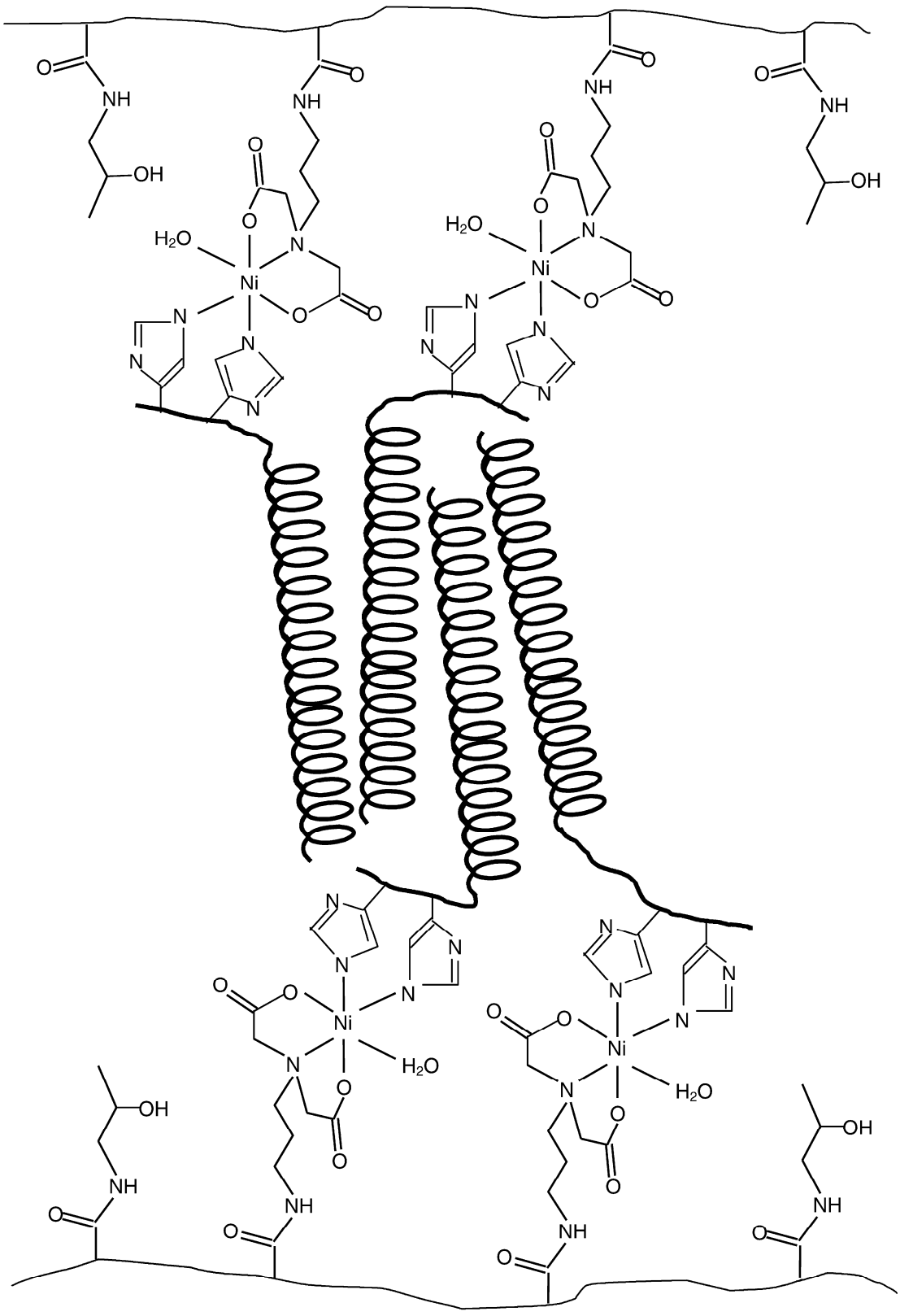
Poliakrilik asit ve polimetakrilik asit polietilenglikol (PEG) ile kompleks oluşturmaktadır. Bu kompleks yapılar, PEG zincirindeki oksijen ile asitte bulunan karboksil grubu arasında oluşan hidrojen bağı taşımaktadır. Hidrojen bağı ancak asit(ler) protone olduğunda oluşmaktadır. Diğer bir ifade ile hidrojen bağı ile çapraz bağlanma işlemi ortamın pH değeri ile doğrudan ilişkilidir. Bu da jel oluşumunun konrol edilebilir olmasını sağlamaktadır (Eagland ve ark., 1994).

1.7.8. Protein etkileşimi ile çapraz bağlanma

Protein mühendisliği, malzeme mühendisliği alanında, Triell ve Cappello tarafından öncülüğü yapılan yeni bir mühendislik alanıdır (Cappello ve ark., 1990; McGrath ve ark., 1992). Bu alanın en büyük avantajı, sentetik DNA dizilimindeki peptit sırasını değiştirmek suretiyle proteinin fiziksel ve kimyasal özelliğinin kontrol edilmesine imkân tanımasıdır. Hatta doğal olarak var olmayan sentetik amino asitlere de uygulanabilmektedir (Yoshikawa ve ark., 1994). Cappello ve ark. (1990) yaptıkları çalışmada genetik mühendisliği ile ipek ve elastin benzeri blok polimer hazırlamışlardır. Bu polimerde ipek benzeri blok, suda çözünmemekle birlikte doğrusal hidrojen bağları oluşturmaktadır. Bu şekilde hazırlanan ve ProLastins olarak adlandırılan biyouyumlu polimerler su içinde akışkan sıvı haldeyken ilaç molekülleri ile etkileşimi sonucu zaman içinde tek yönlü olarak sol-to-gel geçişi ile jel formuna geçmektedir. Jelleşme işleminin tetikleyicisi, polimer yapısındaki ipek benzeri kısımların kristalleşmesi olarak

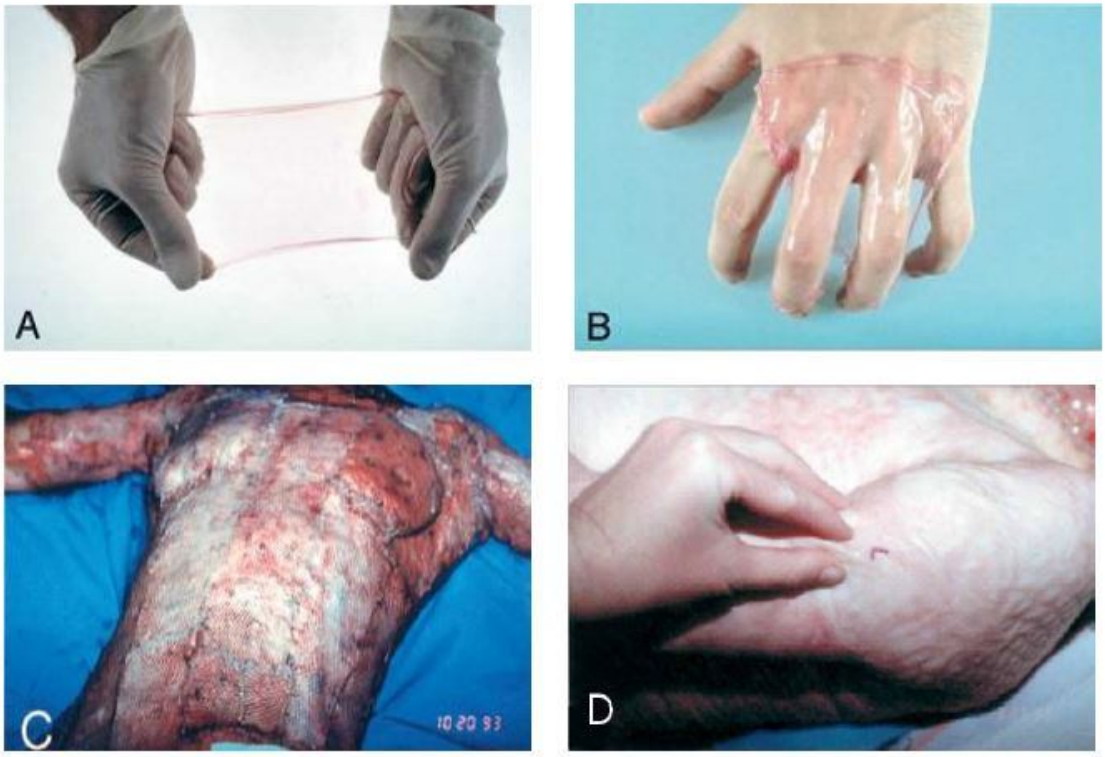
gösterilmiştir. Jelleşme hızı ve onu takibeden ilaç salım hızı, bileşimdeki su miktarına ve bileşimdeki maddelerin molekül kütlelerine bağlı olarak birinci mertebe hız kinetiğine benzer kinetiğe sahiptir (Cappello ve ark., 1990, Cappello ve ark., 1998).

Wang ve ark. (1999) yay-yay (coiled-coil) etkileşimi gösteren doğal ve işlenmiş proteinleri incelemiştir. Araştırmada, Şekil 1.20.'de şematik gösterimi yapılan yay şeklinde gruplar bulunan protein yapısı, polihidroksi propil metakrilamit (PHPMA) polimerini çapraz bağlayıcı moleküler yapı olarak kullanmışlardır. Proteinler, bir uçları ile histidin ile metal-ligand arasında oluşan metal kompleksleri ile polimer ana zincirine bağlanmıştır (Wang ve ark., 1999; Tang ve ark., 2001).



Şekil 1.20. Polimer zincirlerinin yay şekilli proteinler ile çapraz bağlanması (Wang ve ark., 1999)

Hidrojel oluşumunu sağlamak için pek çok çapraz bağlama yöntemi geliştirilmiştir. Ayrılabilir bağ taşıyan biyoaktif ajanı ya da canlı hücreyi kapsül içine hapsetmek için fiziksel çapraz bağlama yöntemi büyük ilgi çekmektedir. Bu yöntem sayesinde fizyolojik şartlarda ve organik çözücü kullanılmaksızın jelleşme sağlanmaktadır. Hidrojel filmler, Şekil 1.21.'de örneği gösterildiği şekilde yanık tedavisi gibi çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır (Ronfard ve ark., 2000). Gelecek projeksiyonu olarak, jelleşmeyi ve çapraz bağlanmayı sağlayacak uyarı etkili sistemlerin geliştirilmesi potansiyel olarak araştırılmaya ve geliştirilmeye aday bir konu olarak beklemektedir (Hennink ve van Nostrum, 2002).

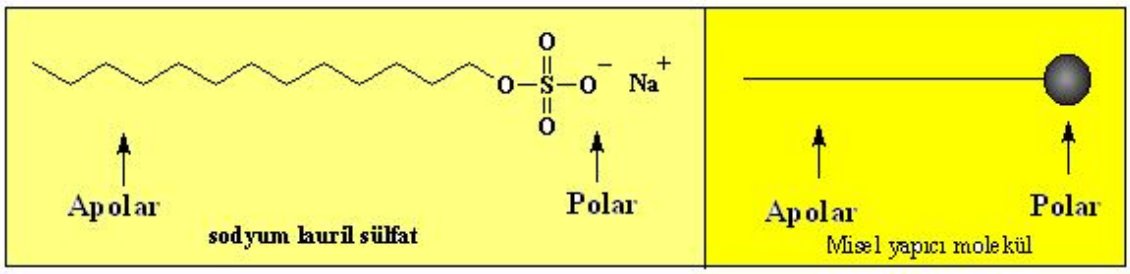


Şekil 1.21. Yanık tedavisinde hidrolej film kullanımı A) hidrojel film B) hidrojel film uygulaması C) tedavi öncesi ağır derece yanık vücut D) hidrojel film tedavisinden 3.5 yıl sonra (Hennink ve van Nostrum, 2002)

1.8. Emülsiyon Polimerizasyonu

Uygun emülsiyon yapıcılar yardımı ile su içinde çok ince dağılmış monomerin polimerleştirilmesi yöntemidir. Emülsiyon ifadesi aslında tarihsel gelişim içerisinde ortaya çıkmış bir yanlış kavramadan kaynaklanmıştır (Wikipedia web sitesi). Su ortamında, Şekil 1.22.'de örnek olarak verilen yapıda yüzey aktif bir madde ve suda

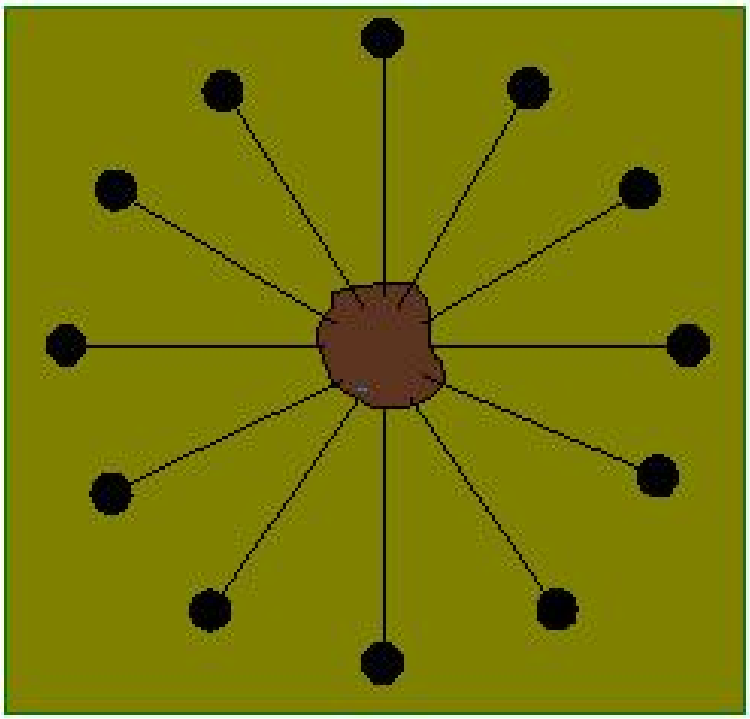
çözünen bir başlatıcı bulunur. Monomer, emülsiyon yapıcı bir madde yardımıyla ortama dağılmış haldedir. Polimerizasyon başlatıcısı suda çözünen bir maddedir. Ortam devamlı karıştırılarak monomerin çok küçük parçacıklar halinde dağılarak elde edilmesi sağlanır. Monomer yüzey aktif bir madde (sabun gibi) ile kararlı hale getirilir ve bu damlacıklara misel denilir. Misellerin bir ucu hidrofobik diğer ucu hidrofiliktir.



(a) (b)

Şekil 1.22. (a) Misel yapıcı olarak kullanılan sodyum lauril sülfat (b) Misel yapıcı molekülün apolar ve polar uçları

Polimerleşme misellerde çabuk ve oldukça düşük sıcaklıklarda yapılır. Yapılan ölçümler misellerin çubuk şeklinde olduğunu göstermiştir. Her misel 50-100 emülsiyon yapıcı molekülden oluşur. Şekil 1.23.'de gösterildiği şekilde, miseli oluşturan bu moleküllerin, hidrokarbon kuyrukları miselin içine, iyonik uçları ise suya doğru dönük durmaktadır.



Şekil 1.23. Yüzey aktif madde ile çevrelenmiş içinde monomer bulunan misel

Emülsiyon polimerizasyonunun başlangıcında misel yapıcı ve su karıştırılır. Karışımda bulunan misellerin bir kısmı suda çözünür, bir kısmı da bir araya toplanarak küresel miseller oluşturur.

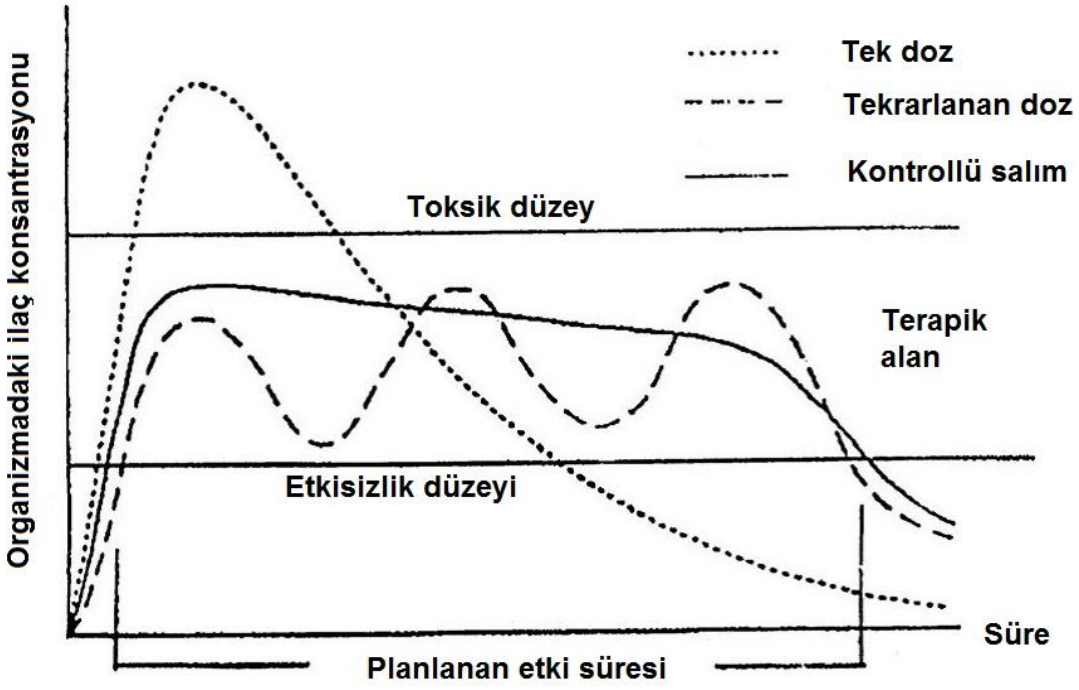
Su içerisinde miseller çözüldükten sonra karıştırılarak ortama monomer katılır. Monomerin bir kısmı suda çözünür, bir kısmı misellerin içine girerek onları şişirir, diğerleri de monomer damlaları halinde suda dağılır. Emülsiyon yapıcı madde ortamda bulunan monomerlere tutunur ve polimerizasyon gerçekleşir. Ortamdaki polimerlere sarılarak polimerizasyon işlemi sonlanmış olur.

Emülsiyon polimerizasyonunun başlıca avantajları: Polimerizasyon hızının yüksek olması, yüksek mol kütleli polimer elde edilmesi, sıcaklık kontrolünün kolay olması, düşük viskozite, kütle ve çözelti polimerizasyonuna göre daha emniyetli olması ve organik çözücü kullanılmaması şeklinde sıralanabilir (MEB web sitesi).

Emülsiyon polimerizasyonunu ilk olarak 1.Dünya savaşı öncesi sentetik lastik elde etme amaçlı Bayer tarafından uygulanmıştır. Gerçek anlamda ve yüzey aktif maddenin kullanıldığı, emülsiyon polimerizasyonu ile elde edilen polimer izoprendir. 2. Dünya savaşından sonra emülsiyon polimerizasyonu tekniği oldukça gelişmiştir. Sentetik plastik üreticileri, organometalik tekniklerin gelişmesi ile emülsiyon polimerizasyonundan zamanla uzaklaşmışlardır (Wikipedia web sitesi).

1.9. Akıllı Polimer Hazırlanmasındaki Güçlükler ve Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar

İlaç taşıyıcı dış etkiye duyarlı sistemlerin oluşturulması ilaç taşınım bilimsel alanında yeni bir senaryo ortaya koymaktadır. Aslında duyarlı sistemlerin ilaç taşınım sistemi olarak kullanılması "basit" bir işlem değildir ve pek çok faktörün dikkate alınması gerekir. Bu faktörlerin başında ilaç yüklü taşıyıcı molekülün biyouyumlu olması, *in-vitro* ve *in-vivo* olarak toksik olmaması, hastanın biyolojik yapısında komplikasyon yapmaması, verimlilik ve üretim maliyetinin kabul edilebilir sınırlar içinde olması sıralanabilir. İlaç taşınım teknolojisi açısından ve farmakinetik açıdan en ideal ilaç taşınımı; belirli bir organ ya da dokuya, önceden belirlenmiş hızda, belirli bir zaman diliminde ve belirli bir dozda ilacın taşınmasıdır. Geleneksel ilaç taşınım sitemi olan tablet veya enjeksiyon ile ilaç taşınımı halen en yaygın olarak kullanılan metotlardır. Fakat, Şekil 1.24.'de gösterildiği şekilde, tablet ve enjeksiyonlar vücut içinde ilaç salım hızında çok kısmi kontrol sağlayabilirler. Bu yolla vücuda verilen ilaçlar terapik seviyenin üstünde bir hızla vücuda nüfuz eder ve zamanla konsantrasyonu azalarak etki sınırının altına düşer. Bu yolla etki hızı kontrolü, ilacın vücuda verileme periyoduna ve ilacın yarı ömrüne bağlıdır. Bu şekilde ilaç derişimindeki osilasyon bir kısım kemoterapi uygulamarda toksik etki meydana getirmektedir (Şekil 1.22., Bajpai ve ark., 2008b).



Şekil 1.24. İlaç salım kinetiği

Akıllı ilaç taşıyıcı polimerler üzerindeki çalışmalar, bu alanın gelecekte daha verimli ve spesifik olarak gelişeceğine dair olumlu işaret vermektedir. Akıllı polimerik sistemlerin üstün yanı ise spesifik olarak işlev görmesidir. Bu alanda yapılan araştırmaların çokluğuna rağmen halen üzerinde çalışılmayı ve geliştirilmeyi bekleyen konular da mevcuttur. Bunlar;

- Birden fazla uyarıya duyarlı ilaç taşınım sistemleri geliştirilmesi
- Çevre ile barışık olması
- Daha hassas duyarlılıkta sistem geliştirilmesi
- Ekonomik olarak uygun olması, geniş halk kitlesinin satın alabiliyor olması
- Hedefe yönelik ve daha lokalize ilaç salım yapılması
- Modern teknolojilere uyumlu olması
- Üretimi ve uygulamasının kolay olması
- Verimliliğin artırılması
- Vücuda uyumlu polimerle ağızdan insülin alınmasını sağlayan akıllı taşıyıcı sistem geliştirilmesi
- Yan etkilerin azaltılması

Akıllı polimerik yapıların nanoteknolojideki gelişmelere paralel olarak gelecekte, Şekil 1.25.'de modeli gösterilen, çok daha kompleks yapıda ve birden fazla etkiye

duyarlı, hedefe yönelik taşınım sağlayan sistemler olacağı öngörülmektedir (Motornov ve ark., 2010).



Şekil 1.25. Birden fazla uyarıcı etkiye duyarlı akıllı polimerik sistemlerin gelecek projeksiyonu

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

Kimyasallar:

4- Vinil fenil boronik asit (VPBA)	Alfa Aesar
Bis(2-hidroksietil) disülfit	Alfa Aesar
D-(−)-fruktoz	Alfa Aesar
Trietilamin	Alfa Aesar
Kafeik asit	Fluka
1,4- ditiyotreitol (DTT)	Merck
Amonyum persülfat (APS)	Merck
Poli (etilenglikol) (PEG, MW= 4000)	Merck
Sodyum karbonat (susuz)	Merck
Sodyum sülfat (susuz)	Merck
2,2'-azobis(2-metilpropinamit) dihidroklorür (AMPDH)	Sigma-Aldrich
2-Hidroksietil metakrilat (HEMA)	Sigma-Aldrich
4-(dimetilamino) piridin (DMAP)	Sigma-Aldrich
Akrilol klorür	Sigma-Aldrich
Alizarin sarısı GG	Sigma-Aldrich
Aseton (for HPLC, ≥99,9%)	Sigma-Aldrich
D-(+)- Glukoz	Sigma-Aldrich
Florosein isotiosiyanat (FITC)	Sigma-Aldrich
Etilen glikol dimekrilat (EGDMA)	Sigma-Aldrich
Kloroform	Sigma-Aldrich
Metil Metakrilat (MMA)	Sigma-Aldrich
N,N′-disiklohekzilkarbodiimin (DCC)	Sigma-Aldrich
N-vinil 2-prolidon (NVP)	Sigma-Aldrich
Poli (etilenglikol) metil eter metakrilat (MW= 188, PEGMA)	Sigma-Aldrich
Rhodamine B	Sigma-Aldrich
Sodyum klorür	Sigma-Aldrich
Tetrahidrofuran (THF)	Sigma-Aldrich

Tüm kimyasallar herhangi bir işleme tabi tutulmaksızın teslim alındığı şekilde kullanıldı.

In-vitro hücresel toksisite deneyler için NIH-3T3 fibroblast cell line (ATCC# CRL-1658), Cell Proliferation Kit (XTT based, Biological Industries) ve Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma) kullanıldı.

Deneylerde, Millipore deiyonize su arıtma sisteminde direnci 18.2 mΩ olarak ölçülen deiyonize saf su kullanıldı.

Cihazlar:

Taramalı elektron mikroskobu (SEM)	Zeiss Evo Ls10
Taramalı elektron mikroskobu altın ile kaplama cihazı	Cressington spliter coater (model 108)
Dinamik ışık saçılımı (DLS)	BIC (Brookhaven Instruments corporation) 90 plus
UV-Vis spektrofotometri	Uv Biochrom Libra
Florasans spektrofotometri	Hitachi F-7000
pH metre	WTW 330i

2.2. Biyouyumlu ve Sıcaklık Duyarlı PEGMA Nanoparçacıkları ile İkili Salım Uygulaması

2.2.1. PEG-Alizarin sarısı makroboya sentezi

1.0 gram alizarin sarısı sodyum tuzu 20 mL saf su içinde çözülmesi ile elde edilen çözelti 0.1 M HCl asit çözeltisi ile titre edildi. Asit titrasyonu ile birlikte koyu kahve renkli alizarin sarısı katı olarak çökelti oluşturdu. Çökelmenin tamamlanmasından sonra filtre kâğıdı ile alizarin sarısı katı ayrıldı ve filtre kâğıdı üzerindeki katı bir gece kurumaya bırakıldı. Kurumuş haldeki alizarin sarısından 200 mg tartıldı 250 mL yuvarlak tabanlı balon joje tepkime kabında 30 mL THF içinde çözüldü. Bu çözeltiye 2 g polietilenglikol (MW= 4000) ilave edildi. Karışıma katalitik miktar 4-(dimetilamino)piridin (DMAP) ilave edildi. Bu karışım manyetik karıştırıcı üzerinde içinde buz bulunan bir kap içine yerleştirildi. Ayrı bir yerde hazırlanan disiklohekzilkarbodiimin (DCC) çözeltisi (0.155 g DCC 10 mL THF içinde) buz

üzerindeki karışıma damla damla ilave edildi. Manyetik karıştırıcı 400 rpm devirde çalıştırıldı. DCC'nin tamamen ilave edilmesinden sonra buz üzerindeki sistem 30 dakika manyetik olarak karıştırılmaya devam edildi. Oda sıcaklığına alınan tepkime sistemi, 60 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Devamında, tepkime sistemi 40 ^{o}C su banyosu içine alındı ve 24 saat bu sıcaklıkta tepkime devam etti. Tepkimede yan ürün olarak oluşan üre türevi katı madde (disiklohekzil üre) filtre edilerek ayrıştırıldı. THF içinde çözünmüş olarak bulunan PEG-Alizarin sarısı makroboya bileşiği, THF'nin düşük basınç altında uçurulması ile açık turuncu renkli katı olarak elde edildi ve ileriki işlemlerde kullanılmak üzere 0-4 ^{o}C sıcaklıkta, ışık almayan ortamda saklandı.

2.2.2 Disülfit bazlı çapraz bağlayıcı sentezi [bis(2-akriloloksietil) disülfit, (DSDA)]

Bis(2-akriloloksietil) disülfit bileşiği yapısında disülfit (-S-S-) bağı içeren çapraz bağlayıcı bileşiktir. DSDA sentezi literatürde prosedürü verilen disülfit bazlı çapraz bağlayıcı sentezine benzer şekilde sentezlendi (Zhang ve ark., 2008b). 10 mmol bis(2-hidroksietil) disülfit ile 80 mmol trietilamin 250 mL hacimli yuvarlak tabanlı balon jojede 80 mL THF içinde çözüldü. Karışım çözelti buz içeren bir kap içinde manyetik karıştırıcı üzerine yerleştirildi. Çözelti 400 rpm devirde karıştırılıyorken üzerine ayrı bir yerde hazırlanan 20 mL THF içinde 40 mmol akrilol klorür içeren çözelti damla damla ilave edildi. Akrilol klorürün tamamen eklenmesinden sonra oda sıcaklığında 60 dakika bekletildi. Devamında tepkime kabı, 45 ^{o}C'de su banyosu içinde 24 saat bekletildi. Tüm bu işlemler manyetik karıştırıcı üzerinde gerçekleştirildi. Tepkimede yan ürün olarak çökelek oluşturan trietil amonyum tuzu filtre edilerek ayrıldı. İçinde DSDA bulunan THF çözeltisinden (açık turuncu rekli), THF düşük basınç altında uzaklaştırıldı. Ham ürün olarak elde edilen yağımsı açık turuncu-kahverengindeki DSDA, 80 mL kloroform içinde çözüldü. Üzerine 0.1 M sodyum karbonat çözeltisi ile yıkama işlemi yapıldı. Tepkimede arta kalan akrilol klorür ve trietilamin su fazına alındı ve ayırma hunisinde organik faz ayrıldı. Toplamda 3 defa 0.1 M sodyum klorür ile devamında da 3 defa saf ile yıkama işlemi yapıldı. Son yıkama işleminden sonra organik faz susuz sodyum sülfat üzerinden geçirilerek organik fazda bulunan kısmi çözünmüş sudan arındırıldı. Düşük basınç altında kloroform uzaklaştırıldı ve açık turuncu-kahverengindeki yağımsı madde olarak elde edilen DSDA ileriki işlemlerde kullanılmak üzere 0-4 ^{o}C sıcaklıkta, ışık almayan ortamda saklandı.

2.2.3. Emülsiyon polimerizasyonu ile çapraz bağlı poli(PEGMA-*ko*-vinil prolidon) polimer nanoparçacık sentezi (NP3)

25 mL hacimli vial içinde 80 µL PEGMA (MW= 188) ile 20 µL vinil prolidon 10 mL aseteon-su karışımı içinde çözüldü (3.5 mL / 6.5 mL). 5.85 mM disülfit bazlı çapraz bağlayıcı DSDA karışıma eklendi. Karışımın içinde çözünmüş oksijenin ortamdan uzaklaştırılması amacıyla karışım içinden 30 dakika boyunca azot gazı geçirildi. Polimerleşmeyi başlatmak için serbest radikal başlatıcısı olan AMPDH (1.11 mM) ilave edildi. Tepkime boyunca vial içindeki asetonun kaynamasını önlemek amacıyla vialin kapağı teflon bant sarılarak sıkıca kapatıldı. Vial, manyetik karıştırıcı üzerinde 70 ^{o}C bulunan su banyosuna yerleştirildi. Manyetik karıştırıcı 400 rpm devirde çalıştırıldı. 3 saat sonra vial su banyosundan alındı ve soğutuldu. Tepkime sonucu oluşan süt beyaz görünümündeki süspansiyon 7000 devirde 10 dakika süre ile santrifüj edildi. Santrifüj sonucu, santrifüj tüpünün tabanında çöken nanoparçacıklar çözücüden ayrıldı. Bu şekilde 3 defa su ile yıkama işlemi yapılarak tepkimeye girmeyen monomerler ve reaktantlar ortamdan uzaklaştırıldı. Son yıkama işleminden sonra nanoparçacıklar 6 mL su içine süspanse edildi (Ulasan ve ark., 2014).

2.2.4. PEGMA nanoparçacıklarına PEG-Alizarin sarısı ve rhodamine B boyalarının yüklenmesi

2.2.3. Bölümde tanımlanan PEGMA nanoparçacıklarının emülsiyon polimerizasyonu yolu ile elde edilmesi prosedüründe, radikal başlatıcı olan AMPDH ilave edilmeden hemen önce 0.5 mg rhodamine B ve 6 mg alizarin sarısı makroboya karışıma ilave edildi. Bundan sonraki işlemler bölüm 2.2.3.'de tanımlandığı şekilde devam etti.

2.2.5. Çapraz bağlı PEGMA nanoparçacıklarının 1,4- ditiyotreitol (DTT) ile degredasyonu

Bölüm 2.2.3.'de işlem sırası verilen PEGMA nanoparçacıklarının sentezlenmesi işleminde, tepkime ortamına radikal başlatıcı AMPDH ilave edilmeden hemen önce 6 mg PEG-Alizarin sarısı ortama eklendi. Bölüm 2.2.3.'de tanımlanan işlem sırası takip edildi. Polimerleşme tepkimesi sonucunda oluşan PEG-Alizarin sarısı makroboya

yüklenmiş nanoparçacıklar su ile 3 defa yıkandı. Son yıkama işleminden sonra elde edilen makroboya yüklü nanoparçacıklar, 7 mL saf su içinde süspanse edildi. Makroboya yüklü nanoparçacık süspansiyonundan 1'er mL alınarak 5 mL hacimli 7 ayrı viale enjekte edildi. Her bir viale DTT derişimi derişimi 1, 2, 5, 10, 25, 50 ve 75 mM olacak şekilde DTT eklendi. Ortam pH değeri 8 olarak ayarlandı. Vialler 37 ^{o}C'de, 2 saat boyunca manyetik karışıtıcı ile karıştırıldı. Viallerdeki süspansiyonlar santrifüj tüplerine aktarıldı ve 7000 devirde 10 dakika süre ile santrifüj edildi. Santrifüj sonrası çözelti kısmı UV küvetlerine aktarıldı. UV-Vis spektrofotometrik cihaz ile 372 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü ve kaydedildi.

2.2.6. Sıcaklık ve DTT degredasyonu ile ikili boya salım ölçümleri

Bölüm 2.2.4.'de tanımlanan PEG-Alizarin makroboya ve rhodamine B yüklü PEGMA nanoparçacıkları oda sıcaklığında 10 mL saf su içerisine süspanse edildi ve 2 saat süreyle manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldı. Devamında, santrifüj edildi ve çözelti kısmı içerisinde her hangi bir boya içeriğini tespit için UV-Vis spektrofotometrik cihaz ile 250-600 nm dalga boyları arası taramalı modda (wavescan) absorbans ölçümü yapıldı. Aynı çözücü içinde tekrar süspanse edilen nanoparçacıklar bu defa 37 ^{o}C'deki su banyosu içinde manyetik karıştırıcı ile 2 saat boyunca karıştırıldı. Devamında santrifüj edildi ve çözelti kısmı bir önceki işlemde olduğu gibi aynı parametler ile UV-Vis absorbans ölçümü yapıldı ve kaydedildi. Çözelti içine tekrar süspanse edilen nanoparçacık süspansiyonuna derişimi 10 mM olacak şekilde DTT eklendi ve 2 saat boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldı. DTT ile muamele sonrasındaki çözelti içindeki boyanın tespiti için süspansiyon karışım santrifüj edildi ve çözelti kısmı bir önceki işlemdeki aynı parametreler ile UV-Vis absorbans ölçümü yapıldı ve kaydedildi.

2.2.7. *In-vitro* hücresel toksisite ölçüm deneyleri

PEGMA nanoparçacıklarının canlı hücre üzerinde toksik etki meydana getirip getirmediği NIH-3T3 fibroplast hücre kültürü ile XTT kiti kullanılarak ölçüldü. 10 fetal bovine serum ve % 1 penisilin içeren DMEM 96 kuyucuklu kite yerleştirildi. Bir sıra kuyucuk kontrol grubu olarak kullanıldı. Diğer sıralara ise PEGMA nanoparçacık derişimi 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5 ve 1 mg/mL olacak şekilde enjekte edildi. Deney kiti

37 ^{o}C'de 24 saat ve 48 saat süre bekletildi. Hücrelerin canlılık aktivitesi 460 nm dalga boyundaki formazan absorbansı ile ölçüldü. Veriler kaydedildi.

2.2.8. PEGMA nanoparçacıklarının karakterizasyonu

2.2.8.1 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterizasyon

Yeni olarak sentezlenmiş disülfit çapraz bağlayıcılı PEGMA nanoparçacıkları saf su içinde seyreltildi. Seyreltik süspansiyondan alınan 1-2 damla SEM grid üzerine damlatıldı ve SEM grid oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Suyun tamamen buharlaşmasından sonra SEM grid, cressington spliter coater (model 108) cihazı ile üzerine altın kaplama işlemi yapıldı. Taramalı elektron mikroskobu (Zeiss Evo Ls10) ile SEM grid üzerindeki tabakanın mikrofotoğrafları kaydedildi.

2.2.8.2. Dinamik ışık saçılımı (DLS) ile karakterizasyon

PEGMA nanoparçacıklarının hidrodinamik çapları ve polidispersite indeksleri BIC (Brookhaven Instruments corporation) 90 plus cihazı ile ölçüldü. Her bir ölçüm için; yeni sentezlenmiş PEGMA nanoparçacıklarından 0.5 mL alındı ve 10 mM KCl çözeltisinden alınan 2 mL ile seyreltildi. Bu şekilde hazırlanan ölçüm numuneleri cihazın küvetine yerleştirildi. Cihazın ölçüm programı 2 dakika boyunca her 20 saniyede bir ölçüm yapacak şekilde ayarlandı (bir numune için 6 ölçüm). Her bir numune ölçüm işlemi 3 defa tekrar edildi. Veriler kaydedildi.

2.2.8.3. UV-Vis spektrofotometrik ölçümler

Tüm UV-Vis spektrofotometri ölçümleri UV Biochrom Libra spectrophotometry cihazı ile gerçekleştirildi. Bölüm 2.2.6.'da tanımlanan UV-Vis absorbans ölçümleri; sanrtifüj işlemi sonunda santrifüj tüpünden alınan çözeltinin doğrudan UV küvetine enjekte edilmesi ile ölçüldü. Herhangi bir seyreltme işlemi uygulanmadı. Referans olarak saf su kullanıldı. UV-Vis spektrofotometri ile 250-600 nm dalga boyları arası ölçüm yapıldı. Veriler kaydedildi.

2.2.8.4. Florasans spektrofotometri ile ölçümler

Florasans ekzitasyon ve emisyon ölçümleri Hitachi F-7000 model Florasans spektrofotometri cihazı ile gerçekleştirildi. Yeni olarak sentezlenen PEGMA nanoparçacıkları seyreltik florosein isotiosiyanat (FITC) sulu çözeltisi ile oda sıcaklığında 4 saat süre ile manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Santrifüj edilerek su ile yıkama işlemi yapıldı (3 defa). Yıkama işlemlerinin ardından elde edilen FITC ile modifiye edilmiş PEGMA nanoparçacıklarının su ile seyreltik süspansiyonunun florasans ekzitasyon ve emisyon ölçümleri yapıldı. Kontrol gurubu olarak yalın PEGMA nanoparçacıklarının florasans ekzitasyon ve emisyon ölçümleri de yapıldı.

2.3. Biyouyumlu Hidrojel Sentezlenmesi, Su Tutma Kapasitesi ve Jelleşme Üzerinde Çözücü Etkisi

2.3.1. Polihidroksietil metkarilat (PHEMA) hidrojel sentezi

Monomer olarak 10 mmol hidroksietil metakrilat (HEMA), çapraz bağlayıcı olarak 0.1 mmol etilen glikol dimekrilat (EGDMA) 10 mL aseton-su karışımı (3 mL aseton+7 mL saf su) 20 mL vial içinde çözüldü. Karışımda çözünmüş oksijeni uzaklaştırmak için karışım içinden 30 dakika azot gazı geçirildi. Görsel olarak reaksiyonu takip etmek için karışıma çok az miktar rhodamine B boyar maddesi ilave edildi. Son olarak, 0.1 mmol radikal başlatıcı olan amonyum persülfat (APS) karışıma ilave edildi. Vialin kapağı teflon bant ile sarıldıktan sonra sıkıca kapatıldı ve önceden hazırlanmış olan 70 ^{o}C'deki su banyosu içine konuldu. 60 dakika manyetik karıştırıcı ile reaksiyon devam etti. 60 dakikadan sonra vial su banyosundan alındı ve soğutuldu (Ulasan ve ark., 2013).

2.3.2. PHEMA hidrojelinin su absorblama kapasitesinin ölçümü

Bölüm 2.3.1.'de elde edilen PHEMA jelinden 2 parça örnek alındı. 75 ^{o}C sıcaklıktaki fırın içinde gece boyu kurutuldu. Kuru olarak ağırlıkları ölçüldü ve kaydedildi. Kuru haldeki 2 adet örnek jel parçası 50 mL beher içinde konmuş 30 mL saf su içerisine yerleştirildi ve 24 saat süre ile jeller su içerisinde hafif şekilde karıştırıldı.

Filtre kağıdı ile fazlalık su uzaklaştırıldıktan sonra jellerin ağırlığı ölçüldü ve kaydedildi.

2.3.3. Jelleşme üzerine çözücü etkisi

Jelleşme üzerine çözücü etkisini araştırmak için monomer, çapraz bağlayıcı ve başlatıcı oran ve miktarları sabit tutulup çözücü ortamı olan aseton-su karışımındaki oranlar değiştirilerek, her bir kombinasyon için polimerleşme deneyi tekrar edildi ve sonuçlar kaydedildi. Polimerleşme parametreleri Çizelge 2.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. PHEMA polimerleşme parametreleri

Deney kod numarası	HEMA (mmol)	EGDMA (mmol)	APS (mmol)	H_2O (mL)	Aseton (mL)	Gözlem
G1	10	0.1	0.2	10	0	Kütle çökelek 5 dk.
G2	10	0.1	0.2	9	1	Kütle çökelek 5 dk.
G3	10	0.1	0.2	8	2	Jel oluşumu 10 dk.
G4	10	0.1	0.2	7	3	Jel oluşumu 30 dk.
G5	10	0.1	0.2	6	4	Jel oluşumu 63 dk.
G6	10	0.1	0.2	5	5	Jel oluşmadı Transparan çözelti
G7	10	0.1	0.2	4	6	Jel oluşmadı Transparan çözelti
G8	10	0.1	0.2	3	7	Jel oluşmadı Transparan çözelti
G9	10	0.1	0.2	2	8	Jel oluşmadı Transparan çözelti
G10	10	0.1	0.2	1	9	Jel oluşmadı Transparan çözelti
G11	10	0.1	0.2	0	10	Reaksiyon olmadı (başlamadı)

2.4. Glukoz Duyarlı PMMA Nanoparçacıkları Sentezi ve Kafeik Asit Salımında Kullanılması

2.4.1. Polimetil metakrilat-*ko*-vinilfenil boronik asit (PMMA-*ko*-VFBA) nanoparçacık sentezi

25 mL hacimli vial içinde 900 mg metil metkarilat ile 100 mg vinilfenil boronik asit 10 mL aseteon-su karışımı içinde çözüldü (4 mL / 6 mL). Karışımın içinde çözünmüş oksijenin ortamdan uzaklaştırılması amacıyla karışımın içinden 30 dakika boyunca azot gazı geçirildi. Polimerleşmeyi başlatmak için serbest radikal başlatıcısı olarak 25 mg amonyum per sülfat (APS) ilave edildi. Tepkime boyunca vial içindeki asetonun kaynamasını önlemek amacıyla vialin kapağı teflon bant sarılarak sıkıca kapatıldı. Vial, manyetik karıştırıcı üzerindeki 70 ^{o}C'deki su banyosuna yerleştirildi. Manyetik karıştırıcı 400 rpm devirde çalıştırıldı. 3 saat sonra vial su banyosundan alındı ve soğutuldu. Tepkime sonucu oluşan süspansiyon 7000 devirde santrifüj edildi ve çözelti kısmından uzaklaştırıldı. Yeniden saf su içinde dispers edilen nanoparçacıklar tekrar santrifüj edildi. Toplamda 3 defa saf su ile yıkama işlemi yapıldı. Nanoparçacıklar son yıkama işleminden sonra 10 mL saf su içerisine dispers edildi ve ileriki işlemLerde kullanılmak üzere stok süspansiyon olarak depolandı.

2.4.2. PMMA-*ko*-VFBA nanoparçacıklarına kafeik asit bağlanması

Bölüm 2.4.1.'de tanımlanan PMMA-*ko*-VFBA nanoparçacık stok süspansiyonundan 200 µL alındı ve 6 mL $1.25*10^{-3}$ M kafeik asit çözeltisine ilave edildi. 0.005 M NaOH ile çözelti ortamı pH= 8.2 olarak ayarlandı. Karışım oda sıcaklığında 2 saat boyunca 500 rpm devirde manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Karışım ortamından mikro pipet ile 80 µL çekildi ve 2.5 mL saf su içeren cam UV küvetine enjekte edildi. 200-400 nm arasında UV-Vis absorbans taraması yapıldı ve sonuçlar kaydedildi.

2.4.3. Glukoz ile kafeik asit salımı

Bölüm 2.4.2.'de tanımlanan kafeik asit bağlı PMMA-*ko*-VFBA nanoparçacıkları $1.25*10^{-3}$ M glukoz ile titre edildi. Titrasyon otomatik şırınga sistemi içeren pompa yardımı ile yapıldı. 10 mL hacimli şırınga içerisine $1.25*10^{-3}$ M glukoz çözeltisi çekildi. Elektrikli pompa sistemi dakikada 0.1 mL glukoz enjekte edecek şekilde ayarlandı. Her bir titrasyon aralığında reaksiyon ortamından 80 µL çekildi ve 2.5 mL saf su içeren UV cam küvetine enjekte edildi. 200-400 nm arasında UV-Vis absorbans taraması yapıldı ve sonuçlar kaydedildi.

Tüm işlemler $1.25*10^{-3}$ M glukoz yerine, $1.25*10^{-3}$ M fruktoz kullanılarak, diğer parametreler glukoz titrasyonundaki ile aynı olmak üzere tekrarlandı. Tüm veriler kaydedildi.

2.4.4. *In-vitro* hücresel toksisite ölçüm deneyleri

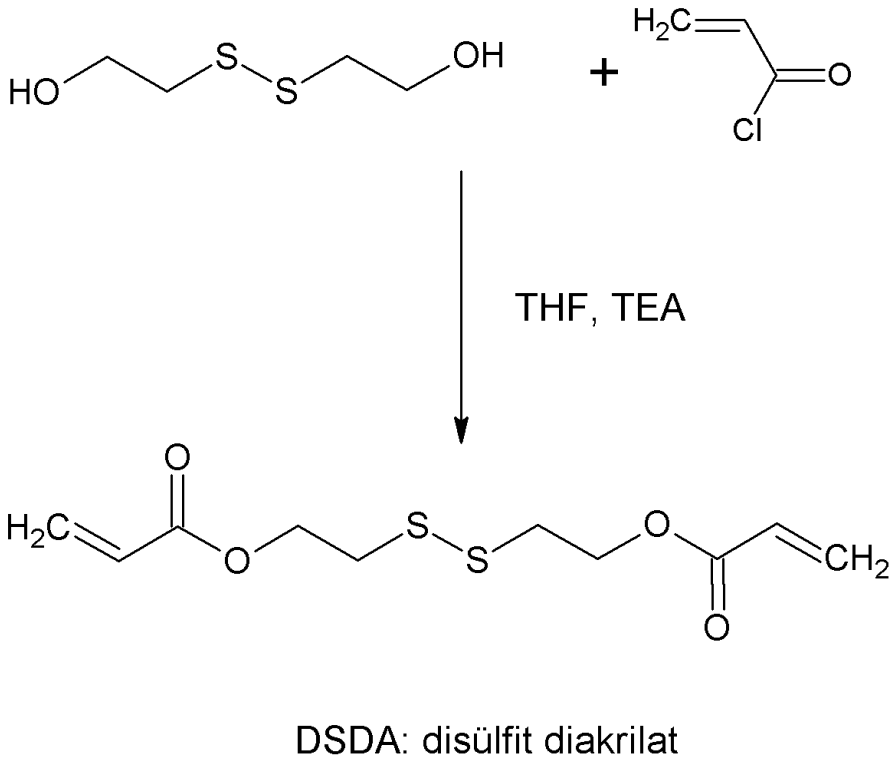
PMMA-*ko*-VFBA nanoparçacıklarının canlı hücre üzerinde toksik etki meydana getirip getirmediği NIH-3T3 fibroplast hücre kültürü ile XTT kiti kullanılarak ölçüldü. % 10 fetal bovine serum ve % 1 penisilin içeren DMEM 96 kuyucuklu kite yerleştirildi. Bir sıra kuyucuk kontrol grubu olarak kullanıldı. Diğer sıralara ise PMMA-*ko*-VFBA nanoparçacık derişimi 0.03125, 0.06250, 0.12500, 0.25000 ve 0.50000 mg/mL olacak şekilde enjekte edildi. Deney kiti 37 ^{o}C'de 24 saat ve 48 saat süre bekletildi. Hücrelerin canlılık aktivitesi 460 nm dalga boyundaki formazan absorbansı ile ölçüldü. PMMA-*ko*-VFBA için yapılan hücresel toksisite ölçüm işlemi PMMA nanoparçacıkları için de ayrıca yapıldı. Tüm veriler kaydedildi.

3. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

3.1. Disüfit Çapraz bağlı PEGMA Nanoparçacıkları

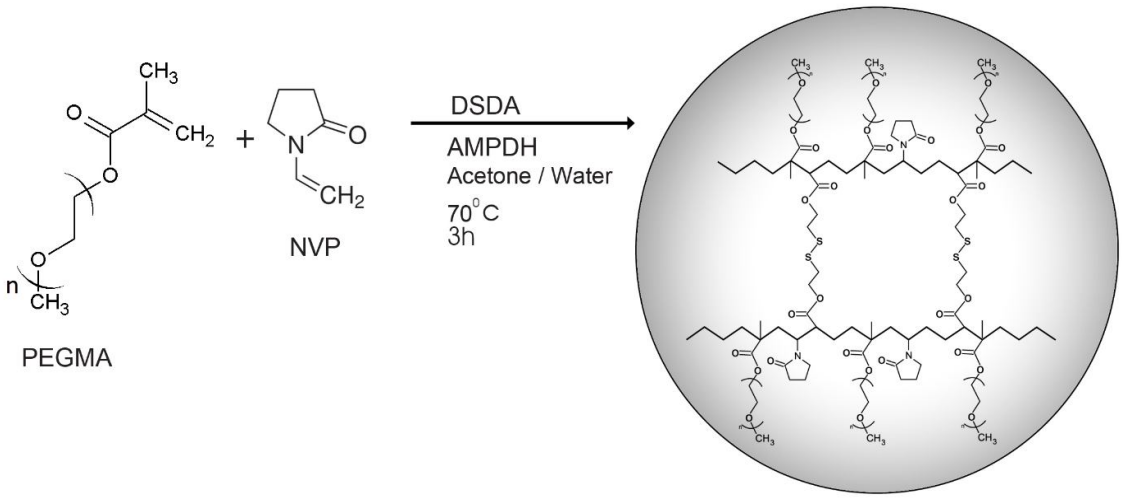
3.1.1. PEGMA nanoparçacıkları sentezi ve karakterizasyonu

Yapısında disülfit bağ içeren çapraz bağlı PEGMA nanoparçacıkların elde edilmesinde yüzey aktif madde kullanılmayan emülsiyon polimerizasyonu metodu kullanıldı (surfactant free emulsion polymerization, Şekil 3.2.). Polietilen glikol metileter metakrilat (PEGMA) monomeri, moleküler yapısında bulunan PEG sayısına bağlı olarak farklı molekül kütlelerine sahiptir. PEGMA nanoparçacıklarının sentezlenmesi için seçtiğimiz PEGMA monomeri molekül kütlesi 188 g/mol olan monomerdir. Nanoparçacık oluşumunu sağlamak için çapraz bağlayıcı olarak disülfit bazlı çapraz bağlayıcı sentezlendi. Sentez işlemi Bölüm 2.2.2.'de tanımlanan disülfit diakrilat (DSDA) reaksiyon mekanizması Şekil 3.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Disülfit bazlı çapraz bağlayıcı sentezi (DSDA)

PEGMA sıcaklık duyarlı bir polimerdir. Lutz ve Hoth (2006)'nın araştırmasında PEGMA (MW= 188) zincir polimerin en düşük kritik çözelti sıcaklığı (lowest critical solution temperature, LCST) 28 ^{o}C olarak rapor edilmektedir. PEGMA'nın LCST değerini fizyolojik vücut sıcaklığı olan 37 ^{o}C'nin biraz üstüne uyarlamak ve kolloid stabilitesini artırmak amacıyla *ko*-monomer olarak N-vinil prolidon kullanıldı.



Şekil 3.2. Disülfit bazlı çapraz bağlı PEGMA nanoparçacıkları polimerleşme reaksiyon bileşenleri

Çizelge 3.1.'de polimerleşme tepkimesinde kullanılan monomer, çapraz bağlayıcı, başlatıcı ve çözücü miktarları verilmiştir. PEGMA su içerisinde, % 4 oranında veya daha düşük oranda ise tamamen çözünmektedir (Tuncel, 2000). Çapraz bağlayıcı olarak kullanılan disülfit bazlı diakrilat (DSDA) ise su içinde çözünmemektedir. İdeal bir emülsiyon ortamı hazırlamak için çözücü ortamı olarak aseton-su karışımı farklı oranlarda denemeye tabi tutuldu. Aseton/su oranı 9/1 ile 1/9 (hacimce) arasında denemeler yapıldı. Denemelerin sonunda, disülfit çapraz bağlı PEGMA nanoparçacıklarının sentezlenmesinde aseton/su oranının 3.5 mL / 6.5 mL olarak en uygun çözücü ortamı olduğu tespit edildi. Çözücü optimizasyonundan sonra diğer denemelerimizde bu karışım oranı kullanıldı. Elde edilen PEGMA süspansiyonu Şekil 3.3'de gösterildi.

Çizelge 3.1. PEGMA nanoparçacıklarının emülsiyon polimerizasyon parametreleri

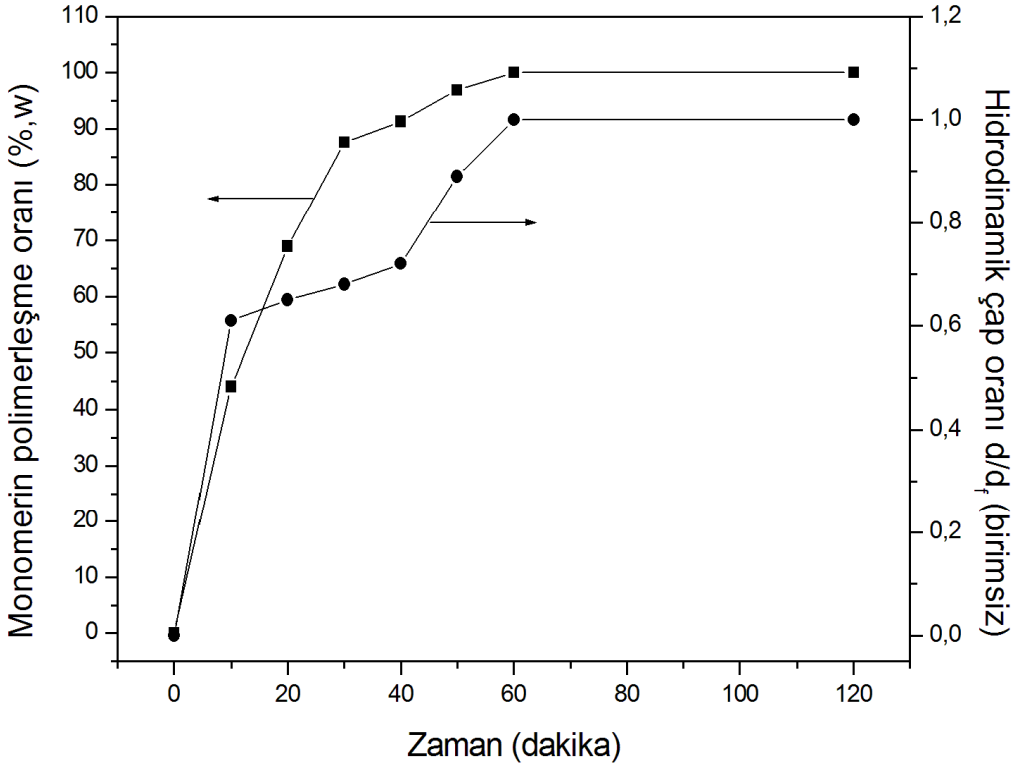
Deney kod numarası	PEGMA (µL)	NVP (µL)	DSDA (mM)[a]	AMPDH (mM)[a]	Dav (nm)[b]	PDI[c]
NP1	80	20	3.90	1.11	261.1	0.032
NP2	80	20	4.87	1.11	180.7	0.059
NP3	80	20	5.85	1.11	210.7	0.081
NP4	80	20	7.80	1.11	160.2	0.102
NP5	80	20	9.95	1.11	230.8	0.080
NP6	80	20	5.85	0.83	252.1	0.005
NP7	80	20	5.85	1.75	195.8	0.063
NP8	80	20	5.85	2.22	184.3	0.060
NP9	80	20	5.85	2.77	161.1	0.005

[a] Toplam hacime göre.
[b] Ortalama hidrodinamik çap.
[c] Polidispersite indeksi, birimsiz.



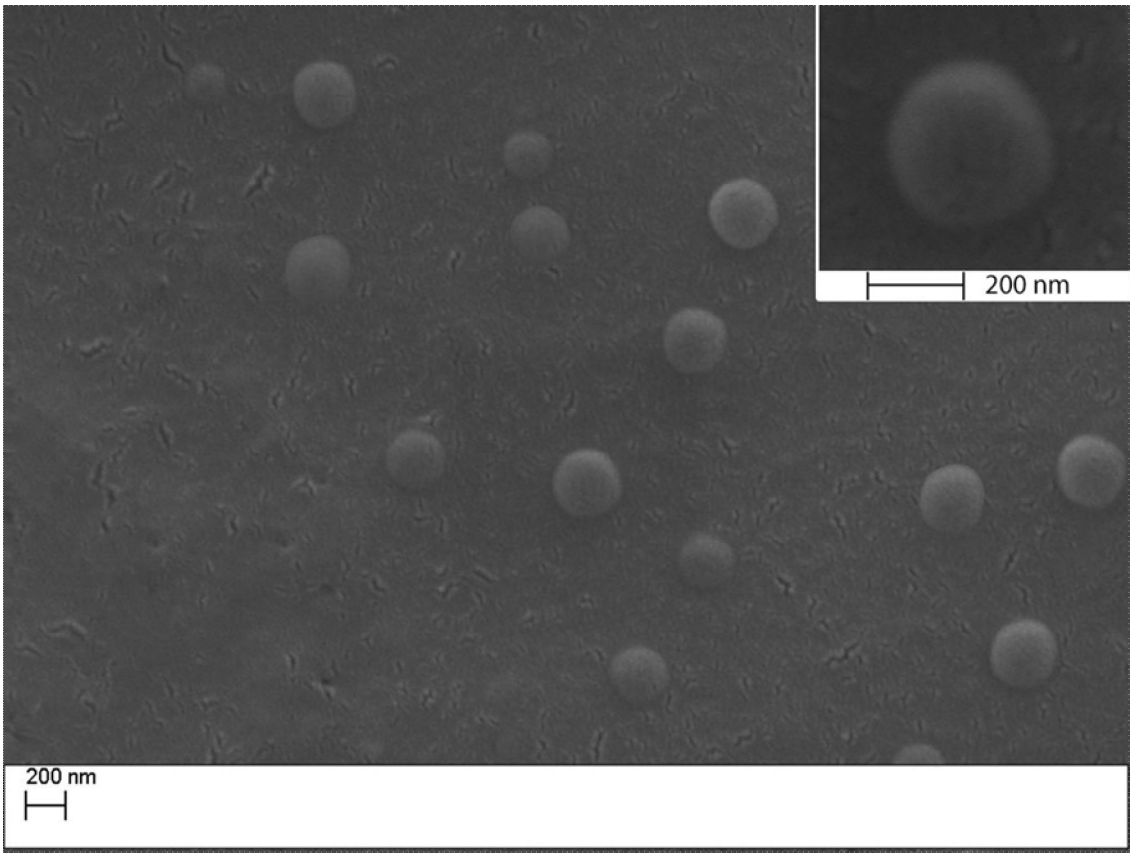
Şekil 3.3. PEGMA nanoparçacık süspansiyonu (NP3)

Zamana bağlı olarak monomerlerin polimer zincirine bağlanma ilişkisi Şekil 3.4.'de gösterilmiştir. Hidrodinamik çap oranı herhangi bir andaki parçacık boyutunun (d) nihai boyuta (d_f) oranı olarak tanımlanmaktadır. Bu oran belli bir zamanda polimerleşme reaksiyonun ne derece ilerlediğini ifade eden bir gösterge olarak kabul edilmiştir (dosSantos ve ark., 1997; Guven ve Piskin, 2006; Elmas ve ark., 2007; Camli ve ark., 2010). Polimerleşme reaksiyonunda başlatıcı olarak kullanılan molekülün homolitik olarak radikal ayrışması ile oluşan ilk radikal molekülleri çevresindeki monomerleri bağlayarak parçacığın çekirdeğini oluşturur. Daha sonra bu çekirdek etrafındaki monomerleri yakalar ve kendine bağlayarak parçacığın büyümesi sağlanır. Parçacığın büyümesi nihai parçacık büyüklüğüne (d_f) ulaşıncaya kadar devam eder. Şekil 3.4.'de açıkça görüldüğü gibi polimerleşme reaksiyonu 60 dakika içinde tamamlanmaktadır. Şekil 3.4.'de gösterilen monomerin polimere katılma oranı ve hidrodinamik çap oranları literatürde verilen değerlerle paralel sonuç göstermektedir (Duracher ve ark., 1999; Goldshtein ve Margel, 2009).



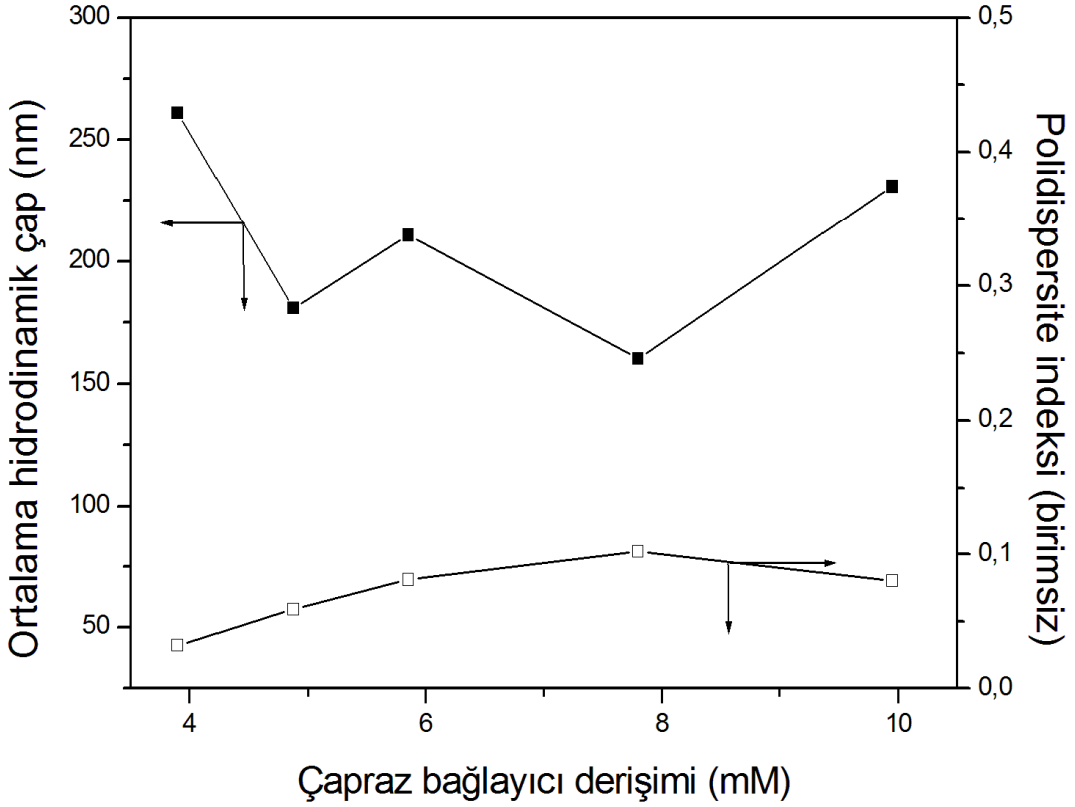
Şekil 3.4. Monomerlerin polimerleşme oranı ve hidrodinamik çap oranlarının zamana göre değişimi

Şekil 3.5. Çapraz bağlı küresel PEGMA nanoparçacıklarının taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüsüdür. Mikrofotoğraf üzerinde image J yazılımı kullanılarak parçacıkların boyutları ölçüldü. Ölçüm sonuçlarına göre ortalama parçacık çapı 281 nm (bağıl hata= 9.1) olarak tespit edildi. Varyasyon katsayısı standart sapmanın ortalamaya oranının yüzde ifadesi olarak tanımlanmaktadır. Parçacık boyutu ölçümlerinin varyasyon katsayısı % 12 olarak hesap edilmiştir. Bu değer nanoparçacıkların orta değerde dağılım sağladığını göstermektedir. Mikrofotoğraf üzerindeki küçük karede görüntülenen parçacığın iç çekirdek kısmının çevresine göre daha koyu olduğu gözükmektedir. Bu durumun polimerleşme prosesinde kullanılan çapraz bağlayıcı derişiminin yüksek olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (% 10 mol/mol). Literatürde benzer sonuçlar rapor edilmiştir (Buyukserin ve ark., 2011).



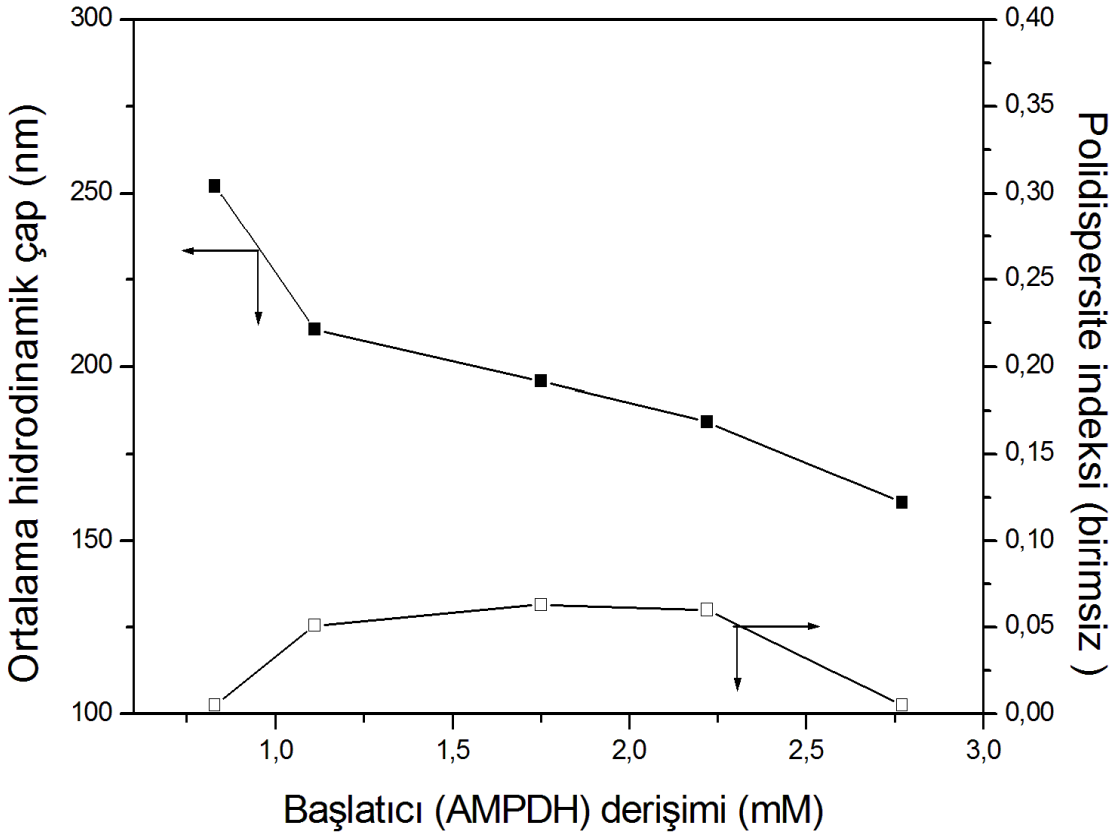
Şekil 3.5. PEGMA nanoparçacıklarının SEM mikrofotoğrafi (NP3)

Şekil 3.6.'da emülsiyon polimerizasyonu işleminde çapraz bağlayıcı olarak kullanılan disülfit diakrilat (DSDA) derişiminin ortalama hidrodinamik çap ve polidispersite indeksi üzerindeki etkisi gösterilmektedir. Çapraz bağlanma oranının artması sonucu polimer nanoparçacığın daha girift olması ile ortalama hidrodinamik çapın azalması beklenmektedir. Şekil 3.6.'da gösterilen sonuçlara göre, çapraz bağlayıcı derişimi ile hidrodinamik çap arasında doğrudan bir ilişki olmadığı görülmektedir. Ancak, çapraz bağlayıcı derşimi 4 mM'dan 5 mM ve 8 mM derişime yükseldiğinde, beklendiği gibi hidrodinamik parçacık boyutunun azaldığı görülmektedir. Şekil 3.6.'da çapraz bağlayıcı derişimine bağlı değişimi gösterilen polidispersite indeksi (PDI) parçacık büyüklüğünün ne kadar homojen dağılım gösterdiğini belirten bir parametredir. Çapraz bağlayıcı derişiminin minimum olduğu durumda (3.9 mM) en küçük PDI değeri ile parçacık boyutunun homojen dağılımı görülmektedir. Çapraz bağlayıcı derişimi 3.9 mM'dan 7.8 mM derişime artış gösterdiğinde PDI değeri hafifçe artmaktadır.



Şekil 3.6. Parçacık boyutu ve polidispersite indeksinin çapraz bağlayıcı derişimi ile değişimi

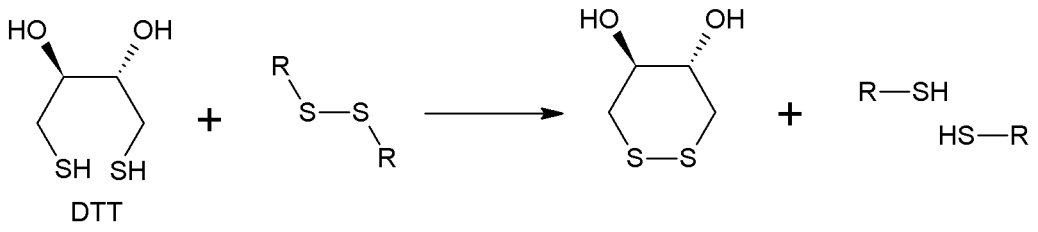
Şekil 3.7.'de, emülsiyon polimerizasyonunda başlatıcı olarak kullanılan AMPDH derişiminin ortalama hidrodinamik parçacık çapı ve polidispersite indeksi üzerindeki etkisi gösterilmektedir. Başlatıcı derişimi arttıkça hidrodinamik çap azmaktadır. Bu durum parçacığın çekirdek oluşumunun polimerleşmenin ilk dakikalarında çok hızlı olması ile açıklanabilir. Şekil 3.4.' de açıkça görüldüğü gibi polimerleşme tepkimesinin başlangıç kısmında grafik eğimi oldukça yüksektir. Bu da bize tepkimenin ilk kısmında serbest radikal oluşumunun hızlı olduğunu ve parçacık çekirdeklerinin hızla oluştuğunu göstermektedir. Başlatıcı derişiminin artırılması ile parçacık çekirdeği başına düşen monomer sayısı azalmaktadır. Bunun bir sonucu olarak parçacık boyutunda küçülme olmaktadır. Başlatıcı derişimindeki manipülasyon, PDI değeri 0.005 civarında monodispers parçacıklar oluşturmaktadır.



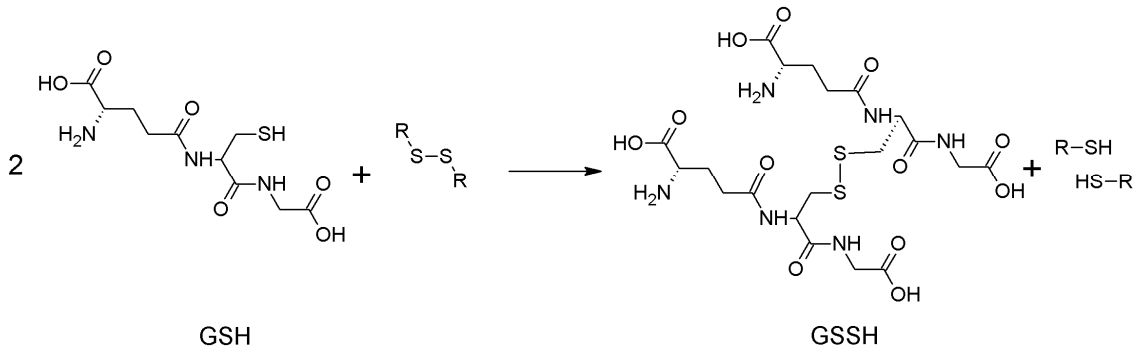
Şekil 3.7. Parçacık boyutu ve polidispersite indeksinin AMPDH derişimi ile değişimi

3.1.2. PEGMA nanoparçacıklarının ditiyotreitol (DTT) ile degredasyonu

Ditiyotreitol (DTT) ve glutatyon (GSH) disülfit bağlarını ayrıştıran ve tiyol gruplarına dönüştüren indirgen moleküllerdir. Şekil 3.8. ve Şekil 3.9.'da her iki molekülün redoks tepkime mekanizması gösterilmiştir.



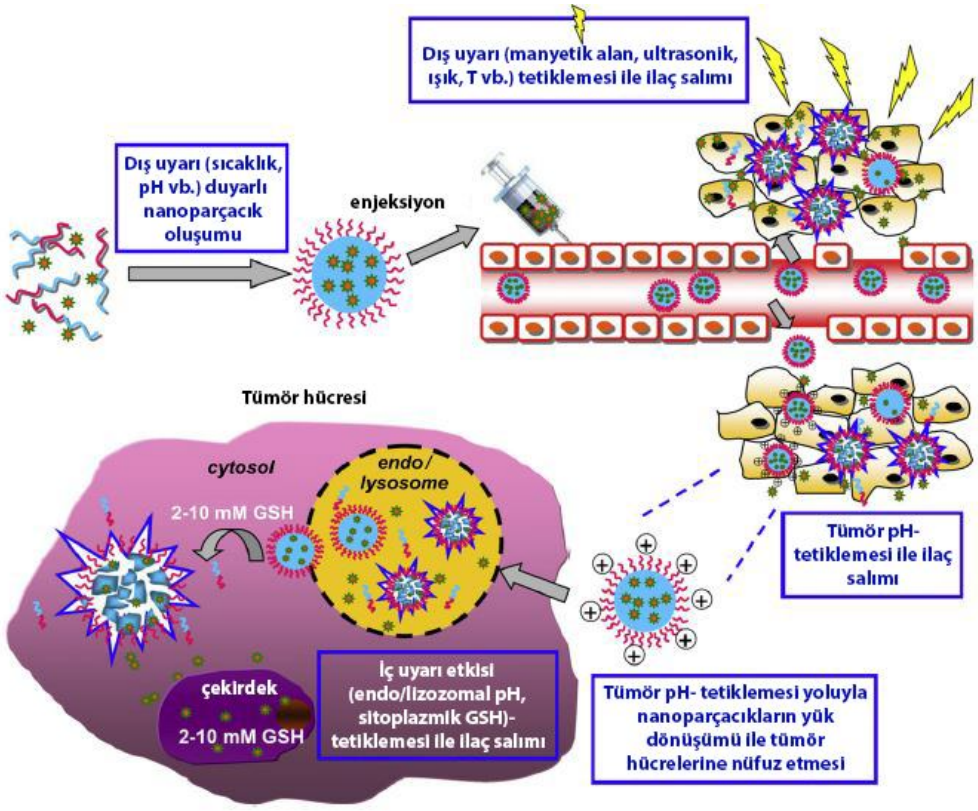
Şekil 3.8. DTT ile disülfit bağlarının tiyol bağlarına indirgenmesi



Şekil 3.9. GSH ile disülfit bağlarının tiyol bağlarına indirgenmesi

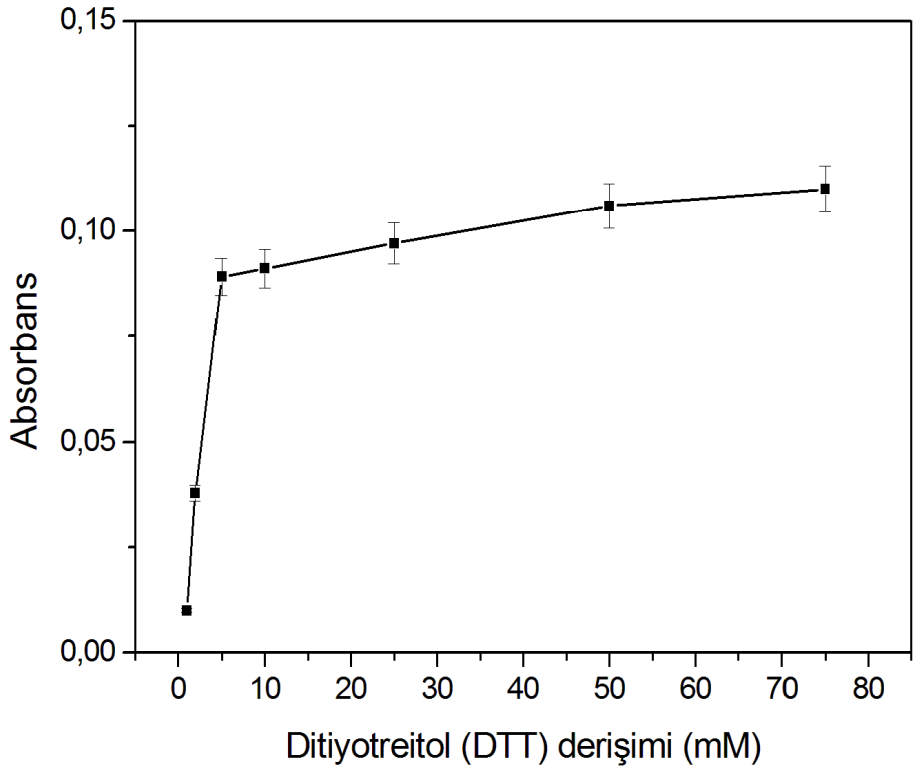
Şekil 3.1.'de gösterildiği gibi PEGMA nanoparçacıklarının oluşmasında kullanılan çapraz bağlayıcı molekül olan disülfit diakrilat (DSDA) molekülü, molekülün simetri merkezinde disülfit bağı içermektedir. Disülfit bağlarının ditiyotreitol (DTT) ya da gluthatione (GSH) ile thiol bağlarına indirgenmesi, redoks duyarlı biyomateryallerin temel bir özelliğidir. Hücre içi ve dışındaki, biyolojik indirgen madde olan gluthatione (GSH) derişimi faklıdır ve bu fark bir redoks potansiyeli oluşturmaktadır (Schafer ve Buettner, 2011). Literatür incelendiğinde, DTT ve GSH'nin biyomedikal uygulama olarak, tiyol akrilat hidrojelinin (Hao ve Lin, 2013), laminin fonksiyonlu hidrojelinin (Stabenfeldt ve ark., 2006), hloran-jelatin hidrojelinin (Liu ve ark., 2004) ve proteinoid miroparçacıklarının (Quirk, 2009; Volkmann ve Liu, 2011) indirgenmesinde kullanılmıştır. Pan ve ark. (2012) araştırmalarında, yapısında disülfit köprüsü bulunan hidrojelin, 10 mM DTT ya da 10 mM GSH ile kısa polimer zincirlerine ayrıldığı rapor edilmiştir. Pan ve ark. (2012)'nın bu tespiti bizim çalışmamızda rapor edilen, Şekil 3.11.'deki verilerle paralellik göstermektedir.

Cheng ve ark. (2013) çalışmalarında, Şekil 3.10.'da gösterildiği şekilde, nanoparçacıkların GSH ile hücresel degradasyon mekanizmasının şematik gösterimini yapmışlardır.



Şekil 3.10. Redoks duyarlı nanoparçacıkların GSH ile hücresel degradasyonu şematik gösterimi

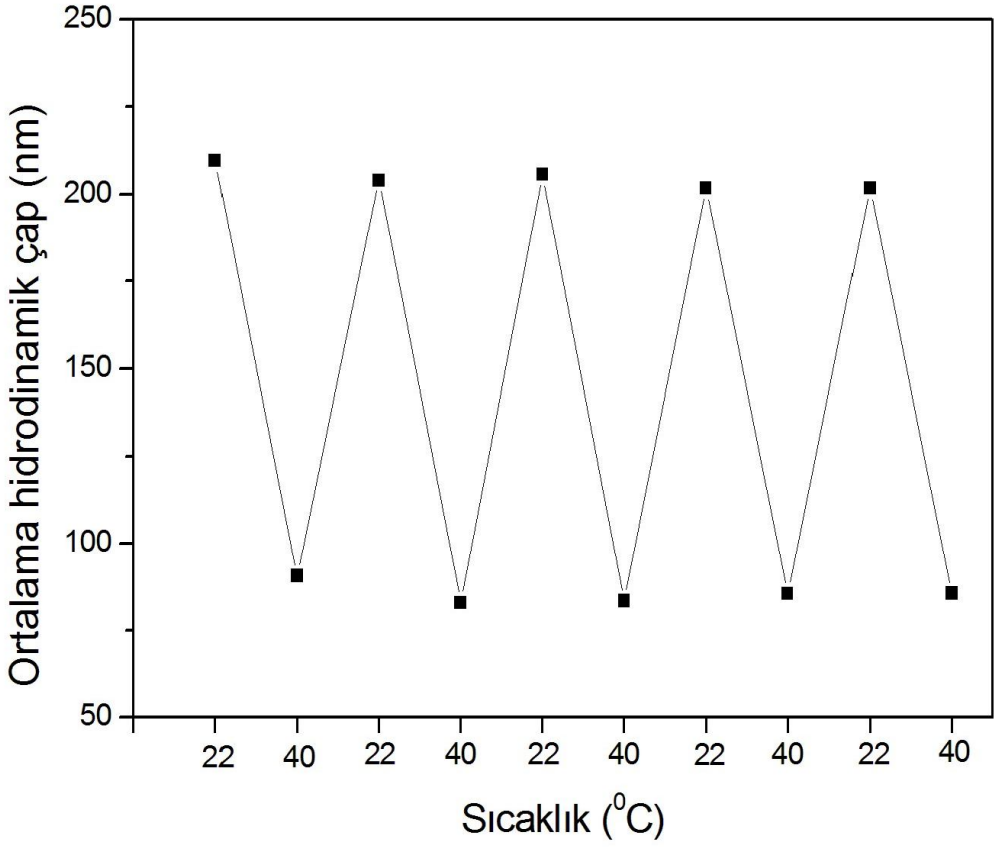
DTT ile PEGMA nanoparçacıklarının içerdiği disülfit bağlarının degredasyonunu daha detaylı incelemek için bölüm 2.2.5.'de işlem sırası verilen, içine PEG-Alizarin sarısı boya yüklenmiş PEGMA nanoparçacıkları kullanıldı. Şekil 3.11. incelendiğinde, PEGMA nanoparçacıklarının tamamen dekomposizasyonu için 8-10 mM DTT derişiminin yeterli olduğu görülmektedir. DTT ile PEGMA nanoparçacıklarının dekompozisasyonuna bağlı olarak içindeki makroboya sulu ortama salınmaktadır. Degredasyon sonunda kalan parçacıklar santrifüj ile ayrılmakta, ortamdaki makroboya içeriği UV-Vis spektrofotometrisi ile tayin edilmektedir. DTT derişimi 10 mM üzerinde kullanıldığında santrifüj işlemi sonunda herhangi bir çökelme olmadığı görsel olarak da tespit edilmiştir. Bu durum, nanoparçacıkların degredasyonu için 8-10 mM DTT derişiminin yeterli derişim olduğunu açıkça göstermektedir.



Şekil 3.11. Ditiyotreitol (DTT) ile disülfit bağlarının indirgenmesi

3.1.3. PEGMA nanoparçacıklarının sıcaklık değişimine tepkisi

PEGMA doğrusal polimerlerinin sıcaklık değişimine tepkisi (Lutz ve Hoth, 2006)'nın çalışmalarında rapor edilmiştir. PEGMA yapısındaki polietilenglikol (PEG) sayısına bağlı olarak 22-90 ^{o}C arasında değişebilen en küçük kritik çözelti sıcaklığını (LCST) haizdir. PEGMA'nın moleküler yapısındaki PEG sayısı ile LCST arasında doğrusala yakın bir ilişki vardır (Lutz ve Hoth, 2006). PEGMA nanoparçacıklarının hidrodinamik çapları 22 ^{o}C ile 40 ^{o}C arasında tekrarlanan ölçümler ile ölçülmüştür. Şekil 3.12. tekrarlanan ölçümlerde elde edilen hidrodinamik çapları göstermektedir. 22 ^{o}C'deki 6 tekrar ölçümlerin ortalama değeri 204.5 ± 3.5 nm'dir. Sıcaklık değeri 40 ^{o}C'ye çıkarıldığındaki ölçümlerinin ortalaması ise 85.7 ± 3.1 nm olarak ölçülmüştür.

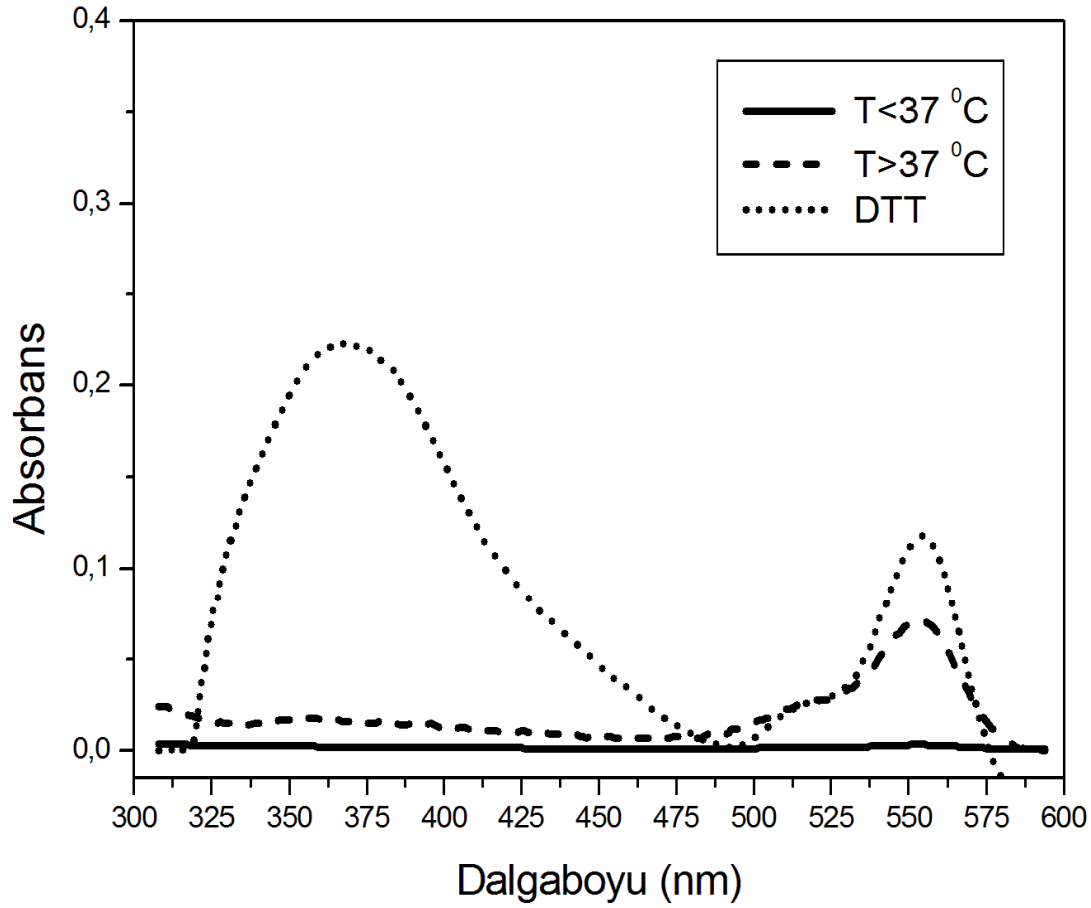


Şekil 3.12. PEGMA nanoparçacıklarının 22-40 ^{o}C'de tekrarlanan ortalama hidrodinamik çapları

3.1.4. PEGMA nanoparçacıklarının ikili salım sistemi olarak kullanılması

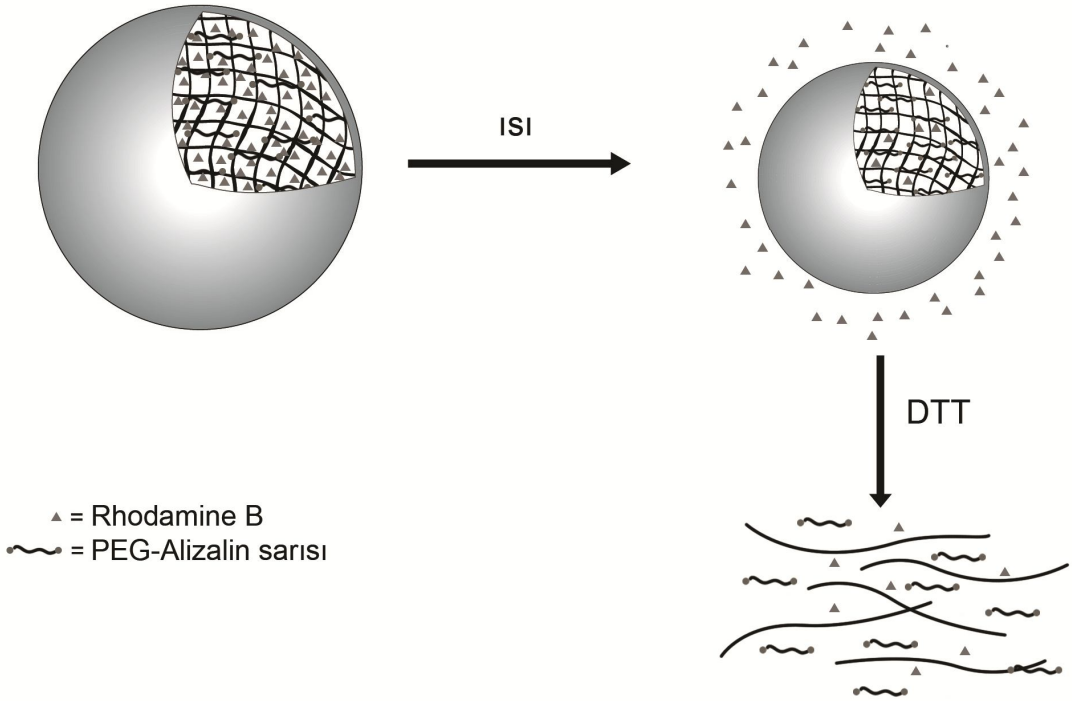
Şekil 3.11. ve 3.12.'de PEGMA nanoparçacıklarının DTT ile degredasyonu ve sıcaklık duyarlılığı gösterilmiştir. Bölüm 2.2.4.'de tanımlandığı şekilde PEGMA nanoparçacıklarına rhodamine B ve PEG-Alizarin sarısı olmak üzere 2 farklı boya molekülü yüklendi. Nanoparçacıkların, oda sıcaklığında, su ortamındaki süspansiyonu santrifüj edildiğinde, sulu ortamda herhengi bir boya salımı gözlenmemiştir. Sıcaklık, fizyolojik vücut sıcaklığı olan 37 ^{o}C'nin biraz üzerine çıkarıldığında, nanoparçacıkların içindeki rhodamine B boya maddesinin çoğunluğunun ortama salım yaptığı, fakat PEG-Alizarin sarısı makroboyanın salım yapmadığı tespit edildi. Şekil 3.12.'de sıcaklıklığın 22-40 ^{o}C arası osilasyonunda nanoparçacıkların boyutsal değişimi görülmektedir. Buna göre, sıcaklığın 37 ^{o}C'nin biraz üzerine çıkarılması sırasında parçacık boyutunda küçülme (büzüşme) olmaktadır. Sterik değişim sırasında rhodamine B boyar

molekülleri nanoparçacıkların gözeneklerinden ortama difüzyon yoluyla salım göstermiştir. Sıcaklığın 37 ^{o}C'nin altında ve üstünde PEG-Alizarin makroboya salımı tespit edilmemiştir. PEG-Alizarin sarısı makroboya uzun PEG polimerinin terminal uçlarında alizarin sarısı boyar madde taşıyan, rhodamine B boyar molekülüne göre, uzun ve büyük bir moleküldür. Bu yapısı ile PEG-Alizarin sarısı makroboya, sıcaklık etkisi ile nanoparçacıkların boyutsal olarak büzüşmesinden etkilenmeden parçacık içinde kalmıştır. Diğer bir ifade ile çapraz bağlı nanoparçacıkların gözenekleri uzun ve büyük yapıda olan PEG-Alizarin makroboyanın difüzyonuna izin vermemiştir. Şekil 3.13.'de gösterildiği gibi sıcaklık değişimi sonucunda rhodamine B boyar maddenin büyük oranda salım göstermesiyle birlikte bir miktar rhodamine B hâlâ parçacık içinde kalmıştır.



Şekil 3.13. Sıcaklık ve DTT etkisi ile ikili boya salımı

Sıcaklık değişimini takiben, PEGMA nanoparçacıkları, ditiyotreitol (DTT) ile muamemle edildi. DTT etkisi ile nanoparçacık moleküler yapısındaki disülfit çapraz bağlar tiyol gruplarına indirgenmiştir. DTT ile degradasyon sonucunda PEGMA moleküler yapısı artık bir parçacık değil, doğrusal polimer haline gelmiştir. Parçacık yapısının bozulmasıyla birlikte, parçacık içinde bulunan PEG-Alizarin sarısı makroboya ve geriye kalan az miktarda rhodamine B başarılı bir şekilde ortama salınmıştır. Salım mekanizması Şekil 3.14'de gösterilmiştir.

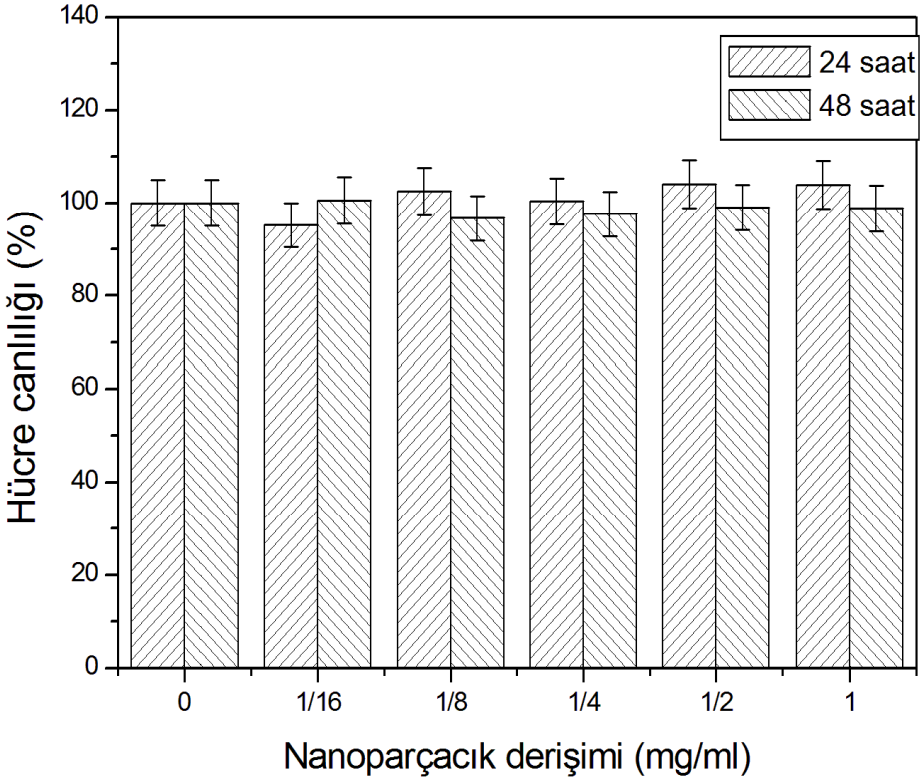


Şekil 3.14. PEGMA nanoparçacıklarının ikili salım mekanizması

3.1.5. PEGMA nanoparçacıklarının biyouyumluluğunun test edilmesi

Biyomedikal uygulamalarda kullanılacak malzemenin kendisinin biyolojik olarak canlı hücreler üzerinde toksik etki oluşturmaması gerekmektedir. İki farklı etken maddenin nanokapsülden salım yapılabileceği bölüm 3.1.4.'de gösterildi. PEGMA nanoparçacıklarının kendisinin canlı hücre üzerinde toksik etki ile hücreleri öldürüp öldürmediği ise *in-vitro* deneysel çalışmayla NIH-3T3 fibroplast hücre kültürü kullanılarak gösterildi. NIH-3T3 Mus musculus mouse fibroblast hücre kültürü, literatürde, *in-vitro*, hücre toksisite çalışmalarında kullanılan hücre kültürü çeşitlerinden birisidir (Peng ve ark., 2010; Yavuz ve ark., 2011; Catauro ve ark., 2013; Shabna ve ark., 2013; Sheikh ve ark., 2013; Yang ve ark., 2013).

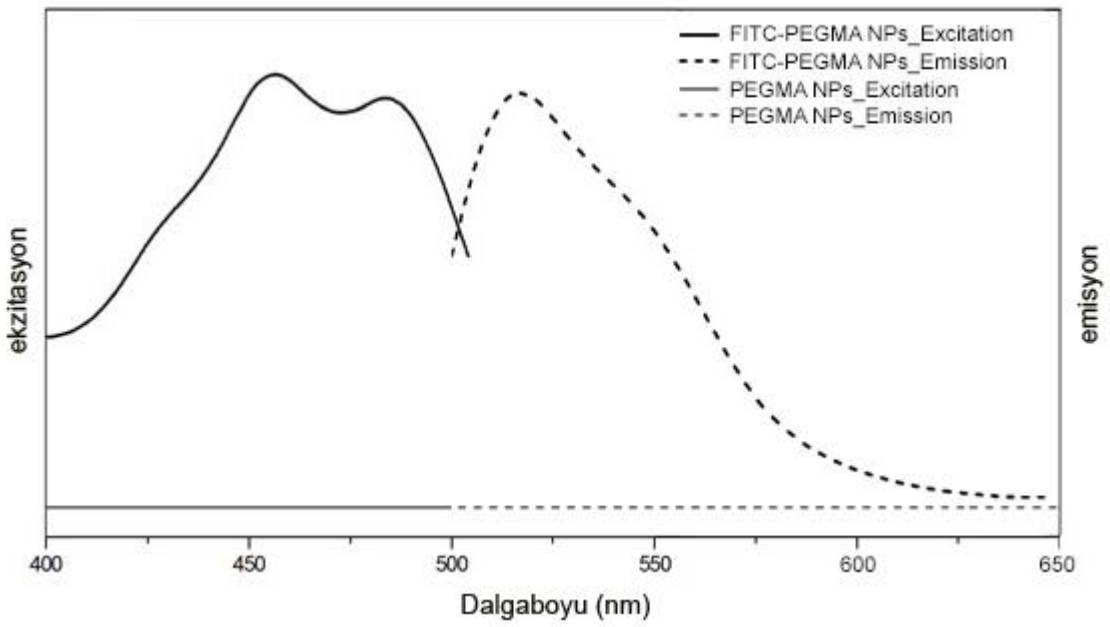
Şekil 3.15.'de kontrol grubu ve derişimi 0.0125 ila 1 mg/mL olan PEGMA süspansiyonlarının hücre canlılığını nasıl etkilediği gösterilmektedir. Bu sonuçlara göre PEGMA nanoparçacıkları canlı hücreler üzeride toksik etki göstermemektedir.



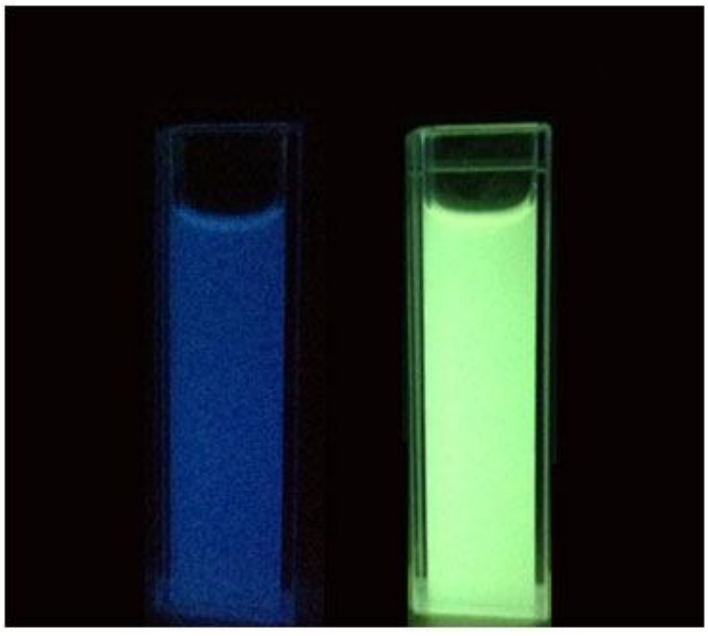
Şekil 3.15. PEGMA nanoparçacıklarının *in-vitro* hücre canlılığına etkisi

3.1.6. PEGMA nanoparçacıklarının florasans spektrofotometrik ölçümleri

Şekil 3.16'da florasans izotiyosiyanat (FITC) ile modifiye edilmiş ve edilmemiş PEGMA nanoparçacıklarının florasans spektrofotometri cihazında kaydedilen ekzitasyon ve emisyon spektrası gösterilmektedir. Polimerleşme tepkimesinde başlatıcı olarak kullanılan AMPDH molekülünde bulunan amidin grupları FITC ile birleşmekte ve PEGMA nanoparçacıklarına florasans özellik kazandırmaktadır. FITC ile modifiye edilmemiş PEGMA süspansiyonu, UV ışığı altında mat bir görünüme sahipken; FITC ile modifiye edilmiş PEGMA nanoparçacıkları parlak olarak gözükmektedir (Şekil 3.17). Bu da FITC'nın PEGMA ile birleştiğinin kanıtıdır. Florasans spektrası incelendiğinde FITC ile modifiye edilmemiş parçacıkların pik vermediği; FITC ile modifiye edilen parçacıkların ise ekzitasyon ve emisyon piki verdiği, Şekil 3.16'da açıkça gözükmektedir. PEGMA nanoparçacıklarının florasans bir madde ile modifiye edilebilir olması, parçacıkların florasans olarak takip edilmesine imkân tanımaktadır.



Şekil 3.16. FITC ile modifiye edilmiş ve edilmemiş PEGMA nanoparçacıklarının florasans spektrofotometri ekzitasyon ve emisyon spektrası



Şekil 3.17. FITC ile modifiye edilmiş ve edilmemiş PEGMA nanoparçacıklarının UV ışığı altındaki fotoğrafı

3.2. PHEMA Hidrojeli

3.2.1. PHEMA sentezi ve su absorblama kapasitesi

PHEMA hidrojeli serbest radikal polimerizasyon metodu ile elde edildi. Serbest radikal başlatıcısı olarak amonyum persülfat kullanıldı. Amonyum persülfatın azo bağları 65 ^{o}C'nin üzerinde homolitik olarak kırılmakta ve serbet radikaller oluşmaktadır. Etilen glikol dimekrilat (EGDMA) çapraz bağlayıcı olarak işlev görmektedir. Polimerizasyon parametreleri Çizelge 2.1.'de gösterilmiştir. Reaksiyon başlatıldıktan sonra ilk 15 dakika içinde jel oluşumu başlamakta ve 30 dakika içinde tamamlanmaktadır (G4 kombinasyonu). Jelleşme tamamlandığında vial içinde bulunan manyetik balık manyetik karıştırıcı açık olmasına rağmen kendi etrafında dönmesi durmaktadır. Oluşan jel balığın dönme hareketini tamamen durdurmaktadır. Hidrojeller suda çözünmeyen fakat su emme özelliği gösteren bileşiklerdir. Elde ettiğimiz PHEMA hidrojelinin su emme kapasitesinin ölçüm işlemi bölüm 2.3.2.'de tanımlanmıştır. Ölçüm sonuçları çizelge 3.2'de gösterilmişir. PHEMA hidrojelinin su emme kapasitesi;

% Su absorblama= (W2-W1)/W1*100

W1= kuru haldeki kütle (g)

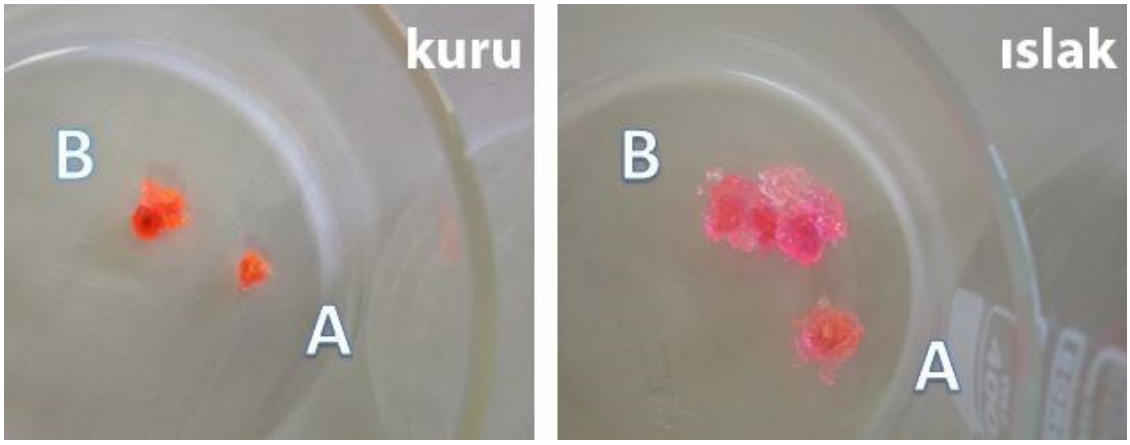
W2= su absorblama sonrası kütle (g)

formülü ile hesaplandı. Bu sonuçlara göre A numunesinin kendi kütlesinin 5 katı su absorbladığı tespit edildi. PHEMA jelinin su absorblama işlemi öncesi ve sonrası çekilen fotoğraf Şekil 3.18.'de gösterilmektedir.

PHEMA ihtiva eden hidrojel örneklerinin su emme kapasitesi literatürde; Cooper ve ark., (2005)'nın araştırmasında % 566; Işık (2000)'ın araştırmasına ise HEMA ve akrilamit *ko*-polimerinin polimer kombinasyonuna bağlı olarak, % 513 ile % 988 arasında değiştiği gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. PHEMA su emme kapasitesi (kütlece %). A ve B aynı PHEMA jelinden alınan numunedir.

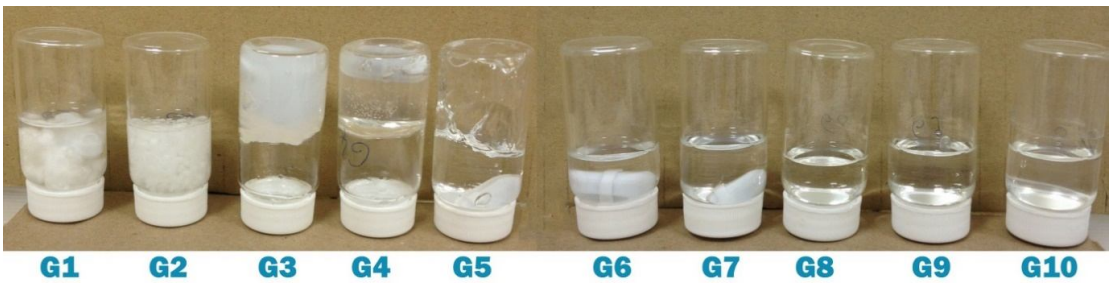
Numune	Kuru hal kütlesi (g) W1	Su ile şişmiş hal kütlesi (g) W2	Emilen su kütlesi (g)	% Kütle artışı
A	0.0825	0.4978	0.4153	% 603
B	0.2035	1.0612	0.8577	% 422



Şekil 3.18. PHEMA hidrojelinin A) kuru haldeki B) su absorbladıktan sonraki fotoğrafı

3.2.2. PHEMA jel oluşumunda çözücü etkisi

PHEMA hidrojelinin oluşmasında çözücü etkisini incelemek amacıyla 11 farklı polimerizasyon denemesi yapıldı. Bu denemelerde, monomer, çapraz bağlayıcı ve başlatıcı miktarları sabit tutulup, çözücü karışımı olan aseton-su karışım oranları değiştirildi. Çizelge 2.1.'de yapılan denemelerin polimerleşme parametreleri gösterilmektedir. Polimerleşme denemeleri ürünlerinin son görselleri Şekil 3.19'da gösterilmiştir. 11. Denemede reaksiyon olmadığı için, polimerleşeme ürünü fotoğrafa eklenmemiştir.

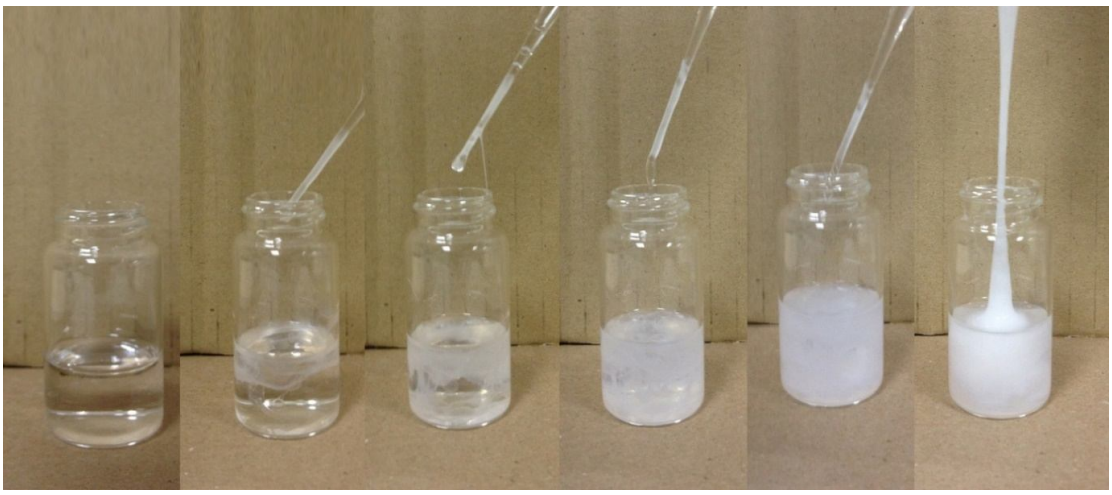


Şekil 3.19. PHEMA polimerleşme ürünleri G1-G10

G1 ve G2 denemesinde çok hızlı bir polimerleşme olmakta ve 5 dakika içinde beyaz bir çökelek katı oluşmaktadır. Oluşan ürün jel formunda değil, çapraz bağlı katı kütle formunda oluşmaktadır. G1'den G10'a gidildikçe çüzücü kombinasyonundaki su oranı azalmakta, aseton oranı artmaktadır. Oluşan ürünlerin formları incelendiğinde uygun jel formundaki PHEMA'nın G3, G4 ve G5 denemelerinde elde edildiği açıkça görülmektedir. Jel oluşum sürelerine bakıldığında G5'in G4'den daha uzun sürede,

G4'ün ise G3'den daha uzun sürede jel oluşumunun başladığı tespit edilmiştir (G5, G4 ve G3 için jel oluşum süreleri sırasıyla 63, 30 ve 10 dakika). Jel formundaki bu üç deneme kıvam (akışkanlık) açısından incelendiğinde; G3'ün en yoğun, G4'ün orta, G5'in ise az yoğun kıvamda olduğu görülmektedir. Bu gözlem ve tespitlerden şu sonuç ortaya çıkmaktadır; G3, G4 ve G5 denemeleri içinde G5, çözücü karışımda aseton oranı en yüksek olandır. G5'deki çözücü kuvveti en yüksek, G4'deki orta ve G3'deki daha az durumdadır. Ortamdaki asetonun çözücü etkisinden dolayı G5'de jelleşme en uzun sürede başlamakta ve jel kıvamı ise en az seviyede olmaktadır. G6-G10 denemelerinde aseton oranı gittikçe artmaktadır. Asetonun çözücü etkisi G6'dan itibaren o kadar kuvvetli olmaktadır ki, artık oluşan PHEMA polimeri çözücü fazında kalmaktadır. PHEMA polimerinin jel formunda oluşabilmesi için aseton-su karışım oranı 1'den küçük, 0.25'den büyük olmalıdır. Karışımdaki aseton oranı 1'den büyük olduğunda PHEMA çözelti fazında, 0.25'den az olması durumunda hızlı bir reaksiyon ile katı polimer kütlesi oluşmaktadır.

G6-G10 içinde PHEMA polimerinin oluştuğunu ve çözücü etkisini daha iyi anlayabilmek için G6 numunesini saf su içerisine bir pastör pipeti ile damla damla ilave edildi. Şekil 3.20'de açıkça görüldüğü üzere, PHEMA beyazımsı, yapışkan bir polimer olarak gözükmektedir.

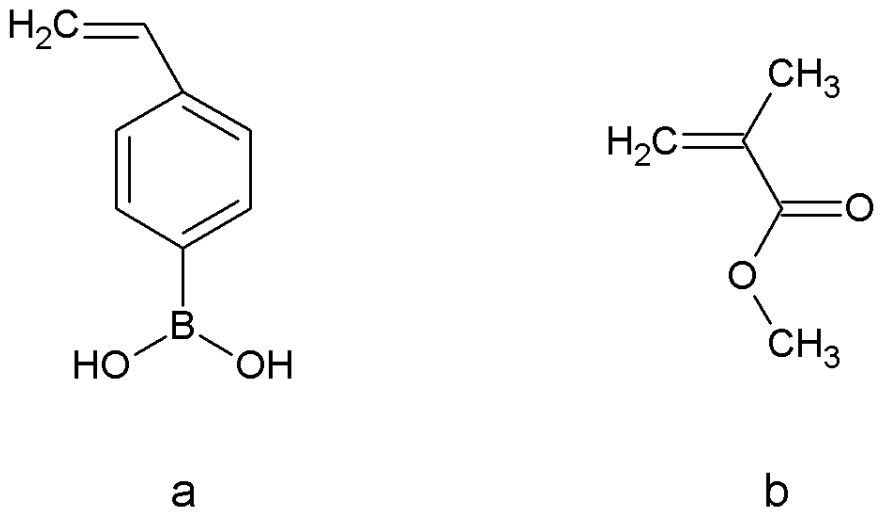


Şekil 3.20. Saf su üzerine damla halinde G6 eklenmesi

3.3. Glukoz Duyarlı PMMA-*ko*-VFBA Nanoparçacıkları

3.3.1. PMMA-*ko*-VFBA nanoparçacık sentezi ve karakterizasyonu

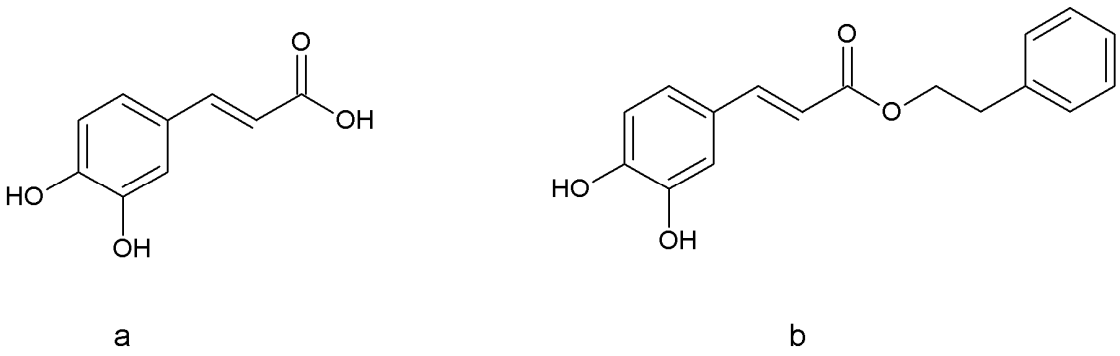
Boronik asit fonksiyon grupları ihtiva eden PMMA nanoparçacıkları yüzey aktif madde kullanılmaksızın emülsiyon polimerizasyonu metodu ile elde edildi. Daha önceki araştırmalarda tek aşamada homojen PMMA nanoparçacıklarının başarıyla elde edildiği rapor edilmiştir (Buyukserin ve ark., 2011). Diol duyarlı nanoparçacık elde etmek için *ko*-monomer olarak vinilfenil boronik asit (VFBA) polimerleşme ortamına enjekte edildi. VFBA kimyasal yapısı incelendiğinde sp^2 hibrit orbitaline sahip, düzlemsel boronik asit fonksiyonel grupları taşıdığı görülür (Şekil 3.21.-a) .



Şekil 3.21. a) Vinilfenil boronik asit (VFBA) b) Metil metakrilat (MMA)

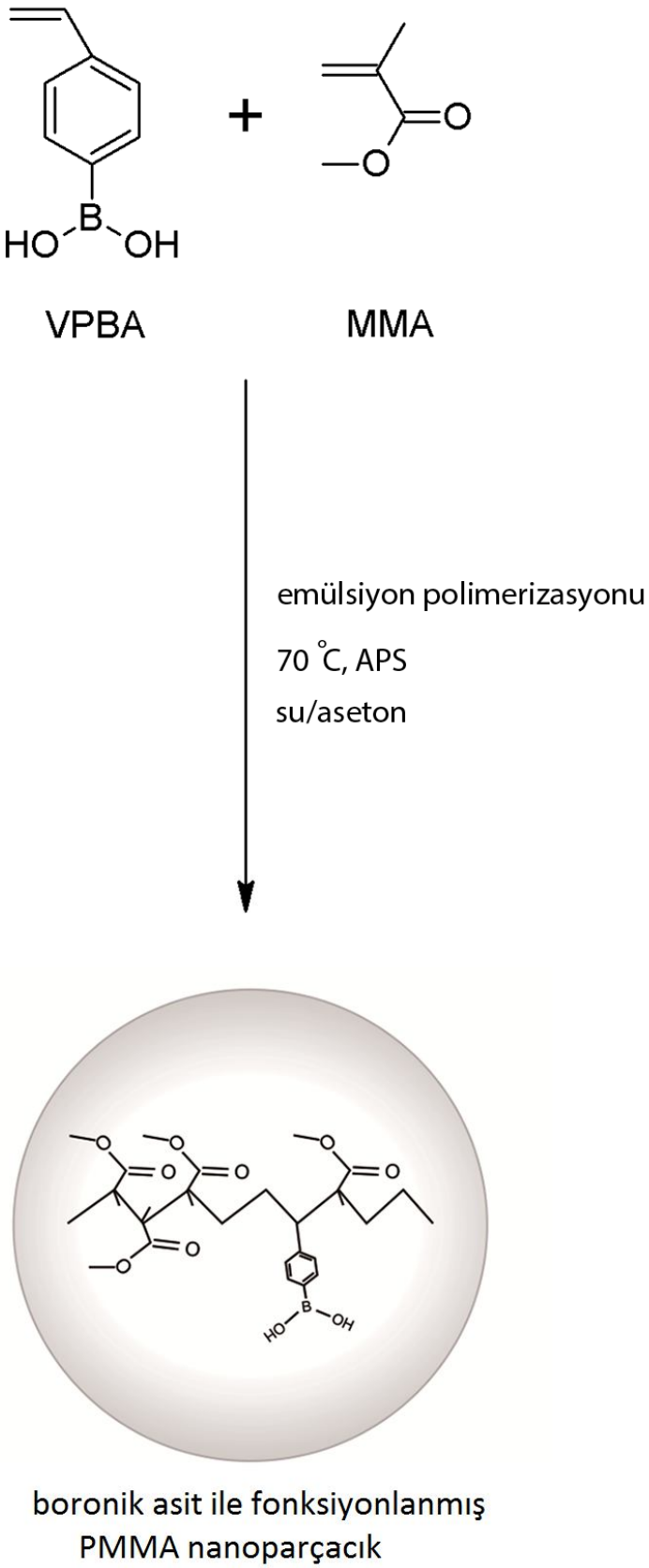
Kafeik asit, bitki hücresi yapısında sekonder hücre duvarının ana maddesi olan lignin (Lebo ve ark., 2001) polimerini oluşturan temel bileşiktir (Stuart ve ark., 2001; Boerjan ve ark., 2003). Kafeik asit hem *in-vitro* hem de *in-vivo* olarak antioksidan bir bileşiktir (Olthof ve ark., 2001). Rajendra ve ark. (2011) kafeik asitin *in-vitro* çalışmalarda kanser kültürü hücreleri (human HT-1080) üzerinde hücrelerin çoğalmasını sınırladığını ve kafeik asitin farmakolojik olarak potansiyel bir madde olduğunu rapor etmiştir. Hirose ve ark. (1998) çalışmasında, fare deneylerinde oral olarak verilen yüksek dozdaki kafeik asitin, farelerin karın bölgesinde tümör benzeri doku bozulmasına neden olduğunu belirtmiştir. Aynı çalışmada, kafeik asitin de içinde

olduğu kombine antioksidanların kolon tümörünün büyümesini engellediği rapor edilmiştir. Çeşitli bitkilerde doğal olarak bulunan kafeik asit türevi olan, kafeik asit 2-feniletil esteri *in-vitro* çalışmalarda, antimitojenik (antimitogenic), antikanserojen (anticarcinogenic), ve antiimflamator (anti-inflammatory) özellikte bir bileşiktir (Huang ve ark., 1996; Natarajan ve ark., 1996; Huang ve ark., 1988; Orban ve ark., 2000, Şekil 3.22.).



Şekil 3.22. a) Kafeik asit b) Kafeik asit 2-feniletil esteri

Metil metakrilat (MMA) ile vinil fenil boronik asit (VFBA) radikal başlatıcılı emülsiyon *ko*-polimerizasyon reaksiyon şeması Şekil 3.23'de gösterilmiştir.



Şekil 3.23. Boronik asit ile fonksiyonlanmış PMMA nanoparçacık sentezi. APS: Serbest radikal başlatıcısı, VPBA: Vinilfenil boronik asit (100 mg), MMA: Metil metakrilat (900 mg). Çözücü karışımı: Aseton/su (4 mL/6 mL). Reaksiyon süresi 3 saat (MMA7)



Şekil 3.24. PMMA-*ko*-VFBA nanoparçacık süspansiyonu (MMA7)

Şekil 3.24'de polimerleşme reaksiyonu sonucu elde edilen PMMA-*ko*-VFBA süspansiyonunun laboratuvar ortamında çektiğimiz fotoğrafı gösterilmiştir. Çizelge 3.3. polimerizasyon denemelerinde kullanılan monomer, başlatıcı ve çözücü kombinasyonunu göstermektedir. 14 farklı deneme yapılmış ve elde edilen nanoparçacıklar DLS cihazı ile parçacık boyutu ve polidispersite indeksi ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.3.'de belirtilmiştir.

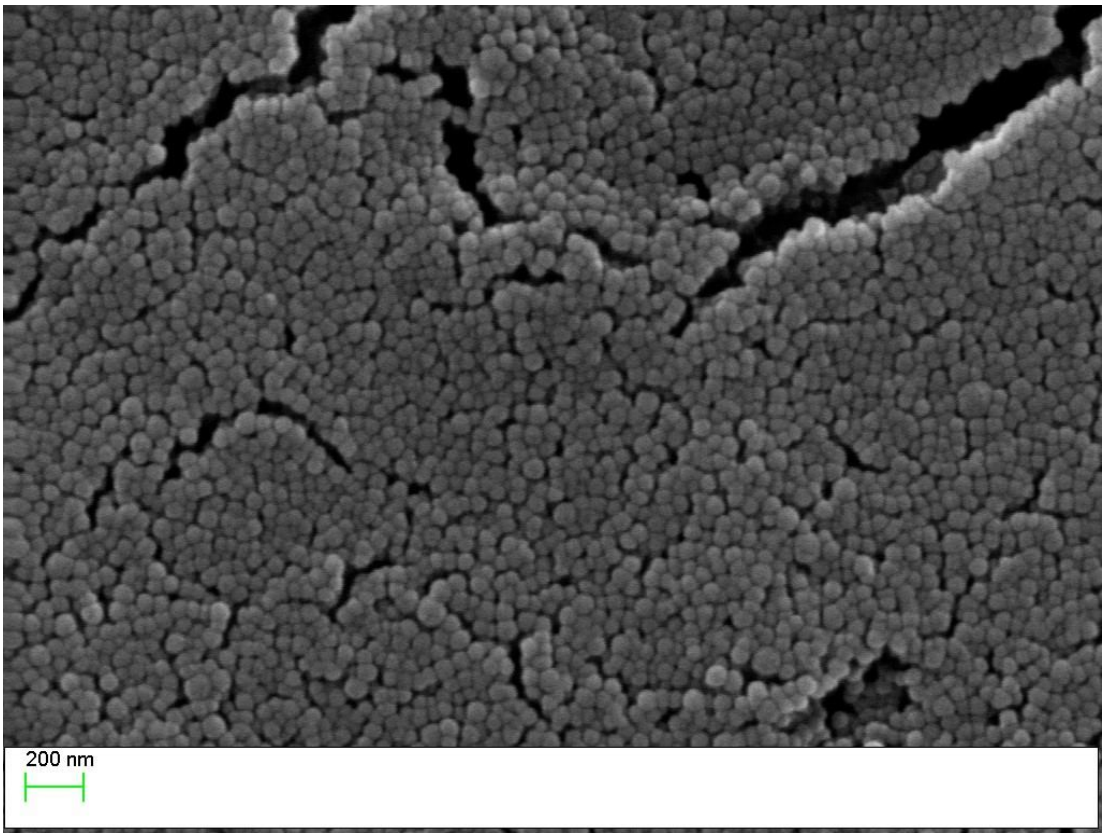
Çizelge 3.3. Boronik asit ile fonksiyonlanış PMMA nanoparçacık polmerizasyon parametreleri

Deney kodu	MMA (mg)	4-Vinil benzene boronic asit (mg)	Aseton (mL)	Su (mL)	APS (mg)	dH (nm)[a]	PDI[b] (boyutsuz)
MMA1	975	25	0	10	25	392	0.035
MMA2	975	25	1	9	25	410	0.081
MMA3	975	25	2	8	25	458	0.111
MMA4	975	25	3	7	25	73	0.064
MMA5	975	25	4	6	25	77	0.056
MMA6	925	75	4	6	25	87	0.077
MMA7	900	100	4	6	25	97	0.119
MMA8	975	25	5	5	25	123	0.173
MMA9	950	50	4	6	25	63	0.065
MMA10	1000	0	4	6	25	86	0.073
MMA11	975	25	4	6	12.5	94	0.048
MMA12	987.5	12.5	4	6	25	67	0.255
MMA13	968.75	31.25	4	6	25	74	0.164
MMA14	800	200	4	6	25	85	0.041

[a] Ortalama hidrodinamik çap.
[b] Polidispersite indeksi, birimsiz.

Literatür incelendiğinde, boronik asit ile fonksiyonlanmış çeşitli polimerik yapıların elde edildiği görülmektedir. Ancak bunlar arasında boronik asit ile fonksiyonlanmış nanoparçacık eldesi nadiren görülmektedir (Larpent ve ark., 1997; Larpent ve ark., 2003; Cannizo ve ark., 2005). Bilim insanları, boronik asit ile fonksiyonlanmış materyal elde etmek için genellikle, polimer zincirine bağlı amin grupları olan polimer sentezlemişler, ikinci bir işlem ile polimer zincirindeki amin gruplarını boronik asit ile bağlamak suretiyle boronik asit fonksiyonlu nanomateryal elde etmişlerdir. Fakat bu işlemler fazla işlem basamakları içermekte ve zaman alıcıdır (bazen 5 gün, Cannizo ve ark. 2005). Ayrıca polimerin ne ölçüde boronik asit ile fonksiyonlandığı kontol edilememektedir. Bu çalışmada, boronik asit ile fonksiyonlanma işlemi ve nanoparçacık oluşumu tek aşamada olmaktadır. Emülsiyon polimerizasyonlarında, nanoparçacığı korumak ve belli bir büyüklükte kalmasını sağlamak için genellikle yüzey aktif maddeler (surfactant) kullanılır. Bu çalışmada, yüzey aktif maddeye ihtiyaç duyulmaksızın PMMA nanoparçacıkları elde edilmiştir. Ayrıca, *ko*-monomer, çözücü bileşim oranlarını değiştirmek suretiyle elde edilen nanoparçacıkların, parçacık boyutu istenilen şekilde kontrol edilebilmektedir. Bütün bu

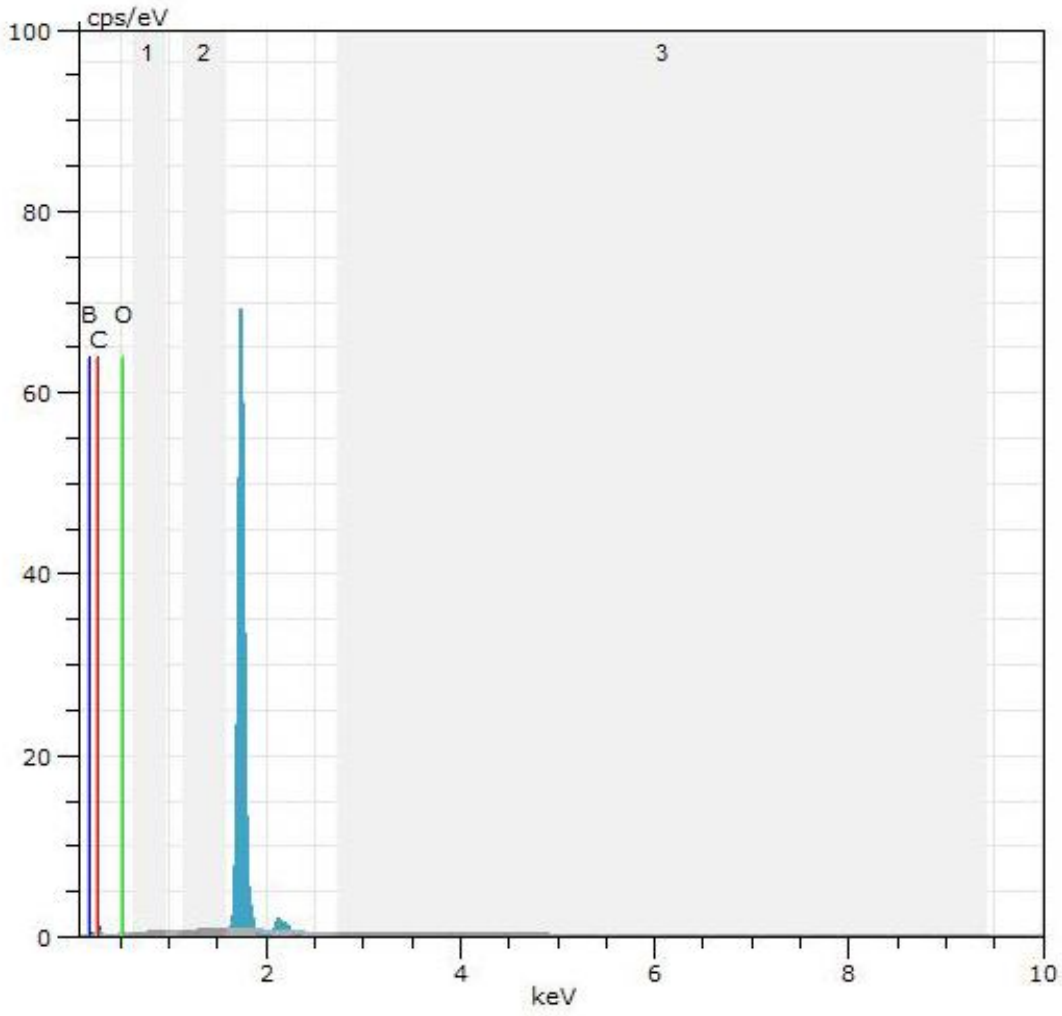
özellikleri ile bilim literatürüne, bilgimiz dâhilinde, ilk olarak, tek aşamada, yüzey aktif madde kullanılmaksızın, boronik asit ile fonksiyonlanmış, diol duyarlı nanoparçacık eldesi sunulmuştur. Elde edilen PMMA-*ko*-VFBA nanoparçacıkların hidrodinamik çapları ve polidispersite indeksleri Çizelge 3.3.'de gösterilmiştir. Şekil 3.25.'de gösterildiği üzere, PMMA-*ko*-VFBA nanoparçacıkları taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterize edilmiştir. Nanopaçacıklardaki boron içeriği SEM cihazına bağlı EDX ile ölçülmüştür. EDX spektrası Şekil 3.26'da gösterilmiştir.



Şekil 3.25. PMMA-*ko*-VFBA nanoparçacıkları taramalı elektron mikroskop mikrofotoğrafi

PMMA-*ko*-VFBA nanoparçacıklarının elde edilmesinde kullandığımız aseton/su karışım çözücü ortamı uygun bir çözücü olarak tespit edildi. Reaksiyon başlangıçta şeffaf haldedir. Reaksiyon, başlatıcı olarak kullandığımız APS ilavesi ile başlatıldıktan sonra 15 dakika içerisinde süt beyaz hal almaya başlamaktadır. Bu gözlem bize nanoparçacıkların oluşmaya başladığını göstermektedir. Reaksiyon 3 saat devam etmekte ve son ürün süt beyaz halde süspansiyon olarak elde edilmektedir. Reaksiyona girmeyen monomer ve reaktantlar, nanoparçacıkların santrifüj edilip su ile yakanması

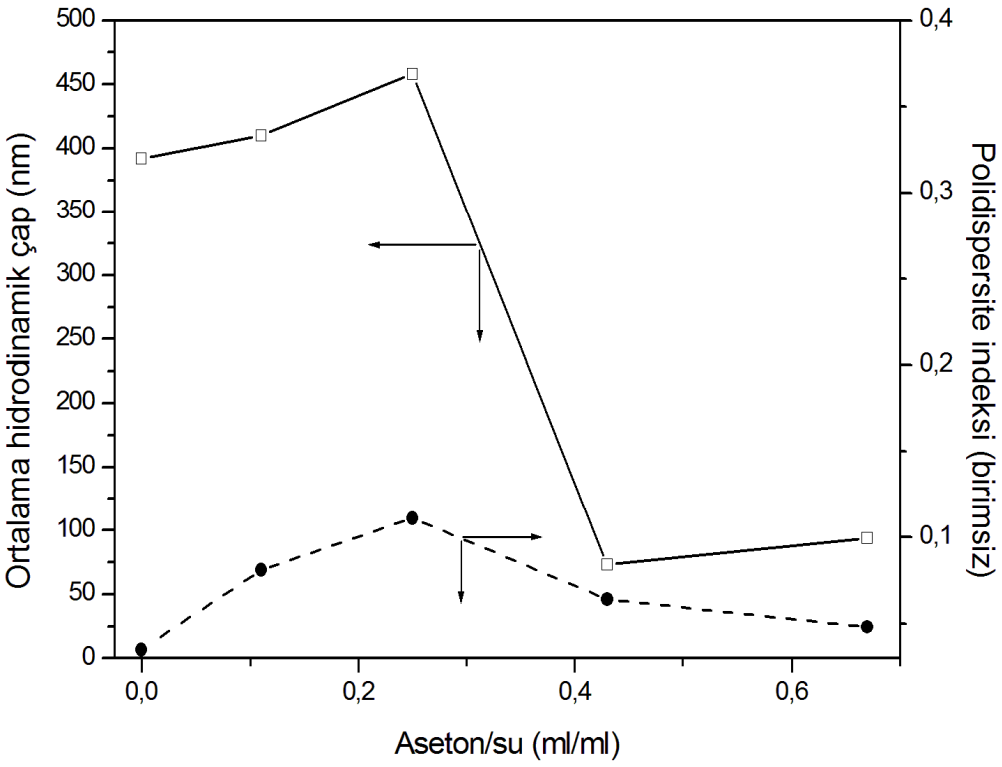
ile uzaklaştırıldı. Farklı monomer oranları, çözücü kombinasyonu ve başlatıcı mikarları denenerek uygun nanoparçacık parametreleri araştırıldı.



Şekil 3.26. PMMA-*ko*-VFBA nanoparçacıkları EDX spektrası

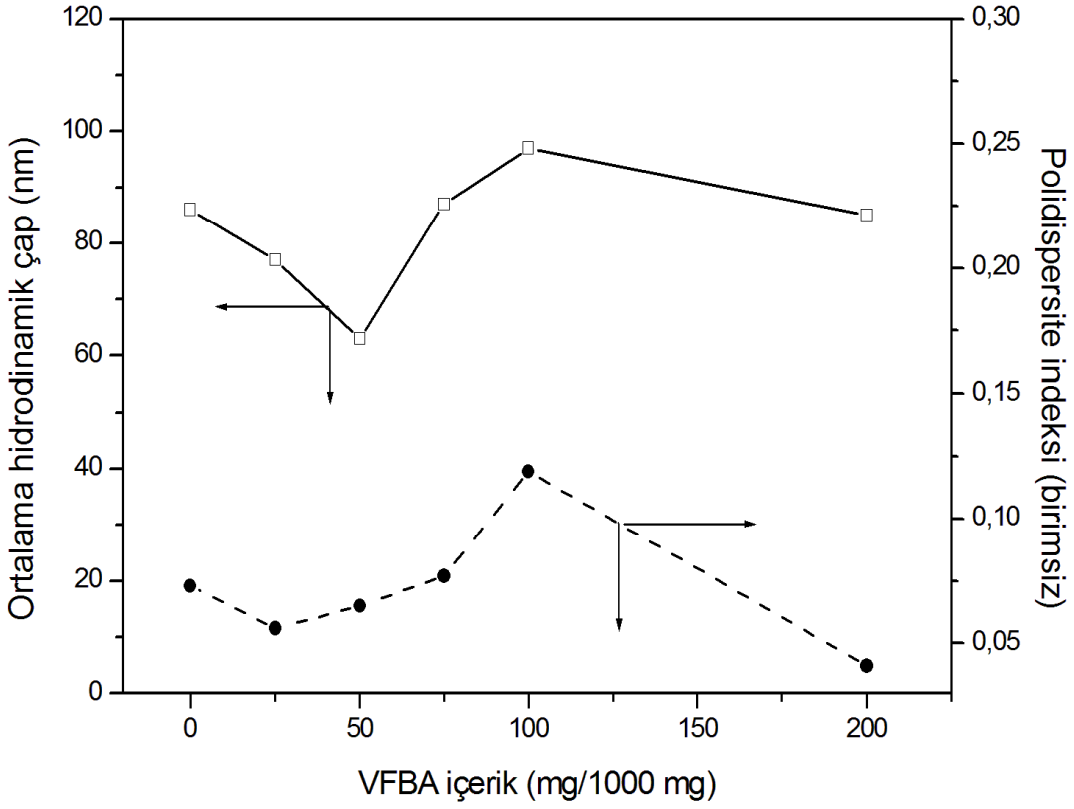
Şekil 3.27'de açıkça görüldüğü gibi, çözücü karışımındaki aseton miktarının (hacimce) su miktarına oranı, PMMA nanoparçacıklarının hidrodinamik çapı üzerinde büyük etkisi olduğu görülmektedir. Çözücü karışımındaki aseton/su oranı 0.0-0.3 aralığından 0.3-0.6 aralığına artırıldığında, ortalama hidrodinamik çap dramatik bir şekilde 350-400 nm'den 50-100 nm'ye düşmektedir. Bu aseton fraksiyonu aralığında, aynı zamanda, PDI değerinin düşük olması monodispers parçacık oluştuğunu göstermektedir. Çözücü karışımındaki aseton oranının artması sürekli fazdaki (continuous phase) dielektrik sabitinde düşüşe sebep olmakta ve böylelikle monemerin

çözünürlüğü artmaktadır. Bu özellik 100 nm altında homojen PMMA nanoparçacıkların elde edilmesini sağlamaktadır (Springsteen ve Wang, 2002) .



Şekil 3.27. Aseton oranı değişimine karşılık ortalama hidrodinamik çap ve PDI değişimi

Bu çalışmada diol duyarlı nanoparçacık olarak geliştirilen nanomateryal metil metakrilat (MMA) ve vinilfenil boronik asit (VFBA) *ko*-polimeridir. Polimer içeriğindeki boronik asit miktarı (ve dolaysıyla oranı) değişimine karşı oluşan nanoparçacıkların ortalama hidrodinamik çapları ve PDI değerleri Şekil 3.28.'de gösterilmiştir. Boronik asit miktarı 0 mg'dan 50 mg'a artırıldığında parçacık çapında azalan bir değişim gözlenmektedir. Boronik asit miktarı 50-100 mg arasında ise parçacık çapı artmaktadır. PDI değerindeki dalgalanma ile parçacık boyutundaki dalgalanmanın biribirine paralel olduğu görülmektedir.



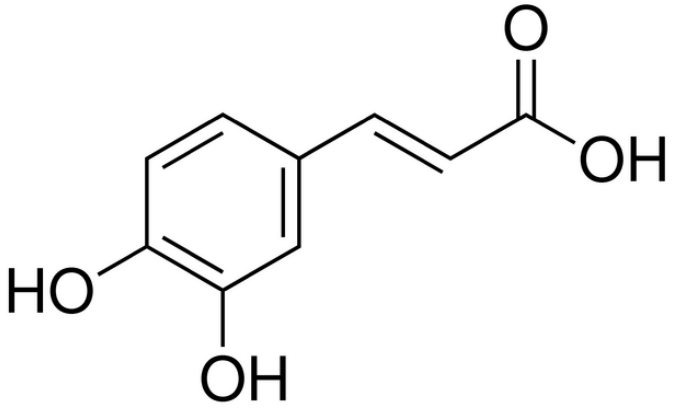
Şekil 3.28. Boronik asit miktarına karşılık ortalama hidrodinamik çap ve PDI değişimi

Şekil 3.27. ve Şekil 3.28.'de gösterilen sonuçları bir arada yorumladığımızda MMA7, düşük parçacık boyutu ve monodispers yapısı ile ileriki işlemler için uygun aday olarak değerlendilmektedir.

SEM cihazından alınan MMA7 deneyine ait mikrofotoğraf, image J programı ile analiz edildi ve ortalama parçacık boyutu 58 nm, varyasyon katsayısı % 5.6 olarak hesaplandı. Bu varyasyon katsayısı ile parçacık boyut dağılımı monodispers olarak değerlendirilmektedir (Nie ve ark., 2005; Xu ve ark., 2005; Choi ve ark., 2007; Choi ve ark., 2009). SEM mikrofotoğrafından hesaplanan ortalama parçacık boyutu (58 nm), DLS cihazından elde edilen ortalama parçacık boyutundan (87 nm) daha küçük olduğu görülmektedir. Bu durum DLS ölçümünde sulu ortamda parçacıkların difüzyon tabakası dağılımından kaynaklandığı öngörülmektedir (dosSantos ve ark., 1997; Duracher ve ark., 1999; Goldshtein ve Margel, 2009).

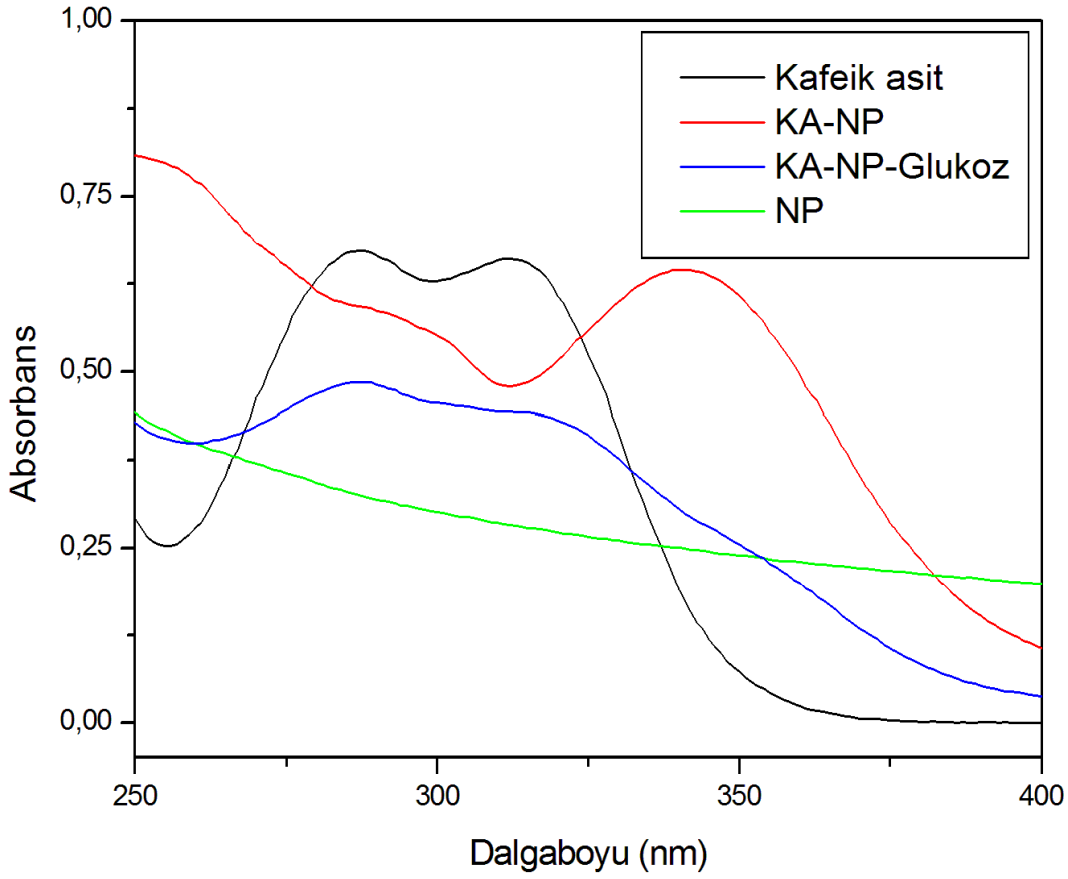
3.3.2. PMMA-*ko*-VFBA nanoparçacıkları ile kafeik asit taşınması ve salımı

Kafeik asit moleküler yapısındaki 1,2 –OH grupları ile boronik asit etkileşimine uygun bir molekül yapısına sahiptir (Şekil 3.29.).



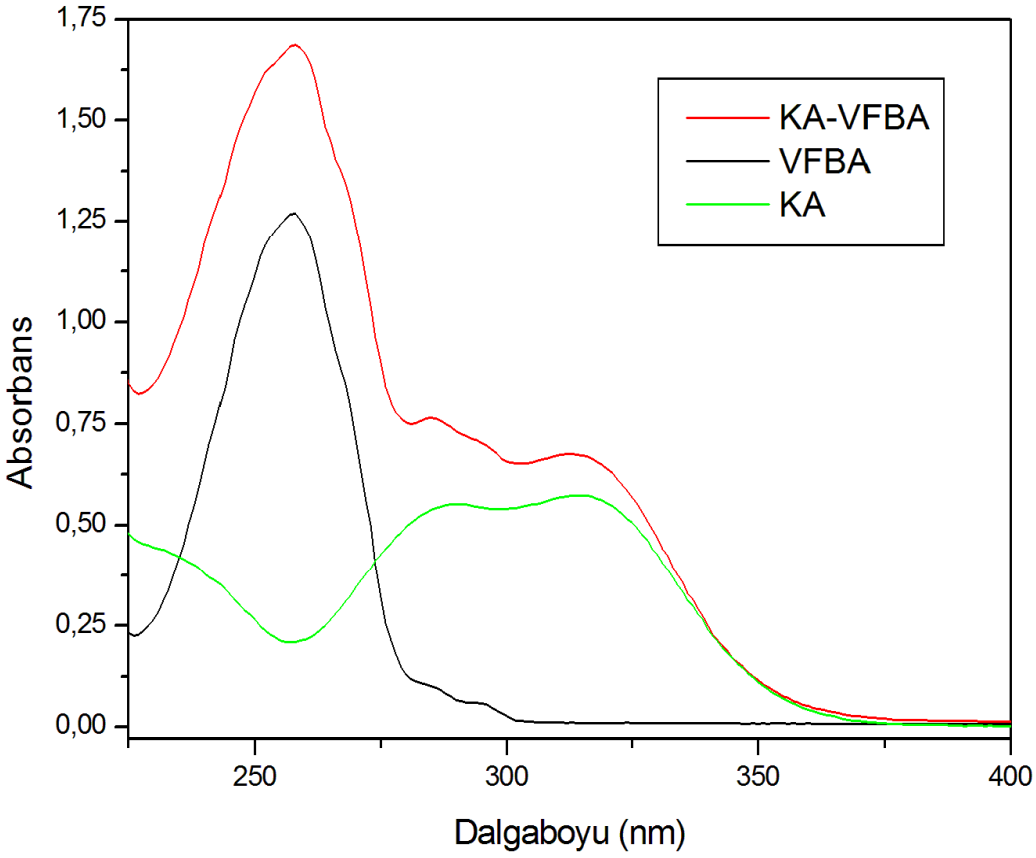
Şekil 3.29. Kafeik asit

Şekil 3.30.'da, tek başına kafeik asit, kafeik asit-nanoparçacık, kafeik asit-nanoparçacıları glukoz ile titre edildikten sonra ve tek başına nanoparçacıklara ait UV-Vis spektrası gösterilmiştir. Şekil 3.30. incelendiğinde; kafeik asit (KA) tek başına 200-400 nm aralığında 287 nm ve 311 nm'de iki belirgin UV-Vis piki vermektedir. PMMA-*ko*-VFBA nanoparçacıkları (NP) ise tek başına 200-400 nm aralığında belirgin bir pik vermemektedir. Bölüm 2.4.2.'de deneysel prosedürü verilen kafeik asit ile nanoparçacıklar etkileştirildiğinde (KA-NP); kafeik asitin 287 nm'de görülen pikin 297 nm'ye kaydığı ve pik netliğinde azalma olduğu; 311 nm'de görülen pikin ise 340 nm'ye kaydığı net bir şekilde görülmektedir. UV-Vis spektradaki bu kayma bize kafeik asit ile nanoparçacıkların etkileşimini göstermektedir (KA-NP). Böylelikle kafeik asit-nanoparçacıkları (KA-NP) kafeik asit için taşıyıcı bir nanomateryal olarak geliştirilmiştir.



Şekil 3.30. KA: kafeik asit, KA-NP: kafeik asit-nanoparçacık, KA-NP-Glukoz: kafeik asit-nanoparçacıkları glukoz ile titrasyon sonrası, NP: nanoparçacık UV-Vis absorbans spektrası

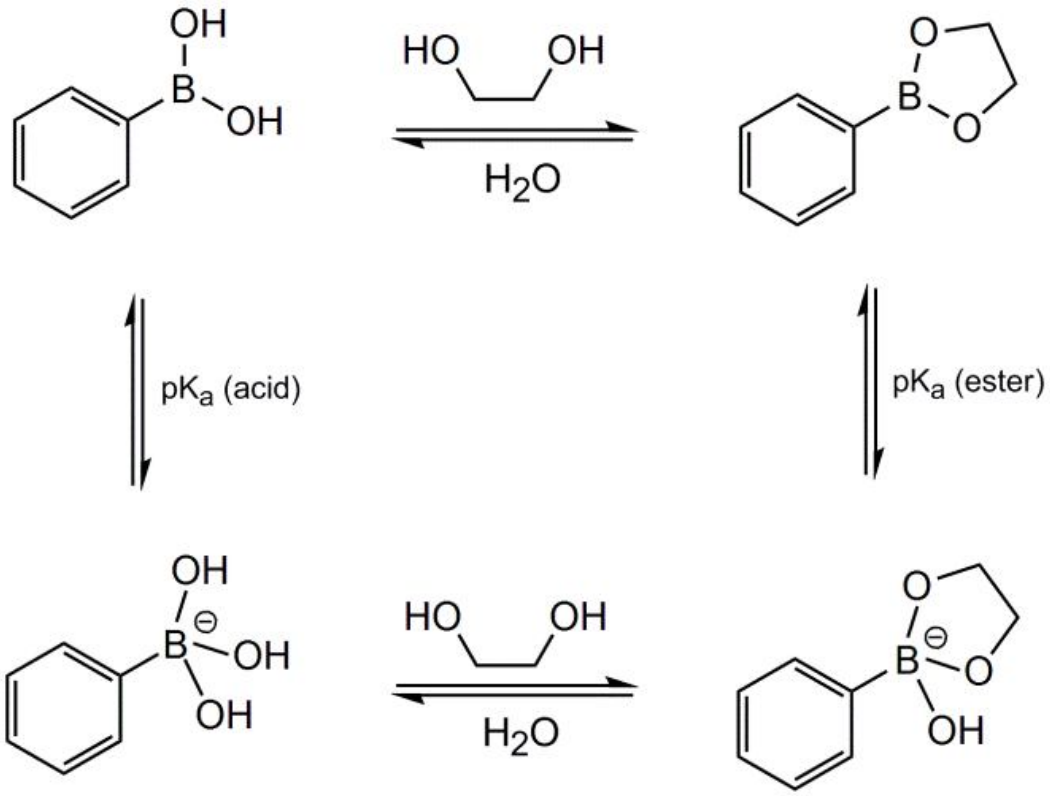
Polimerleşme tepkimesi sonucunda ortamda bulunan fazlalık monomerler santrifüj işlemi ile nanoparçacıkların yıkanması ile ortamdan uzaklaştırılmıştı. Yine de UV-Vis spektradaki bu kaymanın fazlalık monomerden kaynaklanmış olma olasılığına karşı, saf monomerlerin UV-Vis spektrası aynı aralıkta ölçüldü. Monomer spektrası Şekil 3.31.'de gösterilmiştir. Bu sonuca göre monmerlere ait UV-Vis spektrada herhangi bir kayma gözükmemektedir.



Şekil 3.31. KA: kafeik asit, VFBA: vinilfenil boronik asit, KA-VFBA: kafeik asit-VFBA UV-Vis absorbans spektrası

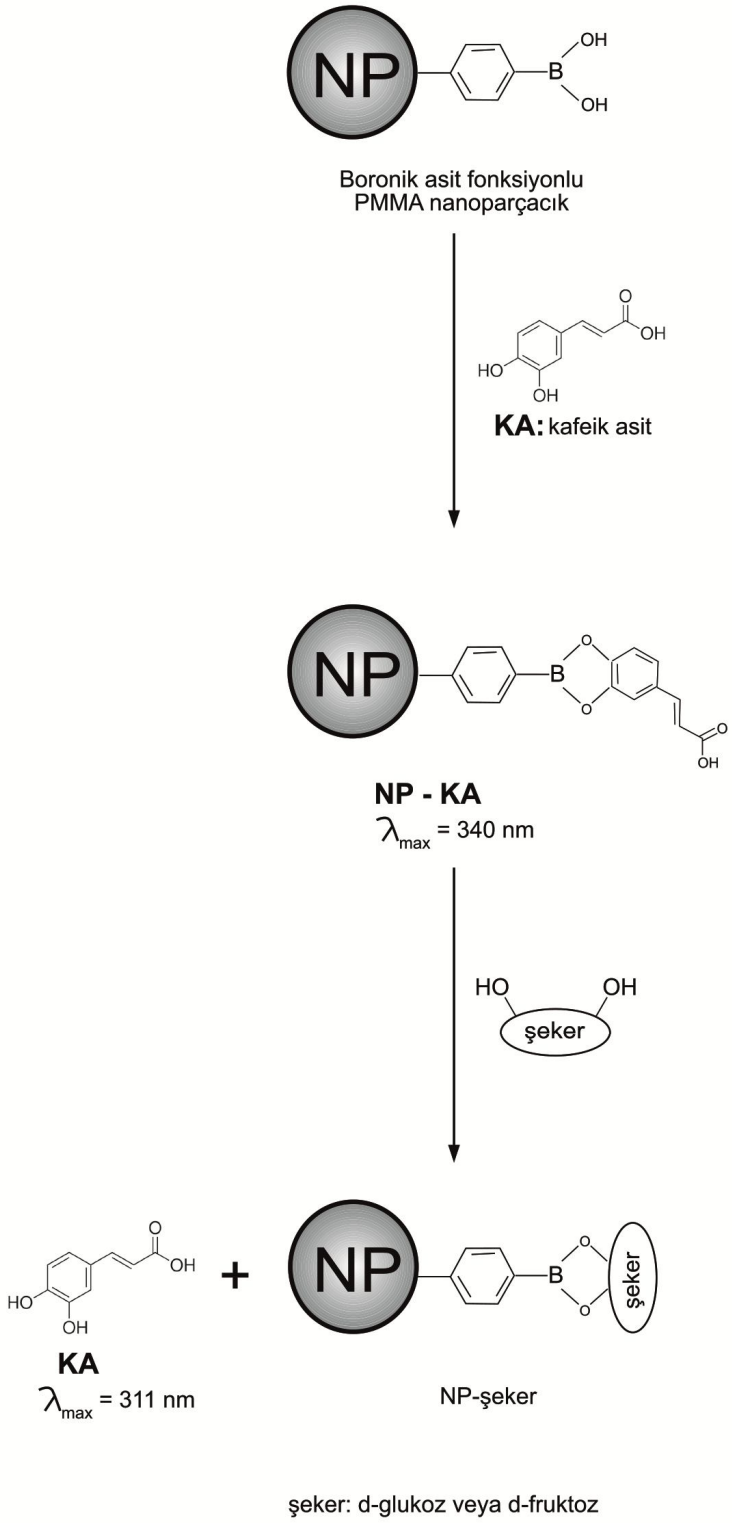
3.3.3. KA-NP ile glukoz titrasyonu ile kafeik asit salımı

Glukoz, boronik asite karşı bazik ortamda yüksek afiniteye sahiptir. Boronik asitin diol grupları ile dengesinin pH değişimine karşı değişimi Springsteen ve Wang (2002)'ın araştırmasında detaylı olarak incelenmiştir. Şekil 3.32.'de fenil boronik asit'in diol'e karşı dengesi gösterilmiştir. Bazik ortamda (pH= 8.2) glukoz ile KA-NP titre edildiğinde; glukozun boronik asite karşı afinitesi yüksek olduğundan kafeik asit ile yer değiştirme tepkimesi ile kafeik asit salımı gerçekleşmektedir.



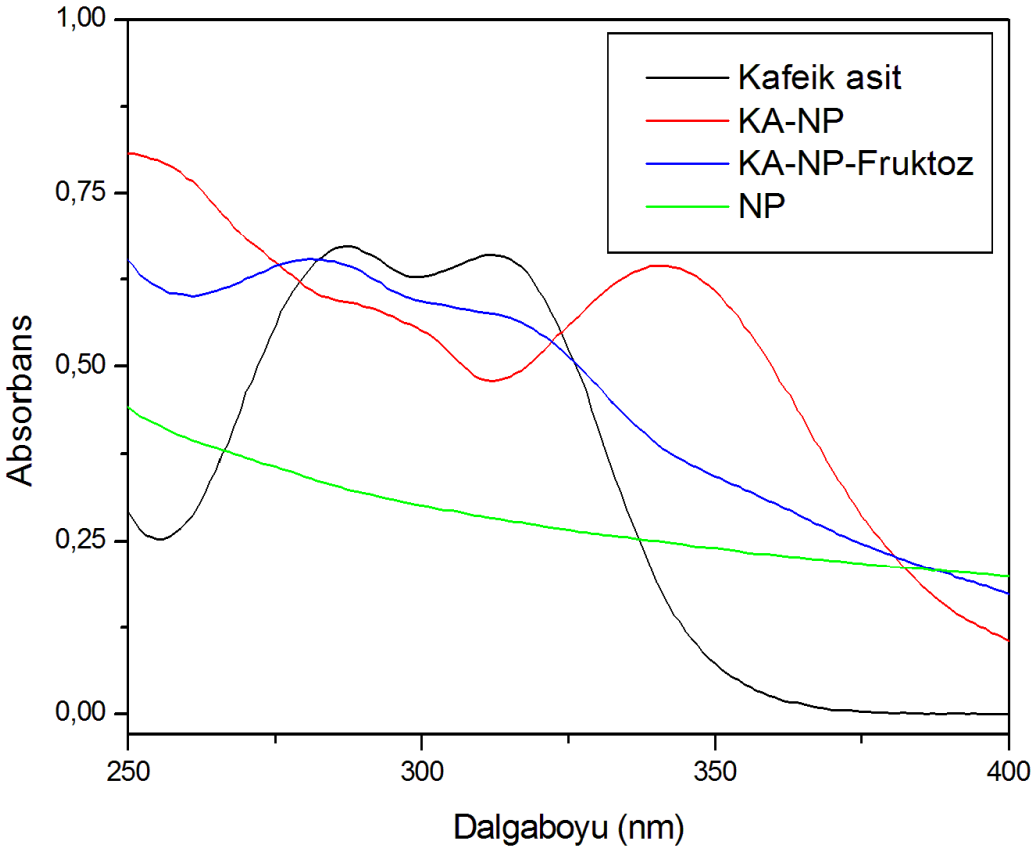
Şekil 3.32. Fenil boronik asit ile diol yerdeğiştirme çoklu dengesi

Şekil 3.30.'da açıkça görüldüğü gibi 297 nm ve 340 nm de gözlemlenen KA-NP ait piklerin eski yerlerine doğru kayma yaptığı açıkça görülmektedir. Glukoz duyarlı kafeik asit-nanoparçacık çalışma mekanizması Şekil 3.33.'de gösterilmiştir. Benzer şekilde metal kompleksi-nanoparçacık davranışı literatürde rapor edilmiştir (Amigoni-Gerbier ve Larpent, 1999; Amigoni-Gerbier ve ark., 2002).



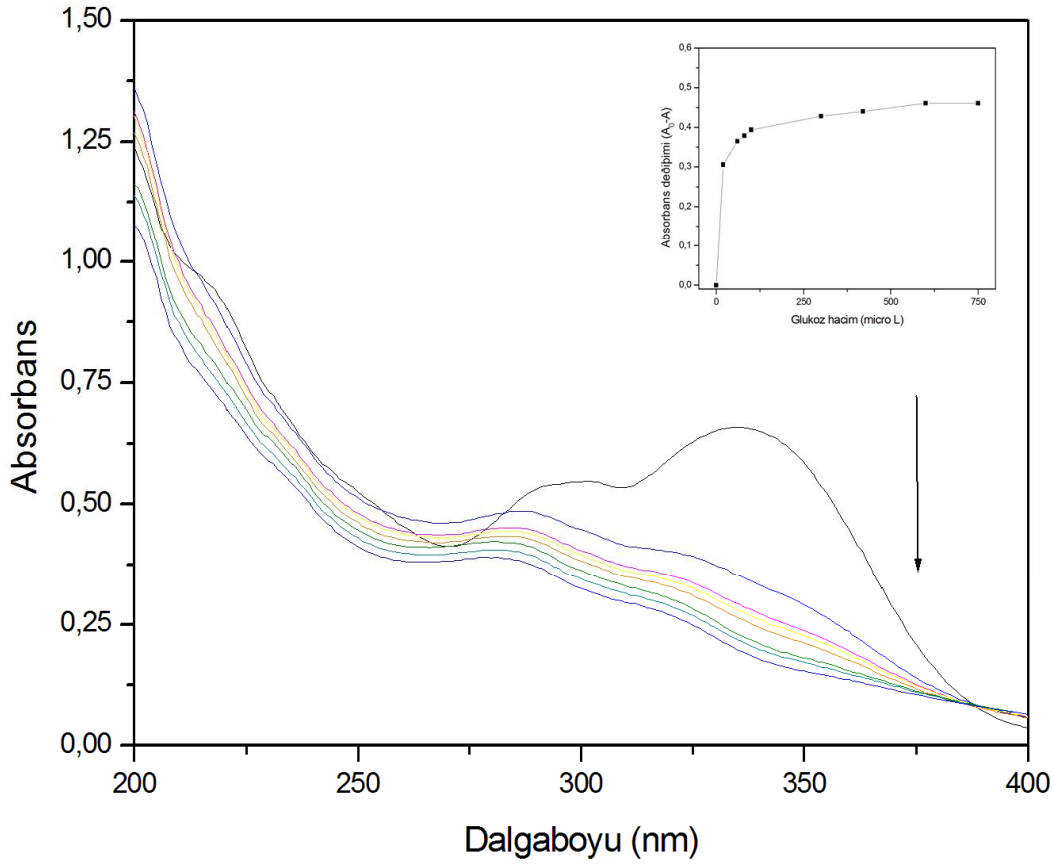
Şekil 3.33. Glukoz titrasyonu ile KA-NP sisteminden KA salım mekanizması

Glukoz ile yapılan deneyler aynı miktar ve derişimde fruktoz ile tekrar edildiğinde, glukoz titrasyonunda elde edilen sonuçlara benzer davranış gözlenmiştir. Şekil 3.34'de fruktoz ile yapılan denemenin sonuçları belirtilmiştir.

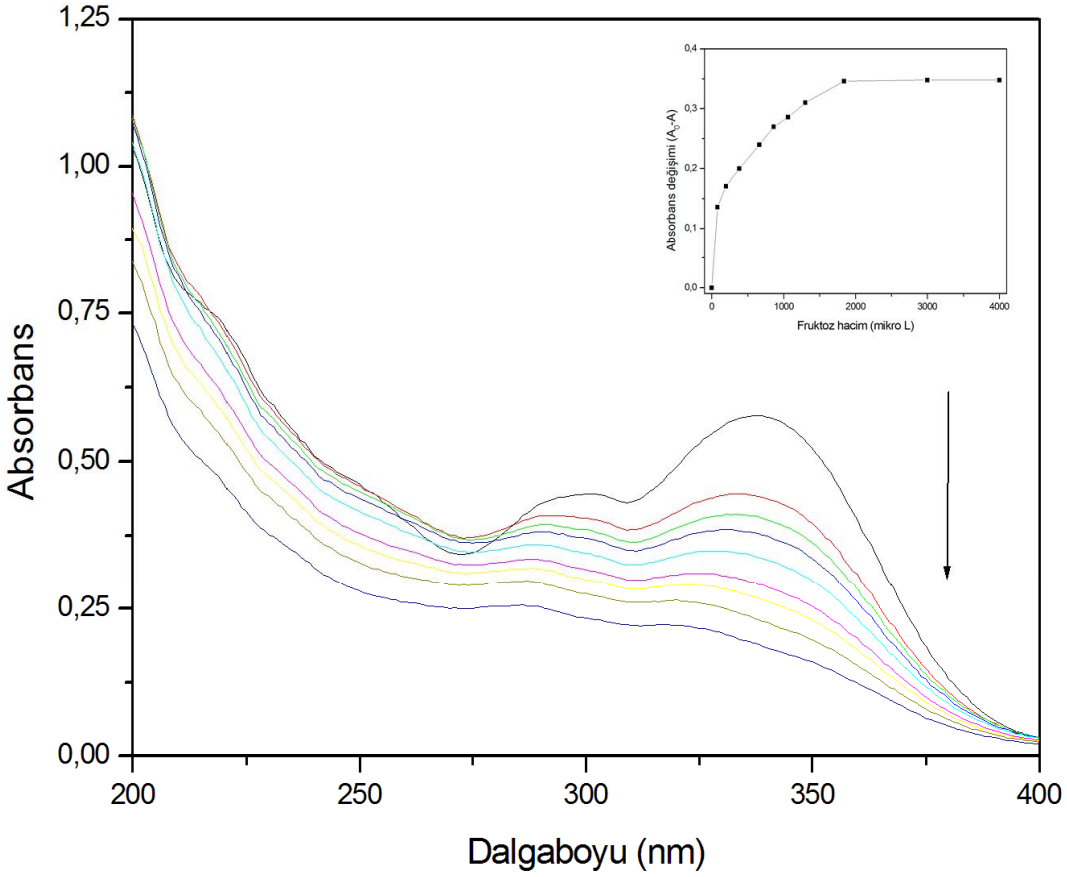


Şekil 3.34. KA: kafeik asit, KA-NP: kafeik asit-nanoparçacık, KA-NP-Fruktoz: kafeik asit-nanoparçacıkları fruktoz ile titrasyon sonrası, NP: nanoparçacık UV-Vis absorbans spektrası

KA-NP taşıyıcı sistemin fruktoz ve glukoz'a karşı duyarlı olması bize KA-NP'a ait UV-Vis spektrasındaki maksimum pikin elde edildiği dalga boyu olan 340 nm değerinde ölçülen absorbans değerinin, eklenen diol miktarına karşı bağıl kalibrasyonunu yapma olanağı sunmaktadır. KA-NP'larının, Şekil 3.35.'de glukoz ile Şekil 3.36.'da fruktoz ile titrasyonunda elde edilen UV-Vis spektra değişimi gösterilmiştir. Titrasyonlara ait diol miktarına bağlı bağıl absorbas değişimi şekil içindeki çerçevede gösterilmiştir.



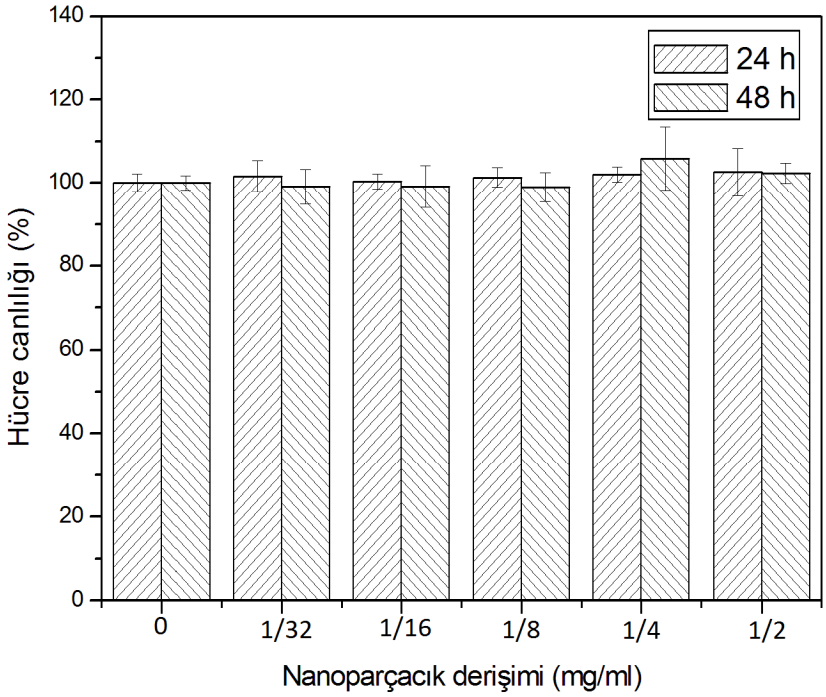
Şekil 3.35. KA-NP ile glukoz titrasyonuna ait UV-Vis spektra değişimi



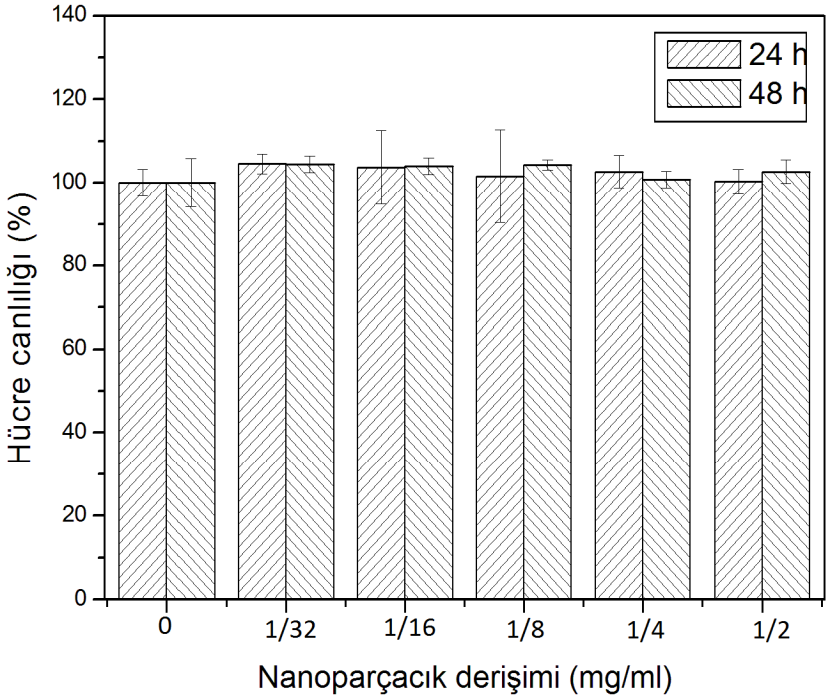
Şekil 3.36. KA-NP ile fruktoz titrasyonuna ait UV-Vis spektra değişimi

3.3.4. PMMA-*ko*-VFBA nanoparçacıklarının *in-vitro* hücresel toksisitesi

Kafeik asit için taşıyıcı ve diol duyarlı nanomateryal olarak geliştirilen PMMA-*ko*-VFBA nanoparçacıklarının biyomedikal olarak uygulanması için canlı hücre kültürü üzerinde toksik olmaması gerekmektedir. Bu amaçla *in-vitro* deneysel çalışmayla NIH-3T3 fibroblast hücre kültürü kullanılarak gösterildi. Şekil 3.37.'de kontrol grubu ve derişimi 0.00625 ila 0.50000 mg/mL olan PMMA nanoparçacıkları; Şekil 3.38.'de ise boronik asit ile fonksiyonlanmış PMMA nanoparçacık süspansiyonlarının hücre canlılığını nasıl etkilediği gösterilmektedir. Bu sonuçlara göre PMMA-*ko*-VFBA nanoparçacıkları canlı hücreler üzeride toksik etki göstermemektedir.



Şekil 3.37. A) PMMA nanoparçacıklarının *in-vitro* hücre canlılığına etkisi



Şekil 3.38. A) PMMA-*ko*-VFBA nanoparçacıklarının *in-vitro* hücre canlılığına etkisi

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

4.1 Sonuçlar

4.1.1. PEGMA nanoparçacıkları ve dual duyarlı ilaç salım sistemi

Bu tez çalışmasında simetri merkezinde disülfit bağı bulunan çapraz bağlayıcı başarılı bir şekilde sentezlendi. Sentezleme işlemi hidroksietil disülfit bileşiğinin iki terminal uçlarının akrilol gruplarına bağlanmasıyla gerçekleştirildi. Disülfit bazlı çapraz bağlayıcı kullanılarak polietilenglikol metil eter metakrilat (PEGMA) ile vinil prolidon *ko*-polimeri emülsiyon polimerizasyonu yöntemi ile PEGMA nanoparçacıkları elde edildi. Emülsiyon polimerizasyonunun kinetiği gravimetrik yöntem ile çalışıldı. Polimerizasyon işleminin parametreleri olan çapraz bağlayıcı derişimi, başlatıcı derişiminin nanoparçacık hidrodinamik çap ve polidispersite indeksi üzerine etkileri gösterildi. PEGMA nanoparçacıklarının sıcaklık değişimine duyarlı olduğu gösterildi. Nanoparçacıklar oda sıcaklığında, ortalama 204 nm olarak ölçülmekteyken sıcaklık 37 ^{o}C'nin biraz üstüne çıkarıldığında, ortalama 85 nm olarak ölçülmektedir. Litetartürde sıcaklık duyarlı polimerler olarak tanımlanan polimer türüne iyi bir örnek oluşturmuştur. Emülsiyon polimerizasyonun sonucunda nanoparçacık elde edildiği için sıcaklık duyarlı polimerik nanoparçacık olarak tanımlamak en uygun tanım olacaktır. PEGMA nanoparçacıklar tasarlanırken iki farklı uyarıcıya karşı duyarlı olacak şekilde tasarlanmıştır. Sıcaklık duyarlılığının yanı sıra nanoparçacık moleküler yapısında çapraz bağlama işlevini gören disülfit bağı içeren çapraz bağlayıcı kullanıldı. Disülfit bağları redoks duyarlı bağlar olup indirgen bir etki ile tiyol bağlarına dönüşmesi sonucu nanoparçacık yapısı bozulmakta ve doğrusal polimerler zinciri oluşmaktadır. İki farklı etkiye karşı duyarlı olduğu gösterilen PEGMA nanoparçacıklarının, ilaç ve protein/gen transferinde taşıcıyı sistem olarak kullanılabileceğini göstermek amacı ile meme kanseri gibi kanser tedavisinde kullanılan doxorubicin (DOX) benzeri küçük bir molekül olan rhodamine B boyar maddesi ile protein/gen benzeri uzun yapıda PEG-Alizarin sarısı boyar madde dual olarak nanokapsül içine yüklendi. Sıcaklığın, fizyolojik vücut sıcaklığının biraz üzerine çıkarılması ile nanokapsül içindeki rhodamine B boyar moleküllerinin önemli bir kısmının ortama salımı gösterdi. Ditiyotreitol (DTT) ile nanokapsüllerin degradasyonu sonucu kapsül içindeki makroboyanın salımı gerçekleştirildi. Disülfit çapraz bağlı PEGMA nanoparçacıklarının biyomedikal uygulamalarda kullanılabilir olduğu *in-vitro* toksisite testi ile tespit edildi. Buluşun

diğer kayda değer bir özelliği ise PEGMA nanoparçacıklarının florasans olarak izlenebilir özellikte olmasıdır. Geliştirdiğimiz PEGMA nanoparçacıklarının florasans özelliği sayesinde ileri düzeyde çalışmalar ile teşhis ve molekül ile hücre etkileşimini takip sistemi olarak geliştirilebilir. Bütün bu özellikleri ile literatüre, bilgimiz dâhilinde, ilk olarak, disülfit çapraz bağlı PEGMA nanoparçacıklarının dual salım sistemi olarak kullanılabileceğini göstermiş bulunmaktayız.

4.1.2. PHEMA hidrojeli

Biyouyumlu bir materyal olan PHEMA hidrojeli emülsiyon polimerizasyonu metodu ile başarılı bir şekilde elde edildi. PHEMA'nın hidrojel özelliği görsel olarak gösterildi ve su absorblama kapasiteleri tespit edildi. PHEMA hidrojelinin kendi kütlesinin beş katı su absorblama kapasitesine sahip olduğu belirlendi. Aseton-su karışımı PHEMA hidrojelinin elde edilebilmesi için uygun çözücü ortamı olduğu gösterildi ve PHEMA hidrojelinin jel formunda oluşabilmesi için çözücü karışımının belli oransal limitler dâhilinde olması gerektiği tespit edildi. Çözücü karışımında, aseton-su oranı 1'den küçük, 0.25'den büyük olması gerektiği rapor edildi. Biyomedikal uygulamalarda sıkça kullanılan PHEMA'nın jel formunda eldesi bu konuda spesifik olarak çalışma yapacak araştırmacılara ışık tutacaktır. PHEMA hidrojeli ileri çalışmalarda ilaç taşıyıcı ve ilaç salım sistemi olarak geliştirilmesi mümkündür.

4.1.3. PMMA-*ko*-VFBA nanoparçacıkları ile glukoz duyarlı kafeik asit salım sistemi

Boronik asit ile fonksiyonlanmış PMMA nanoparçacıkları tek aşamalı, emülsiyon polimerizasyonu ile sentezlendi. Polimerizasyonun tek aşamalı olması ve yüzey aktif madde gerektirmemesi, oldukça kolay bir fabrikasyon metodu olarak tanımlandı. Glukoz ya da fruktoza karşı duyarlı özellikte olan nanoparçacıklar, diol miktarına bağlı olarak nanoparçacığa bağlı kafeik asiti ortama salım yapmaktadır. Bu özelliği ile glukoz duyarlı kafeik asit salımı mümkün olmaktadır. Nanoparçacıkların biyouyumlu özellikte olduğu i*n-vitro* hücre deneyi ile gösterildi. Diol duyarlı bir taşıyıcı sistem olarak geliştirilen nanoparçacıklar ileri çalışmalarda kafeik asit türevi ve bir antikanser etken maddesi olan kafeik asit feniletil esterinin taşıyıcı ve glukoz ile salım yapabilen diol duyarlı nanomateryal olarak geliştirilmesi mümkündür.

4.2 Öneriler

Üç aşamalı olarak yapılan doktora tez çalışmasında elde edilen veriler ve bu konuda literatürde vurgulanan hususlar bir arada değerlendirildiğinde aşağıda maddeler halinde sıralanan hususları öneri olarak sunuyoruz.

1- İlaç salım sistemi olarak (drug delivery) farklı uyarıcılara karşı duyarlı yeni dual sistemlerin geliştirilmesi için çalışmalar yapılması.

2- Üç farklı uyarıcıya duyarlı taşıyıcı kapsüller geliştirilmesi için çalışmalar yapılması.

3- Geliştirilen sistemlerin ekonomik olarak uygun olması.

4- Geliştirilen, dış uyarıya duyarlı sistemlerin (stimuli sensitive) duyarlılığının artırılmasına yönelik çalışmalar yapılması.

5- Lokal olarak hedef bölgeye ilaç taşınımı ve salımı yapacak akıllı sistemler geliştirilmesi (targeted drug delivery systems).

6- Biyouyumlu polimerle ağızdan insülin alınmasını sağlayan akıllı taşıyıcı sistem geliştirilmesi.

7- Üniversite ve araştırma merkezlerinin bu alana yatırım yapması, fon ayırması.

8- İlaç kimyası, modern yöntemlerle ilaç taşınım ve salım sistemleri, akıllı taşıyıcı sistemler, kanser tedavisinde yeni tekniklerin geliştirilmesi konularında ar-ge çalışmaları yapılması, ulusal bazda strateji üretilmesi, ulusal araştırma merkezi kurulması ve bu konuda yetkili resmi makamların gündem oluşturması.

KAYNAKLAR

Akala, E. O., Kopeckova, P. and Kopecek, J., 1998, Novel pH-sensitive hydrogels with adjustable swelling kinetics, *Biomaterials,* 19, 1037–1047.

Allen, T. M. and Cullis P. R., 2004, Drug delivery systems: entering the mainstream, *Science*, 303 (5665), 1818-1822.

Amigoni-Gerbier, S. and Larpent, C., 1999, Synthesis and properties of selective metal-complexing nanoparticles, *Macromolecules*, 32(26), 9071-9073.

Amigoni-Gerbier, S., Desert, S., Gulik-Kryswicki, T. and Larpent, C., 2002, Ultrafine Selective Metal-Complexing Nanoparticles: Synthesis by Microemulsion Copolymerization, Binding Capacity, and Ligand Accessibility, *Macromolecules*, 35(5), 1644-1650.

Anal, K. A., 2007, Stimuli-induced pulsatile or triggered release delivery systems for bioactive compounds, *Recent Pat. Endocr. Metab. Immune. Drug Discov.,* 1, 83–90.

Angelatos, A. S., Radt, B. and Caruso, F., 2005, Light-Responsive Polyelectrolyte/Gold Nanoparticle Microcapsules, *J. Phys. Chem. B.,* 109, 3071–3076.

Aoki, T., Muramatsu, M., Torii, T., Sanui, K. and Ogatapp, N., 2001, Thermosensitive phase transition of an optically active polymer in aqueous medium, *Macromolecules,* 34, 3118–3119.

Argentiere, S., Blasi, L., Morello, G. and Gigli, G., 2011, A novel pH-responsive nanogel for the controlled uptake and release of hydrophobic and cationic solutes, *J. Phys. Chem. C.* 115, 16347-16353.

Bae, Y. H. and Park, S. Y., 2000, pH-sensitive polymer containing sulfonamide and its synthesis method, *US Patent no*: 6103865.

Bahadur, D. and Jyotsnendu, G., 2003, Biomaterials and magnetism, *Sadhana,* 28, 639–56.

Bajpai, A. K., Bajpai, J. and Soni, S. N., 2008a, Preparation and characterization of electrically conducted composites of poly(vinyl alcohol)-g-poly(acrylic acid) hydrogels impregnated with polyaniline (PANI), *Exp. Polym. Lett.,* 7, 26-29.

Bajpai, A. K., Sandeep, K., Bhanu, S. and Kankane, S., 2008b, Responsive polymers in controlled drug delivery, *Progress in Polymer Science,* 33, 1088-1118.

Bartil, T., Bounekhel, M., Cedric, C. and Jerome, R., 2007, Swelling behavior and release properties of pH-sensitive hydrogels based on methacrylic derivatives, *Acta Pharm.,* 57, 301–314.

Bauerlein, E., Schuler, D., Reszka, R. and Pauser S., 2001, Specific magnetosome method for production and use thereof, *US Patent no:* 6251365.

Bedard,M., DeGeest, B., Skirtach, A., Mohwald, H. and Sukhorukov, G., 2010, Polymeric microcapsules with light responsive properties for encapsulation and release, *Adv. Colloid Interface Sci.,* 158, 2–14.

Berndt, I., Pedersen, J. S. and Richtering W., 2005, Structure of multiresponsive "intelligent" core-shell microgels, *J. Am. Chem. Soc.*, 127 (26), 9372-9373.

Blakemore, R. P. and Frankel R. B., 1981, Magnetic navigation in bacteria, *Sci. Am.,* 245, 58–65.

Boerjan, W., Ralph, J. and Baucher, M., 2003, "Ligninbiosynthesis", *Annual Review of Plant Biology*, 54, 519–546.

Brannon-Peppas, L. and Peppas, N. A., 1990, Dynamics and equilibrium swelling behaviour of pH-sensitive hydrogels containing 2-hydroxy methacrylate, *Biomaterials,* 11, 635–644.

Bromberg, I. F. and Ron, E. S., 1998, Temperature responsive gels and thermogelling polymer matrices for protein and peptide delivery, *Adv. Drug. Delivery Rev.,* 31, 197–221.

Bromberg, I., 2003, Intelligent polyelectrolytes and gels in oral drug delivery, *Curr. Pharm. Biotechnol.,* 4, 39–49.

Brondsted, H., Hovgaard, L. and Simonsen, L., 1995, Dextran hydrogels for colon-specific drug delivery. Comparative release study of hydrocortisone and prednisolone sodium phosphate, *Stp. Pharma Sci.,* 5, 65–69.

Buyukserin, F., Camli, S. T., Yavuz M. S. and Budak G. G., 2011, Novel antifouling oligo (ethylene glycol) methacrylate particles via surfactant-free emulsion polymerization, *J. Colloid Interface Sci.,* 355, 76-80.

Camli, S. T., Büyükserin, F., Yavuz, M. S. and Budak G.G., 2010, Fine-tuning of poly(methylmethacrylate) nanoparticle size at the sub-100 nm scale using surfactant –free emulsion polymerization, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects,* 366, 141-146.

Cannizzo, C., Sonia, A. G. and Larpent, C., 2005, Boronic acid-functionalized nanoparticles: synthesis by microemulsion polymerization and application as a re-usable optical nanosensor for carbohydrates, *Polymer,* 46 (4), 1269-1279.

Cao, Y., Zhu, X. X., Luo, J. and Liu, H., 2007, Effects of substitution groups on the RAFT polymerization of N-alkylacrylamides in the preparation of thermosensitive block copolymers, *Macromolecules,* 40, 6481-6488.

Cappello, J., Crissman, J., Dorman, M., Mikolajczak, M., Textor, G., Marquet, M. and Ferrari, F., 1990, Genetic-engineering of structural protein polymers, *Biotechnol. Prog.,* 6, 198–202.

Cappello, J., Crissman, J. W., Crissman, M., Ferrari, F. A., Textor, G., Wallis, O., Whitledge, J. R., Zhou, X., Burman, D., Aukerman, L. and Stedronsky, E. R., 1998, In-situ self-assembling protein polymer gel systems for administration, delivery, and release of drugs, *J. Controlled Release,* 53, 105–117.

Catauro, M., Papale, F., Roviello, G., Ferone, C., Bollino, F., Trifuoggi, M., Aurilio, C., 2013, Synthesis of SiO2 and CaO rich calcium silicate systems via sol-gel process: Bioactivity, biocompatibility, and drug delivery tests, *J. Biomed. Mater. Res. Part A.,* doi: 10.1002/jbm.a.34978.

Chatterjee, J., Haik, Y. and Ching, J. C., 2011, Modification and characterization of polystyrene based magnetic microspheres and comparison with albumin based magnetic microspheres, *J. Magn. Magn. Mater.,* 225, 21–29.

Cheng, R., Meng, F., Deng, C., Klok, H. A. and Zhong, Z., 2013, Dual and multi-stimuli responsive polymeric nanoparticles for programmed site-specific drug delivery, *Biomaterials,* 34, 3647-3657.

Chiu, H. C., Hus, Y. H. and Lin, P. J., 2002, Synthesis of pH-sensitive insulin hydrogels and characterization of their swelling properties, *J. Biomed. Mater. Res.,* 61, 146–152.

Cho, H. S., Jhon, M. S., Yuk, S. H. and Lee, H. B., 1997, Temperature-induced phase transition of poly(N,N-dimethylaminoethyl methacrylateco-acrylamide), *J. Polym. Sci. B: Polym. Phys.,* 35, 595–598.

Choi, C. H., Jung, J. H., Rhee, Y. W., Kim, D. P., Shim, S. E. and C.S. Lee, C. S., 2007, Generation of monodisperse alginate microbeads and in situ encapsulation of cell in microfluidic device, *Biomed. Microdevices*, 9 (6) 855-862.

Choi, C. H., Jung, J. H., Hwang, T. S. And Lee, C. S., 2009, In situ microfluidic synthesis of monodisperse PEG microspheres, Macromol. Res., 17 (3) 163-167.

Cooper, S., Horbett, T., Ratner, M. and Stayton, P., 2005, Gels, genes, grafts and giants, *Festschrift on the Occasion of the 70th Birthday of Allan S. Hoffman*, CRC Press, 36.

Coviello, T., Grassi, M., Rambone, G., Santucci, E., Carafa, M., Murtas, E., Riccieri, F. M. and Alhaique, F., 1999, Novel hydrogel system from sceroglycan: synthesis and characterization, *J. Controlled Release,* 60, 367–378.

Dai, W. S. and Barbari, T. A., 1999, Hydrogel membranes with mesh size asymmetry based on the gradient crosslinking of poly(vinyl alcohol), *J. Membr. Sci.,* 156, 67–79.

de Nooy, A. E. J., Masci, G. and Crescenzi, V., 1999, Versatile synthesis of polysaccharide hydrogels using the Passerini and Ugi multicomponent condensations, *Macromolecules,* 32, 1318– 1320.

de Nooy, A. E. J., Capitani, D., Masci, G. and Crescenzi, V., 2000, Ionic polysaccharide hydrogels via the Passerini and Ugi multicomponent condensations: synthesis, behavior and solid-state NMR characterization, *Biomacromolecules,* 1, 259– 267.

Deng, Y., Wang, L., Yang, W., Pu, S. and Elassari, A., 2003, Preparation of magnetic polymeric particles via inverse microemulsion polymerization process, *J. Magn. Magn. Mater.,* 257, 69–78.

Dimitrov, M., Lambov, N., Strenkov, S., Dosseva, V. and Barnovski, V. Y., 2003, Hydrogel based on the chemically crosslinked polyacrylic acid: biopharmaceutical characterization, *Acta Pharm.,* 53, 25–31.

dosSantos, A. M., McKenna, T. F. and Gulliot, J., 1997, Emulsion copolymerization of styrene and n-butyl acrylate in presence of acrylic and methacrylic acids: Effect of pH on kinetics and carboxyl group distribution, *J. Appl. Polym. Sci.,* 65, 2343-2355.

Duracher, D., Sauzedde, F., Elaissari, A., Perrin, A. and Pichot, C., 1998, Cationic aminocontaining N-isopropylacrylamide-styrene copolymer latex particles: Particle size and morphology vs. polymerization process, *Colloid. Polym. Sci.,* 276, 219-231.

Duracher, D., Elaissari, A. and Pichot, C., 1999, Preparation of poly(N-isopropylmethacrylamide) latexes kinetic studies and characterization, *J. Polym. Sci. Part A. Polym. Chem.,* 37, 1823-1837.

Eagland, D., Crowther, N. J. and Butler, C. J., 1994, Complexation between polyoxyethylene and polymethacrylic acid — The importance of the molar mass of polyethylene, *Eur. Polym. J.,* 30, 767–773.

Elmas, B., Tuncel, M., Senel, S., Patir, S., A. and Tuncel, A., 2007, Hydroxyl functionalized thermosensitive microgels with quadratic crosslinking density distribution, *J. Colloid Interface Sci.,* 313(1), 174-183.

Esser-Kahn, A. P., Sottos, N. R., White, S. R. and Moore, J. S., 2010, Programmable Microcapsules from Self-Immolative Polymers, *J. Am. Chem. Soc.,* 132, 10266–10268.

Ferreira, S. A., Coutinho, P. J. G. and Gama F. M., 2010, Self-assembled nanogel made of mannan: synthesis and characterization, *Langmuir,* 26, 11413-11420.

Fisher, J. P., 2004, Temperature controlled solute delivery systems, *US Patent no:* 6733788.

Fomina, N., McFearin, C., Sermsakdi, M., Edigin, O. and Almutairi,A., 2010, UV and near-IR triggered release from polymeric nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.,* 132, 9540–9542.

Gacesa, P., 1988, Alginates, *Carbohydr. Polym,.* 8, 161–182.

Gan, D. J. and Lyon, L. A., 2003, Fluorescence nonradiative energy transfer analysis of crosslinker heterogeneity in core–shell hydrogel nanoparticles, *Anal. Chim. Acta.,* 496, 53–63.

Ganarkar, C. R., Liu, F., Bardys, M. and Kim, S. W., 1999, Modulating insulin-release profile pH/thermosensitive polymeric beads through polymer molecular weight, *J. Control Release,* 59, 287–298.

Ge, H., Ding, Y., Ma C. and Zhang, G. 2006. Temperature-controlled release of diols from N-isopropylacrylamide-co-acrylamidophenylboronic acid microgels, *J. Phys. Chem. B,* 110, 20635-20639.

Gehrke, S. H., Uhden, L. H. and McBride, J. F., 1998, Enhanced loading and activity retention of bioactive proteins in hydrogel delivery systems, *J. Controlled Release,* 55, 21–33.

Ghandehari, H., Kopeckova P. and Kopecek J., 1997, In vitro degradation of pH sensitive hydrogels containing aromatic azobonds, *Biomaterials,* 18, 861–872.

Giammona, G., Pitarresi, G., Cavallaro, G. and Spadaro, G., 1999, New biodegradable hydrogels based on an acryloylated poly-aspartamide crosslinked by gamma irradiation, *J. Biomed. Sci. Polym. Ed.* 10, 969–987.

Gil, E. S. and Hudson, S. M., 2004, Stimuli-responsive polymers and their bioconjugates, *Progr. Polym. Sci.,* 29, 1173–1222.

Goldshtein, J. and Margel, S., 2009, Synthesis and characterization of new UV absorbing microspheres of narrow size distribution by dispersion polymerization of 2-(2′-hydroxy-5′-methacryloxyethylphenyl)-2H-benzotriazole, *Polymer*, 50, 3422-3430.

Golui, S., Datta, D. and Bohadur, D., 2001, Studies on sol–gel derived and melt quenched magnetic oxide base bioceramics in CaO–Na2–O–P2O5–Fe2O3–SiO2–B2O3 system, *In: Ferrites proceedings of the eighth international convence on ferrites (ICF8)*, 2000, vol. 115.

Gombotz, W. R., and Wee, S.F., 1998, Protein release from alginate matrices, *Adv. Drug Deliv. Rev.,* 31, 267–285.

Goosen, M. F. A., O'Shea, G. M., Gharapetian, H. M., Chou, S. and Sun, A. M., 1985, Optimization of microencapsulation parameters: semipermeable microcapsules as a bioartificial pancreas, *Biotechnol. Bioeng.,* 27, 146–150.

Groll, J., Singh, S., Albrecht, K.and Moeller, M., 2009, Biocompatible and degradable nanogels via oxidation reactions of synthetic thiomers in inverse miniemulsion. *J. Polym. Sci. Pol. Chem.,* 47, 5543-5549.

Gupta, K. C. and Ravi Kumar M. N. V., 2000, Preparation, characterization and release profile of pH-sensitive chitosan beads, *Polym. Int.,* 49, 141–146.

Guven, G. ve Piskin, E., 2006, Optimization of monosize/cationic nanoparticle synthesis and their interaction with genomic DNA, *Polymer. Adv. Tech.,* 17, 850-854.

Handy, E. S., Ivkov, R., Ellis-Busby, D., Foreman, A., Braunhut, S. J., Gwost, D. V. and et al., 2006, Thermotherapy via targeted delivery of nanoscale magnetic particles, *US Patent no:* 6997863.

Hao, Y. and Lin, C. C., 2013, Degradable thiol-acrylate hydrogels as tunable matrices for three-dimensional hepatic culture, *J. Biomed. Mater. Res. Part A,* 2013, 00A: 000–000. doi: 10.1002/jbm.a.35044 (accepted article).

Heiko, J., Vander, L., Sebastian, H., Wonter, O. and Piet, B., 2003, Stimulus-sensitive hydrogels and their application in chemical (micro) analysis, *Royal Soc. Chem.,* 128, 325–331.

Hennink, W. E. and van Nostrum, C. F., 2002, Novel crosslinking methods to design hydrogels, *Advanced Drug Delivery Reviews,* 54, 13-36.

Hirose, M., Takesada, Y., Tanaka, H., Tamano, S., Kato, T. and Shirai, T., 1998, Carcinogenicity of antioxidants BHA, caffeic acid, sesamol, 4- methoxyphenol and catechol at low doses, either alone or in combination, and modulation of their effects in a rat medium-term multi-organ carcinogenesis model, *Carcinogenesis,* 19 (1), 207–212.

Hisamitsu, I., Kataoka, K., Okano, T. and Sakurai Y., 1997, Glucose-responsive gel from phenylborate polymer and poly(vinyl alcohol): prompt response at physiological pH through the interaction of borate with amino group in the gel, *Pharm. Res.,* 14, 289-293.

Hoffman, A. S., Stayton, P. S. and Bulmus, V., 2000, Really small bioconjugates of smart polymers and receptor proteins, *J. Biomed. Mater. Res.,* 52, 577–586.

Huang, M. T., Smart, R. C., Wong, C. Q. And Conney, A. H., 1988, Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, *Cancer Res.,* 48 (21), 5941–5946.

Huang, M. T., Ma, W., Yen, P. and et al., 1996, Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion in mouse skin and the synthesis of DNA, RNA and protein in HeLa cells, *Carcinogenesis,* 17 (4), 761–765.

Inukai, M., Jin, Y., Yomata, C. and Yonese, M., 2000, Preparation and characterization of hyaluronate-hydroxy ethyl acrylate blend hydrogels for controlled release devices, *Chem. Pharm. Bull*, 48, 850–854.

Işık, B., 2000, Swelling behavior of acrylamide-2- Hydroxyethyl methacrylate hydrogels, *Turk J Chem.,* 24, 147-156.

Jameela, S. R. and Jayakrishnan, A., 1995, Glutaraldehyde crosslinked chitosan as a long acting biodegradable drug delivery vehicle: studies on the in vitro release of mitoxantrone and in vivo degradation of microspheres in rat muscle, *Biomaterials,* 16, 769–775.

Javier, M. A., delPino, P., Bedard, M. F., Ho, D., Skirtach, A.G., Sukhorukov, G. B., Plank, C. ve Parak, W. J., 2008, Photoactivated Release of Cargo from the Cavity of Polyelectrolyte Capsules to the Cytosol of Cells, *Langmuir,* 24, 12517–12520.

Jeong, B. and Gutowska, A., 2002, Lesson from nature; stimuli responsive polymers and their biomedical applications, *Trends Biotechnol.,* 20, 305–311.

Jordan, A., Scholz, R.,Wust, P., Fohling, H. and Felix, R., 1999, Magnetic fluid hyperthermia (MFH) cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible super paramagnetic nanoparticles, *J. Magn. Magn. Mater.,* 201, 413–419.

Keerl, M., Smirnovas, V., Winter, R. and Richtering, W., 2008, Interplay between hydrogen bonding and macromolecular architecture leading to unusual phase behavior in thermosensitive microgels, *Angew. Chem. Int. Ed.,* 47(2), 338–341.

Khare, A. R. and Peppas, N. A., 1993, Release behaviour of bioactive agents from pH-sensitive hydrogels, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.,* 4, 275–289.

Khosravi, E., Yagci, Y. and Savelyev, Y., 2009, New smart materials via metal madiated macromolecular enginering, *Springer, NATO scirnce for peace and security series-A: Chemistry and Biology,* Manuscript by Lutz J. F., 37-44.

Kim, B. and Peppas, N. A., 2002, Synthesis and characterization of pH-sensitive glycopolymers for oral drug delivery systems, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.,* 13, 1271–1281.

Kim, B. S., Qiu, J. M., Wang, J. P. and Taton, T. A., 2005, Magnetomicelles: composite nanostructures from magnetic nanoparticles and cross-linked amphiphilic block copolymers, *Nano. Lett.,* 5, 1987–1991.

Kim, D. K., Zhang, Y., Kehr, J., Klason, T., Bjelke, B. and Mohammed, M., 2001, Characterization and MRI study of surfactant-coated superparamagnetic nanoparticles administered into the rat brain, *J. Magn. Magn. Mater.,* 225, 256–261.

Kim, S. W., 1997, Squeezing hydrogels for controlled oral drug delivery, *J. Control Release,* 48, 141–148.

Kiser, P. F., Thomas A. A., 2003, Degradable crosslinking agents as cross-linked network polymers formed therewith, *US Patent no:* 0078339.

Kono, K., 2001, Thermosensitive polymer-modified liposomes, *Adv. Drug. Delivery Rev.,* 59, 307–319.

Kono, K.; Nishihara, Y.; Takagishi, T. J., 1995, Photoresponsive permeability of polyelectrolyte complex capsule membrane containing triphenylmethane leucohydroxide residues, *Appl. Polym. Sci.,* 56, 707–713.

Langer, R. S. and Peppas, N. A., 1981, Present and future applications of biomaterials in controlled drug delivery systems, *Biomaterials,* 2, 201–214.

Larpent, C., Bernard, E., Richard, J. and Vaslin, S., 1997, Synthesis of functionalized nanoparticles via copolymerization in microemulsions and surface reactions, *React. Funct. Polym.,* 1997, 33(1), 49-59.

Larpent, C., Amigoni-Gerbier, S., de Sousa Delgado and Anne-Paula, 2003, Synthesis of metal-complexing nanoparticles by post-functionalisation of reactive nanolatexes produced by microemulsion polymerisation, *C. R. Chimie,* 6 (11-12), 1275-1283.

Lebo, S. E., Gargulak ,J. D. and Timothy M. J., 2001, "Lignin", *Kirk‑Othmer Encyclopedia of Chemical Technology,* John Wiley & Sons, Inc. doi:10.1002/0471238961.

Lee, H., Mok, H., Lee, S., Oh, Y. K. and Park, T. G., 2007, Target-specific intracellular delivery of siRNA using degradable hyaluronic acid nanogels, *J. Control Release,* 119, 245-252.

Lennarz, W. J. and Snyder, H. R., 1960, Arylboronic acids. III. Preparation and polymerization of p-vinylbenzeneboronic acid, *J. Am. Chem. Soc.,* 82, 2169-2171.

Lensen, M., Hansen, P. B., Murdan, S., Frokjaer, S. and Florence, A. T., 2002, Loading into electro-stimulated release of peptides and proteins from chondrotin 4-sulphate hydrogels, *Eur. J. Pharm. Sci.,* 15, 139–48.

Letsinger, R. L. and Hamilton, S. B., 1959, Organoboron compounds. X. Popcorn polymers and highly cross-linked vinyl polymers containing boron, *J. Am. Chem. Soc.,* 81, 3009-3012.

Li, C. H. and Liu, S. Y., 2010, Responsive nanogel-based dual fluorescent sensors for temperature and Hg^{2+} ions with enhanced detection sensitivity, *J. Mater. Chem.*, 20, 10716-10723.

Liberti, P. A., Rao, C. G. and Terstappen, L. W. M., 2001, Optimization of ferrofluids and protocols for enrichment of breast tumor cells in blood, *J. Magn. Magn. Mater.,* 225, 301–307.

Liu, Y., Shu, X. Z., Gray, S. D. and Prestwich, G. D., 2004, Disulfide-crosslinked hyaluronan–gelatin sponge: Growth of fibrous tissue in vivo, *J. Biomed. Mater. Res. Part A.,* 68A, 142–149. doi: 10.1002/jbm.a.10142.

Lutz, J. F. and Hoth, A., 2006, Preparation of Ideal PEG Analogues with a Tunable Thermosensitivity by Controlled Radical Copolymerization of 2-(2-Methoxyethoxy)ethyl Methacrylate and Oligo(ethylene glycol) Methacrylate, *Macromolecules,* 39, 893-896.

Lutz, J. F., Akdemir, O. and Hoth, A., 2006, Point by point comparison of two thermosensitive polymers exhibiting a similar LCST: Is the age of poly(NIPAM) over? *J. Am. Chem. Soc.,* 128, 13046-13047.

Marek W. Urban, 2011, Handbook of stimuli responsive materials. ePDF: 978-3-527-63374-6.

McGrath, K. P., Fournier, M. J., Mason, T. L. and Tirrell, D. A., 1992, Genetically directed syntheses of new polymeric materials-expression of artificial genes encoding proteins with repeating (AlaGly) ProGluGly elements, *J. Am. Chem. Soc.,* 114, 727–733.

MEB web sitesi: http://hbogm.meb.gov.tr/modulerprogramlar/kursprogramlari/kimya/moduller/PolimerEldesi.pdf (ziyaret tarihi: 01.04.2014).

Mittur, A., 2006, Temperature modulation of transdermal drug delivery, *US Patent no:* 0135911.

Miyazaki, S., Suisha, F., Kawaski, A., Shirakawa, M., Yamatoya, K. and Anwood, O., 1998, Thermally reversible xyloglucan gels as vehicles for rectal drug delivery, *J. Control Release,* 56, 75–83.

Morishita, M., Lowman, A. M., Takayama, K., Nagai, P. and Peppas N. A., 2002, Elucidation of the mechanism of incorporation of insulin in controlled release system based on complexation, *J. Control Release,* 81, 25–32.

Motornov, M., Roiter, Y., Tokarev, I. and Minko, S., 2010, Stimuli-responsive nanoparticles, nanogels and capsules for integrated multifunctional intelligent systems, *Progress in Polymer Science,* 35, 174-211.

Murthy, N., Xu, M. C., Schuck, S., Kunisawa, J., Shastri, N. and Frechet J. M. J., 2003, A macromolecular delivery vehicle for protein-based vaccines: acid-degradable protein-loaded microgels, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 4995-5000.

Mykhaylyk, O., Cherchenka, A., Ilkin, A., Dudchenka, N., Ruditsa, V., Novoseletz M. and et al., 2001, Glial brain tumor targeting of magnetite nanoparticles in rats, *J. Magn. Magn. Mater.,* 225, 241–247.

Na, K. and Bae, Y. H., 2002, Self-assembled hydrogel nanoparticles responsive to tumor extracellular pH from pullulan derivative/sulfonamide conjugate: characterization, aggregation, and adriamycin release in vitro, *Pharm. Res,* 19, 681-688.

Natarajan, K., Singh, S., Burke, T. R., Grunberger, D. and Aggarwal, B. B., 1996, Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,* 93 (17), 9090–9095.

Nie, Z. H., Xu S. Q., Seo, M., Lewis, P. C. and Kumacheva, E., 2005, Polymer particles with various shapes and morphologies produced in continuous microfluidic reactors, *J. Am. Chem. Soc.,* 127, 8058-8063.

Oh, J. K., Siegwart, D. J. and Matyjaszewski, K., 2007, Synthesis and biodegradation of nanogels as delivery carriers for carbohydrate drugs, *Biomacromolecules,* 8, 3326-3331.

Olthof, M. R., Hollman, P. C. and Katan, M. B., 2001, Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans, *J. Nutr.,* 131 (1), 66–71.

Oral, E. and Peppas, N. A., 2004, Responsive and recognitive hydrogel using star polymers, *J. Biomed. Mater. Res.,* 68A, 439–447.

Orban, Z., Mitsiades, N., Burke, T. R., Tsokos, M. and Chrousos, G. P., 2000, Caffeic acid phenethyl ester induces leukocyte apoptosis, modulates nuclear factor-kappa B and suppresses acute inflammation, *Neuroimmunomodulation,* 7 (2), 99–105.

Palasis, M., 2003, Implantable or insertable therapeutic agent delivery devices, *US Patent no*: 6506408.

Pan, Y. J., Chen, Y. Y., Wang, D. R., Wei, C., Guo, J., Lu, D. R., Chu, C. C. and Wang C. C., 2012, Redox/pH dual stimuli-responsive biodegradable nanohydrogels with varying responses to dithiothreitol and glutathione for controlled drug release, *Biomaterials,* 33, 6570-6579. doi:10.1016/j.

Pankhurst, Q. A., Connolly, J., Jones, S. K., Dobson, J., 2003, Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine, *J. Phys. D: Appl. Phys.,* 36, 167–181.

Park, J. H., von Maltzahn, G., Ruoslahti, E., Bhatia, S. N. and Sailor, M. J., 2008, Micellar hybrid nanoparticles for simultaneous magnetofluorescent imaging and drug delivery, *Angew Chem. Int. Ed.,* 47, 7284–7288.

Peng, C. L., Yang, L. Y., Luo, T. Y., Lai, P. S., Yang, S. J., Lin, W. J. and Shieh, M. J., 2010, Development of pH sensitive 2-(diisopropylamino)ethyl methacrylate based nanoparticles for photodynamic therapy, *Nanotechnology,* 21, doi:10.1088/0957-4484/21/15/155103.

Peppas, N. A. and Benner, R. E., 1980, Proposed method of intracordal injection and gelation of poly(vinyl alcohol) solution in vocal cords: polymer considerations, *Biomaterials,* 1, 158–162.

Peppas, N. A., and Mikos, A. G., 1986, Preparation methods and structure of hydrogels, in: N.A. Peppas (Ed.), *Hydrogels in Medicine and Pharmacy*, Vol. I, CRC Press, Boca Raton, FL, Chapter 1.

Peppas, N. A., Bures, P., Leobandung, W. and Chikawa, H., 2000, Hydrogels in pharmaceutical formulations, *Eur. J. Pharm. Biopharm.,* 50, 27–46.

Peppas, N. A., 2004, Devices based on intelligent biopolymers for oral protein delivery, *Int. J. Pharm.,* 277, 11–17.

Pillay, V. and Fassihi, R., 1999, In vitro release modulation from cross-linked pallets for site-specific drug delivery to the gastrointestinal tract. I. Comparison of pH-responsive drug release and associated kinetics, *J. Control Release,* 59, 229–242.

Poeckler-Schoeniger, C., Koepke, J., Gueckel, F., Sturm, J. and Georgi, M., 1999, MRI with superparamagnetic iron oxide; efficacy in the detection and characterization of focal hepatic lesions, *Magn. Reson. Imaging,* 17, 383–392.

Popovic, Z. and Sjostrand, J., 2001, Separation of retinal ganglion cells, and cortical magnification in humans, *Vision Res.,* 41, 1313–1319.

Qiu, Y. and Park, K., 2001, Environment sensitive hydrogels for drug delivery, *Adv. Drug Delivery Rev.,* 53, 321–339.

Quirk, S., 2009, Triggered release of small molecules from proteinoid microspheres, *J. Biomed. Mater. Res. Part A.,* 91(2), 391-399. doi: 10.1002/jbm.a.32241.

Radt, B., Smith, T. and Caruso, F., 2004, Optically Addressable Nanostructured Capsules, *Adv. Mater.,* 16, 2184–2189.

Rajendra, P. N., Karthikeyan, A., Karthikeyan, S. and Reddy B. V., 2011, Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line, *Mol Cell Biochem.,* 349(1-2), 11-19.

Ramanathan, S., Block, L. H., 2001, The use of chitosan gels as matrices for electrically-modulated drug delivery, *J. Control Release,* 70, 109–123.

Ramirez, L. P. and Landfester, K., 2003, Magnetic polystyrene nanoparticles with a high magnetite content obtained by miniemulsion processes, *Macromol Chem. Phys.,* 204, 22–31.

Rim, Y. J., Choi, S., Koh, U., Lee, M., Ko, K. S. and Kim, S. W., 2001, Controlled release of insulin from injectable biodegradable triblock copolymer, *Pharm. Res.,* 18, 548–550.

Risbud, M. K., Hardikar, A. A., Bhat, S. V. and Bhonde R. R., 2000, pH-sensitive freeze-dried chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogels as controlled release system for antibiotic delivery, *J. Control Release,* 68, 23–30.

Robin Y., 2002, Cancer treatment by electromagnetic activated nanoheaters, *Eurek Alert-Nanotechnology In context,* 1–3.

Ronfard, V., Rives, J. M., Neveux, Y., Carsin, H. and Barrandon, Y., 2000, Long-term regeneration of human epidermis on third degree burns transplanted with autologous cultured epithelium grown on a fibrin matrix, *Transplantation*, 70(11), 1588-1598.

Schafer, F. Q. and Buettner, G. R., 2001, Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple, *Free Radic. Biol. Med.,* 30, 1191-1212.

Schild, H. G., 1992, Poly(N-isopropylacrylamide): experiment, theory and application, *Prog. Polym. Sci.,* 17(2), 163–249.

Sershen, S. R., Westcott, S. L., Halas, N. J. and West, J. L. J., 2000, Temperature-sensitive polymer–nanoshell composites for photothermally modulated drug delivery, *J of Biomed. Mater. Res. Part A*, 51, 293–298.

Shabna, A., Saranya, V., Malathi, J., Shenbagarathai, R. and Madhavan, H. N., 2013, Indigenously produced polyhydroxyalkanoate based co-polymer as cellular supportive biomaterial, *J. Biomed. Mater. Res. Part A.,* doi: 10.1002/jbm.a.35029.

Sheikh, F. A., Ju, H. W., Moon, B. M., Park, H. J., Kim, J. H., Lee, O. J. and Park, C. H., 2013, Facile and highly efficient approach for the fabrication of multifunctional silk nanofibers containing hydroxyapatite and silver nanoparticles, *J. Biomed. Mater. Res. Part A.,* doi: 10.1002/jbm.a.35024.

Shen, L., Laibinis, P. E. and Hatton, T. A., 1999, Bilayer surfactant stabilized magnetic fluids, synthesis and interaction at interface, *Langmuir,* 15, 417–453.

Shi, L. J., Khondee, S., Linz, T. H. and Berkland, C., 2008, Poly(N-vinylformamide) nanogels capable of pH-sensitive protein release, *Macromolecules*, 41, 6546-6554.

Shinkai, M., Yanase, M., Suzuki, M., Honda, H., Wakabayashi, T., Yoshida, J. and et al., 1999, Intracellular hyperthermia for cancer using magnetite cationic liposomes, *J. Magn. Magn. Mater.,* 194, 176–184.

Shiomori, K., Ivanov, A. E., Galaev, I. Y., Kawano Y. and Mattiosson, B., 2004, Thermoresponsive properties of sugar sensitive copolymer of N-isopropylacrylamide and 3-(acrylamido)phenylboronic acid, *Macromol. Chem. Phys.,* 205, 27-34.

Skirtach, A. G., Dejugnat, C., Braun, D., Susha, A., Rogach, A. L., Parak, W. J., Mohwald, H. and Sukhorukov, G. B., 2005, The Role of Metal Nanoparticles in Remote Release of Encapsulated Materials, *Nano Lett.,* 5, 1371–1377.

Sopinath, K. S., Aminabhavi, T. M., Dave, A. M., Kumbar, S. G. and Rudzinski, W. E., 2002, Stimulus-responsive ‘smart’ hydrogel as novel drug delivery systems, *Drug Del. Ind. Pharm.,* 28, 957–974.

Sperinde, J. J. and Griffith, L. G., 1997, Synthesis and characterization of enzymatically-crosslinked-poly(ethylene glycol) hydro-gels, *Macromolecules,* 30, 5255–5264.

Springsteen, G. and Wang, B. A., 2002, Detailed Examination of Boronic Acid-Diol Complexation, *Tetrahedron*, 58, 5291-5300.

Stabenfeldt, S. E., García, A. J. and LaPlaca, M. C., 2006, Thermoreversible laminin-functionalized hydrogel for neural tissue engineering, *J. Biomed. Mater. Res. Part A.,* 77A, 718–725. doi: 10.1002/jbm.a.30638.

Stuart, E. L. Jr., Gargulak, J., D., and McNally, Timothy J. M., 2001, "Lignin", *Kirk‐Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, John Wiley & Sons, Inc., doi:10.1002/0471238961.12090714120914.a01.pub2.

Tabata, Y. and Ikada, Y., 1989, Synthesis of gelatin microspheres containing interferon, *Pharm. Res.* 6, 422–427.

Tanaka, T., Nishio, I., Sun, S. T. and Ueno-Nishio, S., 1982, Collapse of gels in an electric field, *Science,* 218:467–9.

Tang, A., Wang, C., Stewart, R. J. and Kopecek, J., 2001, The coiled coils in the design of protein-based constructs: hybrid hydrogels and epitope displays, *J. Controlled Release,* 72, 57–70.

Tao, X., Li, J. and Mohwald, H., 2004, Self-Assembly, Optical Behavior, and Permeability of a Novel Capsule Based on an Azo Dye and Polyelectrolytes, *Chem.—Eur. J.,* 10, 3397–3403.

Teong, B., Chai, Y. K., Bae, Y. H., Zentner, G. and Kim, S. W., 1999, New biodegradable polymers for injectable drug-delivery systems, *J. Control Release,* 62, 109–114.

Tertaj, P., Morales, M., Verdoguer, S., Carreno, T. and Serna, C. J., 2003, The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine, *J. Phys. D: Appl. Phys.,* 36, 182–197.

Tuncel, A., 2000, Emulsion copolymerization of styrene and poly(ethylene glycol) ethyl ether methacrylate, *Polymer,* 41, 1257-1267.

Ulasan, M., Çengeloğlu, Y. and Yavuz, M. S., 2013, Biocompatible hydrogels: Synthesis, swelling property and solvent effect on gelation, *S.Ü. Müh. Bilim ve Tekn. Der.,* C.1, S.3, p.31-36.

Ulasan, M., Yavuz, E., Bagriacik, E. U., Cengeloglu, Y. and Yavuz, M. S., 2014, Biocompatible thermoresponsive PEGMA nanoparticles crosslinked with cleavable disulfide based crosslinker for dual drug release, J. Biomed Mater Res Part A., DOI: 10.1002/jbm.a.35146.

Van Dijk-Wolthuis, W. N. E., Tsang, S. K. Y., Kettenes-van den Bosch, J. J. and Hennink, W. E., 1997, A new class of polymerizable dextrans with hydrolyzable groups: hydroxyethyl methacryl-ated dextran with and without oligolactate spacer, *Polymer,* 38, 6235–6242.

Volkmann, G. and Liu, X.-Q., 2011, Intein lacking conserved C-terminal motif G retains controllable N-cleavage activity, *FEBS Journal,* 278, 3431–3446. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08266.x.

Wang, C., Stewart, R. J. and Kopecek, J., 1999, Hybrid hydrogels assembled from synthetic polymers and coiled-coil protein domains, *Nature,* 397, 417–420.

Wichterle, O. and Lim, D., 1960, Hydrophilic gels for biological use, *Nature,* 185, 117–118.

Wikipedia web sitesi: http://en.wikipedia.org/wiki/Emulsion_polymerization (ziyaret tarihi: 01.04.2014).

Willmott, N., Kamel, H. M. H., Cummings, J., Stuart, J. F. B. and Florence, A. T., 1984, Adriamycin-loaded albumin microspheres: lung entrapment and fate in the rat, in: S.S. Davies, L. Illum, J.G. Vie, E. Tomlinson (Eds.), *Microspheres and Drug Therapy. Pharmaceutical, Immunological and Medical Aspects, Elsevier,* Amsterdam, 189–205.

Wormuth, K., 2001, Superparamagnetic later via inverse emulsion polymerization, *J. Colloid Interface Sci.,* 241, 366–377.

Wu, J. Y., Liu, S. Q., Heng, P. W. S. and Yang, Y. Y., 2005, Evaluating proteins release from, and their interactions with, thermosensitive poly (N-isopropylacrylamide) hydrogels, *J. Contr. Rel.,* 102(2), 361–372.

Xie, G., Zhang, Q., Luo, Z., Wu, M. and Li, T., 2003, Preparation and characterization of mono-disperse magnetic poly(styrene butyl acrylatemethacrylic acid) microspheres in the presence of a polar solvent, *J. Appl. Polym. Sci.,* 87, 1733–1738.

Xu, S., Nie, Z., Seo M., Lewis, P., Kumacheva, E., Stone, H. A., Garstecki, P., Weibel, D. B., Gitlin, I. And Whitesides, G. M., 2005, Generation of monodisperse particles by using microfluidics: control over size, shape, and composition, *Angew. Chem.,*117 (5), 734-738.

Xu, Z. Z., Wang, C. C., Yang, W. L., Deng, Y. H. and Fu, S. K., 2004, Encapsulation of nanosized magnetic iron oxide by polyacrylamide via inverse miniemulsion polymerization, *J. Magn. Magn. Mater.,* 277, 136–143.

Yang, X., Bakaic, E., Hoare, T. and Cranston, E. D., 2013, Injectable polysaccharide hydrogels reinforced with cellulose nanocrystals: Morphology, rheology, degradation, and cytotoxicity, *Biomacromolecules,* 14(12), 4447–4455. doi: 10.1021/bm401364z.

Yavuz, M. S., Cheng, Y., Chen, J., Cobley, C. M., Zhang, Q., Rycenga, M., Xie, J., Kim, C., Song, K. H., Schwartz, A. G., Wang, L. V. ve Xia, Y., 2009, Gold nanocages covered by smart polymers for controlled release with near-infrared light, *Nature,* 2009, 8, 935-938.

Yavuz, M. S., Buyukserin, F., Zengin, Z. and Camli S. T., 2011, Thermoresponsive oligo(ethylene glycol) methacrylate colloids with antifouling surface properties, *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.,* 49, 4800–4808. doi: 10.1002/pola.24927.

Yokoyama, F., Masada, I., Shimamura, K., Ikawa, T. and Monobe, K., 1986, Morphology and structure of highly elastic poly(vinyl alcohol) hydrogel prepared by repeated freezing-and- melting, *Colloid Polym. Sci.,* 264, 595–601.

Yoshikawa, E., Fournier, M. J., Mason, T. and Tirrell, D. A., 1994, Genetically engineered fluoropolymers. Synthesis of repetitive polypeptides containing p-fluorophenylalanine residues, *Macromolecules,* 27, 5471–5475.

Zhang, J, Chen, H. Y., Xu, L. and Gu, Y. Q., 2008a, The targeted behavior of thermally responsive nanohydrogel evaluated by NIR system in mouse model, *J. Control Release,* 131, 34-40.

Zhang, L, Wenguang, L., Lin, L., Dayong, C. and Martina, H. S., 2008b, Degradable disulfide core-cross-linked micelles as a drug delivery system prepared from vinyl functionalized nucleosides via the RAFT process, *Biomacromolecules,* 9, 3321-3331.

Zhang, Y. W., Wang, Z. X., Wang, Y. S., Zhao, H. X. and Wu, C. X., 2007, Facile preparation of pH-responsive gelatin-based core–shell polymeric nanoparticles at high concentrations via template polymerization, *Polymer,* 48, 5639–45.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	**:**	Mehmet Ulaşan
Uyruğu	**:**	T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi	**:**	23.08.1969
Telefon	**:**	0.332.2351224
Faks	**:**	0.332.2351225
e-mail	**:**	m.ulasan6663@gmail.com

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:	**Gülşehir Lisesi, Gülşehir, Nevşehir**	**1986**
Üniversite	:	**ODTÜ, Ankara**	**1993**
Yüksek Lisans	:	**Gazi Üniversitesi, Ankara**	**2010**
Doktora	:	**Selçuk Üniversitesi, Konya**	**2014**

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	**Kurum**	**Görevi**
1993-1997	Özel Dershane	Kimya Öğretmeni
1997-devam ediyor	Özel Sektör	Yönetici

UZMANLIK ALANI

Nanokimya, duyarlı polimerler, nanoparçacıklar, ilaç salım sistemleri, nanoboyutlu biyomedikal materyaller

YABANCI DİLLER

İngilizce
Bosna ve Sırp dili

YAYINLAR

Bilimsel makaleler:

1- Mehmet Ulasan, Emine Yavuz, Emin Umit Bagriacik, Yunus Cengeloglu, Mustafa Selman Yavuz. Biocompatible thermoresponsive PEGMA nanoparticles crosslinked with cleavable disulfide based crosslinker for dual drug release. 2014, *J Biomed Mater Res Part A*. 2014. DOI: 10.1002/jbm.a. 35146. (Doktora tezinden yapılmıştır)

2- Zeynep Katircioglu, Hüseyin Sakalak, Mehmet Ulasan, Ahmet Ceyhan Gören, Mustafa Selman Yavuz. Facile synthesis of "green" gold nanocrystals using cynarin in an aqueous solution. *App. Surf. Sci*. 2014, (accepted article), http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.03.013.

3- Mehmet Ulaşan, Yunus Çengeloğlu, Mustafa Selman Yavuz. Biocompatible hydrogels: Synthesis, swelling property and solvent effect on gelation. *S.Ü. Müh. Bilim ve Tekn. Der*. 2013. C.1, S.3, p.31-36. (Doktora tezinden yapılmıştır)

4- Ziya Kılıc, Orhan Acar, Mehmet Ulasan, Murat Ilim. Determination of lead, copper, zinc, magnesium, calcium and iron in fresh eggs by atomic absorption spectroscopy. *Food Chemistry*, 76 (2002) 107-116. (Yüksek lisans çalışmasından yapılmıştır)

Sözlü sunumlar:

1- Mehmet Ulasan, Emine Yavuz, Emin Umit Bagriacik, Yunus Cengeloglu, Mustafa Selman Yavuz.
"Biocompatible thermoresponsive PEGMA nanoparticles crosslinked with cleavable disulfide based crosslinker for dual drug release"
American Chemical Society (ACS), 247th National meetings and expositions
16-20 March 2014
Dallas/USA (Doktora tezinden yapılmıştır)

2- Mehmet Ulaşan, Emine Yavuz, Yunus Çengeloğlu, and Mustafa Selman Yavuz.
"Development of smart nanoparticles as a dual drug delivery vehicle"
9th Nanoscience and Nanotechnology Conference
24-28 June 2013
Atatürk Üniversitesi/ERZURUM (Doktora tezinden yapılmıştır)

3- Mehmet Ulaşan, Emine Yavuz, Yunus Çengeloğlu, and Mustafa Selman Yavuz.
"Synthesis of thermoresponsive PEGMA nanoparticles with cleavable disulfide bridges for drug release"
International Chemistry and Chemical Engineering Conference
17-21 April 2013
Kafkas Üniversitesi/BAKÜ/AZERBAYCAN (Doktora tezinden yapılmıştır)

Poster sunumlar:

1- Mehmet Ulaşan, Emine Yavuz, Yunus Çengeloğlu, Mustafa Selman Yavuz.
Çapraz bağlı PEGMA Nanoparçacıklarının sentezi ve ikili ilaç salınım uygulaması
1.İlaç Kimyası Üretimi, Teknolojisi ve Standarizasyonu Kongresi
29-31 Mart 2013
Kimyagerler Derneği/ ANTALYA (Doktora tezinden yapılmıştır)

2- Huseyin Sakalak, Mehmet Ulasan, S. Tolga. Camli, Mustafa Selman Yavuz.
"One-pot synthesis of sub-100 nm scale boronic acid functionalized nanoparticles for fluorescent carbohydrate sensing"
9th Nanoscience and Nanotechnology Conference
24-28 June 2013
Atatürk Üniversitesi/ERZURUM

3- Huseyin Sakalak, Mehmet Ulasan, Sevket T. Camli, Mustafa S. Yavuz.
"One-pot synthesis of sub-100 nm scale boronic acid functionalized nanoparticles for fluorescent diol sensing"
American Chemical Society (ACS), 247th National meetings and expositions
16-20 March 2014
Dallas/USA

Projeler:

1- Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü
Doktora tez projesi desteği
2013 Konya

2- Türkiye Ulusal Ajansı
Arion study visit projesi
2007 Finlandiya