

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

**İLAÇ VE DNA TAŞIYICI AMFİFİLİK BLOK KOPOLİMERLERİN RAFT YÖNTEMİ
İLE SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU**

MURAT TOPUZOĞULLARI

**DOKTORA TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. SEVİL DİNÇER**

İSTANBUL, 2013

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İLAÇ VE DNA TAŞIYICI AMFİFİLİK BLOK KOPOLİMERLERİN RAFT YÖNTEMİ
İLE SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU**

Murat TOPUZOĞULLARI tarafından hazırlanan tez çalışması 08.07.2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Sevil DİNÇER
Abdullah Gül Üniversitesi

Eş Danışman

Prof. Dr. E. Volga BULMUŞ ZAREİE
İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Sevil DİNÇER
Abdullah Gül Üniversitesi

Prof. Dr. Hakan BERMEK
İstanbul Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Sevil YÜCEL
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. İbrahim IŞILDAK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Kadriye TUZLAKOĞLU
Yalova Üniversitesi

Bu alışma, TÜBİTAK'ın 110T570 numaralı hızlı destek projesi ve TÜBİTAK BİDEB 2211 Yurtiçi Doktora Burs Programı tarafından desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Tez konumu belirleyen, çalışmalarımın şekillenmesinde büyük emeği bulunan, benden hiçbir zaman yardımlarını ve desteğini esirgemeyen, değerli tez hocam Doç. Dr. Sevil DİNÇER'e,

Tez çalışmamın ilerlemesinde önemli katkıları olan ve desteğini esirgemeyen ikinci tez danışmanım Prof. Dr. Volga BULMUŞ'a,

Biyomühendislik Bölümü'nde eğitime başlamamı sağlayan ve her daim destek olan merhum Prof. Dr. M. Mustafa AKDESTE'ye ve merhum Prof. Dr. Huriye KUZU'ya,

Çalışmalarımın yerine getirilmesine imkân sağlayan Biyomühendislik Bölümü'ne, Bölüm Başkanımız Prof. Dr. İbrahim IŞILDAK'a ve Biyomühendislik Bölümü'ndeki değerli hocalarıma,

Doktora tezime mali destekte bulunan TÜBİTAK ve TÜBİTAK BİDEB 2211 Yurtiçi Doktora Burs Programı'na,

Boyut ve zeta potansiyel ölçümlerimi gerçekleştirmeme yardım eden Eray DALGAKIRAN'a, floresans spektrometre ölçümlerimi gerçekleştiren Arş. Gör. Dr. Yasemin BUDAMA KILINÇ'a, AFM görüntülerimi alan Arş. Gör. Yeliz BAŞARAN ELALMIŞ'a,

Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Laboratuvarları'ndaki çalışmalarım sırasında arkadaşlık ve destekleri ile bana yardımcı olan tüm çalışma arkadaşlarıma,

Doktora eğitimim boyunca manevi desteği, emeği ve dostluğu ile hep yanımda olan değerli arkadaşım Eray DALGAKIRAN'a

Bugünlere gelmemi sağlayan ve hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen annem ve babam Meşküre ve Şeref TOPUZOĞULLARI'na, ağabeyim Mustafa TOPUZOĞULLARI'na,

Doktora çalışmam boyunca her zaman yanımda olan ve hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan sevgili eşim Nermin'e,

Ve evimizin neşe kaynağı biricik oğlum Kerem'e,

Bana ve bu teze emeği geçmiş ismini sayamadığım herkese çok teşekkürler.

Haziran, 2013

Murat TOPUZOĞULLARI

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ	viii
KISALTMA LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÇİZELGE LİSTESİ	xv
ÖZET	xvi
ABSTRACT	xviii
BÖLÜM 1.....	1
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı.....	4
1.3 Hipotez.....	5
BÖLÜM 2.....	7
İLAÇ/GEN TAŞIMADA BLOK KOPOLİMER MİSELLER	7
2.1 Tümörlere İlaç/Gen Taşınmasında Karşılaşılan Engeller	9
2.1.1 Hücre Dışı Engeller.....	10
2.1.1.1 Kararlı Misellerin Oluşturulması	10
2.1.1.2 Enjeksiyondan Sonra Kanda Stabilite ve Uzun Süre Sirkülasyon ..	12
2.1.1.3 Hedef Hücreye Ulaşma	13
2.1.1.4 Hücre Membranından Geçme	16
2.1.2 Hücre İçi Engeller	21
2.1.2.1 Endositik Vesiküller	21
2.1.2.2 Hücre çekirdeğine taşınma ve çekirdek membranından geçme..	23
2.2 Blok Kopolimer Miseller	25
2.2.1 Blok Kopolimerlerin Sentezi ve Yapıları.....	26
2.2.1.1 Serbest Radikal Polimerizasyonu	27
2.2.1.2 Kontrollü/“Yaşayan” Radikal Polimerizasyonu	28

2.2.1.3	Anyonik ve Katyonik Polimerizasyonlar	28
2.2.1.4	Diğer Yöntemler	29
2.2.2	Blok Kopolimerlerden Misel Oluşumu ve Özellikleri	29
2.2.2.1	Hidrofobik Etkileşimle Bir Araya Gelen Blok Kopolimer Miseller	30
2.2.2.2	Elektrostatik Etkileşimle Bir Araya Gelen Miseller	34
2.2.2.3	Çapraz Bağlı Blok Kopolimer Miseller	36
2.2.2.4	Diğer Blok Kopolimer Miseller	38
2.2.3	Blok Kopolimer Misellerin Nitelikleri ve Karakterizasyonu	38
2.2.3.1	Kritik Misel Konsantrasyonu	38
2.2.3.2	Morfoloji	39
2.2.3.3	Boyut	41
2.2.3.4	Blok Kopolimer Misellerin Dinamiği	41
2.3	İlaç/Gen Taşımada “Uyarı-Cevap” Polimerlerin Kullanımı	42
2.3.1	Sıcaklığa Duyarlı Polimerler	43
2.3.2	pH’a Duyarlı Polimerler	46
2.4	Yaşayan/Kontrollü Radikal Polimerizasyon	48
2.4.1	Yaşayan/Kontrollü Radikal Polimerizasyon Çeşitleri	51
2.4.2	Tersinir Katılamalı-Ayrışmalı Zincir Transfer (RAFT) Polimerizasyonu	52
2.4.2.1	RAFT Polimerizasyonunun Mekanizması	53
2.4.2.2	RAFT Polimerizasyonunu Etkileyen Faktörler	55
	RAFT Ajanı	55
	Monomer	56
	Zincir Uzunluğu	57
	Reaksiyon Sıcaklığı	57
	Reaksiyon Basıncı	57
	Çözücü	57
	Başlama ve $[CTA]_0/[I]_0$ Oranı	58
	Polimerizasyon Ortamının Konsantrasyonu	58
2.4.2.3	Polimer Yapıları ve Fonksiyonelliği	58
	Blok Kopolimer Sentezi	59
2.4.2.4	RAFT Polimerizasyonunun Biyolojik Uygulamalar İçin Önemi	60
BÖLÜM 3		62
GEREÇ VE YÖNTEMLER		62
3.1	Kimyasallar	62
3.2	Cihazlar	63
3.3	Polimerlerin Sentezi	63
3.3.1	Homopolimerlerin Sentezi	64
3.3.1.1	OEGMA’nın RAFT Polimerizasyonu	65
3.3.1.2	4-VP’nin RAFT Polimerizasyonu	66
3.3.2	Blok Kopolimerlerin RAFT Polimerizasyonu ile Sentezi	67
3.3.3	Blok Kopolimerlerin Kısmen Kuarternerleştirilmesi	67
3.4	Blok Kopolimerlerin Misel Oluşturma Davranışlarının İncelenmesi: Floresans Prob Yükleme	68
3.5	Kuarterner Blok Kopolimerlerin ODN ile Komplekslerinin Hazırlanması ..	69
3.6	Karakterizasyon	70

3.6.1	Polimerlerin Boyut Eleme Kromatografisi ile Analizi.....	70
3.6.2	Polimerlerin FTIR Spektrometresi ile Analizi	71
3.6.3	Polimerlerin ¹ H-NMR Spektroskopisi ile Analizi	71
3.6.4	Blok Kopolimerlerin ve Komplekslerinin Dinamik ve Elektroforetik Işık Saçılması Yöntemleriyle İncelenmesi	72
3.6.5	Blok Kopolimerlerin Floresans Spektrometre ile Analizi	72
3.6.6	Blok Kopolimerlerin UV-Görünür Bölge Spektrometre ile Analizi.....	73
3.6.7	Blok Kopolimerlerin Atomik Kuvvet Mikroskopuyla Görüntülenmesi 73	
BÖLÜM 4.....		74
BULGULAR.....		74
4.1	Homopolimerlerin Sentezi.....	75
4.1.1	OEGMA'nın RAFT Polimerizasyonu	75
4.1.2	4-Vinilpiridin RAFT Polimerizasyonu	83
4.2	Kopolimerlerin Sentezi ve Kısmen Kuarternleştirilmesi.....	87
4.2.1	Set 1 Kopolimerlerin Sentezi	88
4.2.1	Set 2 Kopolimerlerin Sentezi	97
4.3	Kopolimerlerin Çözelti Davranışlarının İncelenmesi.....	112
4.3.1	Set 1 Kopolimerlerin İncelenmesi.....	113
4.3.2	Set 2 Kopolimerlerin İncelenmesi.....	117
4.4	Kuartern Kopolimerlerin ODN ile Komplekslerinin İncelenmesi.....	127
BÖLÜM 5.....		135
SONUÇ VE ÖNERİLER		135
5.1	Homopolimer Sentezi	135
5.2	Blok Kopolimer Sentezi ve Blok Kopolimer Miseller	136
5.2.1	Set 1 Kopolimerleri	136
5.2.2	Set 2 Kopolimerleri	137
5.3	Kuartern Kopolimer-ODN Kompleksleri	142
KAYNAKLAR.....		144
EK-A.....		157
HESAPLAMALAR.....		157
CTA4 ile Poli(OEGMA ₄₇₅) Sentezi için Hesaplamalar:.....		157
CTA4 ile Poli(4-VP) Sentezi için Hesaplamalar:		157
MakroCTA Halindeki Poli(OEGMA ₄₇₅)i Kullanarak Poli(OEGMA ₄₇₅)-b-poli(4-VP) Sentezi için Hesaplamalar:.....		158
Poli(OEGMA ₄₇₅)-b-poli(4-VP) Blok Kopolimerinin Kuarternizasyonu		158
ÖZGEÇMİŞ.....		159

SİMGE LİSTESİ

C	Konsantrasyon
[CTA] ₀	Reaksiyonun başlangıç anındaki zincir transfer ajanı konsantrasyonu
Da	Dalton
I	Işık saçılması şiddeti
I ₃₃₈	338 nm'deki floresans emisyonu şiddeti
I ₃₃₃	333 nm'deki floresans emisyonu şiddeti
[I] ₀	Reaksiyonun başlangıç anındaki başlatıcı konsantrasyonu
kcps	Saniyedeki bin adet ölçüm sayısı
kDa	Kilodalton
M	Molar
[M] ₀	Reaksiyonun başlangıç anındaki monomer konsantrasyonu
[M] _t	Reaksiyonun t zamanında monomer konsantrasyonu
mg	Miligram
μL	Mikrolitre
mL	Mililitre
μm	Mikrometre
Mn	Sayıca ortalama molekül ağırlığı
mV	Milivolt
Mw	Ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı
nm	Nanometre
sa	Saat
T	Sıcaklık
w/v	Hacim içindeki ağırlık

KISALTMA LİSTESİ

AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
ATRP	Atom transfer radikal polimerizasyon
cmc	Kritik misel konsantrasyonu
DNA	Deoksiribonükleik asit
EPR	Arttırılmış Geçirgenlik ve Alıkonma Etkisi (Enhanced Permeability and Retention Effect)
ESR	Elektron spin rezonans
FTIR	Fourier transform infrared
GPC	Boyut eleme kromatografisi
LCST	Düşük kritik çözelti sıcaklığı
NMP	Nitroksit aracılı polimerizasyon
NMR	Nükleer manyetik rezonans
ODN	Oligonükleotid
OEGMA	Oligo(etilen glikol) metil eter metakrilat
PEG	Poli(etilen glikol)
PEO	Poli(etilen oksit)
RAFT	Tersinir katımlı ayrışmalı zincir transfer
RALS	Dik açılı ışık saçılması
RI	Kırılma indisi
RNA	Ribonükleik asit
TEM	Tünellemeli elektron mikroskobu
THF	Tetrahidrofuran
UCST	Yüksek kritik çözelti sıcaklığı
VP	Vinilpiridin

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2. 1	Serum proteinlerinin bulunduğu ortamda misellerin dağılması için 3 olası mekanizma. A. İlaç ekstraksiyonu. B. Protein adsorpsiyonu. C. Proteinlerin miselin içine nüfuz etmesi. [62] 12
Şekil 2. 2	Uzun süre kan dolaşımında kalan polimer terapötiklerin EPR etkisiyle tümör dokusuna ulaşması [1]. 15
Şekil 2. 3	Memeli hücrelerinde hücre içine alma mekanizmaları [72]. 16
Şekil 2. 4	Partiküllerin ve çözünen maddelerin hücre içerisine alınması işlemi (endositoz) mekanizmaları, hücre içi vesikül oluşumları ve bozunmaları [72] [73]. 17
Şekil 2. 5	Proton sünger teorinin şematik gösterimi [93] 22
Şekil 2. 6	Farklı yapılar sahip blok kopolimerler [63] 27
Şekil 2. 7	İlaç ve gen taşıyıcı blok kopolimer misellerin oluşumu 30
Şekil 2. 8	Yaygın olarak kullanılan ilaç yükleme prosedürleri [112]. 31
Şekil 2. 9	Çapraz bağlı blok kopolimer misellerin şematik gösterimi [125] 37
Şekil 2. 10	PGMM-b-PHPM blok kopolimerinin hidrofobik blok uzunluğu arttıkça oluşan farklı küme şekilleri. (a) küresel, (b) kısa çubuk, (c) uzun çubuk, (d) dallanmış çubuk, (e, f) kısmen bir araya gelmiş çubuk, (g) “denizanası” şekilli miseller ve (h-j) vesiküller [132]. 40
Şekil 2. 11	Bir dış uyarana karşı polimer zincirinin, hidrojelin veya yüzeye kaplanmış hidrojelin büzülmesi ve şişmesi 42
Şekil 2. 12	Sıcaklığa duyarlı çeşitli polimerler 45
Şekil 2. 13	Sıcaklığa duyarlı polimer blok içeren farklı tiplerde blok kopolimer miseller[135] 46
Şekil 2. 14	pH’a duyarlı polimer olarak kullanılan çeşitli poliasitler ve polibazlar 47
Şekil 2. 15	Poli((dimetilamino etil metakrilat)-b-(dietilamino etil metakrilat)-b-(etilen oksit)) triblok kopolimerinden pH’a bağlı olarak misel oluşumunun şematik gösterimi [144] 48
Şekil 2. 16	Yaşayan/kontrollü sistemlerde yarılogaritmik kinetik eğri ile molekül ağırlığı, polidispersite ve fonksiyonelliğin monomer dönüşümüne bağlı olarak değişimi [146]. 49
Şekil 2. 17	RAFT polimerizasyonunda kullanılan zincir transfer ajanlarının genel gösterimi 52
Şekil 2. 18	RAFT polimerizasyonu için genel olarak kabul edilen mekanizma [7], [34] 53

Şekil 2. 19	a) Çeşitli monomerlerin polimerizasyonu için uygun R grupları. Ayrışma hızı soldan sağa doğru azalmaktadır. Noktalı çizgiler polimerizasyonun kısmen kontrol edildiğini göstermektedir. b) Çeşitli monomerlerin polimerizasyonu için uygun Z grupları. Soldan sağa doğru ayrışma hızı artmakta, katılma hızı yavaşlamaktadır. Noktalı çizgiler polimerizasyonun kısmen kontrol edildiğini göstermektedir. [34]	55
Şekil 2. 20	Kararlı hale getiren substituent taşı(ma)yan R grubunun yapısına bağlı olarak bir CTA'nın etkinlik skalası [149]	56
Şekil 2. 21	RAFT polimerizasyonu ile blok kopolimer üretim yöntemleri[148]	59
Şekil 2. 22	RAFT polimerizasyonunda makroCTA'dan zincir uzaması yoluyla blok kopolimer sentezi [7]	59
Şekil 3. 1	Tez çalışmasında kullanılan monomerler	63
Şekil 3. 2	OEGMA ve 4-VP'nin blok kopolimerlerinin RAFT polimerizasyonu ile sentezlenmesinin şematik gösterimi	64
Şekil 3. 3	Tez kapsamında kullanılan RAFT ajanları	65
Şekil 4. 1	CTA1 ile sentezlenen poli(OEGMA ₄₇₅) homopolimerlerinin molekül ağırlıklarının (Mn) ve polidispersitelerinin (PDI) zamana bağlı olarak değişimi	76
Şekil 4. 2	a) CTA2 ile sentezlenen poli(OEGMA ₄₇₅)'in zamana bağlı olarak dönüşümü ve kinetiği. b) CTA2 ile sentezlenen poli(OEGMA ₄₇₅)'in %dönüşüme bağlı olarak molekül ağırlığında ve polidispersitesindeki değişim.	77
Şekil 4. 3	a) CTA3 ile sentezlenen poli(OEGMA ₄₇₅)'in zamana bağlı olarak dönüşümü ve kinetiği. b) CTA3 ile sentezlenen poli(OEGMA ₄₇₅)'in %dönüşüme bağlı olarak molekül ağırlığında ve polidispersitesindeki değişim.	77
Şekil 4. 4	CTA4 ile sentezlenen poli(OEGMA ₄₇₅)'lerin kırılma indisi (a) ve ışık saçılması (b) dedektörlerinden alınan GPC kromatogramları.	78
Şekil 4. 5	a) CTA4 ile sentezlenen poli(OEGMA ₄₇₅)'in zamana bağlı olarak dönüşümü ve kinetiği. b) CTA4 ile sentezlenen poli(OEGMA ₄₇₅)'in %dönüşüme bağlı olarak molekül ağırlığında ve polidispersitesindeki değişim.	79
Şekil 4. 6	CTA4 kullanılarak farklı [CTA] ₀ /[I] ₀ oranlarında yapılan OEGMA ₄₇₅ 'in RAFT polimerizasyonunda zamana bağlı olarak % monomer dönüşümü (a), polimerizasyonunun kinetiği (b), sentezlenen poli(OEGMA ₄₇₅)'in %dönüşüme bağlı olarak molekül ağırlığı (c) ve polidispersite (d) değişimi.	80
Şekil 4. 7	CTA4 ile [M] ₀ /[CTA] ₀ /[I] ₀ =50/1/0,2 oranında sentezlenen poli(OEGMA ₄₇₅)'in, a) zamana bağlı olarak dönüşümü ve kinetiği, b) %dönüşüme bağlı olarak molekül ağırlığında ve polidispersitesindeki değişim.	81
Şekil 4. 8	CTA1 ile sentezlenen poli(4-VP)'nin, a) zamana bağlı olarak dönüşümü ve kinetiği, b) %dönüşüme bağlı olarak molekül ağırlığında ve polidispersitesindeki değişim.	84
Şekil 4. 9	CTA4 ile [M] ₀ /[CTA] ₀ /[I] ₀ =500/1/0,4 oranında sentezlenen poli(4-VP)'nin, a) zamana bağlı olarak dönüşümü ve kinetiği, b) %dönüşüme bağlı olarak molekül ağırlığında ve polidispersitesindeki değişim.	85

Şekil 4. 10	CTA4 ile $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=200/1/0,5$ oranında sentezlenen poli(4-VP)'nin, a) zamana bağlı olarak dönüşümü ve kinetiği, b) %dönüşüme bağlı olarak molekül ağırlığında ve polidispersitesindeki değişim.	85
Şekil 4. 11	CTA4 ile $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=75/1/0,2$ oranında sentezlenen poli(OEGMA ₄₇₅)'in, a) zamana bağlı olarak dönüşümü ve kinetiği, b) %dönüşüme bağlı olarak molekül ağırlığında ve polidispersitesindeki değişim.	88
Şekil 4. 12	CTA4 ile $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=75/1/0,2$ oranında sentezlenen poli(OEGMA ₄₇₅)'lerin GPC analizlerinden elde edilen farklı dedektörlere ait kromatogramları. a) Kırılma indisi kromatogramları, b) ışık saçılması kromatogramları.	89
Şekil 4. 13	MakroCTA1'e ait FTIR spektrumu	90
Şekil 4. 14	MakroCTA1'e ait ¹ H NMR spektrumu	91
Şekil 4. 15	MakroCTA1 ile $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=200/1/0,5$ oranında 4-VP'nin polimerleştirilmesiyle sentezlenen poli(OEGMA ₄₇₅)-b-poli(4-VP)'nin a) Zamana bağlı olarak monomer dönüşümü ve kinetiği, b) %Dönüşüme bağlı olarak molekül ağırlığında ve polidispersitesindeki değişim.	92
Şekil 4. 16	MakroCTA1 ile $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=200/1/0,5$ oranında 4-VP'nin polimerleştirilmesiyle sentezlenen poli(OEGMA ₄₇₅)-b-poli(4-VP)'lerin GPC analizlerinden elde edilen farklı dedektörlere ait kromatogramları. a) Kırılma indisi kromatogramları, b) ışık saçılması kromatogramları.	93
Şekil 4. 17	S1-O ₄₇₅ -V3 kopolimerine ait FTIR spektrumu	94
Şekil 4. 18	S1-O ₄₇₅ -V3 kopolimerinin ¹ H-NMR spektrumu	95
Şekil 4. 19	Q14-S1-O ₄₇₅ -V1 (a), Q21-S1-O ₄₇₅ -V1 (b), Q14-S1-O ₄₇₅ -V3 (c) ve Q21-S1-O ₄₇₅ -V3 (d) kopolimerlerinin FTIR spektrumları.....	96
Şekil 4. 20	Q21-S1-O ₄₇₅ -V3 kopolimerinin ¹ H-NMR spektrumu	97
Şekil 4. 21	CTA4 ile $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=75/1/0,2$ oranında sentezlenen poli(OEGMA ₉₅₀)'in, a) zamana bağlı olarak dönüşümü ve kinetiği, b) %dönüşüme bağlı olarak molekül ağırlığında ve polidispersitesindeki değişim.	98
Şekil 4. 22	CTA4 ile $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=75/1/0,2$ oranında sentezlenen poli(OEGMA ₉₅₀)'in GPC analizlerinden elde edilen farklı dedektörlere ait kromatogramları. a) Kırılma indisi kromatogramları, b) ışık saçılması kromatogramları.	98
Şekil 4. 23	MakroCTA2'nin (poli(OEGMA ₉₅₀), Mn=17 kDa) ¹ H-NMR spektrumu	99
Şekil 4. 24	MakroCTA2 ile $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=200/1/0,5$ oranında 4-VP'nin polimerleştirilmesiyle sentezlenen poli(OEGMA ₉₅₀)-b-poli(4-VP)'lerin GPC analizlerinden elde edilen farklı dedektörlere ait kromatogramları. a) Kırılma indisi kromatogramları, b) ışık saçılması kromatogramları.	100
Şekil 4. 25	Polimerizasyonun 6. Saatinde çöktürülen poli(OEGMA ₉₅₀)-b-poli(4-VP) kopolimerinin ¹ H-NMR spektrumu	101
Şekil 4. 26	CTA4 ile $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=75/1/0,2$ oranında sentezlenen poli(OEGMA ₄₇₅)'in, a) zamana bağlı olarak dönüşümü ve kinetiği, b) %dönüşüme bağlı olarak molekül ağırlığında ve polidispersitesindeki değişim.	102

Şekil 4. 27	CTA4 ile $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=75/1/0,2$ oranında sentezlenen poli(OEGMA ₄₇₅)'in GPC analizlerinden elde edilen farklı dedektörlere ait kromatogramları. a) Kırılma indisi kromatogramları, b) ışık saçılması kromatogramları.	102
Şekil 4. 28	MakroCTA3'ün (poli(OEGMA ₄₇₅), Mn=17,2 kDa) ¹ H-NMR spektrumu	104
Şekil 4. 29	MakroCTA3 ile $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=200/1/0,5$ oranında 4-VP'nin polimerleştirilmesiyle sentezlenen poli(OEGMA ₄₇₅)-b-poli(4-VP)'lerin GPC analizlerinden elde edilen farklı dedektörlere ait kromatogramları. a) Kırılma indisi kromatogramları, b) ışık saçılması kromatogramları.	104
Şekil 4. 30	Polimerizasyonun 6. saatinde çöktürülen poli(OEGMA ₄₇₅)-b-poli(4-VP) kopolimerinin ¹ H-NMR spektrumu	105
Şekil 4. 31	CTA4 ile $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=150/1/0,2$ oranında sentezlenen poli(DEGMA-OEGMA ₄₇₅)'in GPC analizlerinden elde edilen farklı dedektörlere ait kromatogramları. a) Kırılma indisi kromatogramları, b) ışık saçılması kromatogramları.	106
Şekil 4. 32	CTA4 ile $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=150/1/0,2$ oranında sentezlenen poli(DEGMA-OEGMA ₄₇₅)'in GPC analizlerinden elde edilen farklı dedektörlere ait kromatogramları. a) Kırılma indisi kromatogramları, b) ışık saçılması kromatogramları.	107
Şekil 4. 33	MakroCTA4'ün (poli(DEGMA-OEGMA ₄₇₅), Mn=19 kDa) ¹ H-NMR spektrumu	108
Şekil 4. 34	MakroCTA4 ile $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=200/1/0,5$ oranında 4-VP'nin polimerleştirilmesiyle sentezlenen poli(DEGMA-OEGMA ₄₇₅)-b-poli(4-VP)'lerin GPC analizlerinden elde edilen farklı dedektörlere ait kromatogramları. a) Kırılma indisi kromatogramları, b) ışık saçılması kromatogramları.	109
Şekil 4. 35	Polimerizasyonun 3. saatinde çöktürülen poli(DEGMA-OEGMA ₄₇₅)-b-poli(4-VP) kopolimerinin ¹ H-NMR spektrumu	110
Şekil 4. 36	S2-DO-V2 (a) ve kuarternerleştirilmiş S2-DO-V2 (b) kopolimerlerinin FTIR spektrumları	111
Şekil 4. 37	Kuarternerleştirilmiş S2-DO-V2'ye ait ¹ H-NMR spektrumu	112
Şekil 4. 38	S1-O ₄₇₅ -V1 (a) ve S1-O ₄₇₅ -V3 (b) kopolimerlerinin konsantrasyon-ışık saçılması şiddeti grafikleri (pH 7)	113
Şekil 4. 39	S1-O ₄₇₅ -V1 ve Q14-S1-O ₄₇₅ -V1 kopolimerlerinin pH-ışık saçılması şiddeti (a) ve pH-hidrodinamik boyut grafikleri (b)	114
Şekil 4. 40	S1-O ₄₇₅ -V3 ve Q14-S1-O ₄₇₅ -V3 kopolimerlerinin pH-ışık saçılması şiddeti (a) ve pH-hidrodinamik boyut grafikleri (b)	115
Şekil 4. 41	S1-O ₄₇₅ -V1, S1-O ₄₇₅ -V3, Q14-S1-O ₄₇₅ -V1 ve Q14-S1-O ₄₇₅ -V3 kopolimerlerinin pH 2 ve pH 9'daki %-hacimce boyut dağılım grafikleri	116
Şekil 4. 42	S1-O ₄₇₅ -V1 ve Q14-S1-O ₄₇₅ -V1 (a) ile S1-O ₄₇₅ -V3 ve Q14-S1-O ₄₇₅ -V3 (b) kopolimerlerinin pH'a bağlı olarak zeta potansiyellerindeki değişim.....	117
Şekil 4. 43	Set 2 kopolimerlerin şematik gösterimi	117
Şekil 4. 44	Set 2 kopolimerlerinin konsantrasyon değişimine karşı floresans şiddeti oranlarında (I_{338}/I_{333}) meydana gelen değişim.....	119
Şekil 4. 45	Set 2 kopolimerlerinin pH değişimine karşı floresans şiddeti oranlarında (I_{338}/I_{333}) meydana gelen değişim	121

Şekil 4. 46	Set 2 kopolimerlerinin pH değişimine karşı hidrodinamik boyutlarında meydana gelen değişim	122
Şekil 4. 47	Set 2 kopolimerlerinin pH değişimine karşı zeta potansiyel değerlerinde meydana gelen değişim	123
Şekil 4. 48	S2-O ₄₇₅ -V1 kopolimerinin AFM görüntüleri ve çizgi profilleri.....	124
Şekil 4. 49	S2-O ₄₇₅ -V2 kopolimerinin AFM görüntüleri ve çizgi profilleri.....	125
Şekil 4. 50	S2-DO-V1 ve S2-DO-V2 kopolimerlerinin sıcaklık değişimine karşı türbiditelerinde meydana gelen değişim	126
Şekil 4. 51	S2-DO-V1 ve S2-DO-V2 kopolimerlerinin pH 3'te LCST değerlerinin üstü ve altındaki sıcaklıklardaki hacimce boyut dağılımları	127
Şekil 4. 52	Polimer ve farklı N/P oranlarındaki polimer-ODN komplekslerinin 25°C'de farklı tuz konsantrasyonlarındaki hidrodinamik çapları	128
Şekil 4. 53	Polimer ve farklı N/P oranlarındaki polimer-ODN komplekslerinin 25°C'de farklı tuz konsantrasyonlarındaki zeta potansiyel değerleri.....	129
Şekil 4. 54	Farklı N/P oranlarındaki ve 1/16 oranında seyreltilmiş kopolimer-ODN komplekslerinin ve kopolimerin 42°C'de farklı tuz konsantrasyonlarındaki hidrodinamik çapları	130
Şekil 4. 55	Farklı N/P oranlarındaki ve 1/16 oranında seyreltilmiş kopolimer-ODN komplekslerinin ve kopolimeri 42°C'de farklı tuz konsantrasyonlarındaki zeta potansiyel değerleri.....	131
Şekil 4. 56	NaCl içermeyen tamponda hazırlanmış kopolimer ve kopolimer-ODN komplekslerinin sıcaklık değişimine karşı hidrodinamik çaplarında meydana gelen değişim	132
Şekil 4. 57	0,15 M NaCl içeren tamponda hazırlanmış kopolimer ve kopolimer-ODN komplekslerinin sıcaklık değişimine karşı hidrodinamik çaplarında meydana gelen değişim	132
Şekil 4. 58	Farklı konsantrasyonda ama aynı N/P oranında hazırlanmış polimer-ODN komplekslerinin sıcaklık değişimine karşı hidrodinamik çaplarında meydana gelen değişim	133
Şekil 4. 59	Farklı N/P oranlarında hazırlanmış polimer-ODN komplekslerinin LCST değerlerinin üstü ve altındaki sıcaklıklarda konsantrasyon seyrelmesine karşı boyutlarında meydana gelen değişim	134
Şekil 5. 1	PoliOEGMA- <i>b</i> -poli(4-VP) blok kopolimerlerinin farklı pH ve sıcaklık değerlerinde sulu çözeltide oluşturduğu yapıların şematik gösterimi	140

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2. 1	Çeşitli dokular ve hücre bölümlerinde pH değerleri [138] 46
Çizelge 2. 2	NMP, ATRP ve RAFT yöntemlerinin karşılaştırması [145] 51
Çizelge 3. 1	OEGMA monomerlerinin RAFT polimerizasyonunda kullanılan RAFT ajanları ve $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0$ oranları..... 66
Çizelge 3. 2	4-VP monomerinin RAFT polimerizasyonunda kullanılan RAFT ajanları ve $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0$ oranları 66
Çizelge 3. 3	GPC analizlerinde kullanılan çalışma şartları 71
Çizelge 4. 1	OEGMA ₄₇₅ 'in farklı $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0$ ve RAFT ajanı ile polimerizasyonu sonucu elde edilen monomer dönüşümü, molekül ağırlığı ve polidispersite değerleri..... 82
Çizelge 4. 2	4-VP'nin farklı $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0$ ve RAFT ajanı ile polimerizasyonu sonucu elde edilen monomer dönüşümü, molekül ağırlığı ve polidispersite değerleri..... 86
Çizelge 4. 3	OEGMA ₄₇₅ 'in RAFT polimerizasyonu sonucu elde edilen monomer dönüşümü, molekül ağırlığı ve polidispersite değerleri 90
Çizelge 4. 4	MakroCTA1 ile $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=200/1/0,5$ oranında 4-VP'nin polimerleştirilmesiyle sentezlenen poli(OEGMA ₄₇₅)-b-poli(4-VP) kopolimerleri 93
Çizelge 4. 5	S1-O ₄₇₅ -V1 ve S1-O ₄₇₅ -V3 kopolimerlerinin kuarternerleşme dereceleri.. 95
Çizelge 4. 6	OEGMA ₉₅₀ 'nin RAFT polimerizasyonu sonucu elde edilen monomer dönüşümü, molekül ağırlığı ve polidispersite değerleri 99
Çizelge 4. 7	OEGMA ₄₇₅ 'in RAFT polimerizasyonu sonucu elde edilen monomer dönüşümü, molekül ağırlığı ve polidispersite değerleri 103
Çizelge 4. 8	DEGMA-OEGMA ₄₇₅ 'in RAFT polimerizasyonu sonucu elde edilen monomer dönüşümü, molekül ağırlığı ve polidispersite değerleri 107
Çizelge 4. 9	Sentezlenen Set 2 polimerleri ve özellikleri 110
Çizelge 4. 10	Set 2 kopolimerlerin kritik misel konsantrasyonları 118

İLAÇ VE DNA TAŞIYICI AMFİFİLİK BLOK KOPOLİMERLERİN RAFT YÖNTEMİ İLE SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU

Murat TOPUZOĞULLARI

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Sevil DİNÇER

Eş Danışman: Prof. Dr. Volga BULMUŞ ZAREİE

Yapısal kararlılıkları, toksisitelerinin düşük olması, ilaç/gen taşıma kapasitelerinin yüksek olması, küçük boyutta olmaları ve suda çözünürlükleri sebebiyle blok kopolimerler polimer terapötikler içinde önemli bir sınıfı oluşturmaktadırlar. Blok kopolimerler; hidrofobik ve hidrofilik bloklardan oluştuğunda hidrofobik etkileşimlerle, iyonik ve noniyonik hidrofilik bloklar içerdiğinde elektrostatik etkileşimle veya uygun gruplar yapıya eklendiğinde kovalent bağlarla bir araya gelerek sulu çözelti içinde misel oluştururlar. İlaç veya DNA gibi moleküller blok kopolimer misel çekirdeğine yüklenerek bu moleküllerin hem fizyolojik engellerle etkileşimlerinde azalma hem de hedef dokuya ulaşım oranlarında önemli bir artış sağlanmaktadır.

Tez çalışmasında, DNA veya ilaç taşıma ve salım potansiyeline sahip, amfifilik blok kopolimerlerin RAFT (tersinir katılmalı ayrışmalı zincir transfer; “reversible addition-fragmentation chain transfer”) polimerizasyonu ile sentezi ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma ile 4-vinilpiridin (4-VP) ve oligoetilenglikol metil eter metakrilat (OEGMA) monomerleri kullanılarak, monodisperse yakın özellikte olan, DNA veya ilaç taşımaya uygun, ek modifikasyonlara izin verecek fonksiyonel gruplara sahip, amfifilik diblok kopolimerler elde edilmiştir. Polimerin yapısındaki fonksiyonel gruplar hedefleyici veya işaretleyici moleküllerin yapıya bağlanmasını olanaklı hale getirmektedir.

Tez çalışması kapsamında öncelikle 4-VP ve OEGMA monomerleri için uygun RAFT ajanı ve reaksiyon şartları belirlenmiştir. Ardından, OEGMA RAFT yöntemiyle polimerleştirilmiş ve makroCTA haline getirilmiştir. MakroCTA zincirinin ucundan 4-VP monomeri polimerleştirilerek hidrofobik ilaç taşımada kullanılabilecek poli(OEGMA)-b-poli(4-VP) kopolimeri elde edilmiştir. Daha sonra, bu kopolimerdeki 4-VP birimleri kuarternerleştirilerek DNA taşımaya uygun pozitif yüklü blok kopolimerler elde edilmiştir. Sentezlenen polimerler GPC, FTIR spektroskopisi ve NMR spektroskopisi ile karakterize edilmiştir.

Kopolimerlerin çözelti davranışları ve kuarterner kopolimerin c-myc genini inhibe eden oligonükleotidle oluşturduğu kompleksler ışık saçılması spektroskopisi, floresans spektroskopisi, atomik kuvvet mikroskobu ve UV spektroskopisi ile incelenmiştir. Poli(OEGMA)-b-poli(4-VP) blok kopolimerlerinin pH 5'in altındaki pH'larda çözeltide tek başlarına bulunduğu ancak pH 5'in üzerinde misel oluşturdukları saptanmıştır. Ayrıca belirli blok kopolimerlerin sıcaklığa duyarlı oldukları bulunmuştur. Kuarternerleştirilmiş pozitif yüklü kopolimerlerin de ODN ile kompleks oluşturduğu ve sıcaklığa bağlı olarak oluşan yapının değiştiği gözlenmiştir. Sonuçta, ilaç taşıyıcı olarak kullanılabilecek pH'a ve sıcaklığa duyarlı amfifilik blok kopolimerler ile gen terapi çalışmalarında kullanılabilecek sıcaklığa duyarlı pozitif yüklü blok kopolimerler elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Amfifilik blok kopolimer, ilaç salımı, gen terapi, RAFT polimerizasyonu, LCST

**SYNTHESIS WITH RAFT METHOD AND CHARACTERIZATION OF DRUG AND
DNA CARRIER AMPHIPHILIC BLOCK COPOLYMERS**

Murat TOPUZOĞULLARI

Department of Bioengineering

Ph.D. Thesis

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Sevil DİNÇER

Co-Advisor: Prof. Dr. Volga BULMUŞ ZAREİE

Block copolymers are an important class of polymer therapeutics because of their structural stability, low toxicity, high loading capacity, compact size, and solubility in water. Block copolymers form micelles in aqueous solutions with hydrophobic interactions if they are comprised of hydrophobic and hydrophilic blocks or, with electrostatic interactions if they are comprised of ionic and nonionic blocks or, with covalent bonds if they have suitable groups. Reduced interaction with physiological barriers and increased transport rates to target tissue are achieved by loading molecules such as DNA or drug into the core of these block copolymer micelles.

In the study, amphiphilic block copolymers with the potential of DNA or drug delivery and release were synthesized by RAFT (reversible addition-fragmentation chain transfer) polymerization and characterized. Near monodisperse amphiphilic diblock copolymers, suitable for DNA or drug delivery and having functional groups for further modifications, were obtained using 4-vinylpyridine and oligoethyleneglycol methyl ether methacrylate (OEGMA) monomers. Functional groups in the structure of the polymer make it possible to bind targeting or marker molecules.

Within the scope of this thesis, suitable RAFT agent and reaction conditions were determined for RAFT polymerization of 4-VP and OEGMA monomers. Then, OEGMA was polymerized with RAFT method and turned into macroCTA. Poly(OEGMA)-b-

poly(4-VP) copolymer, which can be used in carrying hydrophobic drug, was obtained by polymerization of 4-VP monomer through the chain end of macroCTA. Subsequently, positively charged block copolymers, suitable for transport of DNA, were obtained by quaternization of 4-VP units in poly(OEGMA)-b-poly(4-VP). The all synthesized polymers were characterized by GPC, FTIR spectroscopy and NMR spectroscopy.

Solution behavior of copolymers and complexes formed between quaternized copolymers and oligonucleotide inhibiting the c-myc gene were analyzed with light scattering spectroscopy, fluorescence spectroscopy, atomic force spectroscopy and UV spectroscopy. It was determined that poly(OEGMA)-b-poly(4-VP) block copolymers were individual chains in solution at pH values below 5 but they form micelles at pH values above 5. In addition, certain block copolymers were found to be temperature-sensitive. It was also observed that positively charged quaternized copolymers formed complexes with ODN and structure of formed complexes changed according to the temperature. In conclusion, temperature- and pH-sensitive amphiphilic block copolymers that can be used as drug carrier and temperature-sensitive positively charged block copolymers that can be used in gene therapy studies were obtained.

Keywords: Amphiphilic block copolymer, drug delivery, gene therapy, RAFT polymerization, LCST

1.1 Literatür Özeti

Polimer terapötik terimi; polimerik ilaçlar, polimer-ilâç konjugatları, polimer-protein konjugatları, polimerik miseller ve DNA veya proteinlerin polimerlerle oluşturduğu polileksler gibi yapıları tek bir isim altında toplamaktadır [1]. Günümüze değin birçok polimer terapötik klinik kullanıma sunulmuştur [2] ve halen de birçok farklı hastalığın tedavisinde kullanılmak için yeni polimer terapötikler araştırılmaktadır [3], [4], [5] .

Yapısal kararlılıkları, toksisitelerinin düşük olması, ilâç/gen taşıma kapasitelerinin yüksek olması, küçük boyutta olmaları ve suda çözünürlükleri sebebiyle blok kopolimerler polimer terapötikler içinde önemli bir sınıfı oluşturmaktadırlar [6]. Blok kopolimerler; hidrofobik ve hidrofilik bloklardan oluştuğunda hidrofobik etkileşimlerle, iyonik ve noniyonik hidrofilik bloklar içerdiğinde elektrostatik etkileşimle veya uygun gruplar yapıya eklendiğinde kovalent bağlarla bir araya gelerek sulu çözelti içinde misel oluştururlar. Blok kopolimerin hidrofilik bloğu miselin kabuğunu oluşturur ve yapının suda çözünmesini sağlar [7]. Hidrofobik blok içeren kopolimerlerde bu blok miselin çekirdeğini oluşturur ve hidrofobik ilâç buraya yüklenir. İyonik blok içeren blok kopolimerlerde ise iyonik blok protein, DNA gibi yüklü moleküllerle kompleks oluşturup polielektrolit kompleks miselin çekirdeğini oluşturur. Boyut, zincir uzunlukları, blokların molar oranı, molekül ağırlığı, ilâç/gen içeriği misel oluşturan amfifilik blok kopolimerlerin biyolojik etkinliklerini etkileyen özelliklerinden birkaçıdır [7] [8], [9].

Blok kopolimerlerin uygulama alanlarından biri gen terapi çalışmalarıdır. Gen terapi çalışmalarında viral vektörlerin kullanılması gen transferinin etkin bir şekilde

gerçekleşmesini sağlamaktadır. Ama viral vektörlerin immunojen olmaları, üretimlerinin pahalı olması, viral genomun kromozoma girebilmesi bu yöntemin dezavantajlarını oluşturmaktadır [10]. Bu dezavantajların yanı sıra, viral vektör kullanılarak gerçekleştirilen gen terapi çalışmalarında bir hastanın hayatını kaybetmesi ve bazı hastaların da tedavi sırasında kansere yakalanmaları [11], [12], [13], [14] viral olmayan vektörlerle ilgili yapılan çalışmalara ilgiyi arttırmıştır. Yüksek miktarda DNA taşıma kapasitesine sahip olmaları, fizikokimyasal özelliklerinin belli olması, hücre dışı ve hücre içindeki engelleri geçebilmeleri için kapsamlı bir modifikasyon yelpazesi sunmaları [10] ve güvenli olmaları polimerik gen transfer sistemlerini viral olmayan vektörler içinde ön plana çıkarmaktadır [15]. Blok kopolimerlerle yapılan çalışmalarda metal-ligand koordinasyon bağı [16], [17], [18] veya elektrostatik etkileşim [19], [20] ile DNA gibi bir kargo molekülünün miselin çekirdeğinde taşınabileceği gösterilmiştir. Ayrıca, PEG-*blok*-poli(L-lizin) ve PEG-*blok*-poli(aspartik asit) gibi zıt yüklü polielektrolit segmentlere sahip blok kopolimerlerin, polielektrolit kompleksten meydana gelen bir çekirdeğe sahip misel oluşturdıkları gösterilmiştir. Polielektrolit kompleksler, proteinler ve nükleik asitlerin de dahil olduğu sentetik ve biyolojik yüklü makromoleküllerin misellere katılmasının yolunu açmıştır. Polielektrolit kompleksleri temel alarak, plazmid DNA ve oligonükleotidleri taşıyabilen blok kopolimer miseller viral olmayan DNA taşıma sistemleri olarak geliştirilmektedir [20], [21], [22], [23], [24], [25].

Diğer taraftan, blok kopolimer miseller ilaç taşıma sistemlerinde kullanılan taşıyıcı moleküller içinde de önemli bir sınıf haline geldiler [8], [26], [27], [28]. Hidrofobik ilacın suda çözünürlükleri çok düşüktür ve suda çözünen ilaçların ise vücuda verildiklerinde sirkülasyon süreleri çok kısadır. Bu ilaçların ilgili dokuya taşınmasında blok kopolimerler kullanılabilir. Bu sayede ilaç suda çözünür hale getirilmekte, kan bileşenleriyle etkileşimi azaltılmakta ve ayrıca sirkülasyon süresi de uzamaktadır [26], [27]. Amfifilik blok kopolimerlerle ilaç taşınması gerçekleştirildiğinde, miselin çekirdeğini hidrofobik segment oluşturmaktadır ve taşınan hidrofobik özellikteki ilaç molekülü miselin çekirdeğine hapsolmaktadır. PEG gibi bir hidrofilik blok miselin kabuğunu oluşturarak miselin stabilizasyonunu ve suda çözünürlüğünü sağlamaktadır.

Amfifilik blok kopolimerlerin ilaç salımı ve tümöre hedefleme gibi fizyolojik şartlardaki etkinliği, etkiye duyarlı blok veya monomerlerin yapıya eklenmesiyle geliştirilebilmektedir [29]. Kopolimerlerin pH'a duyarlı blokları kargo molekülünü belirli bir pH değerinde salmalarını sağlamaktadır; örneğin bağırsakta veya midede [30], normal ve tümör dokusunda [31]. Sıcaklığa duyarlı polimerler de yapının hedefleme özelliklerini geliştirebilmektedir. "Local hyperthermia" teknikleri sıcaklığa duyarlı taşıyıcılar kullanarak istenen molekülü ilgili dokuya hedeflenmesini olanaklı hale getirmektedir [32].

Polimerik sistemlerin tüm avantajlarına karşın, polimerin molekül ağırlığı, morfolojisi ve kimyasal yapısındaki farklılıkların polimerin biyolojik ve fizikokimyasal özelliklerinin geniş bir aralıkta değişim göstermesine sebep olmakta [33] ve biyolojik uygulamalarda yapı-fonksiyon ve yapı-performans ilişkilerinin doğru olarak kurulmasını engellemektedir. Bu sebeple polimerin temel özelliklerinin (molekül ağırlığı, kimyasal yapı, vb.) uniform karakterde olması gerekmektedir [34].

RAFT polimerizasyonu uniform karakterde vinil esaslı polimer üretimi için kullanılan kontrollü polimerizasyon yöntemlerinden biridir. RAFT polimerizasyonunun Chiefari ve ark. tarafından 1998'de [35] literatüre sunulmasından beri bu konuda yapılan çalışma miktarı giderek artmaktadır ve yayınlanan bu çalışmaya 15 yılda iki binden fazla sayıda atıf yapılması da konunun önemini ortaya koymaktadır. Ayrıca Boyer ve arkadaşları yaptıkları derleme çalışmasında [34], RAFT yönteminin biyoyoungulamalarda kullanılan veya kullanılabilecek hemen hemen tüm vinil esaslı polimerlerin üretimine uygun olduğunu, diğer kontrollü polimerizasyon yöntemlerine göre daha kolay olduğunu ve çok yönlü bir sentez platformu sunduğunu göstermişlerdir.

Gen terapisi veya ilaç salım sistemi çalışmalarında kullanılmak üzere optimum özelliklere sahip polimerin seçilmesi ve klinik çalışmalarda kullanılması açısından uniform özellikte polimerlerle çalışılması çok önemlidir. Bu sebeple tez çalışmasında RAFT yöntemi kullanılarak uniform yapıda blok kopolimer üretilmiştir. DNA veya ilaç taşıma potansiyeline sahip olacağını düşündüğümüz poli(4-vinilpiridin-b-(oligoetilenglikol metileter metakrilat)) blok kopolimeri ilk defa bu tez çalışmasında üretilmiştir. Literatür incelendiğinde bu monomerler kullanılarak çeşitli kopolimerlerin

üretildiği ama blok kopolimer olarak sentezlenmediği görülmektedir [36], [37]. Ayrıca üretilen bu kopolimerlerin antibakteriyel özellikleri ve kan uyumluluğu incelenmiş ama gen terapisi veya ilaç salım sistemi çalışmalarında kullanılabilirliği hakkında bir çalışma yapılmamıştır.

Poli(4-vinilpiridin) ilaç salım sistemlerinde ve gen terapi çalışmalarında çeşitli monomerlerle kopolimerleri ve kısmen kuarternerleştirilmiş homopolimeri olarak kullanılmıştır. Ayrıca polivinilpiridin içeren blok kopolimerlerin pH'a karşı uyarı-cevap özelliğinin olduğu ve bu özelliğinin gen terapi ve kontrollü ilaç salım çalışmalarında kullanılabileceği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [38], [39], [40], [41], [42], [43]. POEGMA ise sıcaklığa duyarlı olması, kontrollü polimerizasyon yöntemleriyle uniform özellikte sentezlenebilmesi ve en önemlisi biyouygulamalarda en çok kullanılan PEG polimerinin özelliklerine sahip olmasından ötürü giderek artan sayıda biyomedikal çalışmada uygulanmaktadır [44], [45], [46], [47], [48].

RAFT polimerizasyonu sonrasında elde edilen polimerler, kullanılan CTA molekülüne bağlı olarak sitotoksik etki gösterebilmektedir [44]. Fakat uygun CTA molekülü seçilerek ya da polimerizasyon sonrasında bu grupların modifiye edilmesiyle toksik etki ortadan kaldırılabilir. Örneğin CTA molekülünün ditiyoester yerine tritiyoester olarak seçilmesi sitotoksikiteyi önemli oranda azaltmaktadır [49].

1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasının amacı, DNA veya ilaç taşıma ve salım potansiyeline sahip, amfifilik blok kopolimerlerin RAFT (tersinir katımlı ayrışmalı zincir transfer; “reversible addition-fragmentation chain transfer”) polimerizasyonu ile sentezi ve karakterizasyonudur. Bu çalışma ile 4-vinilpiridin ve oligo(etilen glikol) metil eter metakrilat monomerleri kullanılarak, monodisperse yakın özellikte olan, DNA veya ilaç taşımaya uygun, ek modifikasyonlara izin verecek fonksiyonel gruplara sahip, amfifilik diblok kopolimerlerin elde edilmesi planlanmaktadır. Polimerin yapısındaki fonksiyonel gruplar hedefleyici veya işaretleyici moleküllerin yapıya bağlanmasını olanaklı hale getirmektedir.

Tez çalışmasıyla enfeksiyonel ve genetik hastalıkların tedavisi amacıyla kullanılabilecek özgün bir polimerik malzeme üretimi gerçekleştirilecektir. Kontrollü polimerizasyon yöntemlerinden biri olan RAFT yöntemi kullanılarak üretilen monodispers özellikteki blok kopolimerlerin canlı sistemlerdeki uygulamalarında yapı-fonksiyon ve yapı-performans ilişkisi klasik yöntemle sentezlenen polimerlere göre daha doğru bir şekilde incelenebileceği ve tekrarlanabilir sonuçlar alınabileceği düşünülmektedir. Kullanılan RAFT yöntemi sayesinde, organ veya bölge spesifik uygulamalar için, ekstra modifikasyonlara uygun polimerler elde edilecektir.

1.3 Hipotez

Tez çalışmasında üretilen polimerlerin bugüne kadar üretilmiş diğer blok kopolimer gen taşıyıcı ve ilaç salım sistemleri içinde önemli bir alternatif olacağı öngörülmektedir. Polimer hem pH'a hem de sıcaklığa bağlı olarak uyarı-cevap özelliği gösterecektir. RAFT polimerizasyonu sayesinde polimerin α - ve/veya ω -uçlarında fonksiyonel gruplar bağlanarak uygun hedefleyici veya işaretleyici molekülün bağlanmasına imkan sağlanacaktır. Bu veriler göz önünde bulundurulduğunda gen terapi veya ilaç salım sistemi çalışmalarında kullanılabilecek çok fonksiyonlu, üretimi ve modifikasyonu kolay, uygulamalarında tekrarlanabilir sonuçlar veren özgün bir polimer ortaya çıkacaktır.

Tez çalışmasında üretilen blok kopolimerlerin kanser hastalıklarının tedavisinde kullanılan diğer gen veya ilaç taşıyıcı polimerlere önemli bir alternatif olacağı ve etkin bir gen veya ilaç taşıyıcı sistemi olarak kullanılabileceği öngörülmektedir. Poli(4-vinilpiridin)-b-poli(oligoetilen glikol metil eter metakrilat) (PVP-b-POEGMA) kopolimerinin PVP bloğu nötral ve bazik pH'ta yüksüz ve hidrofobiktir. POEGMA bloğu ise hidrofilik özelliktedir. Sulu çözeltide bu kopolimer misel oluşturacağı, miselin çekirdeğinde PVP, kabuğunda ise POEGMA bloğunun olacağı öngörülmektedir. Kanser ilaçları gibi hidrofobik ilaçları miselin hidrofobik çekirdeğinde hapsedilerek vücut içinde ilgili dokuya taşınabileceği düşünülmektedir. Ayrıca PVP bloğu asidik pH'ta pozitif yüklenmektedir. Bu sebeple asidik pH'ta misel yapısı bozularak ilaç molekülleri salımı gerçekleşecektir. Ayrıca sıcaklıkla beraber POEGMA bloğunun da çözünürlüğü değişmektedir. pH'a ve sıcaklığa duyarlı olarak ilaç salımı potansiyeline sahip bir sistem üretilcektir.

PVP-b-POEGMA kopolimerinin PVP bloğu kısmen kuarternerleştirildiğinde ise oluşacak pozitif yüklü PVP bloğunun DNA ile kompleks oluşturup onu kondense edeceği, metabolizmada bozunmasını engelleyeceği, toplam net yükü nötr veya pozitif hale getirerek hücre içine girmesini kolaylaştıracağı, hücre içine girdiğinde de proton sünger etkisi göstereceği düşünülmektedir. Polikasyonların homopolimerlerinin gen transfeksiyon etkinliğinin yüksek olduğu bilinmektedir. POEGMA bloğu ise polikasyon-DNA komplekslerinin yüksek tuz konsantrasyonuna sahip kanda agregasyonu engelleyerek sirkülasyon süresini uzatacak ve sitotoksitesini düşürecektir. RAFT polimerizasyonu sayesinde yapı kontrollü şekilde üretilen ve monodispers özellikte olduğundan biyolojik çalışmalarda yapı-fonksiyon ilişkisi daha doğru incelenebilecek ve elde edilecek sonuçların tekrarlanabilirliği daha yüksek olacaktır.

Gen terapi çalışmalarında kullanılabilecek viral vektörler gibi yüksek transfeksiyon başarımına sahip kusursuz bir polimerik vektöre ulaşabilmek için yeni tip polimerik sistemlerin tasarımı ve üretimine devam edilmesi gerekmektedir. Tez çalışmasında üretilen polimer daha önce üretilmemiştir ve var olan polimerik vektörler içinde önemli bir alternatif olacağı düşünülmektedir. Gen terapide ve kontrollü ilaç salım sistemi olarak kullanılmak üzere tasarlanan her türlü polimerik sistemin *in vivo* etkinliklerinin mutlaka incelenmesi gerekmektedir. Bu noktada da tez çalışmasında kullanacağımız RAFT prosesinin önemi ortaya çıkmaktadır. RAFT yöntemi kullanılarak molekül ağırlığı ve bileşimi tam olarak bilinen monodispers blok kopolimerler üretilenektir. Bu yöntemle üretilen polimerlerin uniform karakterde olmaları sonucunda, tez çalışması sonrasında yapılacak *in vivo* çalışmalarda elde edilecek sonuçların güvenilirliği ve tekrarlanabilirliği önemli oranda artacaktır. Elde edilecek polimerlerde RAFT yöntemi sebebiyle bulunan fonksiyonel gruplar uygulama bölgesine yönelik olarak ekstra modifikasyonlara izin verecektir. Bu da özellikle hedeflenmiş gen transferi ve ilaç salımı amacıyla organ veya bölge spesifik taşıyıcıların tasarlanmasında kolaylık sağlayacaktır.

İLAÇ/GEN TAŞIMADA BLOK KOPOLİMER MİSELLER

Kanser hastalıklarının ilaçla tedavi yöntemlerinde kullanılan biyoaktif ajanların faydalı etkilerinin yanında zararlı yan etkileri de olabilmekte ve bu da klinik uygulamalarını kısıtlamaktadır. Ayrıca vücuda verilen biyoaktif molekülün çoğu etkisini göstermeden vücuttan atılmaktadır. Bu sebeple de tümörlü doku veya bölgeye biyoaktif moleküllerin taşınması hem maksimum düzeyde terapötik etki göstermesini sağlayacak hem de yan etkilerini minimum seviyeye çekecektir. Kanser tedavisinde kullanılan sitotoksik bileşikler hem kanser hücrelerini öldürmekte hem de sağlıklı hücreyi öldürmektedir. Bu sebeple, terapötik uygulamanın etkinliğini arttırmak ve yan etkilerini azaltmak için ilaç veya genin vücudun ilgili bölgelerine hedeflenerek taşınması amacıyla çeşitli taşıyıcılar kullanılmaktadır [31].

İlaç veya genin hedef dokuya ulaşabilmesi için bugüne kadar fiziksel, kimyasal ve biyolojik birçok yöntem kullanılmıştır. İlaç ve genin hedef dokuya ulaştırılmasında kullanılan başlıca fiziksel yöntemler mikroenjeksiyon, parçacık bombardımanı, basınç uygulaması, elektroporasyon [50], ultrason [51], manyetik alan ve lokal hipertermi yöntemleri [52] olarak sıralanabilir. Biyolojik taşıyıcı olarak ise virüsler kullanılmaktadır. Gen terapi çalışmalarında kullanılan virüslerle en yüksek transfeksiyon verimi elde edilmektedir. Ancak virüslerin immunojen olmaları, elde edilmelerinin zor ve pahalı olması viral taşıyıcıların önemli dezavantajlarıdır [10]. Ayrıca viral taşıyıcı kullanılarak gerçekleştirilen gen terapi çalışmalarında bir hastanın hayatını kaybetmesi ve bazı hastaların da tedavi sırasında kansere yakalanmaları [11], [12], [13], [14] viral taşıyıcıların kullanımını oldukça kısıtlamaktadır. Kimyasal olarak da çeşitli taşıyıcı moleküllerle ilaç veya gen hedef bölgeye ulaştırılmaktadır. En çok kullanılan kimyasal

taşıyıcılar lipozomlar, polimerler, hidrojel, dendrimerler, karbon nanotüpleri, altın nanopartiküller ve mikroküreler olarak sıralanabilir [53].

Polimerik taşıyıcılar, 1970'lerde kullanılmaya başlanıldığından beri, ilaç taşıyıcı tasarımı ve mevcut ilaçların etkinliğinin artırılmasında önemli bir rol oynamaktadır.

Polimer esaslı taşıyıcıların avantajları;

- Yapılarında ve fonksiyonel özelliklerinde kolay modifikasyon yapılabilmesi,
- Üretim maliyetlerinin düşük olması,
- Doğal polimerler (proteinler, karbohidratlar, vb.) gibi immunojen özellik göstermemeleri,

olarak sıralanabilir.

Polimerler, monomer adı verilen çok sayıda küçük molekülün birbirlerine tekrarlanır biçimde bağlanmasıyla ortaya çıkan büyük moleküllerdir ve lineer, dallanmış, blok, yıldız, dendritik polimerler gibi birçok farklı şekilde sentezlenebilmektedir. Ayrıca yapılarına birçok farklı fonksiyonel grup takılarak hedefleyici veya işaretleyici moleküllerin bağlanması olanaklı hale getirilmektedir. Bu sebeplerden dolayı sentetik polimerler biyomedikal alanda doku mühendisliği, ilaç salım sistemleri, sentetik aşı üretimi, gen terapi çalışmaları, kontakt lens üretimi, dişçilik, protez üretimi gibi birçok farklı uygulamada kullanılmaktadırlar [54] ve en geniş biyomalzeme sınıfını oluşturmaktadırlar [55].

Blok kopolimerler, temel olarak, farklı monomerlerden oluşan iki veya daha fazla polimerik bloğun bir araya gelerek oluşturduğu polimerlerdir. Çözelti içinde blok kopolimer zincirlerinin çözücüye, iyonik şiddete, sıcaklığa, vb. bağlı olarak kendiliğinden bir araya gelmeleriyle mikro- veya nano-boyutlu kümeler ("assembly") oluşturmaları blok kopolimerleri diğer ilaç/gen taşıyıcı polimerlerden [56], [57] ayıran en önemli özellikleridir [6]. Blokların yapısı ve çözücü değiştirilerek blok kopolimerlerin oluşturduğu kümelerin yapısı değiştirilebilmektedir [58]. Ayrıca blok sayıları değiştirilerek de oluşan yapılar üzerinde ilave kontrol sağlanabilmekte ve farklı yapılarda miseller ve vesiküller oluşturulabilmektedir [58].

Blok kopolimerlerin bir araya gelmeleri dışında, oluşan kümelerin kolayca modifiye edilebilmeleri taşıyıcı tasarımında önemli avantajlar sunmaktadır. Örneğin blok polimer kümelerin sadece yüzeyi veya sadece iç kısmı modifiye edilebilmektedir [27]. Blok kopolimerlerin taşıyıcı olarak kullanılmalarındaki diğer bir avantaj ise blok kopolimerlerin bir araya gelmesini sağlayan moleküller arası etkileşim değiştirilerek farklı yapıda moleküllerin taşınabilmesidir. Blok kopolimerler hidrofobik etkileşimle bir araya geldiklerinde hidrofobik ilaç moleküllerini, elektrostatik etkileşimle DNA ve protein gibi yüklü molekülleri veya metal koordinasyon bağlarıyla metal içeren ilaçları taşıyabilmektedir [27].

Blok kopolimer kümeleri ilaç/gen taşıyıcı olarak kullanıldıklarında taşıdıkları kargo molekülünü ilgili dokuya ulaştırabilmeleri için vücut içerisinde dağılmakta ve birçok engelden geçmeleri gerekmektedir. Bu sebeple de ilaç/gen taşıyıcı olarak blok kopolimer kümeler kullanılmadan önce;

- Taşıdıkları kargo molekülünü hedef hücreye ulaştırırken vücut içerisinde karşılaşacakları engellerin iyi bilinmesi,
- Blok kopolimer kümelerin bu engelleri aşacak şekilde tasarlanmaları,

gerekmektedir.

2.1 Tümörlere İlaç/Gen Taşınmasında Karşılaşılan Engeller

Polimerik miselleri kanser tedavisi için güvenilir taşıyıcılar haline getirmek için akademik araştırma alanından klinik uygulamaya geçilmesi gerekmektedir. Bu durumda da ilaç/gen taşıyıcı polimerik misellerin maksimum terapötik etkiyi göstermesi için vücut içindeki dağılımının bilinmesi ve hedef dokuya veya hücreye ulaşana dek karşılaşacağı engelleri aşması gerekmektedir.

Blok kopolimer misellerin de dahil olduğu kolloidal taşıyıcılar vücuda farklı şekillerde (ağızdan veya solunum yoluyla) verilebiliyor olsalar da en çok periferik intravenöz enjeksiyon yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntemde, kolloidal taşıyıcı damar ağıyla enjeksiyon bölgesinden doğrudan kalbe ulaşmaktadır. Kalpten sonra da akciğerdeki kan

dolaşımına katılırlar [59]. Kolloidal ilaç/gen taşıyıcı sistemlerin karşılaştıkları ilk engel akciğerdeki kan dolaşımındadır. Akciğerdeki kılcal damarlar vücuttaki en dar damarlardır ve çapları 6-13 µm arasında değişmektedir. 10 µm'den büyük partiküller burada takılmaktadırlar [60]. Akciğer kılcallarında takılmadan geçen kolloidal taşıyıcılar tekrar kalbe dönüp buradan tüm vücuda pompalanırlar [59].

Büyük kan dolaşımına dahi katılmadan önce akciğerdeki kılcallarda ilk bariyerle karşılaşan blok kopolimer misellerin hedef dokuya ulaşmaları önündeki engelleri şu şekilde sıralayabiliriz [10], [61], [62]:

- Hücre dışı engeller
 - Kararlı misellerin oluşturulması
 - Enjeksiyondan sonra kandaki stabilite ve uzun süre sirkülasyon
 - Hedef hücreye ulaşma
 - Hücre membranından geçme
- Hücre içi engeller
 - Endositik vesiküller
 - Hücre çekirdeğine taşınma ve çekirdek membranından geçme

2.1.1 Hücre Dışı Engeller

2.1.1.1 Kararlı Misellerin Oluşturulması

Blok kopolimerlerin kararlı misel oluşturmalarını misellerin taşıdıkları kargo molekülüne göre hidrofobik ilaçları taşıyanlar ve yüklü gen materyalini taşıyanlar olarak iki başlık altında inceleyebiliriz.

Polimerik miseller, polimer birimlerin fiziksel etkileşimlerle bir araya gelmesiyle oluşmaktadırlar. Bu sebeple hidrofobik ilaç taşıyan blok kopolimer miselin çözelti içinde kararlılığı birçok faktörden etkilenmektedir. Bunlar; konsantrasyon, misel çekirdeğini oluşturan bloğun uzunluğu ve yapıya katılan ilaç miktarı olarak sıralanabilir [62]. Hidrofobik blok içeren blok kopolimerler belirli bir konsantrasyona kadar çözelti içinde

tek başlarına bulunurlar. Bu konsantrasyon değerinin üstüne çıktığında ise bir araya gelerek misel oluştururlar. Blok kopolimerlerin misel oluşturduğu bu konsantrasyona kritik misel konsantrasyonu (cmc) denir. cmc değeri, polimerin hidrofobiklik/hidrofiliklik oranına, molekül ağırlığına ve iyonik şiddete bağlı olarak değişebilmektedir. Blok kopolimer misellerin cmc değerleri küçük molekül ağırlıklı yüzey aktif maddelerin misellerine kıyasla çok daha düşüktür [27]. Bu sebeple daha düşük konsantrasyonlarda bile daha kararlı yapılar oluştururlar. Blok kopolimer misellerin çekirdeği donmuş ("frozen") halde ise cmc değerin altında bile misel yapısı bozulmaz ve kan akışı içinde daha düşük konsantrasyonlarda ve daha uzun süre kararlı halde bulunabilirler [63].

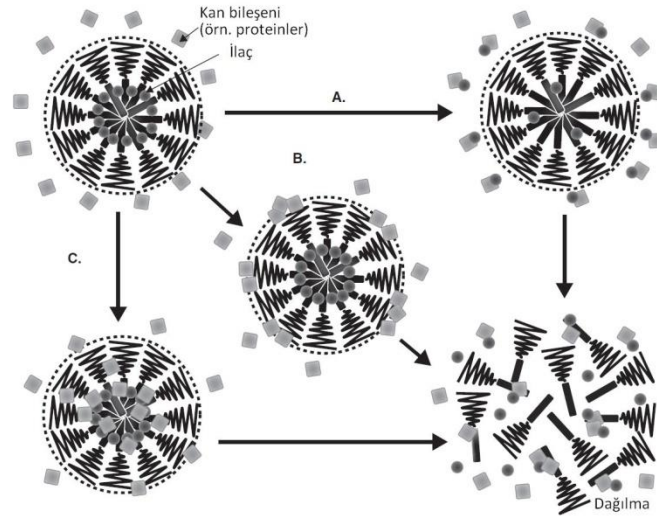
DNA veya RNA gibi negatif yüklü genetik materyalin taşınmasında pozitif yüklü blok içeren blok kopolimerler kullanılmaktadır. Pozitif yüklü kopolimer ile DNA elektrostatik olarak etkileşerek bir araya gelirler ve polielektrolit kompleks (PEC) misel oluştururlar. Bu misellerin çekirdeği elektrostatik etkileşimle olduğundan hidrofobik ilaç taşıyan misellere göre kararlılığı daha farklı etkenlerden etkilenmektedir. Bunlar; kopolimer üzerinde yük sayısı ve yoğunluğu, kargo molekülünün yük sayısı ve yoğunluğu, DNA ve polikasyon bloğun stokiyometrik oranları ve iyonik şiddet olarak belirtilebilir. Hidrofobik blok içeren kopolimerlerden farklı olarak PEC miseller, polimer ve DNA oranına göre negatif veya pozitif yüklü ya da nötral olabilirler. Hücre hedeflemesi için ise yapının pozitif yüklü olması istenmektedir. Ama çok fazla pozitif yüklü misel ise hücrelerin membranını parçalayabilmektedir. [10]

Hem hidrofobik ilaç taşıyan hem de gen taşıyan misellerde kararlılığı arttırmak için hidrofilik blok olarak poli(etilen glikol) (PEG) gibi bir polimer kullanılmaktadır. Hidrofilik blok, hidrofobik ilaç taşıyan misel çekirdeğinin çözünmesini sağlamaktadır. Gen taşıyan pozitif yüklü çekirdeğin ise kan akışında proteinlerle etkileşimini engellemektedir. Eğer stokiyometrik kompleks oluşmuşsa suda çözünmesini sağlamaktadır. Ayrıca hidrofilik blok, misellerin birbirleriyle etkileşerek agregate olmalarını da önleyerek yapının bozulmasını engellediğinden kararlılığı arttırmaktadır. [10]

2.1.1.2 Enjeksiyondan Sonra Kanda Stabilite ve Uzun Süre Sirkülasyon

İntravenöz enjeksiyondan sonra polimerik miseller çok daha seyreltik hale gelirler ve hemen plazma proteinleri ve kan hücreleri gibi kan bileşenleriyle etkileşmeye başlarlar. Eğer bu etkileşim sonucunda agregatlar oluşursa, yukarıda bahsedilen akciğer kılcalları gibi dar geçişlerden polimerik miseller geçemeyeceklerdir. Plazma proteinlerinin polimerik misellerle etkileşimi, misellerin fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır ve misellerin kandaki sirkülasyon süresi ile dokularda birikmesini önemli derecede etkilerler [61], [62]. Bu sebeple polimerik misellerin kan bileşenleriyle minimum düzeyde etkileşmesi gerekmektedir.

Şekil 2.1’de serum proteinleri sebebiyle miselin olası dağılma mekanizmaları özetlenmiştir. Her ne kadar ilaç ekstraksiyonunun misel kararlılığına etkisi tam çalışılmamış olsa da hidrofobik ilaç içeren misellerin kararlılığının daha fazla olduğu bilinmektedir [62].



Şekil 2. 1 Serum proteinlerinin bulunduğu ortamda misellerin dağılması için 3 olası mekanizma. A. İlaç ekstraksiyonu. B. Protein adsorpsiyonu. C. Proteinlerin miselin içine nüfuz etmesi. [62]

İlaç veya gen taşıyan blok kopolimer misellerin kanda kararlı halde kalması ve kan sirkülasyonunda uzun süre durabilmesi için en çok kullanılan yöntem kopolimerin hidrofilik bloğunda PEG gibi bir polimer kullanılmasıdır. PEG suda çözünen, yüksüz ve biyouyumlu bir polimerdir. Blok kopolimerin yapısındaki PEG, esnek yapısından dolayı moleküler fırça gibi davranarak misel ve kan bileşenleri arasındaki spesifik olmayan

etkileşimleri engelleyip sirkülasyon süresini uzatmaktadır. Ayrıca miseller arasındaki agregasyonu da azaltan PEG zincirleri miselin suda çözünmesini de sağlamaktadır [10]. Ancak yapılan çalışmalarda PEG polimerinin de, biyouyumlu olmasına rağmen, kan proteinleriyle etkileşebildiği gösterilmiştir [62]. Günümüzde PEG dışında PHPMA ve dekstran gibi polimerler de hidrofilik blok olarak blok kopolimer misellerde kullanılabilmektedir [25].

İlaç/gen taşıyıcı polimerik miselin boyut, şekil, yüzey özellikleri gibi fizikokimyasal özellikleri kan sirkülasyonunda kalma süresini önemli derecede etkilemektedir. Örneğin, 150-200 nm'den büyük partiküller dalakta tutulurken [64], böbrekler 6 nm'den küçük partikülleri kan dolaşımından dışarı atmaktadır [65]. Polimerik miselin şeklinin kan sirkülasyonu üzerindeki etkisi yapılan bir çalışmada incelendiğinde çubuk şekilli misellerin küresel misellerden daha uzun süre kan dolaşımında kaldığı gösterilmiştir [66]. Yüzey yükü, ilaç/gen taşıyıcı polimerik misellerin en önemli yüzey özelliklerinden biridir. Çünkü yüklü bir miselin kan bileşenleriyle etkileşimi daha fazla olmaktadır ve bu yüzden de dolaşımda kalma süresi kısalmaktadır. Polimerik miselin pozitif yüklü olmasının diğer bir dezavantajı da negatif yüklü böbrek filtrelerine yapışmasıdır [65]. Polimerik miseller akciğer, dalak ve böbrek engellerinden geçse bile protein adsorpsiyonu immün yanıt oluşmasına sebep olur ve makrofajlar fagositozla yabancı partikülü uzaklaştırırlar. Özellikle retikuloendotelial sistemler (RES) istenmeyen partiküllerin çoğunu uzaklaştırırlar. RES monositlerden ve makrofajlardan oluşmaktadır. Hidrofobik veya pozitif yüklü misel çekirdeğini protein adsorpsiyonundan korumak RES tarafından tanınmayı engellemektedir [65]. Genelde yapıya PEG polimeri eklenerek miselin yüzey yükü maskelenmekte, RES tarafından tanınması engellenmekte ve kan dolaşımında daha uzun süre kalması sağlanmaktadır [67].

2.1.1.3 Hedef Hücreye Ulaşma

İlaç/gen taşıyıcıların hedef hücrelere taşınması başarılı bir ilaç/gen hedeflemenin sadece bir parçasıdır. Bazı ilaç taşıyıcıları sadece kan dolaşımında kalma ve damar dışına çıkmayı hedeflerken bazı ilaç taşıyıcılarının ise hücre içine girip sitoplazmada ilacı bırakması gerekmektedir. Bu sebeple ilaç/gen taşımada hedefleme şu şekilde sınıflandırılmaktadır [68]:

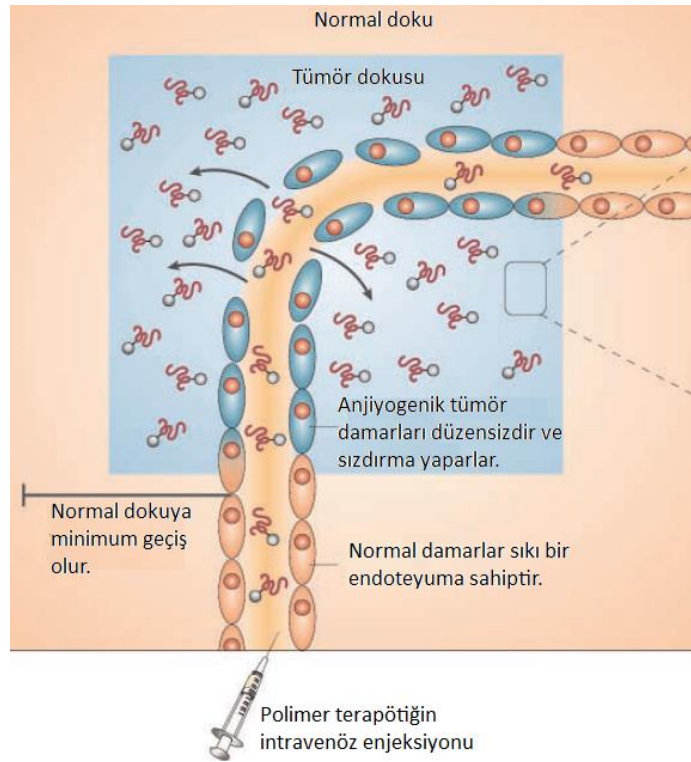
- Kan dolaşımı ve damar dışına çıkmaya dayalı sistemik hedefleme
 - Ligand-reseptör etkileşimine dayalı
 - Lokal olarak aktive edilen taşıma
 - Hedef hücrede kendiliğinden tetiklenerek ilaç salma
 - Dış etkenle uyarılarak aktive edilerek ilaç salma
- Hücre içi hedefleme
 - Düşük pH teknolojileriyle bilinen yolakla lizozoma ilaç taşıma
 - Lizozomal taşıma dışında farklı mekanizmalar

Hücre içi ya da hücre dışı hedefleme yapılacak olsa da kolloidal ilaç/gen taşıyıcı sistemlerle ilaç taşındığında “pasif” ve “aktif” hedefleme adı verilen yöntemlerle taşıyıcı sistem ilgili doku veya hücreye ulaşabilmektedir.

Pasif hedefleme: Polimerik misel taşıyıcıların hedef hücreye ulaşabilmeleri önündeki en büyük engellerden birisi de damar dışındaki dokulara geçebilmeleridir. Bunun için damar yüzeyini oluşturan epitel hücrelerin arasından geçmesi gerekmektedir. Vücut içerisinde epitel hücreler arasında en dar boşluk (1-2 nm) olan doku beyin, en geniş boşluk (5-10 nm) olan doku ise post-kapiler venüllerdir [69]. En çok geçirgenliğe sahip damar yatakları ise 100 nm’lik hücreler arası boşluğa sahip olan karaciğer ve dalaktaki sinüslerdir [69]. Çoğu kolloidal taşıyıcının boyutunun 50 nm ve üzeri olduğu düşünülürse bu taşıyıcıların en çok karaciğer ve dalaklarda birikeceği aşıkardır [61].

Tümör dokuları ise sağlıklı dokulardan farklı davranmaktadır. Tümör dokularındaki mikrodolaşımı gerçekleştiren damarların düzensiz ve sızdıran bir yapıda olduğu bilinmektedir. Maeda ve Matsumura tarafından önerilen Arttırılmış Geçirgenlik ve Alıkonma Etkisi (Enhanced Permeability and Retention Effect) (EPR)teorisine [70] göre tümörlü dokulardaki yetersiz lenfatik drenaj yetersiz sıvı akışına ve dokunun oksijensiz kalmasına sebep olmaktadır. Bu da tümör dokusunda bulunan damarların geçirgenliğinin artmasına sebep olarak daha fazla oksijen ve besinin tümör dokusuna ulaşmasını sağlamaktadır. Kan içinde bulunan kolloidal ilaç/gen taşıyıcılar da bu sayede tümörlü dokudaki kapillerlerin epitel hücreleri arasındaki genişlemiş boşluklardan

geçerek tümörlü dokunun hücreler arası bağ dokusuna ulaşır ve tümör kitlesi içinde kalırlar. Uzun süre kan dolaşımında kalan polimerik misel veya kolloidal ilaç/gen taşıyıcıların bu şekilde tümör hücre veya dokularına ulaşması “pasif hedefleme” olarak adlandırılmaktadır [61] (Şekil 2.2). Pasif hedefleme ile tümör dokularındaki antitümör ilaç konsantrasyonu 70 katına kadar artabilmektedir. Küçük moleküller de bu şekilde tümör dokularına ulaşsalar da koloidal ilaç/gen taşıyıcılardan çok daha kısa süre burada tutunurlar[68].



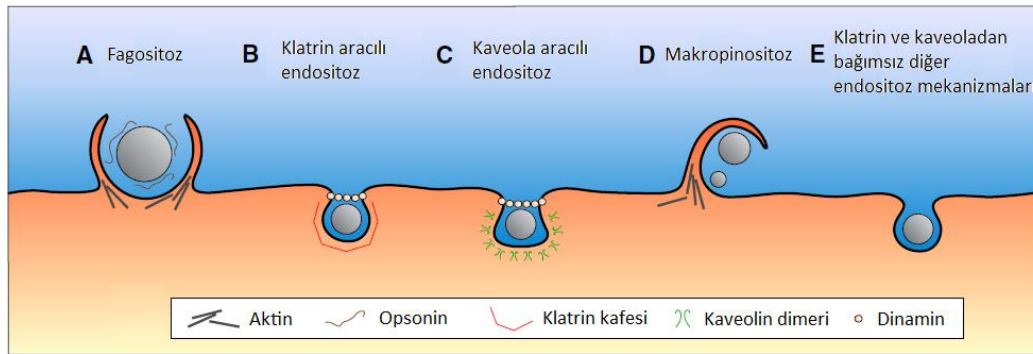
Şekil 2. 2 Uzun süre kan dolaşımında kalan polimer terapötiklerin EPR etkisiyle tümör dokusuna ulaşması [1].

Aktif hedefleme: Pasif hedeflemedeki en önemli dezavantaj, etkin bir şekilde sağlıklı ve hasta hücre ayrımının yapılamamasıdır. Bu sebeple polimerik misel ilaç/gen taşıyıcılarını sadece hedef hücrelere ulaştırmanın bir yolu olarak “aktif hedefleme” yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemde, pasif hedeflemeye ek olarak tümör hücrelerinin tanıyabileceği spesifik ligandlar kolloidal ilaç/gen taşıyıcının yüzeyine bağlanır [31]. Bu sayede, kolloidal taşıyıcı sadece spesifik ligandla etkileşen reseptöre sahip olan tümör hücrelerine yönelmektedir. Tümör hücreleri sağlıklı hücrelere göre çok daha hızlı çoğaldıkları için vitaminler, şeker ve folik asit gibi belirli besinleri daha fazla alabilmek için yüzeylerinde daha fazla miktarda reseptör oluştururlar [68]. Örneğin, yüzeyine folik

asit bağlanmış bir kolloidal ilaç/gen taşıyıcı fazla miktarda folik asit reseptörü olan hücrelere yönelecektir. Aktif hedeflemede, tümör hücresi yüzeyindeki reseptörlerin sağlıklı olanlardan fazla olması, ligand-reseptör etkileşiminden sonra ilaç/gen taşıyıcının içeri alınması veya atılması gibi faktörler rol oynamaktadır. Ayrıca, şu da unutulmamalıdır ki *in vitro* şartlarda alınmış sonuçlar *in vivo* şartlarla tutarlı olmayabilir. Çünkü her bir kanser hücresi için sahip olduğu reseptör miktarı farklı olabilmektedir. Ayrıca tümör dokusu içinde, farklı yapılarda tümör hücreleri de bulunabilmektedir [68].

2.1.1.4 Hücre Membranından Geçme

İlaç/gen taşıyıcı polimerik misel hedef hücreye ulaştıktan sonra hücre içine girmesi Şekil 2.3'te gösterilen mekanizmalarla gerçekleşebilmektedir. Tüm bu endositoz mekanizmalarında kolloidal bir taşıyıcının hücre içine girebilmesi için sahip olması gereken belirli fizikokimyasal özellikler bulunmaktadır. Bunlar partikülün boyutu, şekli ve yüzey özellikleridir [67], [71], [72]. Partikülün fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak hangi mekanizmayla hücre içine alınacağı değişmektedir.



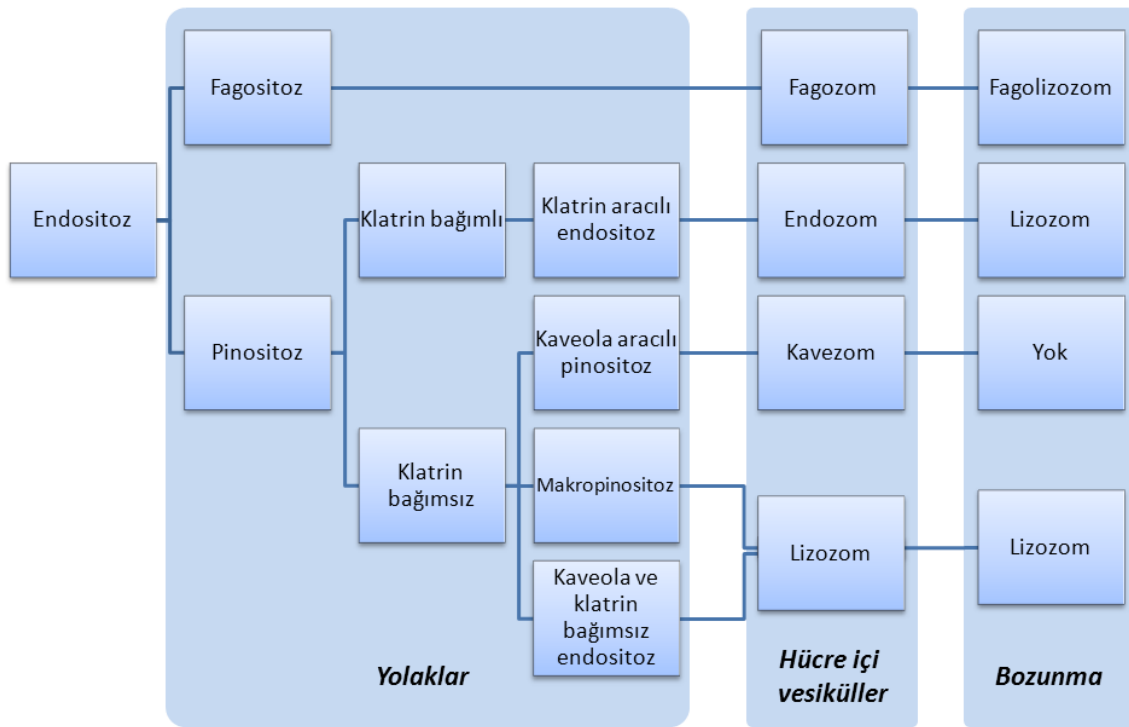
Şekil 2. 3 Memeli hücrelerinde hücre içine alma mekanizmaları [72].

Şekil 2.4'te gösterilen endositoz mekanizmaları fagositoz ve pinositoz olmak üzere temel olarak ikiye ayrılmaktadır (Şekil 2.4). Literatürde, fagositoz bakteri gibi büyük partiküllerin hücre içine alınması, "yeme"; pinositoz ise hücre etrafındaki sıvının hücre içine alınması, "içme", olarak tanımlanmaktadır [67], [72].

Fagositoz, sadece makrofajlar, monositler, nötrofiller gibi belirli hücreler tarafından yapılmasından dolayı diğer mekanizmalardan ayrılmaktadır [71], [72]. Diğer hücreler

fagositozu çok daha az yaparlar. Fagositoz mekanizması 3 basamakta gerçekleşmektedir [72]:

- Partiküllerin opsonin molekülleriyle (immunoglobulinler, laminin ve fibronektin gibi serum proteinleri) tanınması
- Opsonin bağlanmış partiküllerin hücre membranına tutunması
- Partikülün hücre içine alınması.



Şekil 2. 4 Partiküllerin ve çözünen maddelerin hücre içine alınması işlemi (endositoz) mekanizmaları, hücre içi vesikül oluşumları ve bozunmaları [72] [73].

Klatrin aracılı endositoz, pinositoz mekanizmalarından birisidir ve reseptör aracılı endositoz olarak tanımlanabilir. Bu mekanizmada reseptör veya hücre adezyon molekülleri aracılığıyla gerçekleştiği bilinse de günümüzde spesifik olmayan klatrin aracılı endositozun da olabildiği bilinmektedir[74]. Memeli hücrelerinin temel endositoz mekanizmalarından biridir. Klatrin aracılı endositozla, membran bileşenleri, makromoleküller, demir taşıyan transferrin gibi hücrenin temel ihtiyaçları hücre içine alınmaktadır [71]. Bu şekilde hücre içine alınan kesecikler lizozoma dönüşmektedirler. Reseptörden bağımsız klatrin aracılı endositozda ise spesifik olmayan yükler ve

hidrofobik etkileşimlerle hücre membranına bağlanma gerçekleşir [74] ve yine klattrin kafesinden oluşan kesecikler halinde hücre içine alınma gerçekleşir.

Kaveola aracılı endositoz da diğer önemli pinositoz mekanizmalarından biridir. Kaveola şişe şekilli, 50-100 nm boyutunda bir membran girintisidir ve kaveolin proteinleriyle kaplıdır [72], [74]. Kaveola, nöronlar ve lökositlerde bulunmazken kas, endotel, fibroblast ve adiposit hücrelerinde bolca bulunurlar [75]. Bu mekanizmada partikül hücre membranına bağlandıktan sonra kaveola oyuklarına doğru hareket eder. Kaveolaya partikülün gelmesiyle beraber kaveolin çeşitli reseptörleri aktive ederek partikülün reseptör-ligand etkileşimiyle tutunması sağlanır ve kaveola girintisi kesecik haline gelerek membrandan ayrılır [71], [72], [74]. Kaveola aracılı endositozda oluşan sitozolik kesecikte lizozomda olduğu gibi enzimatik aktivite yoktur ve bu kesecikle hücre içine giren partiküller degradasyona uğramazlar. Çoğu patojen bu yolla hücre içine girerek parçalanmaktan korunmaktadır [76].

Diğer bir pinositoz mekanizması olan makropinositoz ise sıvı faz endositoz mekanizmalarından birisidir. Klattrinden bağımsız bu mekanizma makrofajlar da dahil olmak üzere birçok hücrede gerçekleşmektedir. Makropinositoz diğer endositoz mekanizmalarından farklı olarak kargo veya reseptör moleküllerinin uyarılmasıyla çalışmaz. Büyüme faktörlerinin tirozin kinaz reseptörlerini aktive etmesiyle başlayan makropinositoz mekanizması fagositoza benzer fakat içeri alınacak partikülün etrafının ligandla kaplı olmasına gerek yoktur [77]. Partikülün veya sıvının makropinositozla içeri alınması sonucu makropinozom adı verilen, boyutu 0,5-10 µm arasında değişen kesecikler oluşur [71], [78]. Bu kesecikler daha sonra asitlendirilir ve büzülürler [72].

Klattrin ve kaveoladan bağımsız çeşitli endositoz mekanizmaları bulunmaktadır ve yakın zamanda bunlar aydınlatılmaya başlanmıştır. Bu mekanizmaların çoğu spesifik lipid bileşimlerine ihtiyaç duyarlar, kolesterole bağımlıdır ve bunlar da makropinositoz gibi sıvı faz endositoz mekanizmalarıdır [75].

Polimerik ilaç/gen taşıyıcılar hücre içine yukarıda belirtilen mekanizmalarla girmektedirler. Ama hangi mekanizmayla hücre içine girecekleri partikülün boyutu, yüzey özellikleri ve şekli ile hücre tipine göre değişmektedir.

Boyut

Genelde 0,5 μm 'den büyük partiküller fagositozla hücre içine alınır denilse de bu sadece fagositozla ne kadar büyük partiküllerin hücre içine alınabileceğini gösteren bir tanımdır [72]. Yapılan çalışmalarda 20 μm boyutundaki bir polistiren partikülün makrofajlar tarafından fagositozla hücre içine alındığı gösterilmiştir [79]. 250 nm'den ufak partiküllerin fagositozla içeri alınma oranları çok daha düşüktür [72]. Partikülün boyutu arttıkça, opsoninlerin üzerine tutunma oranı artmakta ve makrofajlar tarafından tanınmaktadır.

Pinositozla hücre içine girebilmesi için ilaç taşıyıcıların boyutlarının 10-100 nm olması gerektiği birçok çalışmada gösterilmiştir [71]. Ancak 3 μm 'a kadar boyutu olan ilaç taşıyıcıların çeşitli endositoz mekanizmalarıyla hücre içine alınabildiği de gösterilmiştir [80]. Bu sebeple, ilaç/gen taşıyıcının boyutu hücre giriş mekanizması üzerinde etkili olmasına rağmen, en önemli kriter değildir.

Yüzey özellikleri

İlaç/gen taşıyıcının yükü, pozitif, negatif yada nötral olması, hücre içine girişe etki eden en önemli faktördür. Hücre plazma membranının negatif yüklü olmasından ötürü pozitif yüklü partiküllerin daha yüksek oranda hücre içine alındığı bilinmektedir [71], [72]. Çoğu çalışmada pozitif yüklü ilaç/gen taşıyıcıların da genellikle kltrin aracılı endositozla veya çok daha az miktarda olmakla beraber makropinositozla hücre içine alındığını gösterilmiştir [71]. Ancak PEI polikasyonunun DNA ile komplekslerinin hücreye girişinin kaveola aracılı endositoz da dahil olmak üzere farklı mekanizmalarla olabildiği bildirilmektedir [81]. Bu taşıyıcı yüksek miktarda pozitif yüklüdür. Bu sebeple serum proteinleriyle etkileşerek hücre trafiğini değiştirip farklı mekanizmalarla hücre içine girebilir.

Negatif yüklü taşıyıcılar ise genelde kaveola aracılı endositozla hücre içine girmektedir [71]. Hücre plazma membranı da negatif yüklü olduğundan, negatif yüklü partiküller pozitif yüklülere göre daha yavaş hücreye alınırlar.

Nötral partiküllerin hücre içine alınması ile ilgili olarak herhangi bir genelleme yapılmamaktadır. Ancak yeni yapılan bir çalışmada, PEG'le kaplı nötral poliester nanopartiküllerin lipid-raft aracılı ve kaveoladan bağımsız endositozla hücre içine

girdiği gösterilmiştir [82]. Yüksüz ve hidrofobik partiküllerin makrofajlar tarafından fagositozla hücre içine alınma ihtimali daha yüksektir.

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada yüzeyinde şeritler halinde hidrofobik ve anyonik grupların olduğu bir nanopartikül hiçbir endositoz mekanizmasına dahil olmadan doğrudan hücre içine girmiştir [83]. Aynı partikülün yüzeyindeki anyonik ve hidrofobik gruplar rasgele yerleştirildiğinde ise endositozla hücre içine alınmıştır.

ilaç/gen taşıyıcı partikülün yüzeyinin hedefleyici ligandlarla kaplanması durumunda ilaç/gen taşıyıcının da ligandla aynı yolla hücre içine alınacağı düşünülmektedir [72]. Ancak polimerik ilaç/gen taşıyıcının kendisi de membranla etkileşime girmektedir ve bu sebeple ligandın hücre içine girdiği mekanizmayla içeri girmeyebilmektedirler. En çok kullanılan ligandlar; folik asit, aptamerler, karbohidratlar, transferrin, epidermal büyüme faktörü (EGF), çoklu doymamış yağ asitleri, antikorlar ve peptidlerdir [84], [85], [86].

Şekil

Şeklin en belirgin etkisi fagositozda görülmektedir. Birçok farklı şekle sahip lateks partikülleriyle yapılan deneylerde makrofajların hepsini fagositozla hücre içine aldığı görülmüştür [87]. Ama partikülün şekline göre hücre içine alma hızı belirgin şekilde değişmektedir. Örneğin eliptik bir partikülün sivri ucundan fagositoz başlarsa proses birkaç dakika gibi çok kısa bir sürede gerçekleşmekte ama yassı kısmında fagositoz başlarsa birkaç saatte hücre içine alabilmektedir.

Pinositoz mekanizmalarında ise partikül şeklinin etkisi çok az araştırmada incelenebilmiştir.

Birçok çalışmada, genel olarak, küresel şekilli nanotaşıyıcıların çubuk şekilli olanlara göre hücre içine daha kolay alındığı ve çubuk şekilli yapıların kan dolaşımında daha uzun süre kaldığı gösterilmiştir [85], [88], [89] .

Hücre tipi

Hücre tipi değiştikçe hücre içi yollar değişebilmekte ve hatta bazı yollar belirli hücrelerde olmayabilmektedir. Yapılan bir çalışmada, çapraz bağlı polimerik miselin kanser hücrelerine kaveola aracılı endositozla girdiği ancak sağlıklı hücreye giremediği

gösterilmiştir [90]. Ayrıca aynı çalışmada polimer misel kaveola aracılı olarak hücre içine girmesine rağmen oluşan vesikül lizozoma dönüşmüştür. Bu sebeple ilaç/gen taşıyıcı sistemlerin fizyolojik ortamdaki etkisinin daha iyi anlaşılabilmesi için hücre biyolojisinin çok iyi bilinmesi gerekmektedir.

2.1.2 Hücre İçi Engeller

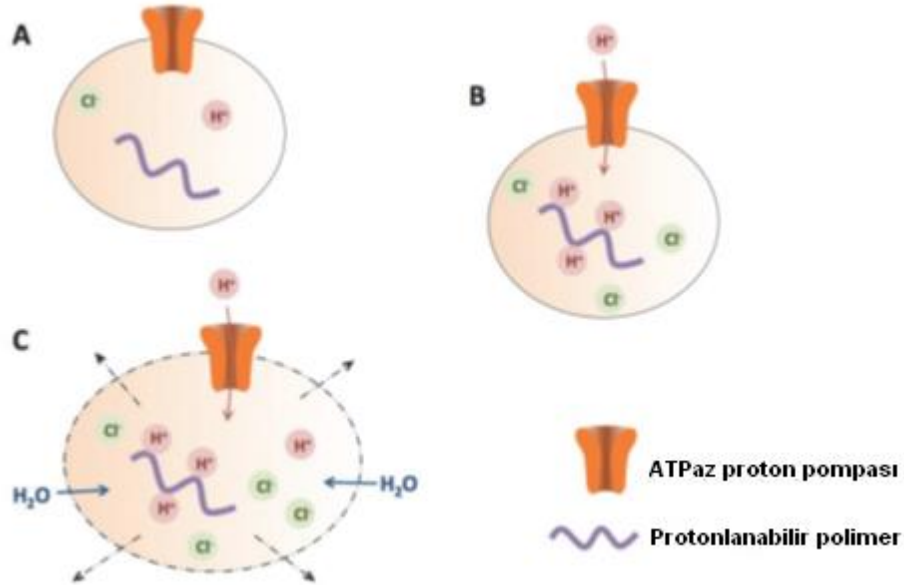
2.1.2.1 Endositik Vesiküller

Endositozla hücre içine alınan kargolar vesiküller içerisinde ve kaveola aracılı endositoz hariç diğer tüm mekanizmalarda oluşan bu vesiküller daha sonra lizozoma ve makrofajlarda da fagolizozoma dönüşmektedirler (Şekil 2.4). Lizozomlar yaklaşık 40 çeşit enzim içermektedirler ve hepsi asit hidrolazdır. Çalışabilmeleri için asidik ortama ihtiyaç duyarlar. Lizozomu sitozolden ayıran çift katmanlı bir membran bulunmaktadır ve bu membranda bulunan ATPaz enzimiyle lizozomun içine H^+ pompalanarak lizozom içindeki pH 4,5-5 aralığında tutulmaktadır. [91]

Polimerik ilaç/gen taşıyıcının taşıdığı kargo molekülünü sitozole veya çekirdeğe ulaştırabilmesi için bozunmadan lizozomdan kaçması/çıkması gerekmektedir. Bu sebeple çeşitli yöntemler geliştirilmiştir.

Taşıyıcının lizozomdan kaçması için en çok kullanılan yöntemlerden birisi, özellikle gen taşıyıcı sistemlerde, PEI gibi bir polikasyon kullanmaktır. PEI yüksek katyonik yük yoğunluğuna sahip etkili bir gen taşıyıcı polimerdir. Yapısında bulunan amin grupları tamponlama etkisi göstermesinden dolayı endozomolitik aktivite göstermektedir ve bu sebeple de yüksek transfeksiyon verimine sahiptirler. Boussif ve arkadaşları PEI gibi polikasyonların yüksek transfeksiyon verimlerini “proton süngeri” adını verdikleri teori ile açıklamışlardır (Şekil 2.5) [92]. Fizyolojik pH’ta PEI’nin yapısındaki her altı amin grubundan biri protonlanmıştır ve pozitif yüklüdür. Lizozomların içindeki gibi asidik ortamda diğer amin grupları da protonlanmakta ve her üç amin grubundan biri protonlanmaktadır. pH’ın düşmesiyle beraber PEI bir “sünger” gibi davranarak daha çok miktarda protonu yapısına bağlar. PEI’nin protonlanmasıyla beraber lizozom içinde yük gradienti oluşur ve bu gradienti denkleştirmek içinden lizozom dışından karşıt yüklü iyonlar lizozom içine girerler. Lizozom içinde iyon konsantrasyonu arttığı için

osmolarite artmaktadır. Bu sebeple de lizozom içine su molekülleri nüfuz ederek lizozomun şişmesine ve patlamasına sebep olmaktadır. Bu sayede ilaç/gen taşıyıcı partiküller sitozole girebilmektedirler.



Şekil 2. 5 Proton sünger teorisinin şematik gösterimi [93]

Endozomal engelleri aşmanın diğer bir yolu ise klorokin gibi endozomotropik bir molekülün taşıyıcıya bağlanmasıdır [61], [93]. Bu molekül zayıf bir bazdır ve plazma membranından geçerek asidik keseciklerde birikmektedir. Asidik vesikülde biriken klorokin pH'ın yükselmesine sebep olarak lizozomal enzimlerin çalışmasını engellemektedir. Ayrıca vesikülün içindeki ozmotik basıncın artarak şişmesine ve yırtılmasına sebep olmaktadır. İlaç/gen taşıyıcı molekül bu sayede sitozole salınmaktadır. Ancak klorokin birçok hücre tipi için toksik bir moleküldür [93].

Hücreye nüfuz eden peptidlerin (cell penetrating peptides, CPP) ilaç/gen taşıyıcı sisteme dahil edilmesi endozomal kaçışta kullanılan önemli yöntemlerden biridir. Bu peptidler katyonik yada amfifilik yapıda 10-30 amino asitlik peptid zincirleridir. Birçok hidrofilik biyomakromolekülün hücre membranını parçalamadan hücre içine taşınmasını sağlamaktadırlar [61], [93]. Bu peptidler farklı mekanizmalarla çalışarak taşıyıcı molekülün veya doğrudan kargo molekülünün sitozole salınmasını sağlamaktadırlar.

“Flip-flop” mekanizması ise genelde lipid veya lipozom taşıyıcılar kullanıldığında gerçekleşmektedir [94]. Bu mekanizmada katyonik lipopleksler (DNA-katyonik lipid

kompleksleri) ile lizozom membranındaki negatif yüklü lipidler arasında elektrostatik çekme kuvveti bulunmaktadır. Anyonik lipidler lipoplekslerle birleşerek nötralize edilmiş iyon çiftleri oluştururlar. Sonuç olarak genetik materyal lipopleksten ayrılıp sitozole salınmaktadır.

Endozomdan kaçış için diğer yöntemler ise inaktif adenovirüs partiküllerin taşıyıcı yapısına dahil edilmesi ve fotokimyasal yöntemlerdir [93]. Adenovirüs partikülü kullanıldığında, adenovirüsün endozomolitik aktivitesi kullanılarak ilaç/gen sitozole salınmaktadır. Fotokimyasal yöntemde, lizozom membranına bağlanabilen amfifilik yapıda fotosensitiv moleküller ilaç/gen taşıyıcı sisteme dahil edilir. Bu moleküller lizozom membranına bağlandığında ışıkla uyarılmaktadırlar. Işıkla uyarıldıktan sonra fotosensitiv moleküller parçalanarak reaktif oksijen türlerinin oluşmasını sağlarlar. Bu oksijen türleri de lizozom membranını parçalanmasına sebep olurlar.

2.1.2.2 Hücre çekirdeğine taşınma ve çekirdek membranından geçme

Hücreye giren ilaç/gen taşıyıcıların hedefi sitozol, organeller ya da hücre çekirdeğidir. Sitozol hedefli ilaç/gen taşıyıcı endozomdan sitozole salındığında kargo molekülünü serbest bırakmalıdır. Çekirdek veya organel hedeflemeli ilaç/gen taşıyıcılar ise iki farklı mekanizmayla kargoyu hedefe ulaştırabilirler: i) kargo molekülünün sitozolde serbest bırakılması ve kargo molekülün kendisinin çekirdeğe veya organelle girmesi, ii) ilaç/gen taşıyıcının çekirdeğe veya organelle girip kargo molekülünü burada serbest bırakması.

İlaç/gen taşıyıcının, sitozol veya çekirdek hedeflemeli, kargo molekülünü hedef bölgede serbest bırakması gerekmektedir. Difüzyonla, etkiye duyarlı taşıyıcı molekül kullanarak, biyobozunur taşıyıcı molekül kullanarak veya taşıyıcı molekülün hücre bileşenleriyle etkileşime girmesi sonucu kargo molekülü sitozolde serbest bırakılabilir. Blok kopolimer misellerin kararlılığı özellikle bu noktada önem kazanmaktadır. Eğer çok kararlı bir misel oluşmuşsa kargo molekülü sitozolde salmayacaktır, eğer kararlılığı düşük bir miselse de ya hücre içine giremeyecek ya da kargo molekülünün çoğunu hücre dışında salmış olacaktır [10]. Bu sebeple optimum kararlılığa sahip misellerin oluşturulması gerekmektedir. Sitozolde çalışan siRNA'nın taşıyıcı kompleksten burada serbest bırakılmasının önemi yapılan bir çalışmada gösterilmiştir [95]. Bu çalışmada poli(TETA/CBA) ile kompleks yapan siRNA 5 saatte tüm sitoplazmaya yayılırken, aynı

siRNA PEI ile kompleks yapıldığında kompleksin yapısının bozulmadığı görülmüştür. RNA moleküllerinin taşınmasında genellikle kısa zincirli polikasyonlar kullanılmaktadır [10]. Çünkü polikasyon zinciri uzadıkça RNA ile daha kuvvetli etkileşmekte ve RNA'nın sitozole salımı azalmaktadır. Sitozole hedeflemede diğer bir yol olarak ilaç/gen materyalinin taşıyıcıya aside duyarlı bağlarla bağlanması sonucu lizozomun içinde bağlar kırılarak kargonun sitozole salınması sağlanabilmektedir [96].

Hücre çekirdeği ikili katmandan oluşan ve üzerinde biyomoleküllerin kontrollü olarak geçmesine izin veren porların bulunduğu bir membrandır. Porlar, yaklaşık 9 nm çapındadır ve 40-45 kDa'dan daha büyük molekülleri yapılarında spesifik peptid dizileri (nuclear localization signal, NLS) yoksa çekirdek içine girişlerini engellemektedir. Bu sebeple hücre içine giriş için kullanılan yöntemlerden ilki NLS peptidlerini ilaç/gen taşıyıcı sisteme dahil etmektir. Günümüzde, ilaç/gen taşıyıcı sistemlerini çekirdek içine hedefleme temel olarak iki başlık altında toplanmaktadır:

- Dolaylı olarak çekirdeğe ilaç/gen taşıma
- İlacın çekirdekte biriktiği sitozol hedeflemeli ilaç/gen taşıma

Dolaylı olarak çekirdeğe ilaç/gen taşıma

İlaç/gen taşıyıcı sistemden sitozolde salınan serbest ilacın/genin, özellikle küçük molekül ağırlıklı ilaçların, difüzyonla hücre çekirdeğine girmesine dayanan bir yöntemdir [97]. Ancak plazmid DNA gibi büyük moleküller, viskozitesi yüksek sitoplazma içinde difüzyonla hareket edemezler. siRNA gibi kısa zincirli, genellikle 250'den daha az sayıda baz içeren, genetik materyalin ise sitoplazmada difüzyonla hareket edebildiği çalışmalarda gösterilmiştir [98]. Ancak DNA veya RNA gibi moleküller tek başlarına çekirdek membranı porlarından geçemezler. Hücrede mitoz bölünme gerçekleşirken hücre membranı açıldığı sırada çekirdek içine yerleşebilirler [10].

Doğrudan çekirdeğe ilaç/gen taşıma

Dolaylı yolla ilaç/genin hücre çekirdeğine girme oranı çok düşüktür. Bu sebeple ilaç/gen taşıyıcının doğrudan çekirdeğe hedeflemesi yapılmaktadır. Bu amaçla en çok kullanılan iki yöntem NLS peptidlerinin veya katyonik polimerlerin kullanımınıdır.

NLS peptidleri ilaç/gen taşıyıcı sisteme dahil edilerek yüksek başarımla çekirdek içine girmesi sağlanmaktadır. Ancak NLS peptidlerinin en büyük dezavantajı katyonik amino asitlere sahip olduklarından, bu peptidle yüzeyi kaplanmış taşıyıcı kan dolaşımında birçok farklı hücre ve bileşenle etkileşebilmesidir [97]. Yapılan çalışmalarda NLS kaplı taşıyıcının tüm vücuda dağıldığı gözlenmiştir [99]. Bu sebeple günümüzde dışı PEG gibi bir polimerle kaplı ama lizozomdaki asidik pH'ta NLS peptidlerini açığa çıkaran sistemler tasarlanmaktadır [100], [101].

Hücre çekirdeğinde hedeflemede kullanılan PEI ve polilizin gibi katyonik polimerler gen aktarımında sıkça kullanılan taşıyıcı moleküllerdir. Bu polimerlerin genetik materyallerle yaptıkları pozitif yüklü polipleksler hücre içindeki anyonik mikrotübül veya moleküler motor proteinlerine bağlanarak çekirdeğe taşınabilmektedirler [102]. Ancak pozitif yüklü polipleksler de kan dolaşımında başka hücreler ve bileşenlerle etkileşebilmektedir. Bu sebeple bu polimerlerin de yapılarında değişiklikler yapılarak hedef hücreye ulaşması sağlanmaktadır [103]. Ayrıca şu da unutulmamalıdır ki ilaç/gen taşıyıcı polipleksler genelde 50-200 nm aralığında boyutla sahiptirler ve çekirdek porlarından geçemezler. Bu sebeple genellikle mitoz bölünme sırasında çekirdeğin içine yerleşebilirler [10], [97].

2.2 Blok Kopolimer Miseller

Blok kopolimerler, farklı monomerlerden oluşan iki veya daha fazla polimerik bloğun lineer, graft yada dairesel şekilde bir araya gelmesiyle oluşan polimerlerdir. Blok kopolimerlere giderek artan miktarda ilgi gösterilmesinin en önemli nedeni çözelti içinde kendiliğinden bir araya gelerek oluşturdukları yapılardır. Blok kopolimerlerin çözelti içinde kendiliğinden bir araya gelmelerinin sebebi farklı ve hatta zıt özelliklere sahip segmentlere sahip olmalarıdır. Blok kopolimerler, segmentlerinden biri için çözücü ve diğer segment için çöktürücü özelliğe sahip bir sıvı içinde çözüldüklerinde tersinir olarak bir araya gelirler. Oluşan misel, çözünmeyen bloğun oluşturduğu bir “çekirdeğe” ve çözünen blokların oluşturduğu bir “kabuğa” sahiptir. Miseller genelde küresel olmakla beraber çözelti ve/veya polimerin özellikleri değiştirilerek birçok farklı şekle sahip olabilirler.

ilaç/gen taşıyıcı olarak blok kopolimer miseller kullanıldığında birçok farklı parametrenin oluşacak yapıya etki edeceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bu sebeple hedef çalışma için;

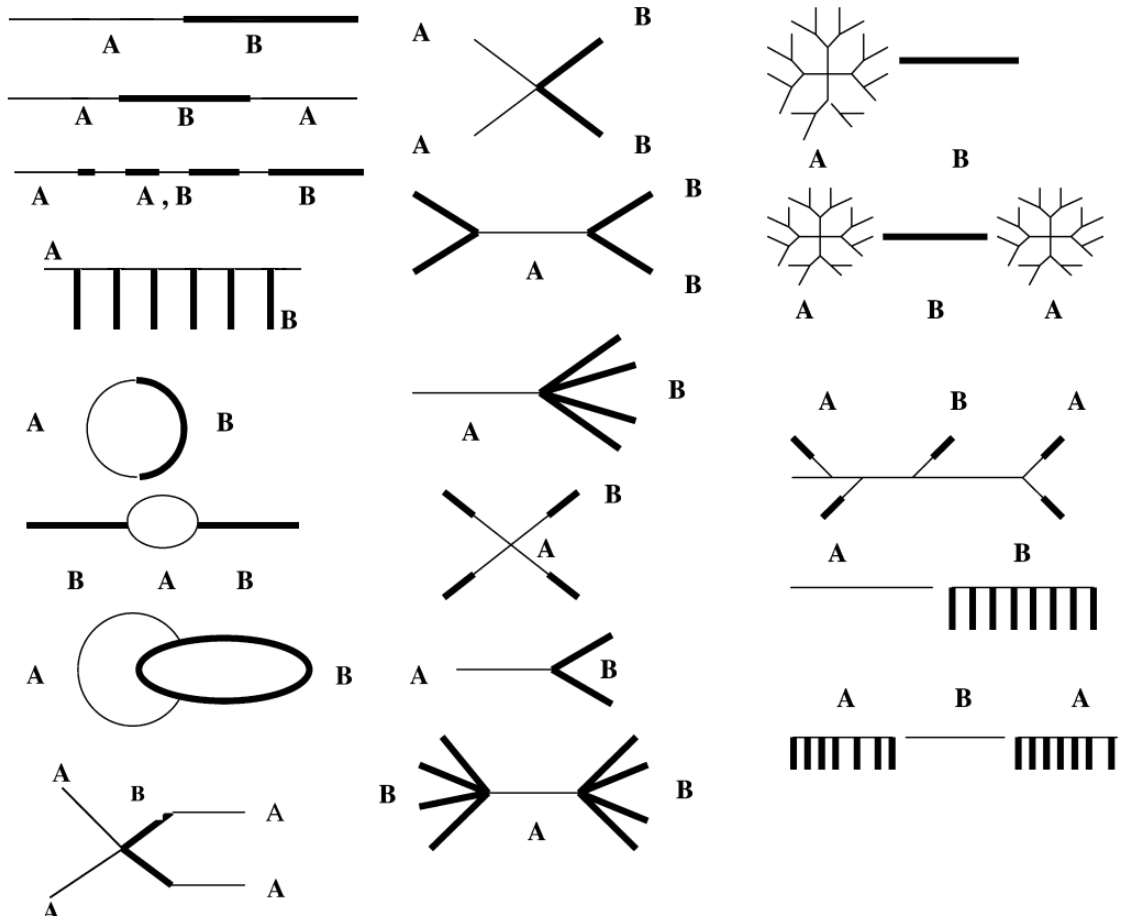
- İlk olarak hangi yapıda bir kopolimerin (lineer, graft, dairesel, vs.) kullanılacağına karar verilmeli
- Kopolimer sentezi için uygun bir yöntem seçilmeli
- Kopolimerin çözelti içindeki davranışları (misel oluşumu ve dağılması, şekil, boyut, yük, vs.) ayrıntılı olarak incelenmelidir.

2.2.1 Blok Kopolimerlerin Sentezi ve Yapıları

Blok kopolimerler temel olarak dört farklı özellikte polimerik blok kullanılarak oluşturulabilmektedir. Bu polimerleri;

- Hidrofobik,
- Noniyonik hidrofilik,
- Katyonik,
- Anyonik,

polimerler olarak sınıflandırabiliriz. Bu polimerik bloklar farklı kombinasyonlarda ve farklı şekillerde birbirlerine eklenerek iki veya daha fazla bloktan oluşan blok kopolimerler sentezlenebilmektedir [63]. Şekil 2.6 farklı yapılarda sentezlenmiş blok kopolimerleri şematik olarak göstermektedir.



Şekil 2. 6 Farklı yapıları sahip blok kopolimerler [63]

Şekilde verilen yapılarıdaki blok kopolimerlerin sentezi için birçok farklı yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemler tek başlarına kullanılabildikleri gibi birkaç sentez yöntemi arka arkaya kullanılarak blok kopolimerler üretilmektedirler.

2.2.1.1 Serbest Radikal Polimerizasyonu

Serbest radikal polimerizasyon blok kopolimerlerin üretiminde kullanılan ilk yöntemdir [104]. Bu ilk çalışmadan beri serbest radikal polimerizasyonu birçok çalışmada kullanılmış ve diblok veya triblok lineer kopolimer üretilmiştir. Bu yöntemde genelde, aktif zincir ucuna sahip makrobaşılatıcılar kullanılarak blok polimerler üretilmektedir. Bu yöntemle, çoğu vinil monomer polimerleştirilebilmektedir. Ayrıca iyonik polimerizasyon yöntemlerinden farklı olarak safsızlıklara toleranslıdır. Ancak bu yöntemin en büyük dezavantajı molekül ağırlığı dağılımı kontrol edilememektedir. Ayrıca karmaşık yapıların üretilmesine olanak vermemektedir.

2.2.1.2 Kontrollü/“Yaşayan” Radikal Polimerizasyonu

İleriki bölümlerde daha ayrıntılı açıklanacak olan bu yöntem tersinir zincir sonlanmasına dayanan Otsu’nun çalışmasından [105] sonra kullanılmaya ve geliştirilmeye başlanmıştır. Bu yöntemde aktif uca sahip polimer izole edilip daha sonra tekrar polimerleştirilebilmektedir. Günümüzde bu yöntem temel olarak üç farklı şekilde uygulanmaktadır:

- Atom transfer radikal polimerizasyon (ATRP)
- Tersinir katımlı-ayrışmalı zincir transfer polimerizasyonu (RAFT)
- Nitroksid ortamlı radikal polimerizasyon (NMP)

Kontrollü/“yaşayan” radikal polimerizasyonu, serbest radikal polimerizasyonu gibi birçok vinil monomerin polimerleştirilmesinde kullanılabilir. Ayrıca safsızlıklara karşı toleranslıdır. Serbest radikal polimerizasyona göre avantajı ise molekül ağırlığı dağılımının kontrol edilebilmesi ve monodisperse yakın özellikte polimerler elde edilebilmesidir. Ayrıca, sentezlenen polimerik bloklar izole edilip daha sonra bunlardan karmaşık yapıda blok kopolimerler üretilebilmektedir [106]. Kontrollü/“yaşayan” radikal polimerizasyonu birçok farklı yapıda ve karmaşık yapılarda blok kopolimer üretimine izin veren bir yöntemdir.

2.2.1.3 Anyonik ve Katyonik Polimerizasyonlar

Anyonik polimerizasyonda monomerlerin sırayla eklenmesi sonucunda diblok kopolimerler, difonksiyonel organometalik başlatıcılar kullanılarak ABA tipi triblok kopolimerler ve “yaşayan” diblok kopolimer difonksiyonel bir ajanla bağlanarak yine ABA tipi triblok kopolimerler elde edilebilmektedir [63]. Ayrıca fonksiyonel grup içeren blok kopolimerler de sentezlenebilmektedir.

Bu yöntemin en büyük dezavantajı sadece belirli sayıda monomerin polimerleştirilebilmesidir [63]. Anyonik polimerizasyondan türetilen grup transfer polimerizasyonunda, anyonik polimerizasyonla üretilemeyen çeşitli polimerler sentezlenebilmektedir.

Katyonik polimerizasyon da kısıtlı sayıda monomerin polimerleştirilmesine imkan vermektedir [63]. Ama yine de birçok farklı blok kopolimerin sentezinde kullanılmıştır [107].

2.2.1.4 Diğer Yöntemler

Yukarıda belirtilen yöntemlere ilave olarak çeşitli yöntemlerle blok kopolimer sentezi gerçekleştirilmektedir. Bunlardan birisi mekanizma değiştirerek blok kopolimer sentezidir. Bu yöntemde polimerin yapısında bulunan monomerlere uygun farklı yöntemler ardı ardına kullanılarak blok kopolimerler üretilmektedir [108]. Diğer bir sentez yöntemi de multifonksiyonel başlatıcı kullanmaktır [109]. Her fonksiyonel grup farklı bir polimerizasyon yöntemiyle çalışmaktadır.

Zincir uçlarında fonksiyonel gruplara sahip polimerlerin birbirine bağlanmasıyla blok kopolimer üretimi de sıkça kullanılan bir yöntemdir. Difonksiyonel çapraz bağlama ajanları kullanılarak veya “yaşayan” polimerlerin doğrudan bağlanmasıyla veya zincir uçlarına uygun fonksiyonel gruplar bağlanarak polimer bloklar birbirlerine bağlanabilmektedir [110], [111].

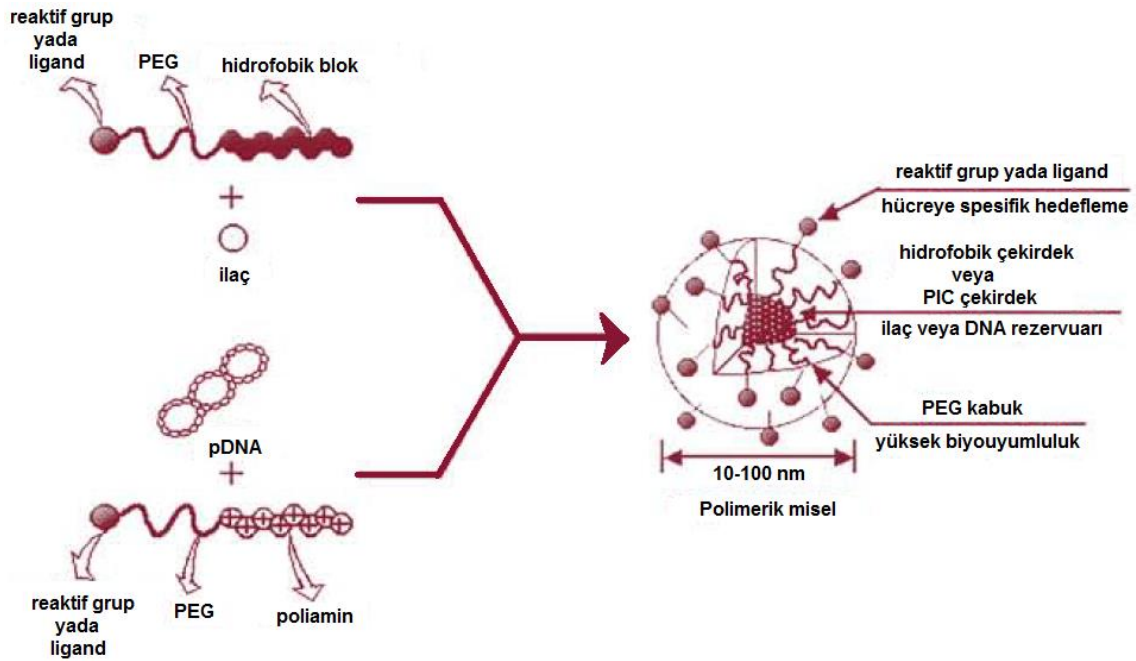
2.2.2 Blok Kopolimerlerden Misel Oluşumu ve Özellikleri

İlaç/gen taşıma sistemi olarak blok kopolimer miseller kullanılacaksa taşınacak kargo molekülüne uygun yapıda blok kopolimer seçilmelidir. Bu sebeple taşıdıkları kargo molekülü ve çekirdeklerini bir arada tutan bağın veya etkileşimin tipine göre ilaç/gen taşıyıcı blok kopolimer miselleri,

- Hidrofobik etkileşimle bir araya gelen miseller
- Elektrostatik etkileşimle bir araya gelen (polielektrolit kompleks) miseller
- Çapraz bağlı miseller
- Metal koordinasyon bağıyla bir araya gelen miseller
- Hidrojen bağıyla bir araya gelen miseller

şeklinde sınıflandırabiliriz. Yukarıda belirtilen her misel tipinin taşıyacağı kargo molekülleri birbirlerinden farklı olmakta ve misel oluşum mekanizmaları da farklılık

göstermektedir. İlaç veya gen taşıyan farklı yapıdaki blok kopolimerlerden misel oluşumu şematik olarak şekil 2.7’de gösterilmektedir.



Şekil 2. 7 İlaç ve gen taşıyıcı blok kopolimer misellerin oluşumu

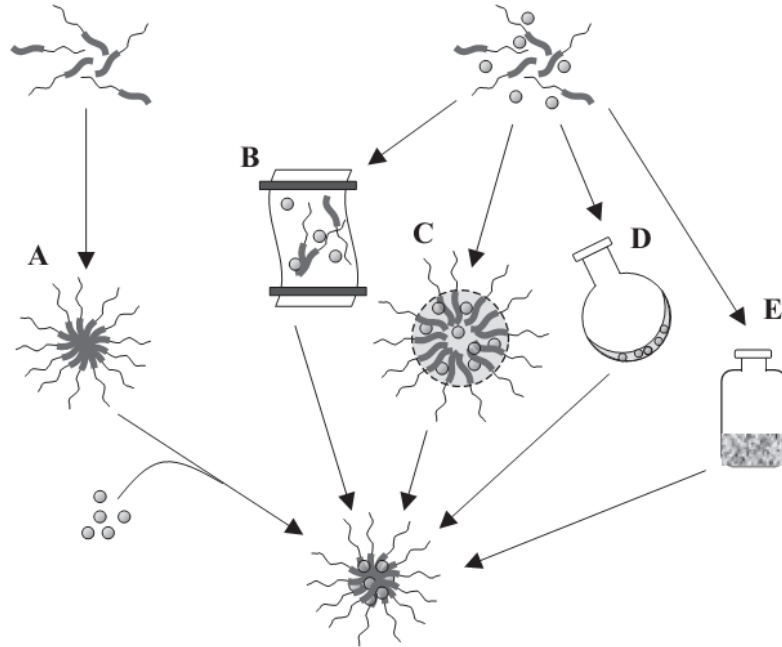
2.2.2.1 Hidrofobik Etkileşimle Bir Araya Gelen Blok Kopolimer Miseller

Hidrofobik etkileşimle bir araya gelen blok kopolimer miseller, blok kopolimer misel denince ilk akla gelen yapılardır. Hidrofobik ve hidrofilik bloklardan oluşan amfifilik blok kopolimerlerin bir araya gelmesiyle oluşan misellerdir ve hidrofobik ilaçların taşınmasında kullanılırlar. Bu polimerlerin hidrofobik blokları su içinde çözünmezler ve hidrofobik etkileşimle bir araya gelerek miselin çekirdeğini oluştururlar. Hidrofilik bloklar da miselin suda çözünmesini sağlayan dış kabuğunu oluştururlar. Misel oluşumu kritik misel konsantrasyonundan (cmc) daha yüksek konsantrasyonlarda gerçekleşir ve oluşan miselle misele katılmayan polimerler (unimerler) arasında bir denge oluşur. Oluşan miseller aşağıda belirtilen kriterlere göre karakterize edilirler [63]:

- Miselle unimerler arasındaki denge
- Kritik misel konsantrasyonu ve kritik misel sıcaklığı
- Miselin morfolojisi
- Miselin molekül ağırlığı

- Miselin agregasyon sayısı veya miselin yapısında bulunan polimer zinciri sayısı
- Miselin boyutu
- Misel çekirdeğinin boyutu
- Miselin kabuk kalınlığı

Misellerin hem çekirdeğine hem de kabuğuna ilaç molekülü yüklenebilmektedir. Ancak kabuğa ilaç yüklemenin bazı sakıncaları bulunmaktadır. Bunlardan birincisi miselin diğer misellerle etkileşerek agregasyona sebep olabilmesidir. Diğer sakıncası ise miselin vücut içinde biyomoleküllerle etkileşerek miselin ilgili dokuya gitmesini engelleyebilmesidir.



Şekil 2. 8 Yaygın olarak kullanılan ilaç yükleme prosedürleri [112].

Hidrofobik etkileşimle bir araya gelen blok kopolimer misellerin yapısına ilaç yüklemek için şekil 2.8'deki yöntemler kullanılmaktadır. Temel olarak iki farklı yöntemle misellere ilaç yüklenmektedir [112]. Birinci yöntemde suda çözünabilir amfifilik blok kopolimerler ilaç molekülleriyle beraber çözülerek ilaç yüklü misel oluşturulur (Şekil 2.8A). İkinci yöntem ise suda tek başına çözünmeyen amfifilik blok kopolimerler için uygulanmaktadır. Bu yöntemde organik bir çözücü yardımıyla ilaç ile kopolimer çözülür ve daha sonra organik çözücü uzaklaştırılarak ilaç yüklü miselin su içinde oluşması sağlanır. Bu amaçla diyaliz yapılarak (Şekil 2.8B), yağ-su emülsiyonu

kullanılarak (Şekil 2.8C), organik çözücünün tamamen uçurulup polimer ve ilacın film haline getirildikten sonra suda çözülmesiyle (Şekil 2.8D) ya da dondurarak kurutma yöntemiyle (Şekil 2.8E) ilaç yüklü miseller oluşturulabilmektedir.

İlaç taşımada blok kopolimer misel kullanımının en önemli avantajları olarak ise;

- 10-100 nm arası çapa sahip olmaları,
- Yüksek yapısal kararlılık,
- Suda çözünürlük,
- Düşük toksisite,
- Farklı fonksiyonel yapılar içermesi

sayılabilir [6]. Bu avantajları diğer etkileşimlerle bir araya gelen blok kopolimer miseller için de genelleleyebiliriz. 10-100 nm arasında bir çapa sahip olmaları blok kopolimer misellerin pasif hedeflemede kullanılmasına imkan vermekte ve 0,2µm por çaplı filtrelerden süzülerek sterilize edilmelerini sağlamaktadır. Misel boyutu genel olarak blok kopolimerin molekül ağırlığı ve blokların uzunluklarına bağlı olarak kontrol edilebilmektedir [8]. Ancak bazı durumlarda bimodal boyut dağılımı gözlenebilmektedir. Bunun sebebi ikincil agregasyonlardır, yani misellerin birbirleriyle bir araya gelmesidir [6]. Eğer kan dolaşımında büyük misel agregatları çok seyreltik olmalarında dolayı küçük misellere ayrılıyorsa bu bir sorun teşkil etmemektedir. Ancak agregatlar ayrılmıyorlarsa vücuttaki etkileri tek başına misellere göre çok daha farklı olacaktır.

İlaç taşıyıcı olarak blok kopolimer misellerin sunduğu diğer bir avantaj da statik (termodinamik) ve dinamik (kinetik) yapısal kararlılıklarıdır [6]. Statik kararlılıkları kritik misel konsantrasyonları ile belirlenmekte ve düşük molekül ağırlıklı yüzey aktif maddelerin oluşturduğu klasik misellere göre çok daha düşüktür. Bu sayede kan dolaşımı içinde çok düşük konsantrasyonlarda bile yapıları bozulmamaktadır. Dinamik kararlılıkları ise düşük dissosiasyon hızlarından kaynaklanmaktadır. Misel çekirdeğindeki hidrofobik blok büyüdükçe miselin kararlılığı artmaktadır. Ayrıca misel çekirdeğini oluşturan polimerin fiziksel haline göre de miselin kararlılığı değişebilmektedir. Misel çekirdeğini oluşturan polimerin camsı geçiş sıcaklığı (T_g)

37°C'den daha yüksekse "donmuş" çekirdek oluşmakta ve misel daha kararlı hale gelmektedir [8]. Tg değerinin altındaki sıcaklıklarda kristalin halde olan polimerler misel çekirdeğinde daha sıkı yerleşerek kararlılığı artırmaktadır. Misel çekirdeğine hidrofobik ilaç yüklemek de misel kararlılığını arttıran diğer bir etmendir [8].

Misellerin suda çözünürlüğü özellikle ilaç-polimer konjugatlarıyla kıyaslandıklarında önemli bir avantajlarıdır. Çünkü suda çözünen bir polimere hidrofobik bir ilaç konjuge edildiğinde suda çözünmeyen bir yapı elde edilebilmektedir [113], [114]. Ancak blok kopolimer misellerde hidrofobik ilaç miselin hidrofobik çekirdeğinde sudan ayrı tutulmaktadır ve miselin hidrofilik kabuğu suda çözünmeyi sağlamaktadır.

Küçük molekül ağırlıklı yüzey aktif moleküllerin misellerine kıyasla blok kopolimer miseller daha düşük toksisiteye sahiptir. Özellikle PEG kaplı miseller yüksek biyoyumluluğa sahiptirler [112]. Ayrıca, uygun molekül ağırlığında blok kopolimerler kullanılırsa, böbrekten dışarı atılmayan miseller unimerlerine ayrıldıklarında böbrekten dışarı atılabilmektedirler [6]. Bu sayede, uzun sirkülasyon süresine sahip olan blok kopolimer miseller ilgili dokuya kargo molekülünü taşıyıp unimerlerine ayrıldıktan sonra vücuttan kolayca uzaklaştırılabilmektedir.

Miselin çekirdeği ve kabuğu farklı yapılarıdaki polimerlerden oluşur. Başarılı bir ilaç taşıma çalışması için gerekli özellikler bu bloklara dağıtılarak istenen polimerik yapı oluşturulabilir. En büyük avantaj her bir bloğun diğerinden bağımsız olarak modifiye edilebilmesidir.

Hidrofobik ilaçların blok kopolimer misellerle taşınması için kullanılmasının en önemli sebepleri ilaç hedefleme, kontrollü salım ve ilacın çözünür hale getirilmesidir [6]. İlaç hedefleme önceki bölümlerde de belirtildiği üzere aktif ve pasif hedefleme olarak yapılabilmektedir. Miseller genelde 200 nm'den küçük oldukları için EPR etkisiyle pasif hedeflemede kullanılabilmektedirler. Ayrıca hidrofilik blok olarak PEG gibi bir polimer kullanılırsa kan proteinleri ve hedef olmayan hücrelerle etkileşimleri de minimum düzeyde olur ve kan dolaşımında daha uzun süre kalabilirler.

Misel çekirdeğinde bulunan hidrofobik ilaçlar, ilacın difüzyon yada partiyon katsayısına göre, hidrofobik polimer bloğun viskozitesi ve hidrofobluğuna göre değişen hızlarda salınmaktadır [6]. İlaç moleküllerinin hedef dokuya ulaşmadan önce

salınmaması gerekmektedir. Bu sebeple uygun yapıda misel oluşturulmalıdır. Ayrıca etkiye duyarlı (“stimuli-responsive”) polimerler blok kopolimerin yapısına katılarak hedef dokunun şartlarına göre ilaç salabilen misel yapıları oluşturulabilmektedir.

Hidrofobik ilaçların çözünür hale getirilmesi ise blok kopolimer misellerin ilk kullanılmaya başlandığından beri en önemli görevlerinden biri olmuştur. Çünkü çoğu ilaç, özellikle kanser ilaçları, hidrofobik özelliklerinden dolayı kan dolaşımına verilememektedir. Blok kopolimer misellerin çekirdeği suda çözünmeyen bu tip ilaçlar için uyumlu bir mikroçevre oluşturmaktadır ve ilaçları çözünür hale getirmektedir [6], [63], [112]. Yapılan bir çalışmada PCL-PEO blok kopolimer miseller kullanılarak dihidrotestesteronun suda çözünürlüğü 300 kat arttırıldığı gösterilmiştir [115].

Kontrollü ilaç salımı ve ilacın suda çözünür hale getirilmesi konularında miselin çekirdeğini oluşturan polimer ile ilaç arasındaki etkileşimin kuvveti çok önemlidir. Çünkü ilaç salım kinetiğini, enkapsülasyon verimini ve miselin kararlılığını doğrudan etkilemektedir [112].

2.2.2.2 Elektrostatik Etkileşimle Bir Araya Gelen Miseller

Genel olarak iyonik bloğa ve noniyonik hidrofilik bloğa sahip blok kopolimerlerin zıt yüklü makromoleküllerle elektrostatik etkileşimle birleşerek oluşturdukları misellerdir. Misel oluşumuna polielektrolit kompleks oluşumu sebep olduğu için bu yapılar polielektrolit kompleks miseller olarak adlandırılmaktadırlar. Ayrıca interpolielektrolit kompleks miseller veya poliiyon kompleks miseller olarak da adlandırılmaktadırlar. Gen taşımak amacıyla pozitif yüklü polikasyon ve noniyonik hidrofilik blok içeren blok kopolimerler kullanılmaktadır. Pozitif yüklü polimer blok DNA veya RNA'nın negatif yüklü fosfat gruplarıyla birleşerek kompleks oluşturmaktadır.

Polielektrolit kompleks miseller, hidrofobik etkileşimle bir araya gelen polimerik misellere kıyasla çok daha basit bir şekilde oluşturulmaktadırlar. Zıt yüklü moleküllerin basitçe birbirine karıştırılmasıyla polielektrolit kompleks miseller elde edilmektedirler [116], [117].

Polielektrolit homopolimerler zıt yüklü polielektrolitlerle bir araya geldiklerinde bileşenlerin oranlarına bağlı olarak oluşan kompleksin yükü ve yapısı değişmektedir

[118], [119]. Örneğin stokiyometrik kompleks oluşturulursa nötral ve suda çözünmeyen bir misel çekirdeği oluşmakta; aşırı polikasyon kullanılırsa miselle girmeyen polimerler olabilmekte ve oluşan misel pozitif yüklenmektedir. Blok kopolimerde bulunan noniyonik hidrofilik blok, genellikle PEG, sayesinde suda çözünmeyen kompleks suda çözünür hale getirilmektedir. Eğer misel çekirdeği pozitif yüklüyse de kayma düzlemini yüzeyden öteleyerek bu yükü perdeleyip etkisini azaltmakta ve olası toksik etkilerini engellemektedir [25]. Gen terapi çalışmalarında genellikle pozitif yüklü çekirdeğe sahip miseller kullanılarak transfeksiyon etkinliği artırılmaktadır.

Polielektrolit kompleks oluşumunda önemli bir özellik de kooperatif etkileşimin olmasıdır [25]. Etkileşime giren zincir uzunluğu arttıkça daha kuvvetli etkileşim gerçekleşmektedir. Ayrıca kritik bir zincir uzunluğu da bulunmaktadır ve bu zincir uzunluğunun altındaki değerlerde kooperatif etkileşim gerçekleşmemektedir. Yapılan çalışmalarda 5 monomerlik bir polielektrolitin kompleks oluşturabildiği gösterilmiştir [120]. Bir polikasyonla DNA arasında kompleks oluşumu için kritik zincir uzunluğunun da oldukça kısa olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Örneğin polilizin DNA ile kompleksleşmesi için 7 monomerlik bir zince sahip olması yeterli olmuştur [121].

Kompleks oluşumuna polimerin zincir uzunluğu ve bileşenlerin oranı dışında polikasyonun yük yoğunluğu ve çözeltinin iyonik şiddeti de etki etmektedir [25]. Yük yoğunluğu zincir üstündeki yüklü grup sayısı ve yüklü grupların türüne göre değişmektedir. Zayıf asit veya bazlar (amin veya karboksilik asit grupları gibi) pH'a bağlı olarak yüklenmekteyken kuvvetli asit veya bazlar (kuarterner amonyum veya sülfonat grupları gibi) tüm pH değerlerinde yüklüdür. Yük yoğunluğuna bağlı olarak kompleksin yapısı değişmektedir.

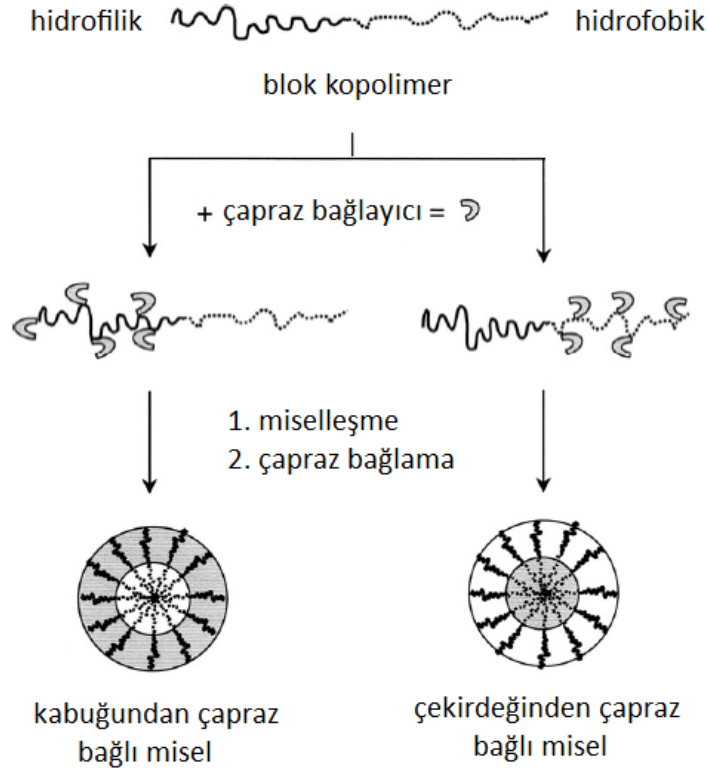
Çözeltinin iyonik şiddeti de kompleksin oluşumuna doğrudan etki etmektedir. Çözeltide bulunan yüksek konsantrasyondaki tuz iyonları, polielektrolitler arasında perdeleme etkisi yaparak kompleks oluşumunu engellemektedir. Çözeltideki tuz konsantrasyonuna bağlı olarak polielektrolit kompleksin boyutu ve kararlılığı değişmektedir [122], [123].

Polielektrolit kompleks miseller genelde gen tedavisi çalışmalarında kullanılmakta ve kargo molekülü olarak da plazmid DNA, antisens ODN veya siRNA seçilmektedir.

Kullanılan genetik materyal kompleksin yapısını ve şeklini doğrudan etkilemektedir. Çünkü genetik materyaller organik ilaç moleküllerine göre çok daha büyüktürler. Özellikle plazmid DNA molekülleri 5000-7000 baz çifti içerebilen ve molekül ağırlığı milyon Da seviyesinde olan dev moleküllerdir. Hücre içine tek başlarına girememelerinin en önemli sebeplerinden birisi de budur. DNA zincirleri polikasyonlarla kompleks oluşturduklarında kompaktlaşarak boyutları çok küçülmektedir. Bu sayede 50-200 nm aralığında boyutlara sahip polielektrolit kompleks miseller elde edilebilmektedir.

2.2.2.3 Çapraz Bağlı Blok Kopolimer Miseller

Misel yapılarının en büyük dezavantajları kritik misel sıcaklığının üstündeki sıcaklıklarda veya kritik misel konsantrasyonunun altındaki konsantrasyonlarda veya çözelti bileşiminde meydana gelen çeşitli değişikliklerde kararsız hale gelmeleri ve unimerlerine ayrılmalarıdır [124]. Misel yapısının kararlılığının bozulmaması için kullanılan en önemli yöntem çapraz bağlamadır. Bu sayede misel yapısı değişen şartlarda bozulmamaktadır. Çapraz bağlı miselleri kullanmanın diğer bir sebebi de yapı üzerinde zamana bağlı bir kontrol sağlamasıdır. Çapraz bağlı polimerik miselleri kabuğunda veya çekirdeğinde çapraz bağlar bulunan blok kopolimer miseller olarak ikiye ayırabiliriz (Şekil 2.9).



Şekil 2. 9 Çapraz bağlı blok kopolimer misellerin şematik gösterimi [125]

Çekirdeği çapraz bağlı miseller 3 yöntemle oluşturulmaktadır[125]. En çok kullanılan yöntem blok kopolimerin var olan hidrofobik zincirinin ucuna çapraz bağlayıcı grupları içeren yeni bir polimer zincirinin eklenmesidir. Bu sayede miselin ilaç yükleme kapasitesi değişmemektedir. Diğer yöntemler ise hidrofobik blok zinciri boyunca çapraz bağlayıcı grupları olan monomerler yerleştirmek ya da misel çekirdeği içinde düşük molekül ağırlıklı bir monomerin polimerleştirilmesidir. Yapılan son çalışmalarda disülfid bağlarıyla çapraz bağlama gerçekleştirilmektedir. Bu sayede misel hücre içine girdiğinde buradaki yüksek glutatyon konsantrasyonundan dolayı disülfid bağları kırılmakta ve ilaç salımı gerçekleşmektedir [126].

Kabuğu çapraz bağlı miselleri oluşturmak çekirdeği çapraz bağlı misellerden daha zordur. Çünkü kabuğu çapraz bağlarken miselleri de birbirine çapraz bağlama ihtimali bulunmaktadır. Bu sebeple ya çok seyreltik misel çözeltisi hazırlanarak çapraz bağlama gerçekleştirilir ya da çapraz bağlanacak kabuk katmanının dışına ek bir katman daha eklenerek diğer misellerle etkileşim minimum seviyeye düşürülür [124]. Misellerin kabuğu çapraz bağlanarak, misel kabuğu yarı geçirgen bir membran haline getirilebilir. Ayrıca miselin çekirdeği bozulan bir polimerden oluşturulduğunda, misel oluşumundan

sonra bu polimer bozunarak uzaklaştırıldığında “nanokafes”ler oluşturulabilmektedir [127], [128].

2.2.2.4 Diğer Blok Kopolimer Miseller

Metal koordinasyon bağıyla ve hidrojen bağlarıyla bir araya gelen blok kopolimer miseller yukarıda bahsedilen polimerik misellere göre daha az kullanılmaktadırlar.

Özellikle kanser hastalıklarının tedavisinde, metal içeren çeşitli ilaçlar kullanılabilmektedir. Bu ilaçlardan bazıları tek başlarına kullanıldıklarında suda çözünmemekte ve hastaya verildiklerinde önemli yan etkileri ortaya çıkmaktadır. Bu sebeple metal koordinasyon bağlarıyla misel çekirdeğine hapsedilip ilgili dokuya taşınabilmektedirler [6]. Örnek olarak cisplatin adı verilen platin içeren bir antikanser ilacı verilebilir. Suda çözünmeyen bu ilacın akut ve kronik nefrotoksisiteye sebep olduğu belirtilmektedir. Yapılan bir çalışmada karboksilik asit grubu içeren blok kopolimerler kullanılarak platinin bu gruplarla metal koordinasyon bağı yapması sağlanmıştır [16]. Bu sayede miselin çekirdeği karboksilik asit ve platin arasındaki koordinasyon bağlarıyla bir araya gelmiştir. Vücuda verildiğinde, karboksilik asitlerle klorür iyonları yer değiştirerek ilaç salımı gerçekleşmektedir.

Misel oluşumunda kullanılan diğer etkileşim türleri ise hidrojen bağları ve π - π etkileşimleridir. Bu etkileşimler yukarıda belirtilen diğer etkileşimlerle beraber misel oluşumuna etki etmektedir [6].

2.2.3 Blok Kopolimer Misellerin Nitelikleri ve Karakterizasyonu

2.2.3.1 Kritik Misel Konsantrasyonu

Özellikle hidrofobik etkileşimle bir araya gelen miseller için geçerli olan bu terim misel oluşumu için gerekli olan minimum blok kopolimer konsantrasyonunu belirtmektedir. İlaç taşıyıcı bir misel kan dolaşımına enjekte edildiği anda konsantrasyonu önemli miktarda düşmektedir. Basit bir örnek vermek gerekirse yetişkin bir insanda bulunan 5 L kan içine %2 (w/v) polimer içeren 100 mL çözelti enjekte edildiğinde kan içindeki polimer konsantrasyonu 0,4 mg/mL'ye düşmektedir. Miselin hasta dokuya ulaşabilmesi için düşük konsantrasyonlar da dahi kararlı olması gerekmektedir. Bu sebeple cmc

değeri düşük polimerik miseller geliştirilmesi gerekmektedir. Genelde blok kopolimer misellerin cmc değerleri bu değerin altında bulunmaktadır.

Misellerin termodinamik kararlılığının bir ölçüsü olan kritik misel konsantrasyonu (cmc), polimerin hidrofobik-hidrofilik blok oranına, hidrofobik bloğun Tg değerine ve misel çekirdeğine yüklenmiş ilaç miktarına göre değişmektedir [8]. Blok kopolimerin hidrofobik blok uzunluğu arttıkça cmc değeri azalmaktayken hidrofilik blok uzunluğu arttıkça cmc değeri de artmaktadır [129]. Daha önceki bölümlerde de bahsedildiği üzere Tg değerinin altındaki sıcaklıklarda kristalin halde olan hidrofobik polimerler misel çekirdeğinde daha sıkı yerleşerek kararlılığı artırmakta ve cmc değerinin daha düşük olmasını sağlamaktadır. Misel çekirdeğine ilaç yüklenerek hidrofobik etkileşim artırılmakta ve cmc değeri düşürülebilmektedir.

Miselin hedefe ulaştıktan sonra vücuttan atılması gerektiği de unutulmamalıdır. Çok kararlı misel oluşumunun, polimerlerin vücuttan atılmasını engelleyeceği dikkate alınmalıdır.

Kritik misel konsantrasyonu çeşitli yöntemlerle saptanabilmektedir ama en çok kullanılan yöntem floresans spektrofotometresi kullanımını içeren yöntemdir. Bu yöntemde su içinde ve misel çekirdeği içinde farklı floresans spektrumlar veren bir molekül kullanılarak cmc tayin edilmektedir [130]. Ayrıca dinamik ışık saçılması [131], yüzey gerilimi ve iletkenlik ölçümleriyle de cmc değeri saptanabilmektedir.

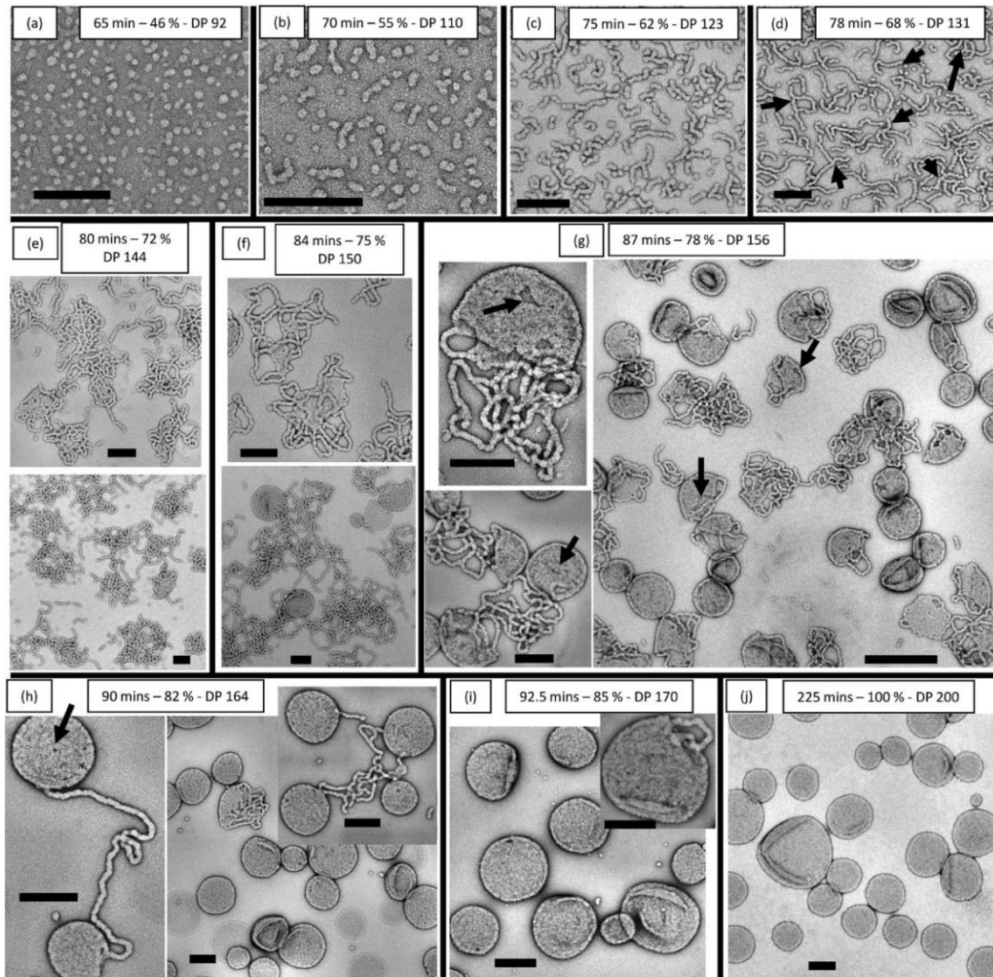
2.2.3.2 Morfoloji

Misellerin şeklinin ilaç/gen taşınması üzerine etkisi halen araştırılmakta olan bir konudur. Blok kopolimer miseller; küresel, çubuk, disk şekilli, vesikül, “denizanası” şekilli, vb. birçok farklı şekilde üretilebilmektedirler. Blok kopolimer miselin şekli;

- Kopolimerin bileşimi,
- Kopolimerin konsantrasyonu,
- Organik çözücü miktarı,
- Çözelti pH'ı ve iyonik şiddeti,

değiştirilerek kontrol edilebilmektedir. Ayrıca polielektrolit kompleks misellerde bileşenlerin yük oranının da şekil üzerine etkisi bulunmaktadır.

Kopolimerin bileşiminin miselin şekli üzerine etkisi Adam Blanazs ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada [132] ayrıntılı olarak gösterilmiştir. Çalışmada poli(gliserol monometakrilat)-poli(2-hidroksipropil metakrilat) (PGMM-b-PHPM) blok kopolimerinin hidroforik blok uzunluğu arttırıldığında küresel miseller, çubuk şekilli miseller, dallanmış çubuk şekilli miseller, “denizanası” şekilli miseller ve vesiküller gibi çok farklı şekilli blok kopolimer kümeler elde edilebileceği gösterilmiştir (Şekil 2.10). Ancak, blok kopolimer misellerin bu kadar çok farklı şekli olmasına karşın en çok karşılaşılan şekli küresel halleridir. Blok kopolimer misellerin şekilleri genellikle elektron mikroskobu (TEM) [132] ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) [133] kullanılarak belirlenmektedir.



Şekil 2. 10 PGMM-b-PHPM blok kopolimerinin hidroforik blok uzunluğu arttıkça oluşan farklı küme şekilleri. (a) küresel, (b) kısa çubuk, (c) uzun çubuk, (d) dallanmış çubuk, (e, f) kısmen bir araya gelmiş çubuk, (g) “denizanası” şekilli miseller ve (h-j) vesiküller [132].

2.2.3.3 Boyut

Blok kopolimer misellerin boyutunu doğru ayarlamak ilaç/gen taşıma etkinliğini doğrudan etkileyen bir konudur. Genellikle 20-100 nm arası boyuta sahip miseller en yüksek etkinliğe sahip olmaktadır. Bu boyuttan daha ufak olanlar genelde böbrekten atılmakta ve daha büyük olanların makrofajlar tarafından tutulma ihtimali artmaktadır [134]. Misellerin boyutu genel olarak çekirdeği ve kabuğu oluşturan blokların uzunluğu değiştirilerek kontrol edilmektedir. Ayrıca, polielektrolit kompleks misellerin taşıdıkları genetik materyalin boyutu ve katlanma şekli de miselin boyutu üzerine önemli derecede etkisi olmaktadır [25].

Blok kopolimer miseller bazı durumlarda bimodal boyut dağılımı göstermektedirler [8]. Bunun sebebi olarak ikincil agregasyonlar belirtilmektedir. İkincil agregasyon, misel çekirdeklerinin hidrofobik etkileşimle bir araya gelmesi sonucu gerçekleşmektedir. İkincil agregasyonu engellemek için misel kabuğu genelde PEG gibi bir noniyonik hidrofilik blokla oluşturulmaktadır. İkincil agregasyon oluşumu ilaç/gen taşıma etkinliğini değiştirebildiği için oluşması istenmemektedir.

Blok kopolimer misellerin boyutları dinamik ışık saçılması, TEM, AFM, boyut eleme kromatografisi (GPC) ve viskozimetri yöntemleriyle bulunabilmektedir [63]. Boyut dağılımı ise genelde dinamik ışık saçılması yöntemiyle incelenmektedir.

2.2.3.4 Blok Kopolimer Misellerin Dinamiği

Misel sistemlerinin dinamiği üç başlık altında incelenmektedir. Bunlar miselleşme kinetiği, misellerin hibritleşmesi ve zincir dinamiğidir [63]. Miselleşme kinetiği iki aşamalı olarak incelenmektedir. İlk aşamada, sabit kopolimer konsantrasyonunda unimer-misel dengesi oluşmaktadır ve bu aşama hızlı olan aşamadır. Daha yavaş gerçekleşen ikinci aşamada ise değişen kopolimer konsantrasyonuna karşı asosiasyon-disosiasyon dengesi oluşmaktadır. Miselleşme kinetiği NMR, ESR, “stop-flow” teknikleri gibi yöntemlerle incelenmektedir.

Misellerin hibritleşmesi, iki misel arasında unimer değişiminin gerçekleşmesi olarak tanımlanmaktadır. Genelde floresans, analitik ultfrasantrifüj gibi yöntemlerle incelenmiştir.

Zincir dinamiği ise miselin kabuğunda ve çekirdeğinde bulunan polimer zincirlerinin konformasyonlarında meydana gelen değişimlerle açıklanmaktadır. NMR, floresans ve ışık saçılması yöntemleriyle zincir dinamiği incelenebilmektedir.

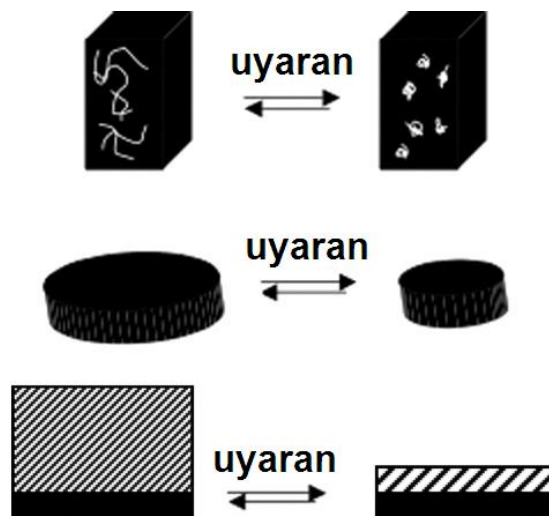
2.3 İlaç/Gen Taşımada “Uyarı-Cevap” Polimerlerin Kullanımı

“Akıllı” polimerler de denilen uyarı-cevap polimerleri, çevre koşullarında meydana gelen ufak değişimlere yanıt olarak büyük ve ani bir fiziksel veya kimyasal değişim gösteren polimerlerdir (Şekil 2.11). Örneğin, bazı durumlarda polimerin zincir konformasyonu değişirken bazı durumlarda suda çözünürlüğü değişmektedir. Birçok farklı uyarı kullanarak polimerlerde yanıt oluşturulabilmektedir. Bu uyarıları şu şekilde sınıflandırabiliriz [135]:

- Kimyasal uyarılar: pH, iyonik şiddet, redoks reaksiyonları, çeşitli kimyasal ajanlar
- Fiziksel uyarılar: sıcaklık, ışık, manyetik/elektrik alan, mekanik gerilim
- Biyokimyasal uyarılar: antijen, enzim, ligand, diğer biyokimyasal ajanlar

Polimerlerin uyarı-cevap özellikleri ilaç/gen taşıma, biyoteknoloji uygulamaları ve ayırma işlemlerinde önemli avantajlar sağlamaktadır. Üzerinde en çok çalışma yapılan uyarılar sıcaklık ile pH’tır ve bu sebeple daha ayrıntılı olarak irdeleneceklerdir.

Uyarı-cevap polimerleri hidrojel, misel, yüzey kaplama, polimer konjugatları olarak çok farklı formlarda hazırlanabilmektedirler.



Şekil 2. 11 Bir dış uyarana karşı polimer zincirinin, hidrojinin veya yüzeye kaplanmış hidrojin büzülmesi ve şişmesi

2.3.1 Sıcaklığa Duyarlı Polimerler

Uyarı-cevap polimerleri için en çok kullanılan uyaran sıcaklıktır. Sıcaklığı kontrol etmenin kolay olması ve ayrıca hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak kolayca uygulanabilmesi sıcaklık duyarlı polimer uygulamalarının diğer uyarı-cevap polimerlerine göre daha fazla olmasına sebep olmuştur [135]. Örneğin sıcaklık duyarlı polimerle kaplanmış petri kapları kullanılarak *in vitro* olarak hücreler manipüle edilebilirken [136], sıcaklığa duyarlı hidrojel veya miseller tasarlanarak *in vivo* ilaç taşıma [137] gerçekleştirilebilmektedir.

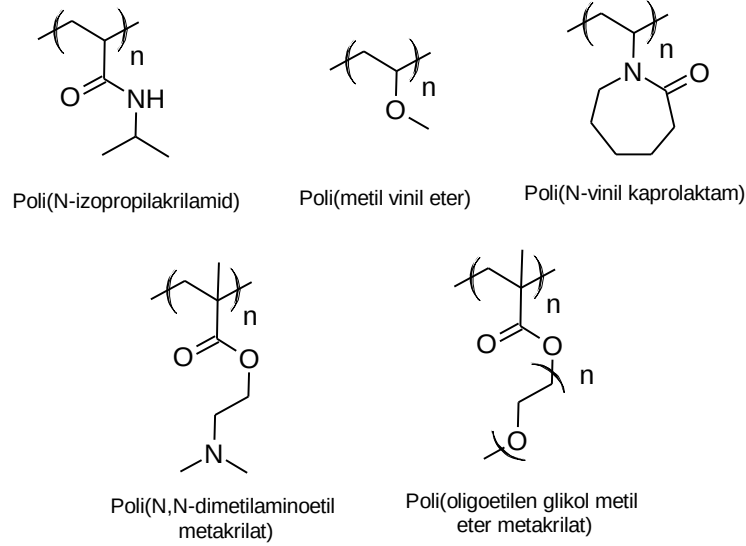
Sıcaklığa duyarlı polimerler, belirli bir sıcaklıkta polimerin çözünürlüğünde ani bir değişim meydana getiren hacimsel faz geçişi sergilerler [135], [138]. Isıtıldığında belli bir sıcaklığın üzerinde çözünmeyen hale gelen polimerler düşük kritik çözünme sıcaklığına ("lower critical solution temperature", LCST) sahiplerdir. Isıtıldığında çözünür hale geçen polimerler ise yüksek kritik çözünme sıcaklığı ("upper critical solution temperature", UCST) gösterirler. Hacimsel faz geçişine sebep olan polimerin çözünürlüğündeki bu değişim, birbirine rakip hidrojen bağlarıyla ilişkilidir. Polimerin molekül içi ve moleküller arası hidrojen bağları, polimerin suyla yaptığı hidrojen bağlarına galip gelmekte ve polimer suda çözünmeyen hale gelmektedir. Bu prosese; çözünme prosesinin kendisi, su moleküllerinin polimerin çevresinde düzenli yerleşimi, molekül içi ve moleküller arası kuvvetler, hidrojen bağı ve hidrofobik etkileşimlerin etkisi olmaktadır. Poli(N-izopropilakrilamid) (PNIPA) en çok kullanılan sıcaklığa duyarlı polimerdir. PNIPA, LCST'ye sahiptir ve sıcaklığa bağlı olarak rasgele yumaktan küresel şekle dönüşümünden ötürü tersinir faz ayırımına uğramaktadır [139]. Bu polimer, öncelikle molekül içi büzülmeye uğramakta ve bu sebeple de çözeltiden saçılan ışığı arttırmaktadır yani çözelti bulanıklaşmaktadır. Daha sonra, büzülmüş polimer zincirleri bir araya gelerek agregatları oluşturmakta ve su molekülleri polimer zincirinden uzaklaşmaktadır. Bu sayede faz ayrımı gerçekleşmektedir. Kısaca anlatmak gerekirse LCST değerinin üstündeki sıcaklıklarda hidrofobik etkileşimler baskın gelmekte ve eğer konsantrasyon yeterli derecede yüksekse çökme gerçekleşmektedir [140].

Sıcaklığa duyarlı polimerler; LCST'ye sahip polimerler, amfifilik dengeye sahip polimerler ile biyopolimerler ve yapay polipeptidler olarak sınıflandırılmaktadırlar

[135]. LCST'ye sahip polimerlere en iyi örnek PNIPA'dır ve bu polimerler kritik sıcaklığın üzerinde çözünür halden çözünmez hale geçerek faz geçişi gerçekleştirirler. Amfifilik dengeye sahip polimerler kritik jelleşme sıcaklığı üzerinde miselleşme davranışı gösterirler veya hidrojel oluştururlar. Biyopolimerler ve yapay peptidler ise kritik sıcaklığın üzerinde rasgele yumak halinden heliks konformasyonuna dönüşmekte ve fiziksel çapraz bağlarla jelleşmektedirler.

Polimerlerin sıcaklığa duyarlı davranışları çözeltiye olan etkileşimlerine bağlı olduğu için çözelti bileşiminde yapılan değişiklikler hacimsel faz geçişi noktasını değiştirmektedir. Çözeltiye ilave bir çözücü eklenmesi, yüzey aktif madde eklenmesi veya tuz eklenmesi polimerin LCST değerini değiştirmektedir [138]. Ayrıca, sıcaklığa duyarlı polimer zincirine başka monomerlerin eklenerek kopolimer oluşturulması da LCST değerini değiştirmektedir. Örneğin, PNIPA'nın yapısına hidrofilik monomerlerin eklendiğinde LCST değeri yükselmekteyken hidrofobik özellikte monomerler eklendiğinde LCST değeri azalmaktadır [140].

Poli(N-alkilakrilamid)ler, poli(metil vinil eter), poli(N-vinil kaprolaktam), poli(N-etil oksazolin), poli(akrilik asit-akrilamid) kopolimeri, poli(N-vinilizobütilamid), poli(dimetilaminoetil metakrilat) ve çeşitli polipeptitler bugüne kadar LCST'ye sahip olan polimer sınıfları olarak incelenmişlerdir (Şekil 2.12). Biyoygulamalarda en çok PNIPA kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda poli(oligo etilen glikol metakrilat) türevleri de biyoygulamalarda sıkça kullanılmaya başlanmış ve PNIPA'ya karşı önemli bir alternatif olmuştur [141].



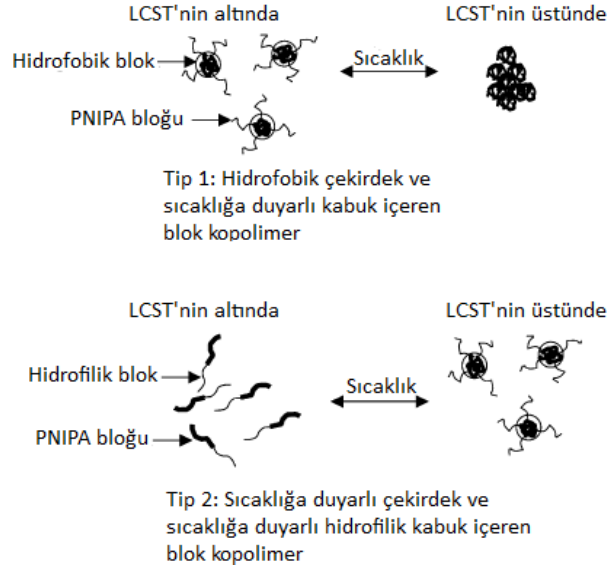
Şekil 2. 12 Sıcaklığa duyarlı çeşitli polimerler

Sıcaklığa duyarlı polimerlerin en çok kullanıldığı biyouygulamaları;

- Lokal hipertermiye dayalı ilaç salımı,
- Ayırma, geçirgenlik ve hareket kontrolü için akıllı açma-kapama sistemleri

olarak ikiye ayırabiliriz [135]. Sıcaklığa duyarlı polimerler kullanılarak ilaç, protein ve genetik materyal istenilen bölgeye iki şekilde ulaştırılabilmektedir. İlk yöntemde ulaşacağı bölgenin sıcaklığı LCST değerinden daha aşağıda olduğunda sıcaklığa duyarlı polimer taşıdığı kargo molekülünü bırakmaktadır [142]. İkinci yöntemde ise hedef dokunun sıcaklığı lokal hipertermi yöntemleriyle LCST değerinin üzerine çıkarılarak polimerin burada çökerek birikmesi amaçlanmaktadır [143].

Blok kopolimer miseller de sıcaklığa duyarlı polimerler kullanarak tasarlanabilmektedir. Sıcaklığa duyarlı polimer bloğa hidrofilik veya hidrofobik yapıda bloklar eklenerek sıcaklık değişimine farklı yanıtlar veren miseller oluşturulabilmektedir [135] (Şekil 2.13). Sıcaklığa duyarlı polimere hidrofilik polimer bloğu eklendiğinde LCST değerinin altında unimerler halinde bulunan blok kopolimer LCST değerinin üzerinde ise sıcaklığa duyarlı polimerin hidrofoblaşması sonucu misel oluşturmaktadır. Sıcaklığa duyarlı polimere hidrofobik blok eklendiğinde ise LCST değerinin altında blok kopolimerler misel oluşturmakta ancak LCST değerinin üstünde ise miseller birleşerek agregat oluşmaktadır.



Şekil 2. 13 Sıcaklığa duyarlı polimer blok içeren farklı tiplerde blok kopolimer miseller[135]

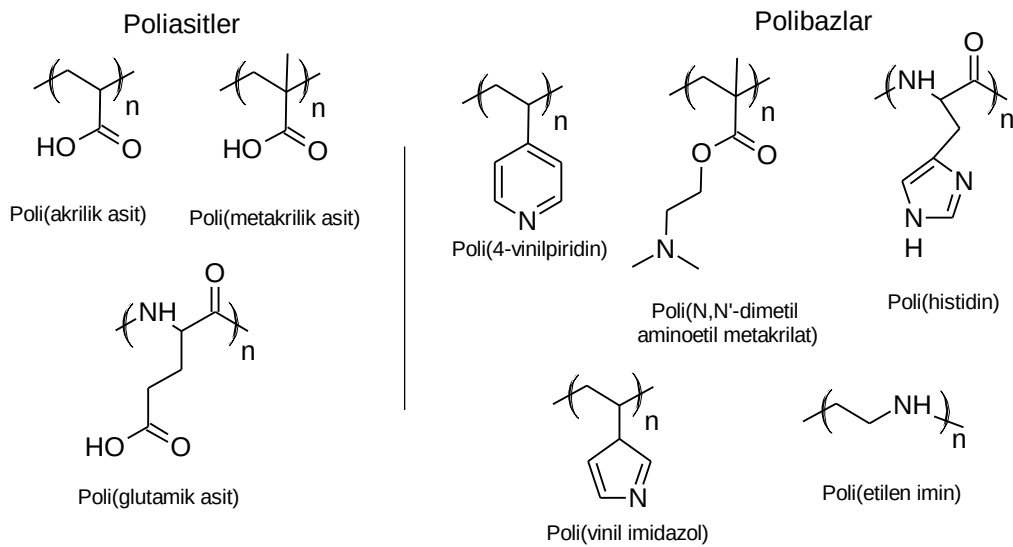
2.3.2 pH'a Duyarlı Polimerler

Fizyolojik pH değerlerindeki değişimler göz önüne alındığında (Çizelge 2.1) biyoygulamalarda pH'ın önemli bir sinyal olarak kabul edilmesi kaçınılmazdır. Zayıf asitler veya bazlar pH değiştiğinde farklı iyonlaşma halleri gösterirler. Bu gruplara sahip olan zayıf polielektrolitlerin pH değiştiğinde iyonlaşma halleri değiştiği için konformasyon değişimi (şişme-büzülme) ve bazı polimerlerde de faz geçişi göstermektedirler. Zayıf polielektrolitlerin bu özelliği kullanılarak etkin bir şekilde kontrollü ilaç salımı ve gen transferi gerçekleştirilebilmektedir.

Çizelge 2. 1 Çeşitli dokular ve hücre bölümlerinde pH değerleri [138]

Doku/Hücre Bölümü	pH
Kan	7,35-7,45
Mide	1,0-3,0
Oniki Parmak Bağırsağı	4,8-8,2
Bağırsak	7,0-7,5
Erken Endozom	6,0-6,5
Geç Endozom	5,0-6,0
Lizozom	4,5-5,0
Golgi	6,4
Tümör, hücre dışı	7,2-6,5

Zayıf polielektrolitleri polibazlar, poliasitler ve poliamfolitler olarak üçe ayırabiliriz. Zayıf poliasitler veya polibazların pKa değerleri genelde 4-8 arasında değişmektedir. Zayıf poliasit olarak karboksilik asit grubu içeren polimerler en fazla kullanılmaktadır. Bu polimerlerin karboksilik asit gruplarına düşük pH'ta proton bağlanarak polimeri nötrleştirmekte, yüksek pH'ta ise proton koparak negatif yüklü hale gelmektedir. Düşük pH'ta nötrleşen polimer hidrofoblaşarak büzülme, yüksek pH'ta negatif yüklenen polimer ise molekül içi itme kuvvetlerinden dolayı şişmektedir. Polibazlarda ise bunun tam tersi geçerlidir. Genelde amin grubuna sahip polimerler kullanılmaktadır. Bu polimerler düşük pH'ta protonlanarak pozitif yüklenerek şişmekte yüksek pH'ta ise nötrleşerek büzülme veya faz değişimi gerçekleşmektedir. pH'a duyarlı polimer olarak kullanılmış çeşitli polibazlar ve poliasitler Şekil 2.14'te verilmektedir. pH'a duyarlı polimerler kullanılarak miseller, hidrojel, yüzeyler ve "akıllı" biyokonjugatlar üretilmektedir.

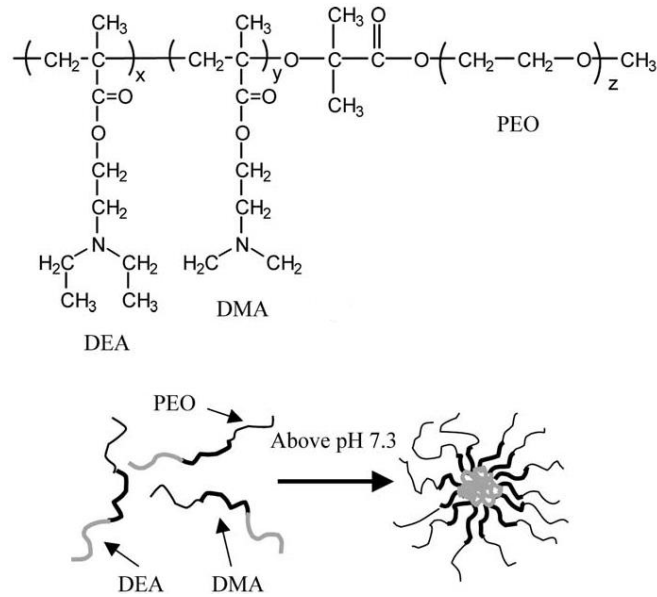


Şekil 2. 14 pH'a duyarlı polimer olarak kullanılan çeşitli poliasitler ve polibazlar

pH'a duyarlı polimerler ilaç/gen taşıyıcı polimerik sistemlerde farklı şekillerde kullanılabilir. Gen transferi çalışmalarında genelde polibazlar kullanılmaktadır. Bu polimerler nükleotidlerle elektrostatik etkileşimle kompleks oluşturabilmektedirler. Polibazın pH'a duyarlı karakteri ise kompleks hücre içinde lizozoma ulaştığında önem arz etmektedir. Lizozomun içine proton pompalandığında polibaz bu protonları bağlayarak pH'ın düşmesine engel olmakta ve daha çok protonun lizozoma

pompalanmasına sebep olmaktadır. Bu da lizozomun ozmoz dengesini bozarak şişip patlamasına sebep olmaktadır. Bu alanda en çok kullanılan polimer olan poli(etilen imin), gen taşıyıcı polimerler arasında “altın standart” olarak gösterilmektedir [135]. pH’a duyarlı polimerler kullanılarak blok kopolimer miseller de oluşturulabilmektedir. Nötral haldeyken hidrofobik özellik gösteren pH’a duyarlı bir bloğa ve hidrofilik bir bloğa sahip blok kopolimer misel oluştururken, pH’a duyarlı blok pH değiştirilerek yüklü hale getirildiğinde misel yapısı bozularak unimerler açığa çıkacaktır (Şekil 2.15). Bu özellik kullanılarak pH değişimine bağlı olarak kontrollü ilaç salımı yapabilen polimerik miseller üretilmektedir.

Ancak tüm bu biyoygulamalarda doğru pH değerinde “yanıt” veren polimerler kullanılması gerektiği unutulmamalıdır. Örneğin pH’a duyarlı ilaç taşıyıcı bir miselin lizozomdaki pH’ta taşıdığı hidrofobik ilaçları salması isteniyorsa pKa değeri lizozomun pH değerine yakın değerde olan polielektrolit kullanılmalıdır.

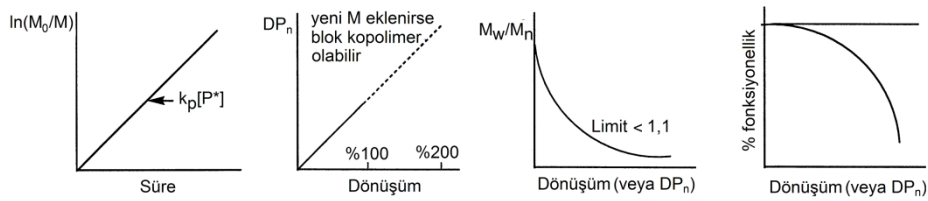


Şekil 2. 15 Poli((dimetilamino etil metakrilat)-b-(dietilamino etil metakrilat)-b-(etilen oksit)) triblok kopolimerinden pH’a bağlı olarak misel oluşumunun şematik gösterimi [144]

2.4 Yaşayan/Kontrollü Radikal Polimerizasyon

RAFT polimerizasyonu bir yaşayan/kontrollü radikal polimerizasyon yöntemidir. Yaşayan polimerizasyon yöntemlerinin en önemli özelliği aktif ve inaktif (dormant) türler arasında bir denge bulunmasıdır [145]. Aktif ve inaktif türler arasındaki değişim

tüm zincirlerin yavaş fakat eşzamanlı olarak büyümesini sağlamak ve radikal konsantrasyonunu düşük tutarak sonlanma basamağını minimize etmektedir.



Şekil 2. 16 Yaşayan/kontrollü sistemlerde yarılogaritmik kinetik eğri ile molekül ağırlığı, polidispersite ve fonksiyonelliğin monomer dönüşümüne bağlı olarak değişimi [146]

Şekil 2.16'da ideal bir yaşayan/kontrollü polimerizasyon prosesinin dayandığı dört temel özelliği belirtilmiştir. Bu özellikler şu şekilde sıralanabilir [146];

- Yarı-logaritmik koordinatlarda monomer konsantrasyonunun zamanla değişimi lineer olmalıdır. Bu lineer değişim aktif türlerin konsantrasyonlarının sabit kaldığını ve sonlanma basamağının katkısının düşük olduğunu göstermektedir. Ancak, bu durum türler arasında transfer olduğunu göstermez ve serbest radikal polimerizasyon da bile gözlenebilir.
- Molekül ağırlığı monomer dönüşümüyle birlikte lineer olarak artmalıdır. Bu lineer artış, sistemde sabit sayıda zincir olduğunu göstermektedir. Ancak zincirlerin durumu hakkında, yani aktif veya sonlanmış olup olmadıkları hakkında, bilgi vermemektedir. Unimoleküler sonlanma veya orantısız sonlanma da aynı lineer grafiği vermektedir. Bu eğrinin lineerliğinden sapması yavaş başlamayı ya da transferin gerçekleştiğini göstermektedir.
- Yavaş başlama ve yavaş değişimin olduğu sistemlerde polidispersite azalmalıdır. Polidispersitenin dönüşümle birlikte artması önemli oranda zincir kırılma reaksiyonunun olduğunu göstermektedir.
- Sonlanma ve transfer olan durumlarda bazı zincirler fonksiyonelliklerini kaybetmekte ve büyümemektedirler. Fonksiyonelliğin kaybı yüksek dönüşümlerde önemli hale gelir, çünkü zincir büyüme hızı azalırken zincir kırılma reaksiyonlarının hızı azalmamaktadır. Zincir sonu fonksiyonelliği blok kopolimer ve telekelik polimer sentezi için çok önemlidir ve son ürünün özelliklerini etkilemektedir.

Yaşayan/kontrollü radikal polimerizasyon ve serbest radikal polimerizasyonun her ikisi de zincir büyümesi sırasında radikal kullanılmaktadırlar. Bu sebeple benzer stereo-seçicilik, kimyasal seçicilik ve regio-seçicilik göstermektedirler. Ancak aralarında şu farklar bulunmaktadır [145]:

- Yaşayan/kontrollü radikal polimerizasyonda aktivasyon ve deaktivasyon hızları dengelenerek serbest radikallerin konsantrasyonu sabit tutulmaktadır. Yaşayan/kontrollü radikal polimerizasyonda başlama, aktivasyon ve deaktivasyon hızları sonlanmadan çok daha fazladır. Bu da tüm zincirlerin eşzamanlı olarak başlamasını ve çeşitli polimer yapıları üzerinde kontrol sağlamaktadır.
- Büyüyen zincirlerin yaşam süresi serbest radikal polimerizasyonda ~ 1 saniye iken, yaşayan/kontrollü polimerizasyonda aktif ve inaktif türler arasındaki değişim sayesinde 1 saatten daha fazladır. Bu sayede makromoleküllerin fonksiyonelliği, topolojisi ve bileşimi gibi birçok özelliği kontrol edilebilmektedir.

Yaşayan/kontrollü radikal polimerizasyonun gerçekleşmesi için ise şu şartların sağlanması gerekmektedir [145]:

- Başlama basamağı düşük monomer dönüşümlerinde tamamlanmalıdır.
- Transfer etkilerini önlemek için düşük M_w ($DP < 1000$) hedeflenmelidir. Bu da yüksek konsantrasyonlarda büyüyen zincir gerektirmektedir.
- Yeteri kadar yüksek molekül ağırlığına ulaşmak için büyüyen radikal konsantrasyonu düşük tutulmalıdır.

Büyüyen zincir ve büyüyen radikalın konsantrasyonları arasındaki yüksek fark kararlı halde bulunan yüksek konsantrasyondaki büyüyen zincirle çok düşük konsantrasyondaki büyüyen serbest radikal arasındaki değişim reaksiyonlarıyla sağlanabilmektedir. Değişim reaksiyonları yaşayan/kontrollü radikal polimerizasyon yöntemlerinin özünü oluşturmaktadır.

2.4.1 Yaşayan/Kontrollü Radikal Polimerizasyon Çeşitleri

Günümüzde kullanılan en etkin yaşayan/kontrollü polimerizasyon yöntemleri NMP, ATRP ve RAFT olarak bilinmektedir ve üçü de ticari olarak önemli ve gelecek vadeden yöntemlerdir. Her bir yöntemin diğerlerine göre avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Bu avantaj ve dezavantajlar, yaşayan/kontrollü polimerizasyon yöntemlerinin dört tipik özelliği karşılaştırılarak ortaya çıkmaktadır. Bu özellikler polimerize edilebilen monomer çeşitliliği, reaksiyon şartları (sıcaklık, süre, safsızlıklara hassasiyet, vb.), transfer edilebilen uç grupları ve atomlar ile katalizörler gibi çeşitli katkı maddeleridir. Bu özelliklerin karşılaştırması Çizelge 2.2’de verilmektedir.

Çizelge 2. 2 NMP, ATRP ve RAFT yöntemlerinin karşılaştırması [145]

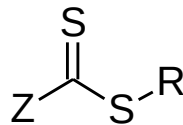
Özellik	Yaşayan/Kontrollü Polimerizasyon Yöntemleri		
	NMP	ATRP	RAFT
Monomerler	TEMPO kullanılarak stirenler Yeni nitroksitler kullanılarak akrilat ve akrilamidler Metakrilatlarla çalışmıyor	Aktif çift bağa sahip nerdeyse tüm monomerler Vinil asetatla çalışmıyor	Nerdeyse tüm monomerler
Reaksiyon Şartları	Yüksek sıcaklık Sulu çözeltide çalışıyor Oksijene hassas	Geniş sıcaklık aralığında çalışabiliyor. Sulu çözeltide çalışıyor Oksijene kısmen toleranslı	Düşük reaktiviteye sahip monomerler için yüksek sıcaklık Sulu çözeltide çalışıyor Oksijene hassas
Uç Grup / Başlatıcı	Alkoksiaminler Isıl olarak kararsız Göreceli pahalı Dönüşümü için radikal kimyası gerekiyor Stabilizatör olarak davranabiliyor	Alkil (psödö)halojenürler Isı ve ışığa karşı kararlı Ucuz ve piyasada mevcut Dönüşümü için S _N , E veya radikal kimyası Artan çapraz-büyüme basamağı için halojen değişimi	Ditiyoesterler, iyodürler ve metakrilatlar Isı ve ışığa daha az kararlı Göreceli pahalı Dönüşümü için radikal kimyası gerekli Renkli ve kokulu
Katkı Maddesi	Yok	Geçiş metal katalizörü Reaksiyon sonunda uzaklaştırılmalı ve tekrar kullanılmalı	Radikal başlatıcıları Uç grup fonksiyonelliği azalabilir Çok fazla yeni zincir başlatabilir

Çizelge 2.2’de verilen bilgiler ve reaksiyonların özellikleri dikkate alındığında her bir yöntemi diğerlerinden ayıran en önemli özelliklerini kısaca şu şekilde açıklayabiliriz [145]:

- ATRP, özel fonksiyonelliğe sahip düşük molekül ağırlıklı polimerlerin ve diğer yöntemlerle kolayca sentezlenemeyecek bazı blok kopolimerlerin üretimi için en uygun yöntemdir.
- NMP, kükürt gibi çeşitli elementler ve metallerin kesinlikle bulunmaması gereken ürünler için en iyi yöntemdir.
- RAFT, yüksek molekül ağırlıklı polimerler ve düşük reaktiviteye sahip monomerler için en uygun yöntemdir.

2.4.2 Tersinir Katılmalı-Ayrışmalı Zincir Transfer (RAFT) Polimerizasyonu

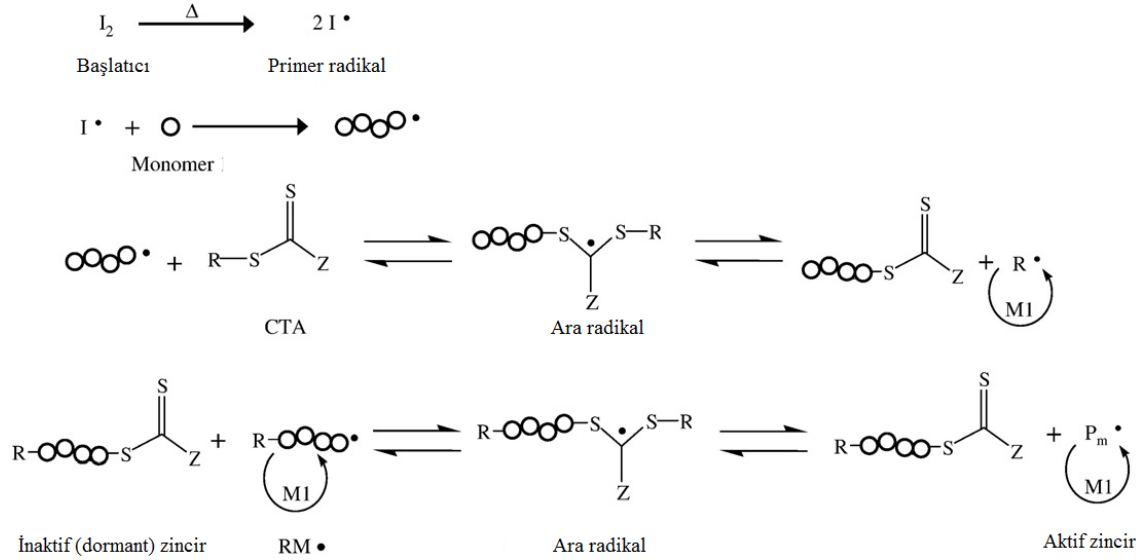
Tersinir katılmalı-ayrışmalı zincir transfer polimerizasyonu ilk defa 1999 yılında Avustralyalı CSIRO grubunun yayınladığı çalışmayla ortaya çıkmıştır [35] ve bugüne kadar binlerce çalışmaya konu olmuştur [147]. RAFT prosesi NMP ve ATRP yöntemlerinden farklı şekilde ilerlemektedir. Bu yöntem, kontrolü sağlamak için kalıcı radikal etkisi yerine dejeneratif zincir transferine dayanmaktadır [148]. Bu sebeple de RAFT polimerizasyonu, serbest radikal polimerizasyona göre yarı-özdeş polimerizasyon hızları gösterir. RAFT polimerizasyonunun en önemli özelliği ise vinil asetat ve akrilik asit gibi fonksiyonel monomerler de dahil olmak üzere nerdeyse tüm vinil monomerlerin polimerleştirilmesinde kullanılabilmesidir. RAFT polimerizasyonunun gerçekleşmesi için uygun bir zincir transfer ajanı (CTA) (Şekil 2.17) kullanılması gerekmektedir. Bu ajan tiyokarboniltiyo grubu içeren ve radikallere karşı aktif olan bir moleküldür.



Şekil 2. 17 RAFT polimerizasyonunda kullanılan zincir transfer ajanlarının genel gösterimi

2.4.2.1 RAFT Polimerizasyonunun Mekanizması

Şekil 2.18’de RAFT polimerizasyonunun genel olarak kabul edilmiş mekanizması şematik olarak gösterilmektedir. Literatürde RAFT polimerizasyonunun mekanizması basamaklar halinde şu şekilde açıklanmıştır [7], [34]:



Şekil 2. 18 RAFT polimerizasyonu için genel olarak kabul edilen mekanizma [7], [34]

- Birinci basamak başlama basamağıdır. Başlatıcı parçalanarak radikal oluşumu ve aktif radikal zincirinin başlaması sağlanır. Genellikle ısıyla radikal oluşturulmakla birlikte ışık, lazer, γ -ışınması gibi kaynaklarla da radikal oluşturulabilmektedir.
- İkinci basamakta başlama basamağında oluşan oligomerik radikaller RAFT ajanıyla reaksiyona girerler. Literatürdeki bilgilere göre, eğer uygun seçilmişse, tüm RAFT ajanı bu basamakta tüketilmektedir. Bunun sebebi olarak da çok reaktif olan C=S bağları verilmektedir. Radikaller, monomerlerdeki çift bağlardan daha reaktif olan bu bağa katılmayı tercih etmektedirler. Oluşan ara ürün orijinal RAFT ajanı ve oligomerik radikale ayrışabilir yada oligomerik RAFT ajanı ve tekrar zincir başlatan R grubuna ayrışabilir. R grubu iyi bir başlatıcı olmalıdır. R grubu kararlı haldeki radikal ara ürünündeki polimer zincirinden ya da başlatıcıdan daha hızlı ayrışabilmelidir.
- Üçüncü basamakta ayrılan R grubuna monomerler eklenerek zincirler uzamaktadır.

- Dördüncü basamakta, büyüyen polimerik radikal ve inaktif tiyokarboniltiyo grubu içeren türler arasında ana dengeye ulaşılır. Zincir transfer aşamasındaki bu türler arasındaki hızlı karşılıklı değişim, büyüyen radikal zincirlerin konsantrasyonunun kararlı ara radikallerden daha az olmasını sağlamaktadır. Bu sayede de zincir sonlanma reaksiyonunun oluşumu sınırlanmaktadır.
- Beşinci ve son basamakta, her ne kadar sınırlanmış olsa da, birleşme ya da orantısız olarak sonlanma gerçekleşir.

RAFT prosesinin dördüncü aşamasında ulaşılan denge anında ara radikal ürünü her iki yöne de ayrışabilmekte ve bu da her iki zincirin de eşit miktarda uzamasına imkan vermektedir. Proses sonunda uniform zincir büyüklükleri ve dar bir molekül ağırlığı dağılımı elde edilmektedir. Eğer monomer, CTA, başlatıcı, reaksiyon şartları ve dönüşüm doğru seçilirse molekül ağırlığı üzerinde kusursuz bir kontrol sağlanabilmektedir. Orta değerlerde dönüşümde polimerizasyonu durdurarak sonlanma reaksiyonu minimuma indirilebilmekte ve zincir ucundaki tiyokarboniltiyo ucu korunmaktadır. Zincir ucunda bu grubun kalmasıyla “yaşayan” zincir ucu ve dolayısıyla makroCTA elde edilmektedir. MakroCTA’nın zincir ucundan ikinci bir monomer kullanılarak zincir uzatılabilmektedir. RAFT prosesinin “yaşayan” özelliğine sahip olması ve nerdeyse tüm vinil monomerlerinde kullanılabilmesi çok geniş bir fonksiyonel blok kopolimer kütüphanesi oluşturulabilmesine imkan sağlamaktadır.

RAFT polimerizasyonunda elde edilen ürünün molekül ağırlığı monomerin konsantrasyonunun CTA’nın konsantrasyonuna oranı değiştirilerek kontrol edilmektedir [7]. Aşağıdaki formül kullanılarak hedeflenen molekül ağırlığı değerleri için gerekli $[M]_0/[CTA]_0$ oranı hesaplanabilmektedir.

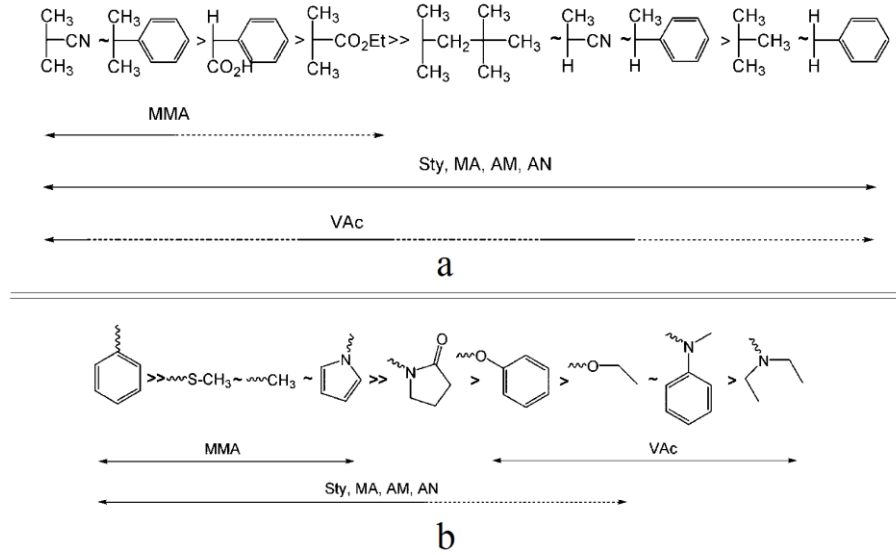
$$M_{n,teorik} = \frac{[M]_0 \times M_{w,monomer} \times \rho}{[CTA]_0} + M_{w,CTA} \quad (2.1)$$

Formül 2.1’de $M_{n,teorik}$ teorik sayıca ortalama molekül ağırlığını, $[M]_0$ monomerin başlangıç konsantrasyonunu, ρ dönüşümü, $[CTA]_0$ başlangıç CTA konsantrasyonunu, $M_{w,monomer}$ monomerin molekül ağırlığını ve $M_{w,CTA}$ ise CTA’nın molekül ağırlığını göstermektedir. Formülden anlaşıldığı üzere reaksiyon istenen dönüşüm değerinde durdurularak belirli bir molekül ağırlığı veya zincir uzunluğuna ulaşılabilir.

2.4.2.2 RAFT Polimerizasyonunu Etkileyen Faktörler

RAFT Ajanı

Başarılı bir RAFT polimerizasyonu için RAFT ajanında bulunan R ve Z grupları (Şekil 2.19) kritik öneme sahiptirler [34]. R grubu ayrışma reaksiyonunun seçiciliğini ve tekrar başlatma basamağını etkilemektedir [149]. R grubu S-R bağı mümkün olduğunca zayıflatmalıdır ve R• radikali büyüyen radikal zincirinden daha iyi bir ayrılan grup olmalıdır. R• radikali ne kadar kararlı olursa o denli kolay ayrışabilmektedir. Ancak çok kararlı olursa da yeni zincir başlatamamaktadır. Genelde polimerleştirilecek monomere yapısal olarak benzeyen R grupları kullanılmaktadır [34], [149]. Bu sayede elektronik ve yapısal özellikleri büyüyen radikale benzediğinden tekrar başlatma kabiliyeti artmaktadır. Şekil 2.19a'da RAFT polimerizasyonunda kullanılan çeşitli R grupları ve bunların uygun oldukları monomer sınıfları belirtilmektedir. R grubu polimer zincirinin α-ucunda bulunmaktadır. RAFT polimerizasyonundan önce veya sonra modifiye edilerek çeşitli fonksiyonel gruplar zincir ucuna bağlanabilmektedir. Polimerizasyondan önce R grubunun modifiye edilmesi daha fazla sayıda zincir ucunun fonksiyonelleştirilmesine imkan sağlamaktadır.

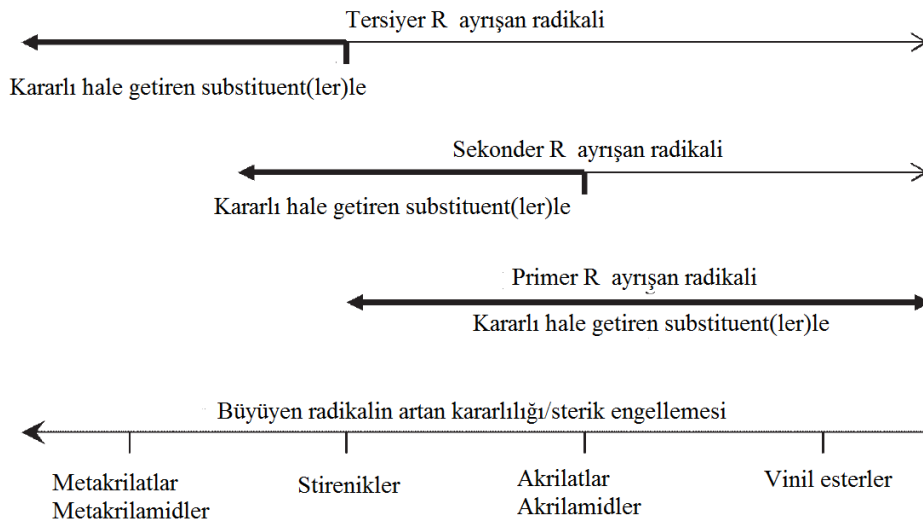


Şekil 2. 19 a) Çeşitli monomerlerin polimerizasyonu için uygun R grupları. Ayrışma hızı soldan sağa doğru azalmaktadır. Noktalı çizgiler polimerizasyonun kısmen kontrol edildiğini göstermektedir. b) Çeşitli monomerlerin polimerizasyonu için uygun Z grupları. Soldan sağa doğru ayrışma hızı artmakta, katılma hızı yavaşlamaktadır. Noktalı çizgiler polimerizasyonun kısmen kontrol edildiğini göstermektedir. [34]

Z grubu temel olarak transfer hızını etkilemektedir [149]. Z grubu tiyokarbonil grubunu aktive ederek katılma hızıyla zincir uzama hızının yarışmasını sağlamalı ve ara radikalın kararlılığını minimize etmelidir. Ama Z grubu tiyokarbonil grubunu ne kadar aktive ederse ara radikalın kararlılığını da o denli arttırmaktadır. Ara radikalın kararlılığının artması sonucu ayrışma gerçekleşmemekte ve reaksiyon inhibe edilmektedir. Şekil 2.19b’de RAFT polimerizasyonunda kullanılan çeşitli Z grupları ve bunların uygun oldukları monomer sınıfları belirtilmektedir. Z grubu polimer zincirinin ω -ucunda bulunmaktadır. Sonraki uygulamalar için çeşitli fonksiyonel gruplar Z grubu olarak zincir ucuna takılabilmektedir. Ancak zincir sonundaki tiyokarboniltiyo grubu indirgenerek tiyol ucu elde edilmektedir. Bu durumda Z grubu polimer ucunda kalmamaktadır.

Monomer

Monomerin yapısının katılma ve ayrışma reaksiyonları üzerinde önemli bir etkisi bulunmaktadır. Genellikle, daha stabil ve sterik olarak engellenmiş büyüyen radikaller için daha aktif C-S bağına sahip CTA ile daha kararlı ve sterik olarak engelli ayrılan $R\bullet$ grubu gerekmektedir [149]. Sonuç olarak akrilik monomerleri için kullanılabilen etkin RAFT ajanı sayısı metakrilat monomerleri için kullanılanlardan daha fazla olmaktadır.



Şekil 2. 20 Kararlı hale getiren substituent taşı(ma)yan R grubunun yapısına bağlı olarak bir CTA'nın etkinlik skalası [149]

Literatürdeki örnekler incelendiğinde, seçilen CTA/monomer ikilisine bağlı olarak S-R ve S-P_n bağlarının katılma hız katsayısı ve ayrışma hız katsayısı, transfer sabiti ve molekül kütlesi dağılımının kontrol miktarı bulunabilir. Şekil 2.20’de genel özellikleriyle bir

CTA'nın ilgili monomerlerle çalışabilmesi için sahip olması gereken uygun R● ayrışan radikalının yapısı gösterilmektedir.

Zincir Uzunluğu

Zincir uzunluğu aktif ve inaktif türlerin reaktivitesini etkilemektedir. Sonlanma gibi difüzyon kontrollü mekanizmaların hız katsayıları zincir uzunluğuna bağlıdır [150]. Sonlanma hız katsayısı aktif türlerin zincir uzunluğu ya da ortam viskozitesi arttıkça azalmaktadır [149].

ATRP ve NMP yöntemlerinde büyüyen türlerin deaktivasyonu nitroksit ve metal kompleksleri gibi moleküler türlerle olurken RAFT yönteminde diğer makromoleküler türlerle olmaktadır. Bu sebeple de zincir uzunluğunun RAFT yönteminin etkinliği üzerinde çok önemli bir etkisi bulunmaktadır.

Reaksiyon Sıcaklığı

RAFT polimerizasyonu oda sıcaklığıyla 140°C arasındaki sıcaklıklarda yapılabilmektedir. Sıcaklıktaki artış genelde radikal reaktivitesini ve dolayısıyla polimerizasyon hızını arttırmaktadır ancak seçicilik azalmaktadır [149]. Yapılan çalışmalarda, yüksek sıcaklıklarda RAFT polimerizasyonunda gecikmenin daha az gerçekleştiği ve daha dar molekül ağırlığı dağılımı elde edildiği bulunmuştur [148].

Reaksiyon Basıncı

RAFT polimerizasyonunun çok yüksek basınçlarda gerçekleşebildiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [151]. Basınç arttıkça polimerizasyon hızı artmaktadır. Yüksek basınçta radikal-radikal sonlanma reaksiyonu yavaşlamaktadır. Bu sebeple de daha yüksek molekül ağırlıklarına ulaşılabilir. RAFT prosesinde basınç arttıkça katılma reaksiyonu artarken ayrışma reaksiyonunun azalacağı düşünülmektedir.

Çözücü

Genel olarak serbest radikal polimerizasyonda kullanılan tüm çözücüler RAFT polimerizasyonunda da kullanılabilir. Çoğu organik çözücü, su ve alkoller gibi protik çözücüler, iyonik sıvılar ve süper kritik CO₂ çözücü olarak RAFT yönteminde

kullanılabilir. Önemli olan RAFT ajanının çözünmesidir. Polar çözücülerde ve Lewis asitlerinin olduğu ortamlarda RAFT ajanı hidroliz olabilmektedir [152].

Başlama ve $[CTA]_0/[I]_0$ Oranı

RAFT polimerizasyonun radikal kaynağı serbest radikal polimerizasyonundaki kadar önemli değildir. Polimer zincir sayısı CTA sayısı ile kontrol edilmektedir. Genellikle, ısıyla parçalanarak başlatıcılar kullanılmaktadır. Monomerlerin ısıyla kendilerinin radikal oluşturmasıyla da RAFT prosesi başlatılabilir. Ayrıca alternatif yöntemler olarak UV ve γ ışınları da kullanılmaktadır.

Sonlanma reaksiyonlarını önlemek için, prensipte, $[CTA]_0/[I]_0$ oranının mümkün olduğu kadar yüksek olması gerekmektedir [149]. Ancak molekül ağırlığı kontrolünü tam olarak sağlamak için optimal bir değer seçilmelidir.

Polimerizasyon Ortamının Konsantrasyonu

Hem monomer konsantrasyonu hem de dönüşüm oranının bir sonucu olarak ortamın viskozitesi, polimerizasyon hızını ve molekül ağırlığı dağılımını doğrudan etkilemektedir. Konsantrasyon arttıkça reaksiyon hızı artmaktadır. Ayrıca viskozite arttıkça difüzyon kontrollü reaksiyonlar (örneğin sonlanma) yavaşlamaktadır ve bu sebeple de reaksiyon hızlanarak molekül ağırlığı dağılımının genişlemesine sebep olmaktadır.

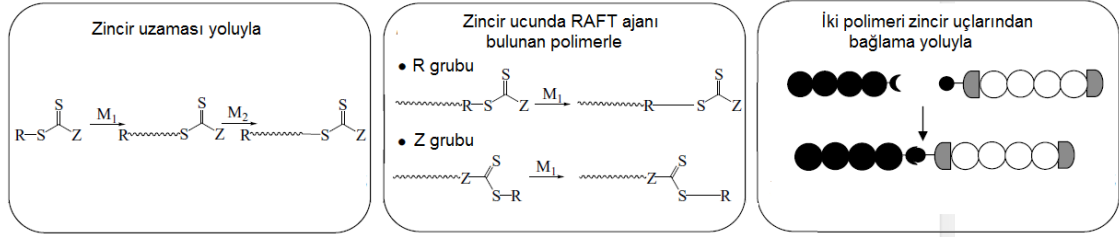
2.4.2.3 Polimer Yapıları ve Fonksiyonelliği

RAFT polimerizasyonunda neredeyse tüm vinil monomerleriyle çalışılabildiğinden birçok farklı fonksiyonel gruba sahip monomerler polimerleştirilebilmektedir. Ayrıca kullanılan RAFT ajanının Z ve R gruplarına bağlı olarak da zincir uçlarına çeşitli fonksiyonel gruplar bağlanabilmektedir. Bu gruplar ya RAFT ajanı modifiye edilerek polimerizasyondan önce eklenebilmekte [153] ya da polimerizasyon sonrasında [154], [155] eklenebilmektedir.

RAFT polimerizasyonu ile rasgele, blok, sıralı, gradient, graft ve yıldız kopolimerler kolayca sentezlenebilmektedir.

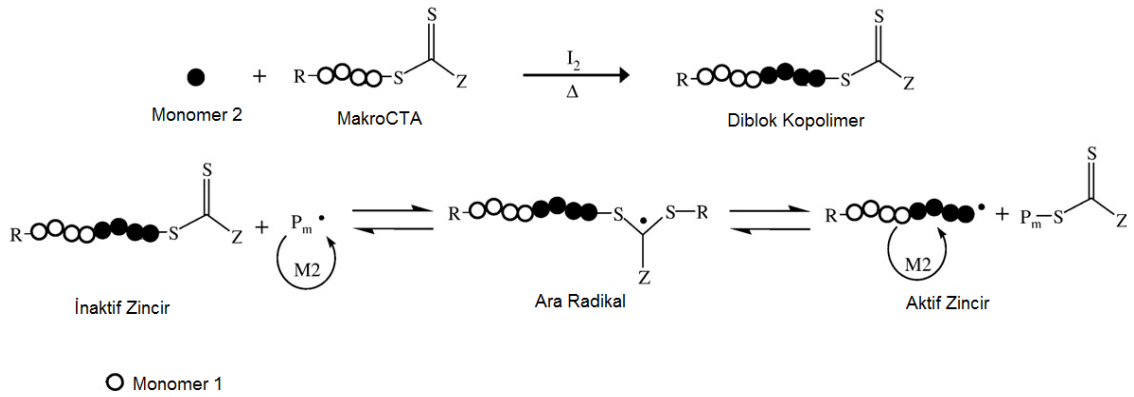
Blok Kopolimer Sentezi

RAFT polimerizasyonu ile blok kopolimer sentezinde Şekil 2.21’de de görüldüğü üzere üç farklı yol izlenebilir.



Şekil 2. 21 RAFT polimerizasyonu ile blok kopolimer üretim yöntemleri[148]

Birinci yöntemde makroCTA olarak sentezlenen bir polimer bloğun ucundan başka bir monomerle ikinci bir polimer blok uzatılabilir. Bu yöntemin mekanizması Şekil 2.22’de verilmektedir. RAFT prosesi sırasında oluşan tüm polimer zincirleri tiyokarboniltiyo uç grupları taşımaktadırlar ve bu sebeple de makroCTA olarak davranırlar. Zincir uzaması yoluyla blok kopolimer sentezi, bir monomerin makroCTA’nın bulunduğu ortamda polimerleştirilmesiyle basitçe gerçekleştirilebilir. RAFT yöntemiyle homopolimerizasyon sırasında tüm monomerler tükenmeden önce reaksiyon sonlandırılıp homopolimer izole edilirse makroCTA olarak kullanılabilirler. MakroCTA, homopolimerizasyon sırasında düşük molekül ağırlıklı RAFT ajanının üstlendiği görevi gerçekleştirmektedir.



Şekil 2. 22 RAFT polimerizasyonunda makroCTA’dan zincir uzaması yoluyla blok kopolimer sentezi [7]

RAFT polimerizasyonu ile blok kopolimer üretiminden bahsedilirken her monomerin birbiriyle blok kopolimer oluşturamayacağını söylemekte fayda bulunmaktadır. Vinil asetat ve stiren gibi birbirinden çok farklı reaktivitelere sahip monomerler aynı RAFT ajanıyla polimerleştirilememektedir, çünkü her ikisi de farklı Z grubuna ihtiyaç

duymaktadır. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda “değiştirilebilir” RAFT ajanları kullanılarak reaktiviteleri çok farklı olan monomerlerden blok kopolimerler sentezlenebilmektedir [156].

Blok kopolimer sentezi aslında homopolimer sentezine benzemektedir. Ancak burada dikkat edilmesi gereken nokta blok kopolimeri oluşturacak her monomer için aynı RAFT ajanının kullanılabilir olmasıdır. Yani her bir monomer için eşdeğer R ve Z gruplarına sahip RAFT ajanları uygun olmalıdır. Bu sebeple önce homopolimer daha sonra da kopolimer sentezlenirken Z grubu aynı olacaktır. Ancak kopolimer sentezlenirken ayrılan R grubu blok kopolimerin ilk sentezlenen bloğu olacaktır. Bu sebeple kopolimerin ilk bloğunun ayrışma kabiliyeti ve ikinci monomerle polimerizasyon başlatabilmesi kritik önem taşımaktadır. Metakrilatlar gibi kararlı radikaller oluşturan monomerler ikinci monomer olarak seçilirse blok kopolimer oluşmaz ve ikinci bir homopolimer ayrıca oluşur. Bu sebeple genellikle metakrilat tipindeki monomerlerle makroCTA oluşturulmakta ve bu zincirin ucundan ikinci polimer bloğu uzatılmaktadır [148].

RAFT tekniği ile blok kopolimer üretiminde dikkat edilmesi gereken diğer bir nokta da tiyokarboniltiyo ucunun kararlılığıdır. Isı [157], ışık [158], belirli pH aralığındaki çözeltiler [152] ve okside edici grup içeren çözücüler [159] makroCTA'nın RAFT aktivitesinin kaybına sebep olabilirler.

2.4.2.4 RAFT Polimerizasyonunun Biyolojik Uygulamalar İçin Önemi

Uygulamaya göre değişiklik gösterse de, sentetik polimerler biyolojik çalışmalarda kullanıldığında en çok dikkat edilen özellikleri molekül ağırlığı, molekül ağırlığı dağılımı, moleküler yapısı, bileşimi ve kimyasal fonksiyonelliğidir. Ayrıca temel özelliklerinde uniform karakter göstermesi de istenen diğer bir özelliktir. RAFT polimerizasyonu tüm bu özellikler üzerinde kontrol sağlamak ve uniform karakterde polimer üretimini olanaklı kılmaktadır. Bu sebeple RAFT polimerizasyonu biyolojik uygulamalarda kullanılacak polimerik yapıların üretimi için en önemli yöntemlerden biridir.

RAFT polimerizasyonu ile polimer-protein konjugatları, polimer-peptid konjugatları, polimer-DNA veya polimer-RNA konjugatları, glikopolimerler ve supramoleküler yapılar

(miseller, vesiküller, yıldız polimerler) üretilebilmektedir [34]. Ayrıca yüzey modifikasyonunda da kullanılabilir.

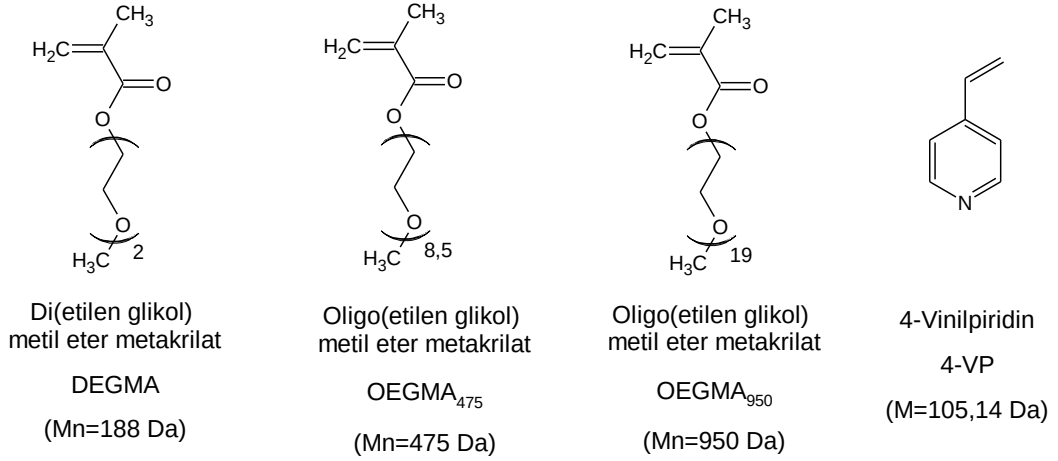
RAFT polimerizasyonunu biyoyuğulamalar için önemli hale getiren özelliklerini şu şekilde sıralayabiliriz [34]:

- Nerdeyse tüm vinil monomerlerinin su da dahil olmak üzere birçok farklı çözücü içerisinde herhangi bir ek kimyasala (metal katalizörler, vb.) ihtiyaç duymadan sadece zincir transfer ajanı ve başlatıcıyla polimerleştirilebilmesi
- Birçok fonksiyonel gruba karşı toleranslı olması sayesinde yan gruplarında ya da zincir uçlarında fonksiyonel grup taşıyan polimerler sentezlenebilmesi ve bu sayede sentezlenen polimerle biyomoleküllerin, işaretleyicilerin ya da hedefleyici moleküllerin konjugatlarının oluşturulabilmesi
- Telekelik, blok kopolimerler, graft kopolimerler, nanojeller, yıldız ve dendritik yapıların sentezlenebilmesi
- Yığın, çözelti, süspansiyon, emülsiyon ve dispersiyon polimerizasyonlarında kullanılabilmesi
- Yüzey modifikasyonu ve *in situ* polimerizasyon gibi birçok farklı substratta polimerizasyon gerçekleştirilebilmesi.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 Kimyasallar

Azoizobutironitril (Sigma-Aldrich), 4-vinilpiridin (Aldrich) (Şekil 3.1), diklorometan (Sigma-Aldrich), dietilenglikol metil eter metakrilat (Sigma-Aldrich) (Şekil 3.1), dietil eter (Merck), N,N'-dimetilformamid (Carlo Erba), metanol (Fluka), oligo(etilen glikol) metil eter metakrilat (Mn=951, Mn=475, Aldrich) (Şekil 3.1), etanolde tekrar kristallendirilmiş piren (Sigma), sodyum asetat (Sigma-Aldrich), sodyum azid (Applchem), sodyum klorür (Carlo Erba), sodyum dihidrojen fosfat (Fluka), disodyum hidrojen fosfat (Fluka), toluen (Riedel de Haen), 2,2'-[karbonotiyoilbis(tiyu)]bis[2-metilpropanoik asit] (Strem Inc., CSIRO grubu tarafından patentlidir), S-(2-siyanoprop-2-il)-S-dodesiltritiyokarbonat (Strem Inc., CSIRO grubu tarafından patentlidir), 2-[(dodesilsulfaniltiyokarbonil)sulfanil]propanoik asit (Strem Inc., CSIRO grubu tarafından patentlidir), 4-siyano-4-(tiyobenzoiltiyu)pentanoik asit (Strem Inc., CSIRO grubu tarafından patentlidir), sodyum hidroksit (Fluka), hidroklorik asit (Riedel de Haen), tetrahidrofuran (Merck) c-myc genini inhibe eden oligonükleotid (AACGTTGAGGGGCAT) (İontek). Saf su ve ultra saf su Millipore MilliQ su saflaştırma sisteminden temin edilmiştir.



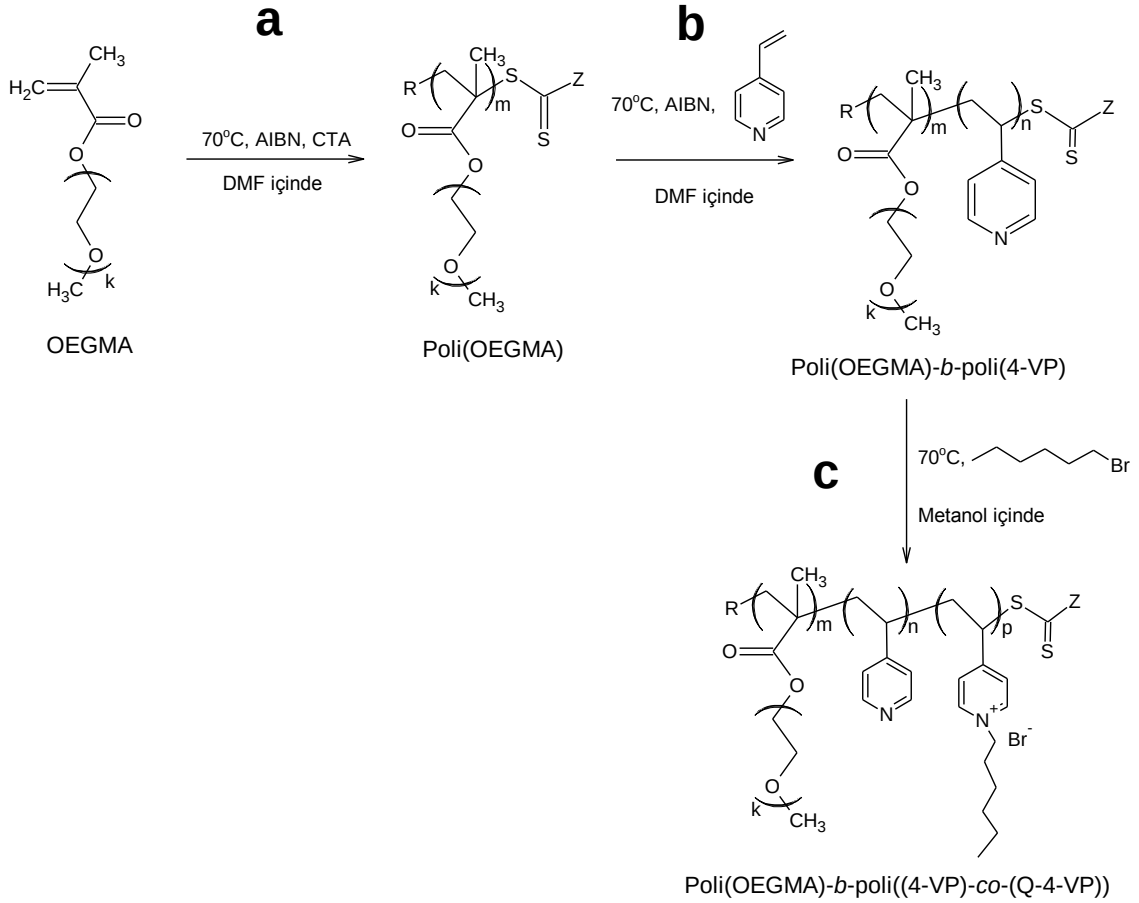
Şekil 3. 1 Tez çalışmasında kullanılan monomerler

3.2 Cihazlar

Sıcaklık kontrollü UV-Görünür bölge spektrofotometresi (Shimadzu UV-1700), ATR aparatlı FTIR spektrofotometresi (Shimadzu IR-Prestige 21), NMR spektroskopisi (Bruker Avance III 500 MHz), “steady state” floresans spektrofotometresi (Photon Technology International QM-4/2003 Quanta Master), ışık saçılması ve kırılma indisi dedektörlü boyut eleme kromatografisi (Viscotek TDA 302), dinamik ve elektroforetik ışık saçılması spektroskopisi (Malvern Zetasizer Nano ZS), AFM mikroskobu (Shimadzu SPM 9600), soğutmalı santrifüj (Sigma 3-18 K), ısıtıcı ve sıcaklık kontrollü manyetik karıştırıcı (Heidolph Hei-Tec).

3.3 Polimerlerin Sentezi

Tez kapsamında hedeflenen kopolimerlerin sentezi için gerçekleştirilen reaksiyonlar dizisi Şekil 3.2’de gösterilmektedir. Çalışmada öncelikle homopolimer sentezi (Şekil 3.2a), ardından poli(OEGMA) polimerlerinin makroCTA olarak kullanılıp blok kopolimer sentezi (Şekil 3.2b) ve daha sonrasında da blok kopolimerlerdeki 4-VP’lerin kısmen kuarternerleştirilmesi (Şekil 3.2c) gerçekleştirilmiştir.

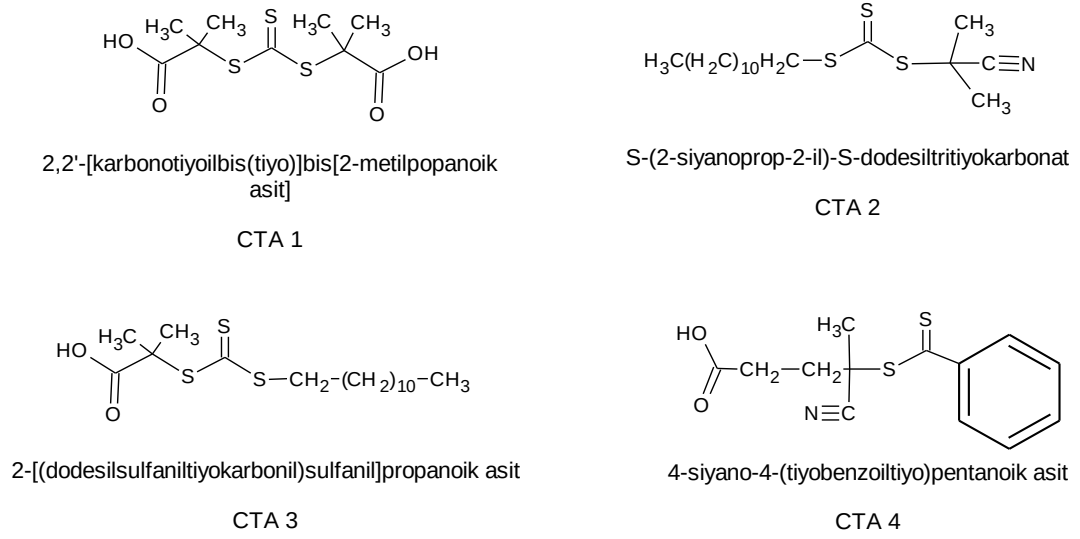


Şekil 3. 2 OEGMA ve 4-VP'nin blok kopolimerlerinin RAFT polimerizasyonu ile sentezlenmesinin şematik gösterimi

3.3.1 Homopolimerlerin Sentezi

Tez kapsamında OEGMA ve 4-VP monomerlerinin homopolimerizasyonları gerçekleştirilmiştir. Bu homopolimerlerin RAFT polimerizasyonu ile sentezlenmesi için uygun şartların saptanması amacıyla farklı RAFT ajanları ve farklı $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0$ oranlarında çalışılmıştır. Bu sebeple aşağıda her bir homopolimerin sentezi için bir adet örnek sentez prosedürü açıklanmıştır.

Poly(OEGMA)-b-poly(4-VP) blok kopolimerlerinin RAFT polimerizasyonu ile sentezlenebilmesi için öncelikle her iki bloktaki polimerlerin de aynı RAFT ajanıyla polimerleşebildiğini göstermek gerekmektedir. Çünkü aynı RAFT ajanıyla polimerleşmiyorlarsa blok kopolimer oluşmayacaktır. Bu sebeple Şekil 3.3'te gösterilen RAFT ajanlarıyla denemeler yapılarak uygun RAFT ajanı saptanmıştır. Ayrıca her iki monomer için de farklı $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0$ oranları da denenerek uygun oran saptanmıştır.



Şekil 3. 3 Tez kapsamında kullanılan RAFT ajanları

3.3.1.1 OEGMA'nın RAFT Polimerizasyonu

Tez çalışmasında farklı uzunluklarda oligo(etilen glikol) gruplarına sahip OEGMA monomerleri kullanılmış ve farklı $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0$ oranlarında polimerizasyonlar gerçekleştirilerek oluşan ürünler incelenmiştir. Tez çalışmasında sentezlenen poli(OEGMA) polimerleri için kullanılan RAFT ajanları ve $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0$ oranları Çizelge 3.1'de verilmektedir.

Tipik bir poli(OEGMA) sentezi reaksiyonu $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=75/1/0,2$ oranı için şu şekildedir: Monomer konsantrasyonu 0,5 M ve toplam çözelti hacmi 10 mL olarak seçilmiştir. Başlatıcı olarak AIBN ve RAFT ajanı olarak 4-siyano-4-(tiyobenzoiltiyu)pentanoik asit kullanılmıştır. 2,375 g OEGMA₄₇₅ ve 18,6 mg CTA4 8,83 mL DMF içinde çözülmüştür. Çözelti 30 dakika azot gazı altında tutulmuştur ve yağ banyosu içinde 70°C'ye ısıtılmıştır. Azotta tutulmuş 0,25 mL DMF içindeki 2,22 mg AIBN çözeltiye eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. Her saat başı çözelti içinden 1 mL örnek çekilmiş ve aşırı miktardaki soğuk dietil eterle çöktürölüp santrifüjlenmiştir. Eter dekantasyonla uzaklaştırılmıştır ve elde edilen pembe renkli viskoz polimer diklorometanda çözülüp tekrar soğuk eterle çöktürölmüştür. Örnek vakumlu etüvde 50°C'de bir gece kurumaya bırakılmıştır. Monomer dönüşümü gravimetrik olarak belirlenmiştir. Homopolimerlerin molekül ağırlıkları GPC ile belirlenmiştir.

Çizelge 3. 1 OEGMA monomerlerinin RAFT polimerizasyonunda kullanılan RAFT ajanları ve $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0$ oranları

Polimerleştirilen OEGMA Monomeri	Polimerizasyonda Kullanılan RAFT Ajansı	Polimerizasyonda Kullanılan $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0$ Oranları
OEGMA ₄₇₅	CTA1	100/1/0,25
	CTA2	100/1/0,25
	CTA3	100/1/0,2
	CTA4	100/1/0,2
		100/1/0,1
		100/1/0,33
		100/1/0,5
		50/1/0,2
		75/1/0,2
OEGMA ₉₅₀	CTA4	75/1/0,2
DEGMA-OEGMA ₄₇₅	CTA4	150/1/0,2

3.3.1.2 4-VP'nin RAFT Polimerizasyonu

Tez çalışmasında 4-VP monomeri farklı $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0$ oranlarında polimerizasyonu gerçekleştirilerek oluşan ürünler incelenmiştir. Tez çalışmasında sentezlenen poli(4-VP) polimerleri için kullanılan RAFT ajanları ve $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0$ oranları Çizelge 3.2'de verilmektedir.

Çizelge 3. 2 4-VP monomerinin RAFT polimerizasyonunda kullanılan RAFT ajanları ve $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0$ oranları

4-VP'nin Polimerizasyonunda Kullanılan RAFT Ajansı	4-VP'nin Polimerizasyonunda Kullanılan $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0$ Oranları
CTA1	500/1/0,25
CTA2	500/1/0,25
CTA4	500/1/0,4; 200/1/0,5

Tipik bir poli(4-VP) sentezi reaksiyonu $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=200/1/0,5$ oranı için şu şekildedir: $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=200/1/0,5$ oranı kullanılarak 4-VP'nin polimerizasyonu gerçekleştirilmiştir. Monomer konsantrasyonu 2 M ve toplam çözelti hacmi 10 mL olarak seçilmiştir. Başlatıcı olarak AIBN ve RAFT ajanı olarak 4-siyano-4-(tiyobenzoiltiyo)pentanoik asit kullanılmıştır. 2,16 mL 4-VP ve 27,9 mg CTA4 7,48 mL DMF içinde çözülmüştür. Çözelti 30 dakika azot gazı altında tutulmuştur ve yağ

banyosu içinde 70°C'ye ısıtılmıştır. Azotta tutulmuş 0,25 mL DMF içindeki 8,2 mg AIBN çözeltiye eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. Her saat başı çözelti içinden 1 mL örnek çekilmiştir ve aşırı miktardaki toluenle çöktürölüp santrifüjlenmiştir. Toluen dekantasyonla uzaklaştırılmıştır ve elde edilen katı polimer diklorometanda çözölüp tekrar tolüenle çöktürölmüştür. Örnek vakumlu etüvde 50°C'de bir gece kurumaya bırakılmıştır. Monomer dönüşümü gravimetrik olarak belirlenmiştir. Homopolimerlerin molekül ağırlıkları GPC ile belirlenmiştir.

3.3.2 Blok Kopolimerlerin RAFT Polimerizasyonu ile Sentezi

OEGMA kullanılarak sentezlenen homopolimerler blok kopolimer sentezinde makroCTA olarak kullanılmıştır. MakroCTA'dan poli(4-VP) bloğunun uzatıldığı blok kopolimer sentezi aşamasında her sentez için $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=200/1/0,5$ oranı kullanılarak 4-VP polimerleştirilmiştir.

Örnek bir blok kopolimer sentezi şu şekildedir: $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=200/1/0,5$ oranı kullanılarak kopolimer sentezlenmiştir. RAFT ajanı olarak makro-CTA ($M_n=20$ kDa) ve başlatıcı olarak AIBN kullanılmıştır. 440 mg makroCTA, 0,47 g 4-VP 1,58 mL DMF içinde çözölmüştür. Çözelti 30 dakika azot gazı altında tutulmuş ve yağ banyosu içinde 70°C'ye ısıtılmıştır. Azotta tutulmuş 0,25 mL DMF içindeki 1,8 mg AIBN çözeltiye eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. 2 saat arayla çözelti içinden 1 mL örnek çekilmiş ve aşırı miktardaki soğuk dietil eterle çöktürölüp santrifüjlenmiştir. Eter dekantasyonla uzaklaştırılmış ve elde edilen turuncu renkli viskoz polimer diklorometanda çözölüp tekrar soğuk eterle çöktürölmüştür. Örnek vakumlu etüvde 50°C'de bir gece kurumaya bırakılmıştır. Monomer dönüşümü gravimetrik olarak belirlenmiştir. Kopolimerlerin molekül ağırlıkları GPC ile belirlenmiştir.

3.3.3 Blok Kopolimerlerin Kısmen Kuarternleştirilmesi

Sentezlenen kopolimerler OEGMA ve 4-VP birimlerinin blokları halinde olduğundan amfifilik özellik taşımaktadır. Bu haliyle bu kopolimerlerin ilaç taşınmasında kullanım potansiyeli bulunmaktadır. Ancak, sentezlenen kopolimerlerin DNA ile etkileştirilerek gen transferinde kullanılabilmesi için pozitif yüklenmeleri gerekmektedir. Bu nedenle blok kopolimerlerdeki 4-VP birimleri kuarternleştirme yoluyla pozitif yüklenmiştir. Bu

amaçla, poli(OEGMA)-b-poli(4-VP) blok kopolimerleri 1-bromohekzan veya metil-6-bromohekzanoat kullanılarak kısmen kuarternerleştirilmiştir.

Örnek bir kuarternerleştirme reaksiyonu şu şekildedir: Her bir mol 4-VP monomeri için 5 mol 1-bromohekzan eklenerek reaksiyon gerçekleştirilmiştir. 1 mL metanol içinde 100 mg kopolimer ve kullanılan kopolimerin 4-VP içeriğine göre uygun miktarda 1-bromohekzan eklenip reaksiyon kabının ağzı sıkıca kapatılmıştır. Çözelti 70°C'deki yağ banyosunda Set 1 kopolimerleri için 14 ve 21 gün ısıtılmıştır. Set 2 kopolimerleri için ise bu süre 6 güne çıkarılmıştır. Süre sonunda, örnek soğuk eterle çöktürülmüş ve santrifüjlenmiştir. Fazla eter dekante edilip uzaklaştırılmıştır. Örnek vakumlu etüvde 50°C'de bir gece kurutulmuştur. Katı polimer örnekleri FTIR spektrofotometresi ile analiz edilerek kopolimerlerin kuarternerleşme dereceleri saptanmıştır. FTIR spektrumlarında 4-VP, 1600 cm⁻¹'de bant verirken kuarterner 4-VP 1640 cm⁻¹'de bant vermektedir. Bu bantların şiddetleri oranlanarak kopolimerlerin kuarternerleşme dereceleri bulunmuştur.

3.4 Blok Kopolimerlerin Misel Oluşturma Davranışlarının İncelenmesi: Floresans Prob Yükleme

Sentezlenen poli(OEGMA)-b-poli(4-VP) kopolimerlerinin misel oluşturduğunu anlamak amacıyla pH 7'de değişen konsantrasyonlarda kopolimer çözeltileri hazırlanmıştır. Ayrıca sabit konsantrasyonda farklı pH'larda kopolimer çözeltileri hazırlanarak kopolimerlerin misel oluşturma kabiliyetlerinin pH'a duyarlı olup olmadığı anlaşılmaya çalışılmıştır. Tüm örnekler piren molekülü içeren tampon çözeltilerde hazırlanmıştır. Örnek kopolimer çözeltisi hazırlama prosedürleri aşağıda verilmiştir.

pH 7'de ve değişen konsantrasyonlarda kopolimer çözeltileri hazırlamak için öncelikle 0,02 M fosfat tamponunda (pH 7,0) 2 mg/mL konsantrasyonda stok poli(OEGMA)-b-poli(4-VP) kopolimer çözeltisi hazırlanmıştır. Kopolimer çözeltisinin hazırlanacağı kaba asetonda çözülmüş ve 0,182 mg/mL konsantrasyonda 1 µL piren çözeltisi eklenmiştir. Bunun üstüne 750 µL 0,02 M fosfat tamponu (pH 7,0) eklenmiştir. Bu çözeltinin üstüne de stok kopolimer çözeltisinden 750 µL eklenerek 1,5 mL son hacme sahip blok kopolimer çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözelti en az 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Son halde piren konsantrasyonu 6.10⁻⁷ M idi. Aynı işlemler yapılarak,

farklı olarak sadece eklenen stok çözelti ve tampon çözelti hacimleri değiştirilip son hacim sabit tutularak, konsantrasyonu 0,0001-1 mg/mL aralığında değişen blok kopolimer çözeltileri hazırlanmıştır ve ardından tüm çözeltilerin analizleri gerçekleştirilmiştir.

1 mg/mL konsantrasyonda ve değişen pH değerlerinde kopolimer çözeltileri hazırlamak için öncelikle 0,02 M fosfat tamponunda (pH 7,0) 2 mg/mL konsantrasyonda stok poli(OEGMA)-b-poli(4-VP) kopolimer çözeltisi hazırlanmıştır. Kopolimer çözeltisinin hazırlanacağı kaba asetonda çözülmüş ve 0,182 mg/mL konsantrasyonda 1 µL piren çözeltisi eklenmiştir. Bunun üstüne 750 µL stok çözelti eklenmiştir. Çözeltinin pH'ı 0,5 M NaOH veya 0,5 M HCl çözeltileri kullanılarak ilgili pH değerine ayarlanmıştır. Çözeltinin son hacmi su ile 1,5 mL'ye tamamlanmış ve kopolimer örneğinin son konsantrasyonu 1 mg/ml olmuştur. Bu çözelti en az 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Son halde piren konsantrasyonu 6.10^{-7} M idi. Aynı işlemler yapılarak, pH değeri 2-9 arasında değişen ve konsantrasyonları 1 mg/mL olan blok kopolimer çözeltileri hazırlanmış ve ardından tüm çözeltilerin analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.5 Kuarterner Blok Kopolimerlerin ODN ile Komplekslerinin Hazırlanması

Kuarterner kopolimerler ile c-myc genini inhibe edecek antisens oligonükleotid değişen N/P oranlarında karıştırılarak kopolimer-ODN komplekslerinin oluşumu incelenmiştir. Bu amaçla 0,15 M NaCl içeren ve NaCl içermeyen 0,02 M fosfat tamponlarında kopolimer-ODN karışımları hazırlanarak incelenmiştir. N/P oranı kopolimerdeki pozitif yüklü kuarterner amonyum sayısının oligonükleotiddeki fosfat grubu sayısına oranını göstermektedir. Kopolimer-ODN komplekslerinin hazırlanışı aşağıda verilmiştir.

Stok blok kopolimer çözeltisi 0,5 mg/mL konsantrasyonda 0,02 M fosfat tamponunda (pH 7,0) hazırlanmıştır. Stok ODN çözeltisi 0,465 mg/mL konsantrasyonda suda hazırlanmıştır. N/P=1 oranı için 25 µL stok kopolimer çözeltisi üzerine 23 µL stok ODN eklenmiştir. 0,02 M fosfat tamponuyla son hacim 50 µL'ye tamamlanmıştır. Aynı işlemler N/P=1, 3, 5, 10, 15, 20, 30 oranlarındaki kopolimer-ODN çözeltileri için de yapılmıştır. Eklenen stok kopolimer hacmi sabit tutulurken stok ODN çözeltisinin hacmi ve tampon hacmi değiştirilerek farklı N/P oranları ayarlanmıştır. Çözeltiler vorteksle hafifçe ve çok kısa süre karıştırıldıktan sonra analiz edilmiştir.

Blok kopolimer ile ODN kompleksleri 0,15 M NaCl içeren 0,02 M fosfat tamponunda da aynı şekilde ve aynı oranlarda hazırlanarak analiz edilmiştir.

3.6 Karakterizasyon

3.6.1 Polimerlerin Boyut Eleme Kromatografisi ile Analizi

Boyut eleme kromatografisi (GPC) çalışma prensibi, polimerlerin boyutlarına göre ayrılmasına ve farklı boyuttaki polimerlerin kolonu farklı zamanlarda terk etmelerine dayanmaktadır. Bu sayede polimer çözeltisi içindeki polimer veya polimerlerin boyut dağılımı kromatogram adı verilen bir grafik halinde alınmaktadır. Elde edilen kromatogramlar kullanılarak yapılan hesaplamalar sonucunda polimer veya polimerlerin sayıca ortalama molekül kütleri (M_n), ağırlıkça ortalama molekül kütleleri (M_w) ve polidispersite değerleri (M_w/M_n) bulunabilmektedir.

Tüm GPC analizleri Viscotek marka TDA302 model GPC cihazıyla gerçekleştirilmiştir. Cihazda kırılma indisi ve dik açılı ışık saçılması dedektörleri bulunmaktadır. Mobil faz akışı ve örnek enjeksiyonu Viscotek marka GPCmax model pompa ve otomatik enjeksiyon sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Örnek enjeksiyonu 100 μ L'lik hacimle yapılmıştır. Tüm örnekler ölçümden önce 0,2 μ m'lik enjektör filtresinden süzölmüştür. Analiz öncesinde dedektörler, ilgili çalışma şartı için uygun polimer standardı (Çizelge 3.3) ile kalibre edilmiştir.

Sentezlenen polimerlerin farklı özelliklere sahip olmasından dolayı farklı kolon ve mobil fazlar kullanılarak GPC analizleri gerçekleştirilmiştir. GPC analizlerinde kullanılan çalışma şartları Çizelge 3.3'te açıklanmaktadır.

Çizelge 3. 3 GPC analizlerinde kullanılan çalışma şartları

GPC Şartı	Özellikler	
Şart 1	Kolon	: Tosoh TSKGel G3000PWxl
	Mobil Faz	: PBS, 0,15 M NaCl, pH 7,0
	Akış Hızı	: 0,8 mL/dak
	Sıcaklık	: Oda sıcaklığı
	Kalibrasyon Standardı	: Poli(etilen oksit), 10 kDa
Şart 2	Kolon	: Shimadzu GPC804
	Mobil Faz	: THF
	Akış Hızı	: 0,8 mL/dak
	Sıcaklık	: Oda sıcaklığı
	Kalibrasyon Standardı	: Polistiren, 99 kDa
Şart 3	Kolon	: Tosoh TSKGel G3000PWxl
	Mobil Faz	: 0,4 M NaCl içeren asetat tamponu
	Akış Hızı	: 0,8 mL/dak
	Sıcaklık	: Oda sıcaklığı
	Kalibrasyon Standardı	: Poli(etilen oksit), 10 kDa
Şart 4	Kolon	: Kromatek LCC 1150
	Mobil Faz	: DMF
	Akış Hızı	: 0,5 mL/dak
	Sıcaklık	: 50°C
	Kalibrasyon Standardı	: Polistiren, 99 kDa

3.6.2 Polimerlerin FTIR Spektrometresi ile Analizi

FTIR spektrometresi ile infrared bölgedeki ışınların madde üzerine gönderilip maddenin yaptığı absorpsiyon şiddeti ölçülmekte ve sonuç spektrum olarak alınmaktadır. Bu yöntem kullanılarak, çalışılan skalada, organik moleküllerin yapısındaki gruplar hakkında bilgi sahibi olunmaktadır.

Homopolimer, kopolimer ve kuarterner kopolimerlerin IR spektrumları Shimadzu marka IR-Prestige21 model FTIR spektrofotometresi ile herhangi bir numune hazırlama prosedürü uygulanmadan alınmıştır. Ölçümler ATR aparatı kullanılarak 4000-650 cm⁻¹ aralığında gerçekleştirilmiştir.

3.6.3 Polimerlerin ¹H-NMR Spektroskopisi ile Analizi

¹H NMR spektrometresi yönteminde, manyetik alanda tutulan molekülün üzerine elektromanyetik dalga gönderilerek moleküldeki H atomu çekirdeklerinin yaptıkları

rezonanslardan faydalanarak protonlar saptanmakta ve bu sayede yapıda hangi grupların olduğu anlaşılmaktadır.

Tüm polimerlerin ^1H NMR spektrumları Bruker marka 500 MHz'lik NMR spektrometresi ile alınmıştır. Örnekler D_2O , CDCl_3 veya CD_3OD 'de çözülerek spektrumları alınmıştır.

3.6.4 Blok Kopolimerlerin ve Komplekslerinin Dinamik ve Elektroforetik Işık Saçılması Yöntemleriyle İncelenmesi

Dinamik ışık saçılması yöntemiyle kolloidlerin hidrodinamik çapları ve çözelti içinde bulunan partiküllerin birbirlerine göre miktarları saptanabilmektedir. Elektroforetik ışık saçılması spektrometresi ile de kolloidlerin zeta potansiyelleri (yüzey yükleri) belirlenebilmektedir.

Kopolimer ve komplekslerin çözelti içindeki davranışları ve kolloidal özellikleri Malvern marka Zetasizer NanoZS model foton korelasyon spektrometresi ile incelenmiştir. Spektrometrede 633 nm'de çalışan lazer bulunmaktadır. Tüm örnekler ölçümden önce 0,2 μm 'lik enjektör filtresinden süzölmüştür ve tüm ölçümler 25°C'de gerçekleştirilmiştir. Ancak sıcaklığa duyarlı kopolimerlerde çökmeyi önlemek için 15°C'de ölçüm alınmıştır.

Sıcaklığa bağlı ölçümlerde sıcaklık 2°C aralıklarla arttırılmış ve çözeltinin kararlı hale gelmesi için minimum 5 dakika beklenmiştir.

3.6.5 Blok Kopolimerlerin Floresans Spektrometre ile Analizi

Floresans spektrofotometre yöntemiyle floresans özelliğe sahip moleküllerin UV ve görünür bölgede yaptıkları emisyon özellikleri incelenebilmektedir.

Piren içeren blok kopolimer çözeltileri floresans spektrofotometre ile incelenirken örnekler 300-360 nm aralığında uyarılmıştır ve 390 nm'de yaptıkları emisyon değerleri kaydedilmiştir. Slit aralığı 2 nm olarak ayarlanmıştır ve spektrumlar 0,5 nm/0,5 sn hızında kaydedilmiştir. Pirenin mikroçevresindeki hidrofobluğu anlamak için 338 nm ve 333 nm'deki floresans şiddetleri (I_{338}/I_{333}) oranlanmıştır. Tüm ölçümler 25°C'de gerçekleştirilmiştir ancak, sıcaklığa duyarlı kopolimerlerde çökmeyi önlemek için 15°C'de ölçüm alınmıştır.

3.6.6 Blok Kopolimerlerin UV-Görünür Bölge Spektrometre ile Analizi

UV-görünür bölge spektrometresi ile moleküllerin elektromanyetik spektrumun 200-700 nm aralığında absorpsiyon özellikleri incelenmektedir.

Kopolimerlerin sıcaklık değişimine karşı gösterdikleri değişimi incelemek amacıyla çözeltilerinin farklı sıcaklıklarda 550 nm'deki absorpsiyon değerleri Shimadzu UV-1700 UV-VIS spektrofotometre ile kaydedilmiştir. CPS-240A sıcaklık kontrol ünitesiyle örnek küveti istenen sıcaklığa ayarlanmıştır ve çözeltinin kararlı hale gelmesi için en az 5 dakika beklenmiştir.

3.6.7 Blok Kopolimerlerin Atomik Kuvvet Mikroskopuyla Görüntülenmesi

AFM mikroskobu ile nm boyutunda partiküllerin ve hatta atomların bir yüzey üzerine tutturulmasından sonra nm kalınlığında bir proba bu yüzeyin taranması sonucunda partiküllerin şekil ve boyutları hakkında bilgi alınmaktadır.

Shimadzu SPM 9600 marka atomik kuvvet mikroskobu (AFM) kullanılarak dinamik modda görüntü alınmıştır. Mika yüzey üzerine 5 µL örnek çözeltisi damlatılıp 5 dakika bekletilmiştir. Ardından su ile seyreltilip çözelti uzaklaştırılmıştır. Mika 20 dakika kurumaya bırakılıp görüntüleme gerçekleştirilmiştir.

BÖLÜM 4

BULGULAR

Çalışmada amaç ilaç veya DNA gibi molekülleri taşıma ve salım potansiyeline sahip, blok kopolimerlerin RAFT polimerizasyonu ile sentezi ve karakterizasyonudur. Bu amaçla OEGMA ve 4-VP'nin blok kopolimerleri ve bu kopolimerlerdeki 4-VP'lerin kısmen kuarternerleştirilmesiyle pozitif yüklü hale gelen kopolimerler üretilmiştir. Bu kapsamda yürütülen sentez çalışması Şekil 3.2'de şematik olarak gösterilmektedir.

Hedef kopolimerlerin sentezi ve ilaç/gen taşıma uygulamalarına yönelik karakterizasyonu için yürütülen çalışma basamakları şu şekilde sıralanabilir:

- Hem OEGMA'nın hem de 4-VP'nin RAFT polimerizasyonu için uygun RAFT ajanı ve reaksiyon şartlarının belirlenmesi
- OEGMA'nın RAFT polimerizasyonu ile makroCTA sentezi
- 4-VP'nin makroCTA kullanılarak RAFT polimerizasyonu ile amfifilik blok kopolimer sentezi
 - Sentezlenen bu amfifilik blok kopolimerlerde misel oluşumunun ve misele hidrofobik molekül yüklenmesinin araştırılması
- Sentezlenen amfifilik blok kopolimerdeki 4-VP'lerin kısmen kuarternerleştirilmesiyle pozitif yüklü blok kopolimerlerin sentezi
 - Pozitif yüklü kopolimerlerin c-myc genini inhibe edecek antisens oligonükleotid ile kompleks oluşturmalarının araştırılması

4.1 Homopolimerlerin Sentezi

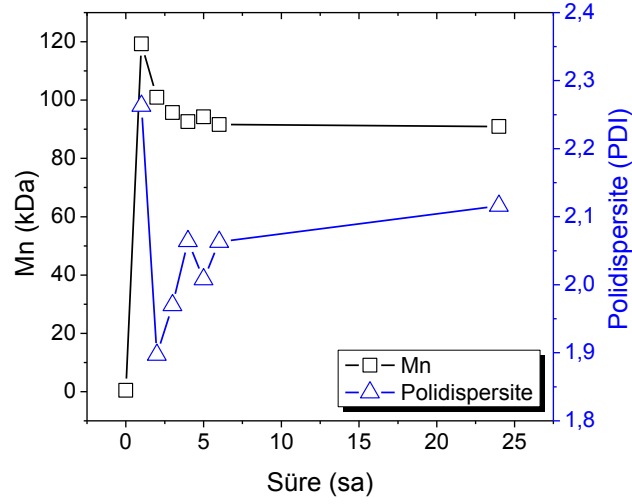
Poli(OEGMA)-b-poli(4-VP) blok kopolimerlerinin RAFT polimerizasyonu ile sentezlenebilmesi için öncelikle her iki polimerin de aynı RAFT ajanıyla polimerleşebildiğini göstermek gerekmektedir. Çünkü aynı RAFT ajanıyla polimerleşmiyorlarsa blok kopolimer oluşmayacaktır. Bu sebeple Şekil 3.3'te gösterilen RAFT ajanlarıyla denemeler yapılarak her iki monomerin polimerizasyonu için uygun RAFT ajanı saptanmıştır. Ayrıca her iki monomerin polimerizasyonu için de farklı $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0$ oranları denenerek uygun oran saptanmıştır.

4.1.1 OEGMA'nın RAFT Polimerizasyonu

Tez çalışmasında üç farklı OEGMA monomeri kullanılmıştır (Şekil 3.1). Bu üç monomerin de aktif merkezleri aynı olduğundan ve sadece sahip oldukları etilen glikol birimlerinin sayısı değiştiğinden reaktiviteleri aynıdır. Bu sebeple aynı RAFT ajanı ve reaksiyon şartlarında polimerleştirilebilmektedirler. Polimerizasyonlarındaki tek fark ise aynı molekül ağırlığında polimere ulaşmak için farklı $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0$ oranının kullanılmasının gerekmesidir. Bu monomerler aynı reaktiviteye sahip olduklarından hepsi için ortak şartları belirlemek amacıyla sadece OEGMA₄₇₅ ile çalışmalara başlanmıştır.

İlk olarak CTA1 ajanıyla OEGMA₄₇₅'in RAFT polimerizasyonu yapılmıştır. Polimerizasyon 70°C sıcaklıkta ve DMF içinde gerçekleştirilmiştir. %100 dönüşümde molekül ağırlığı (M_n) 50 kDa olan polimer elde edebilmek için (2.1) nolu formül kullanılarak $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0$ oranı 100/1/0,25 olarak belirlenmiştir. Bu polimerizasyon sonrasında elde edilen polimerler Şart 1'de çalışan GPC'de (Çizelge 3.3) incelenmiştir ve sonuçlar Şekil 4.1 ile Çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Polimerizasyon sonucunda monomer dönüşümünün lineer olarak artmadığı görülmüştür. RAFT polimerizasyonunda polimerin molekül ağırlığı zamanla birlikte artması gerekmektedir ancak Şekil 4.1'den görüldüğü üzere polimerizasyonun başlangıcında yüksek molekül ağırlığı elde edilmektedir. Ayrıca ilerleyen süreyle molekül ağırlığı azalmaktadır. Elde edilen polimerlerin polidispersite (PDI) değerleri de 2'ye çok yakındır. RAFT yöntemiyle sentezlenen polimerler 1-1,2 arasında PDI değerlerine sahip olmakta ve monodispers karakter göstermektedir. PDI değerinin 2 ve daha yukarıda olması serbest radikal

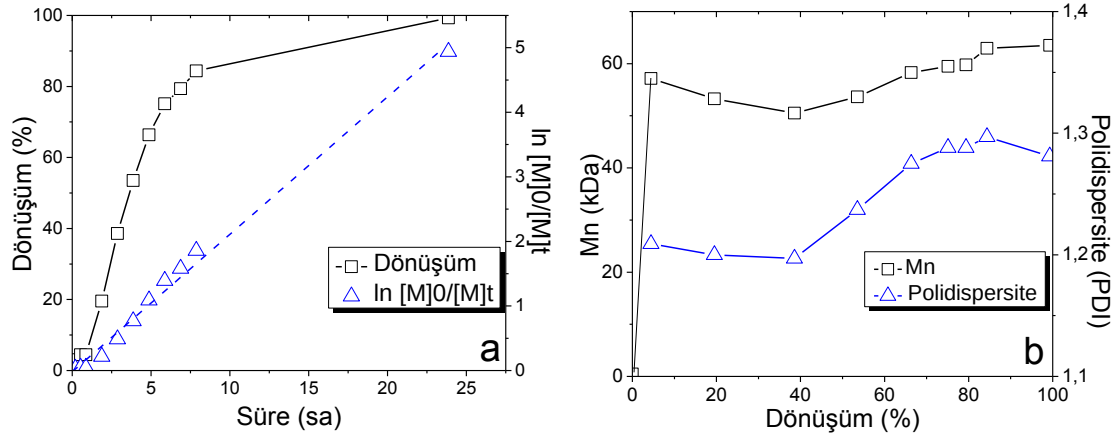
polimerizasyonun gerçekleştiğini göstermektedir. CTA1 ajanı bu şartlarda çalışmamış ve RAFT polimerizasyonu gerçekleşmemiştir.



Şekil 4. 1 CTA1 ile sentezlenen poli(OEGMA₄₇₅) homopolimerlerinin molekül ağırlıklarının (Mn) ve polidispersitelerinin (PDI) zamana bağlı olarak değişimi

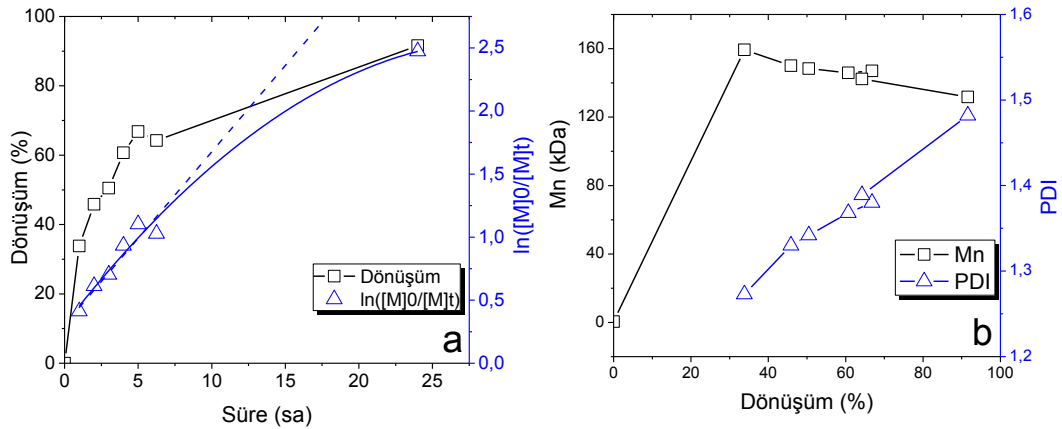
CTA1 ajanı çalışmadığı için aynı şartlarda CTA2 ajanı kullanılarak OEGMA₄₇₅ polimerleştirilmeye çalışılmıştır. Şartlar aynı tutularak sadece CTA ajanı değiştirilerek yapılan polimerizasyon sonrasında elde edilen sonuçlar Şekil 4.2 ile Çizelge 4.1'de verilmektedir.

Şekil 4.2a'da görüldüğü üzere monomerin polimere dönüşümü zamanla artmakta ve $\ln[M]_0/[M]_t$ ile zaman arasında lineer bir ilişki bulunmaktadır. Şekil 4.2b'de ise molekül ağırlığının ve polidispersitenin %dönüşüme bağlı olarak değişimi verilmektedir. Şart 1'de çalışan GPC'de yapılan analizler sonucunda molekül ağırlığı reaksiyonun başlangıcında yüksek değere ulaşmış ve daha sonra çok az artmıştır. RAFT polimerizasyonunda ve yaşayan/kontrollü radikal polimerizasyonlarda olması gereken lineer artış burada gözlenmemiştir. Polidispersite değeri ise 1,2-1,3 aralığında bulunmaktadır. Önceki polimerizasyondan farklı olarak monodisperse yakın özellikte polimerlerin sentezlendiği görülmektedir. Ancak reaksiyon sırasında kontrollü polimerizasyon gerçekleşmemiş ve CTA2 ajanı da bu şartlarda tam olarak çalışmamıştır.



Şekil 4. 2 a) CTA2 ile sentezlenen poli(OEGMA₄₇₅)'in zamana bağlı olarak dönüşümü ve kinetiği. b) CTA2 ile sentezlenen poli(OEGMA₄₇₅)'in %dönüşüme bağlı olarak molekül ağırlığında ve polidispersitesindeki değişim.

CTA3 kullanılarak poli(OEGMA₄₇₅) homopolimerinin sentezine devam edilmiştir. Bu reaksiyonda $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0$ oranı 100/1/0,2 olarak alınmış, diğer şartlar sabit tutulmuştur. Reaksiyona ait kinetik değerler ve oluşan polimerlerin fizikokimyasal değerleri Şekil 4.3 ile Çizelge 4.1'de verilmektedir. Molekül ağırlığı ve polidispersite değerleri Şart 1'de çalışan GPC cihazıyla elde edilmiştir.

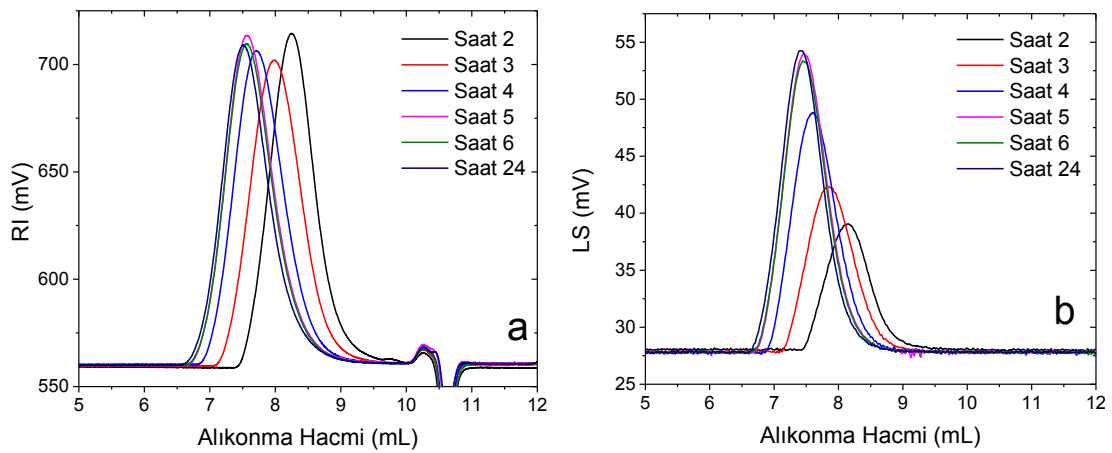


Şekil 4. 3 a) CTA3 ile sentezlenen poli(OEGMA₄₇₅)'in zamana bağlı olarak dönüşümü ve kinetiği. b) CTA3 ile sentezlenen poli(OEGMA₄₇₅)'in %dönüşüme bağlı olarak molekül ağırlığında ve polidispersitesindeki değişim.

Şekil 4.3a'da görüldüğü üzere monomerin polimere dönüşümü zamanla artmaktadır. $\ln([M]_0/[M]_t)$ ile zaman arasındaki lineer ilişki reaksiyonun 5. saatinden sonra sapmaktadır. Bu sapma ortamdaki monomerin azaldığını göstermektedir. Şekil 4.3b'de ise molekül ağırlığının ve polidispersitenin %dönüşüme bağlı olarak değişimi verilmektedir. Molekül ağırlığı reaksiyonun başlangıcında yüksek değere ulaşmış ve

daha sonra azalmıştır. RAFT polimerizasyonunda olması gereken lineer artış burada da gözlenmemiştir. Polidispersite değeri ise 1,2-1,5 aralığında bulunmaktadır. Reaksiyon sırasında kontrollü polimerizasyonun gerçekleşmemiş ve CTA3 ajanı da bu şartlarda çalışmamıştır.

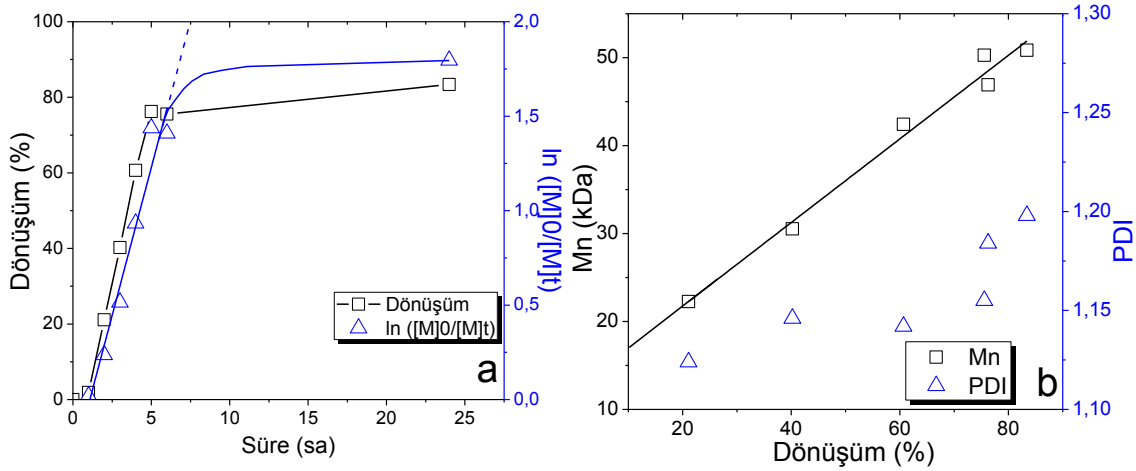
Sonraki denemede ise CTA4 kullanılarak OEGMA monomerinin RAFT polimerizasyonu incelenmiştir. $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0$ oranı yine 100/1/0,2 olarak alınmıştır. Molekül ağırlığı ve polidispersite analizi için Şart 1’de çalışan GPC cihazı kullanılmıştır. Şekil 4.4’te reaksiyon çözeltisinden saat başı alınan örneklerin çöktürülmesiyle elde edilen polimerlere ait GPC kromatogramları verilmektedir.



Şekil 4. 4 CTA4 ile sentezlenen poli(OEGMA₄₇₅)’lerin kırılma indisi (a) ve ışık saçılması (b) dedektörlerinden alınan GPC kromatogramları.

Şekil 4.4a’da verilen kırılma indisi (RI) dedektöründen alınmış GPC kromatogramlarındaki alıkonma hacmi 7,2-8,5 mL arasında değişen pikler farklı saatlerde çöktürülmüş poli(OEGMA₄₇₅) homopolimerlerine ait piklerdir. Bu dedektörden alınan sinyali polimerin konsantrasyonu ile ilişkilidir ve tüm polimerler cihaza aynı konsantrasyonda verilmiştir (her bir polimere ait pikin alanı 133 ± 2 mVmL’dir). Reaksiyon süresi ilerledikçe polimerin alıkonma hacmi azalmakta yani polimer zinciri büyümektedir. Şekil 4.4b’de ise aynı polimerlerin ışık saçılması dedektöründen alınmış GPC kromatogramları bulunmaktadır. Bu dedektörden alınan sinyal polimerin konsantrasyonu ve molekül kütlesi ile doğrudan ilişkilidir. Her biri aynı konsantrasyondaki polimerlerin pik alanlarının reaksiyon ilerledikçe arttığı yani polimerlerin molekül kütlelerinin arttığı şekilde görülmektedir. Bu kromatogramlar

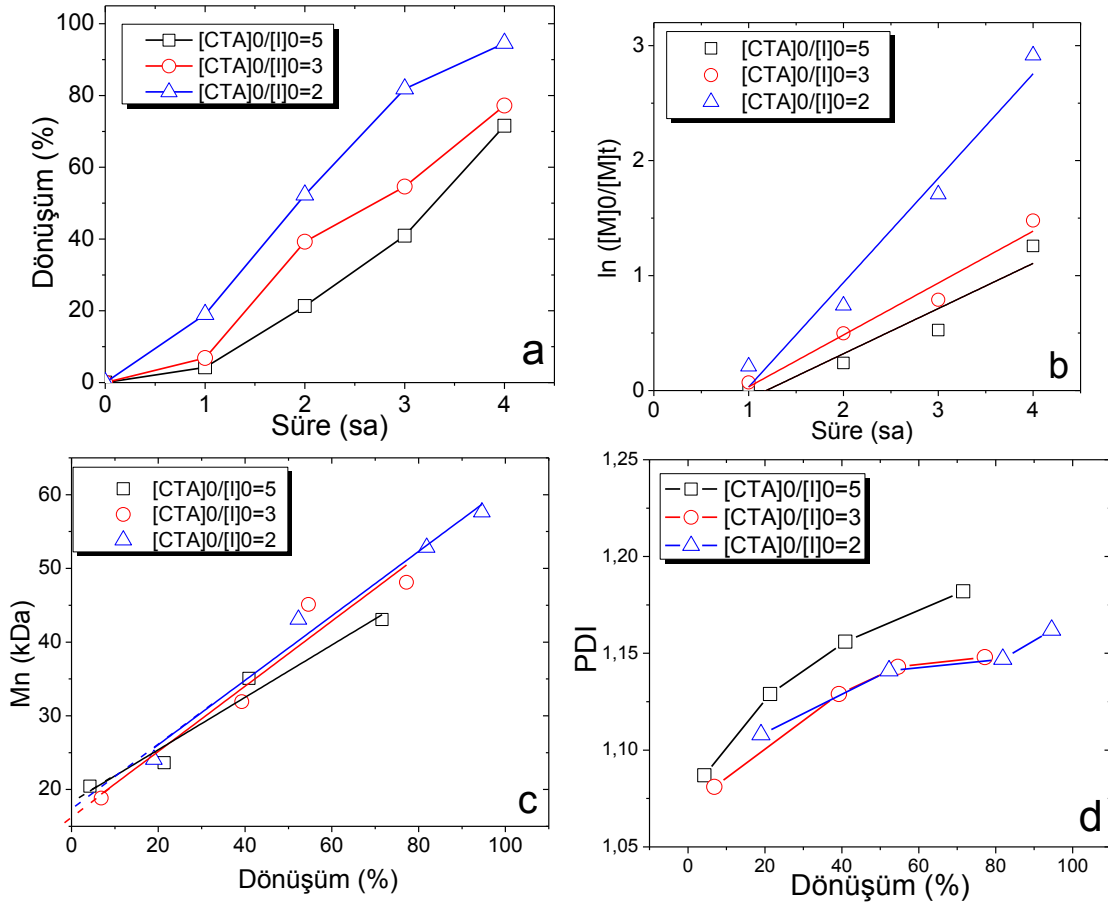
kullanılarak elde edilen sonuçlar ve reaksiyona ait kinetik veriler Şekil 4.5 ve Çizelge 4.1’de verilmektedir.



Şekil 4. 5 a) CTA4 ile sentezlenen poli(OEGMA₄₇₅)’in zamana bağlı olarak dönüşümü ve kinetiği. b) CTA4 ile sentezlenen poli(OEGMA₄₇₅)’in %dönüşüme bağlı olarak molekül ağırlığında ve polidispersitesindeki değişim.

Şekil 4.5a’da görüldüğü üzere monomerin polimere dönüşümü zamanla artmaktadır. Ayrıca polimerizasyon bir gecikmeden sonra başlamakta ve $\ln([M]_0/[M]_t)$ ile zaman arasındaki lineer ilişki reaksiyonun 6. saatinden sonra sapmaktadır. Monomerin tükenmesinden ötürü bu sapma gerçekleşmektedir. Şekil 4.5b’de ise molekül ağırlığının ve polidispersitenin %dönüşüme bağlı olarak değişimi verilmektedir. Molekül ağırlığının monomer dönüşümüyle birlikte lineer olarak arttığı şekilde görülmektedir. Ancak, reaksiyonun başlangıcında molekül ağırlığı çok hızlı artmıştır. Polidispersite değeri ise 1,1-1,2 aralığında değişmektedir. Sonuçlar ışığında CTA4 kullanıldığında RAFT polimerizasyonunun gerçekleştiğini söyleyebiliriz.

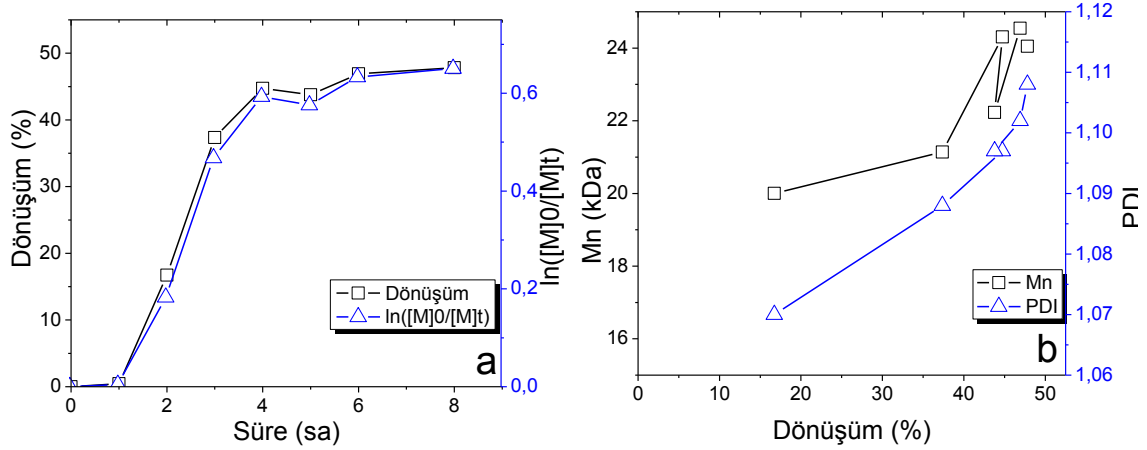
Sonraki aşamada, $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0$ oranının OEGMA’nın RAFT polimerizasyonuna etkisi incelenmiştir. İlk olarak, reaksiyon başlangıcındaki gecikme ve molekül ağırlığındaki ani artışı önlemek amacıyla $[M]_0/[CTA]_0$ oranı 100’de sabit tutulup farklı $[CTA]_0/[I]_0$ oranlarında ($[CTA]_0/[I]_0=2, 3, 5, 10$) reaksiyon tekrarlanmıştır. Şekil 4.6 ve Çizelge 4.1’de bu reaksiyonlardan elde edilen sonuçlar verilmektedir.



Şekil 4. 6 CTA4 kullanılarak farklı $[CTA]_0/[I]_0$ oranlarında yapılan OEGMA₄₇₅'in RAFT polimerizasyonunda zamana bağlı olarak % monomer dönüşümü (a), polimerizasyonunun kinetiği (b), sentezlenen poli(OEGMA₄₇₅)'in %dönüşüme bağlı olarak molekül ağırlığı (c) ve polidispersite (d) değişimi.

$[CTA]_0/[I]_0 = 10$ oranında yapılan reaksiyonda polimerizasyon gerçekleşmemiştir. Oranı düşürdükçe yani kullanılan başlatıcı miktarı arttıkça monomer dönüşümü ve molekül ağırlıklarında artış olduğu Şekil 4.6'da görülmektedir. Ancak reaksiyonun gecikmeli olarak başlaması ve başlangıçta yüksek molekül ağırlıklı polimerlerin oluşmasının $[CTA]_0/[I]_0$ oranına bağlı olmadığı gösterilmiştir. Bu konu ileride ayrıntılı olarak tartışılacaktır.

$[M]_0/[CTA]_0$ oranının etkisini incelemek ve daha düşük molekül ağırlıklı polimerler elde etmek amacıyla $[M]_0/[CTA]_0$ oranı 50'ye düşürülmüştür. Reaksiyon sonucu elde edilen veriler Şekil 4.7 ve Çizelge 4.1'de gösterilmektedir.



Şekil 4. 7 CTA4 ile $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=50/1/0,2$ oranında sentezlenen poli(OEGMA₄₇₅)'in, a) zamana bağlı olarak dönüşümü ve kinetiği, b) %dönüşüme bağlı olarak molekül ağırlığında ve polidispersitesindeki değişim.

OEGMA₄₇₅, CTA4 ile $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=50/1/0,2$ oranında polimerleştirildiğinde reaksiyon gecikmeli olarak başlamış ve 4. saatten sonra polimerizasyonun sonlandığı görülmüştür. Molekül ağırlığı da reaksiyon başlangıcında yüksek değerlere ulaşmış ve daha sonra az miktarda artmıştır. Hedeflendiği gibi daha yüksek $[M]_0/[CTA]_0$ oranlarına kıyasla daha düşük molekül ağırlıklarına ulaşılmıştır. PDI değeri ise 1-1,1 arasında değişmektedir. OEGMA'nın bu şartlarda da RAFT yöntemiyle polimerleştirilebildiği gösterilmiştir.

Çizelge 4. 1 OEGMA₄₇₅'in farklı [M]₀/[CTA]₀/[I]₀ ve RAFT ajanı ile polimerizasyonu sonucu elde edilen monomer dönüşümü, molekül ağırlığı ve polidispersite değerleri

RAFT Ajanı	[M] ₀ /[CTA] ₀ /[I] ₀	Süre (sa)	%Dönüşüm ¹	Mn _{Teorik} ² (Da)	Mn _{GPC} ³ (Da)	PDI
CTA1	100/1/0,25	1	*	*	119300	2,26
		2	*	*	100900	1,90
		3	*	*	95700	1,97
		4	*	*	92600	2,06
		5	*	*	94300	2,01
		6	*	*	91600	2,06
		24	*	*	90900	2,12
CTA2	100/1/0,25	0,2	3,03	1719	*	*
		0,53	4,46	2399	*	*
		0,9	4,44	2390	57160	1,21
		1,9	19,53	9558	53200	1,2
		2,9	38,57	18599	50500	1,2
		3,9	53,52	25701	53600	1,24
		4,9	66,36	31799	58300	1,28
		5,9	75,12	35959	59500	1,29
		6,9	79,37	37979	59800	1,29
		7,9	84,38	40359	63000	1,3
CTA3	100/1/0,2	23,9	99,28	47439	63500	1,28
		1	33,81	16341	159400	1,27
		2	45,85	22059	150000	1,33
		3	50,48	242555	148300	1,34
		4	60,68	29102	145800	1,37
		5	66,79	32005	147000	1,38
		6,25	64,23	30788	142200	1,39
CTA4	100/1/0,2	24	91,59	43782	131800	1,48
		1	1,88	1172	*	*
		2	21,10	10303	22300	1,12
		3	40,22	19384	30500	1,15
		4	60,68	29101	42400	1,14
		5	76,26	36500	46900	1,18
		6	75,57	36172	50300	1,16
CTA4	100/1/0,2	24	83,40	39895	50800	1,20
		1	4,25	2299	20500	1,09
		2	21,35	10419	23600	1,13
		3	40,93	19719	35100	1,16
CTA4	100/1/0,2	4	71,58	34279	43100	1,18

¹Polimerizasyon sonucunda oluşan ürünler tartılarak hesaplanmıştır.

²Dönüşüm değerleri Formül 2.1'e yerleştirilerek hesaplanmıştır.

³Polimerizasyon sonucunda oluşan ürünler boyut eleme kromatografisiyle incelenerek hesaplanmıştır.

Çizelge 4. 1 OEGMA₄₇₅'in farklı [M]₀/[CTA]₀/[I]₀ ve RAFT ajanı ile polimerizasyonu sonucu elde edilen monomer dönüşümü, molekül ağırlığı ve polidispersite değerleri (devam)

CTA4	100/1/0,33	1	6,86	3539	18800	1,08
		2	39,24	18919	31900	1,13
		3	54,61	26219	45100	1,14
		4	77,21	36952	48100	1,15
CTA4	100/1/0,5	1	18,99	9299	24100	1,11
		2	52,30	25119	43100	1,14
		3	81,85	39159	52800	1,15
		4	94,58	45205	57600	1,16
CTA4	50/1/0,2	1	0,45	385	*	*
		2	16,72	4250	20000	1,07
		3	37,36	9152	21100	1,09
		4	44,74	10904	24300	1,10
		5	43,77	10674	22200	1,10
		6	46,91	11420	24500	1,10
		7	47,81	11633	24100	1,11
		8	47,81	11633	24100	1,11

*Yeterli miktarda örnek olmadığından bulunamamıştır.

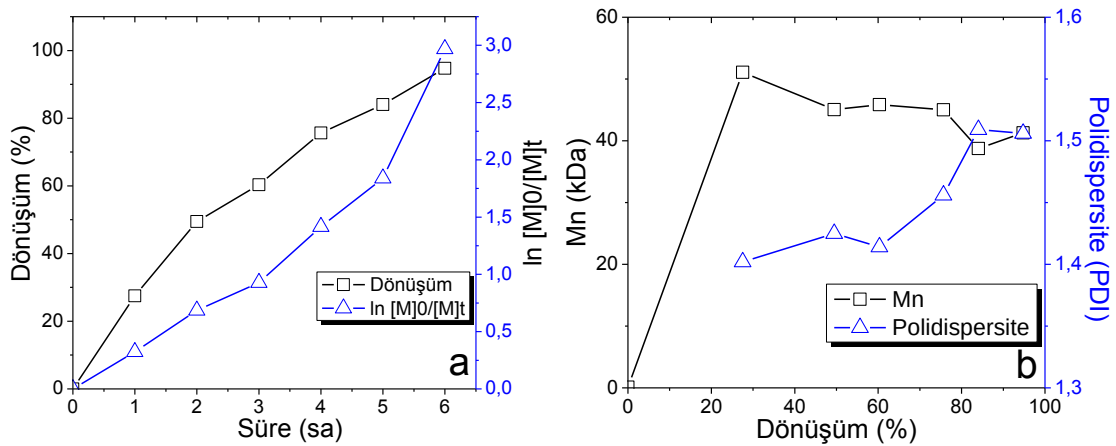
4.1.2 4-Vinilpiridin RAFT Polimerizasyonu

4-VP'nin RAFT polimerizasyonunda, OEGMA için kullanılan aynı RAFT ajanları kullanılarak her iki monomer için de uygun RAFT ajanı bulunmaya çalışılmıştır. Öncelikle, %100 dönüşümde molekül ağırlığı (Mn) 50 kDa olan polimer elde edebilmek için [M]₀/[CTA]₀ oranı (2.1) nolu formül kullanılarak 500 olarak belirlenmiş ve tüm reaksiyonlar bu oran üzerinden gerçekleştirilmiştir.

Poli(4-VP) örneklerinin GPC ile incelenmesinde POEGMA'ların incelenmesinde kullanılan farklı bir mobil faz kullanılmıştır. Poli(4-VP)'lerin analizinde kullanılan mobil faz 0,4 M NaCl içeren asetat tamponudur. GPC analizlerinde kullanılan TOSOH G3000PWxl isimli kolonda poli(4-VP) gibi polikasyon özellikli polimerlerle çalışıldığında her ne kadar tuzlu bir mobil fazla çalışılsa da kolon dolgu malzemesi ve polimer arasında etkileşim olabilmekte ve sonuçların doğruluğunu etkilemektedir. Molekül ağırlığı hesabını polimerin konsantrasyonundan bağımsız hale getirmek ve bu sayede daha doğru sonuçlar elde edebilmek için poli(4-VP) örneklerinin diferansiyel refraktometre ile dn/dc değeri 0,2516 olarak saptanmıştır ve GPC cihazındaki molekül

ağırlığı hesabında kullanılmıştır. Elde edilen değer literatüre ($dn/dc_{\text{Poli(2-VP)}}=0,25$) yakın bir değerdir [160].

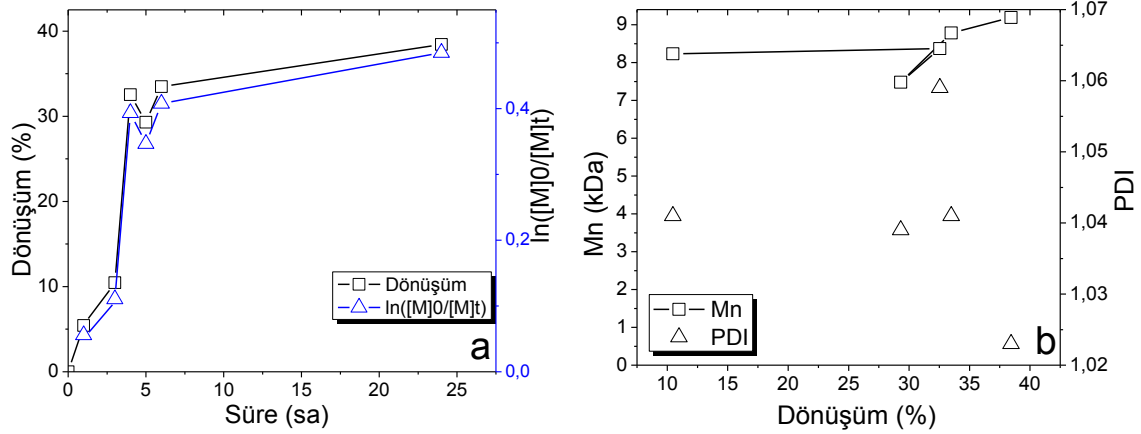
Poli(4-VP)'nin RAFT yöntemiyle sentezi için yapılan ilk çalışmada CTA1 kullanılarak $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=500/1/0,25$ oranında polimerizasyon gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.2). Şekil 4.8a'da görüldüğü üzere süreyle birlikte monomerin polimere dönüşüm oranı artmakta ancak $\ln[M]_0/[M]_t$ ile süre arasında lineer bir ilişki bulunmamaktadır. Şart 3'te çalışan GPC cihazından elde edilen molekül ağırlığı (M_n) değerleriyle oluşturulan dönüşüm- M_n grafiğine (Şekil 4.8b) bakıldığında da aralarında lineer bir ilişki olmadığı açıkça görülmektedir. Ayrıca polidispersite değerlerinin 1,4-1,5 arasında değiştiğini ve RAFT polimerizasyonunda beklediğimiz 1,2'nin altındaki değerlere ulaşmadığını görmekteyiz. Bu sonuçların ışığında bu şartlarda CTA1 ajanıyla RAFT polimerizasyonunun gerçekleşmediği anlaşılmaktadır.



Şekil 4. 8 CTA1 ile sentezlenen poli(4-VP)'nin, a) zamana bağlı olarak dönüşümü ve kinetiği, b) %dönüşüme bağlı olarak molekül ağırlığında ve polidispersitesindeki değişim.

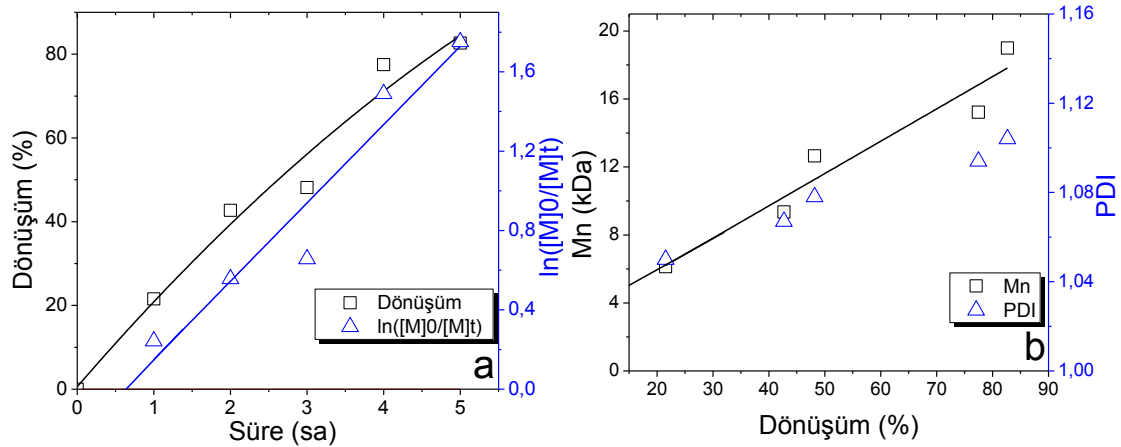
CTA2 ile aynı şartlarda yapılan PVP polimerizasyonunun sonucunda elde edilen polimerin veriminin çok düşük olmasından dolayı GPC ile analizi yapılmamış ve sonuçları verilmemiştir.

Daha sonra CTA4 ile poli(4-VP)'nin RAFT polimerizasyonu incelenmiştir. $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0$ oranı 500/1/0,4 olarak seçilmiştir. Sentezlenen poli(4-VP) homopolimerlerine ait sonuçlar Şekil 4.9 ve Çizelge 4.2'de verilmektedir.



Şekil 4. 9 CTA4 ile $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=500/1/0,4$ oranında sentezlenen poli(4-VP)'nin, a) zamana bağlı olarak dönüşümü ve kinetiği, b) %dönüşüme bağlı olarak molekül ağırlığında ve polidispersitesindeki değişim.

Şekil 4.9'daki sonuçlar ışığında bu oranda RAFT polimerizasyonunun olmadığı görülmektedir. Çünkü molekül ağırlığında monomer dönüşümüne bağlı olarak bir artış söz konusu değildir. Ancak $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0$ oranı 200/1/0,5 olarak değiştirilip reaksiyon tekrarlandığında molekül ağırlığının lineer olarak arttığı görülmüştür (Şekil 4.10, Çizelge 4.2).



Şekil 4. 10 CTA4 ile $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=200/1/0,5$ oranında sentezlenen poli(4-VP)'nin, a) zamana bağlı olarak dönüşümü ve kinetiği, b) %dönüşüme bağlı olarak molekül ağırlığında ve polidispersitesindeki değişim.

Şekil 4.10a'da görüldüğü üzere $\ln([M]_0/[M]_t)$ ile reaksiyon süresiyle lineer olarak artmaktadır. Ayrıca poli(4-VP) polimerlerinin hem PDI değerleri 1,2'den küçüktür hem de molekül ağırlıkları monomer dönüşümüyle lineer olarak artmaktadır (Şekil 4.10b). Sonuç olarak, CTA4 kullanılarak RAFT polimerizasyonu ile kontrollü olarak poli(4-VP) sentezlenmiştir.

Şu ana kadar gösterilen sonuçlar ışığında hem OEGMA₄₇₅'in hem de 4-VP'nin RAFT polimerizasyonu için uygun RAFT ajanının CTA4 olduğu net şekilde ortaya konulmuştur. Her iki monomer de bu ajanla polimerleştirildiğinde polidispersite değerleri 1'e yakın çıkmış ve ayrıca molekül ağırlıkları da dönüşüm değerleriyle lineer olarak artmıştır. Diğer taraftan, uygun RAFT ajanı dışında uygun çalışma şartları da belirlenmiştir. Çalışmanın sonraki aşamasında bu RAFT ajanı ve çalışma şartları kullanılarak diblok kopolimer RAFT polimerizasyonu ile üretilenektir.

Çizelge 4. 2 4-VP'nin farklı $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0$ ve RAFT ajanı ile polimerizasyonu sonucu elde edilen monomer dönüşümü, molekül ağırlığı ve polidispersite değerleri

RAFT Ajanı	$[M]_0/[CTA]_0/[I]_0$	Süre (sa)	%Dönüşüm ¹	Mn _{Teorik} ² (Da)	Mn _{GPC} ³ (Da)	PDI
CTA1	500/1/0,25	1	27,50	14734	51100	1,40
		2	49,48	26288	45000	1,43
		3	60,32	31991	45800	1,41
		4	75,64	40044	45000	1,46
		5	84,02	44445	38700	1,51
		6	94,77	50097	41300	1,51
CTA4	500/1/0,4	1	5,42	3128	*	*
		2	*	*	*	*
		3	10,47	5783	8200	1,04
		4	32,54	17385	8400	1,06
		5	29,31	15687	7500	1,04
		6	33,49	17884	8800	1,04
		24	38,44	20486	9200	1,02
CTA4	200/1/0,5	1	21,56	4812	6100	1,05
		2	42,70	9257	9350	1,07
		3	48,16	10406	12650	1,08
		4	77,48	16571	15200	1,09
		5	82,66	17660	19000	1,10

*Yeterli miktarda örnek olmadığından bulunamamıştır.

¹ Polimerizasyon sonucunda oluşan ürünler tartılarak hesaplanmıştır.

² Dönüşüm değerleri Formül 2.1'e yerleştirilerek hesaplanmıştır.

³ Polimerizasyon sonucunda oluşan ürünler boyut eleme kromatografisiyle incelenerek hesaplanmıştır.

4.2 Kopolimerlerin Sentezi ve Kısmen Kuarternerleştirilmesi

Poli(OEGMA)-b-poli(4-VP) blok kopolimerlerinin RAFT polimerizasyonu ile sentezi için öncelikle OEGMA monomeri CTA4 ajanıyla polimerleştirilecektir. Ardından, poli(OEGMA) makroCTA olarak kullanılarak zincir ucundan 4-VP polimerleştirilerek diblok kopolimer oluşturulacaktır. İlk olarak OEGMA'nın polimerleştirilmesinin iki amacı bulunmaktadır:

- OEGMA, metakrilat türevi olduğu için ikinci blok olarak kullanılırsa diblok kopolimer oluşmayabilecektir.
- Poli(OEGMA) bloğu, diblok kopolimer suda çözündüğünde oluşturacağı misellerin kabuğunda bulunacaktır. Bu sebeple, kullanılan RAFT ajanının R grubunda bulunan fonksiyonel grup (karboksilik asit) miselin dışında kalacaktır. Bu da misel kabuğuna hedefleyici moleküllerin bağlanmasına imkan verecektir.

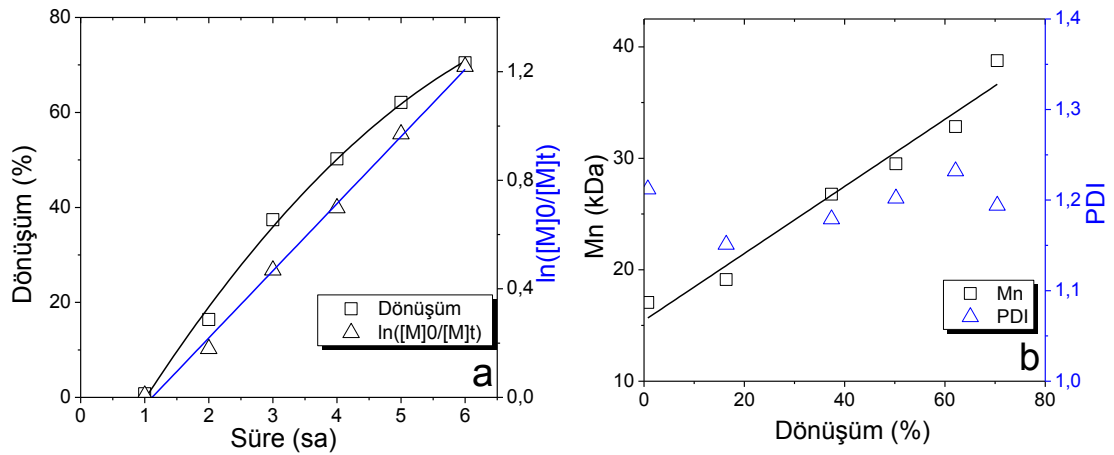
Diblok kopolimer sentezi bu aşamada iki farklı set halinde oluşturulmuş ve oluşan yapıların farklı özelliklerinin anlaşılması için ayrı ayrı incelenmişlerdir. Bu iki set kopolimerleri şu şekilde açıklayabiliriz:

- Set 1: Bu seride, öncelikli amaç hedeflenen diblok kopolimerin sentezlenebildiğini göstermektir. Bu set kopolimerlerin sentezinin diğer amaçlardan biri, aynı poli(OEGMA) zincir uzunluğuna fakat farklı poli(4-VP) zincir uzunluklarına sahip polimerlerin çözelti içindeki davranışlarında meydana gelen değişimin incelenmesidir. Diblok kopolimerlerin kuarternerleştirilmesiyle oluşan pozitif yüklü kopolimerlerin yüksüz kopolimerlerle karşılaştırılmalı olarak incelenmesi de bu set kopolimerlerin sentezinin diğer bir amacıdır.
- Set 2: Bu seri kopolimerlerin sentezinin öncelikli amacı farklı OEGMA monomerleri kullanarak aynı molekül ağırlığında poli(OEGMA) bloğu içeren ve aynı molekül ağırlığına sahip blok kopolimerler sentezleyerek OEGMA monomerinin sahip olduğu etilen glikol zincirlerinin uzunluğunun oluşan yapıya etkisini incelemektir. Ayrıca, sentezlenen kopolimerlerin sıcaklığa duyarlı olup olmadıklarının araştırılması da bu set kopolimerlerin sentezinin bir amacıdır.

iki set halinde hazırlanan kopolimerlerin birbirleriyle karışmaması için ilerleyen bölümlerde Set 1 kopolimerleri S1-O_x-V olarak ve Set 2 kopolimerleri de S2-O_x-V olarak adlandırılacaklardır.

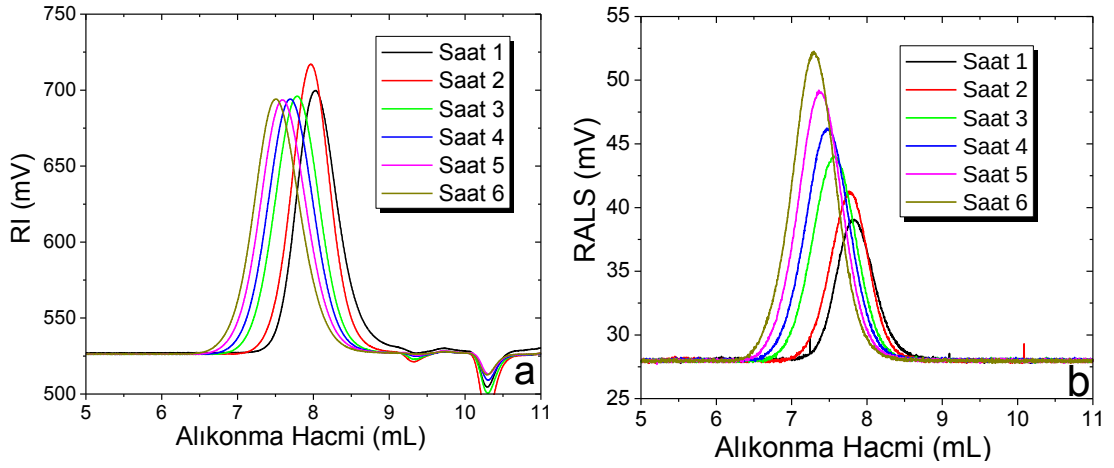
4.2.1 Set 1 Kopolimerlerin Sentezi

Bu set kopolimerlerin sentezine OEGMA₄₇₅ monomerinin CTA4 kullanılarak RAFT polimerizasyonu ile başlanmıştır. $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=75/1/0,2$ oranı kullanılarak poli(OEGMA₄₇₅) homopolimerinin sentezi gerçekleştirilmiştir. RAFT yöntemi ile gerçekleşen polimerizasyon reaksiyonuna ait kinetik ve molekül ağırlığı grafikleri Şekil 4.11 ve Çizelge 4.3'te gösterilmektedir.



Şekil 4. 11 CTA4 ile $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=75/1/0,2$ oranında sentezlenen poli(OEGMA₄₇₅)'in, a) zamana bağlı olarak dönüşümü ve kinetiği, b) %dönüşüme bağlı olarak molekül ağırlığında ve polidispersitesindeki değişim.

Şekil 4.11a'da reaksiyon kinetiğinin 1. dereceden ilerlediği ve molekül ağırlıklarının dönüşümle beraber lineer olarak arttığı (Şekil 4.11b) görülmektedir. Ayrıca polidispersite değerleri de 1,15-1,23 arasında (Şekil 4.11b) değişmektedir. Bu bilgiler ışığında reaksiyonun RAFT polimerizasyonu ile kontrollü olarak gerçekleştiği söylenebilmektedir. Ancak sonuçlara bakıldığında, önceki OEGMA₄₇₅ polimerizasyonlarında olduğu gibi, molekül ağırlığının reaksiyon başlangıcında yüksek değerlere ulaştığı ve reaksiyonun gecikmeli olarak başladığı görülmektedir.



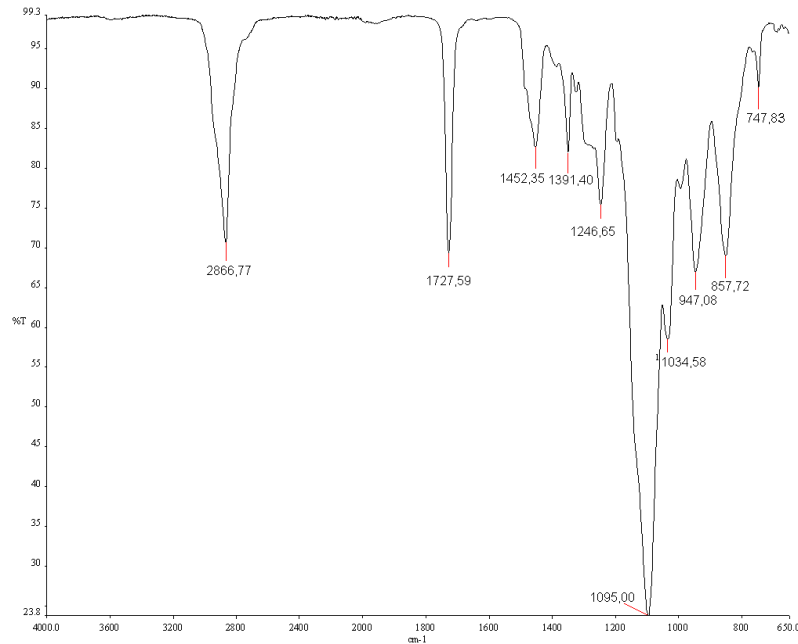
Şekil 4. 12 CTA4 ile $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=75/1/0,2$ oranında sentezlenen poli(OEGMA₄₇₅)'lerin GPC analizlerinden elde edilen farklı dedektörlere ait kromatogramları. a) Kırılma indisi kromatogramları, b) ışık saçılması kromatogramları.

Şekil 4.12'de CTA4 ile $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=75/1/0,2$ oranında sentezlenen poli(OEGMA₄₇₅)'lerin Şart 1'de çalışan GPC cihazından alınan kromatogramları verilmektedir. Kırılma indisi (RI) dedektöründen alınmış GPC kromatogramlarındaki alıkonma hacmi 7,5-8,0 mL arasında değişen pikler farklı saatlerde çöktürülmüş ve cihaza eşit konsantrasyonda verilmiş poli(OEGMA₄₇₅) homopolimerlerine ait piklerdir. Reaksiyon süresi ilerledikçe polimerin alıkonma hacmi azalmakta yani polimer zinciri büyümektedir. Şekil 4.12b'de ise aynı polimerlerin ışık saçılması dedektöründen alınmış GPC kromatogramları bulunmaktadır. Her biri aynı konsantrasyondaki polimerlerin pik alanlarının reaksiyon ilerledikçe net bir şekilde arttığı yani polimerlerin molekül kütlelerinin arttığı şekilde görülmektedir. Bu kromatogramlardan elde edilen molekül ağırlığı ve molekül ağırlığı dağılımı değerleri kullanılarak Şekil 4.11b oluşturulmuştur.

Çizelge 4. 3 OEGMA₄₇₅'in RAFT polimerizasyonu sonucu elde edilen monomer dönüşümü, molekül ağırlığı ve polidispersite değerleri

RAFT Ajanı	[M] ₀ /[CTA] ₀ /[I] ₀	Süre (sa)	%Dönüşüm ¹	Mn _{Teorik} ² (Da)	Mn _{GPC} ³ (Da)	PDI
CTA4	75/1/0,2	1	0,76	549	17050	1,21
		2	16,38	6114	19550	1,15
		3	37,39	13599	26800	1,18
		4	50,23	18173	29500	1,20
		5	62,11	22405	32850	1,23
		6	70,44	25373	38750	1,19

CTA4 ile [M]₀/[CTA]₀/[I]₀=75/1/0,2 oranında sentezlenen poli(OEGMA₄₇₅)'lerden 2. saatte çöktürülen polimer (Mn=19548 Da) makroCTA olarak seçilmiştir ve sonraki aşamada bu polimer zincirinin ucundan poli(4-VP) zinciri uzatılmıştır. Daha sonraki bölümlerde karışıklığa sebep olmamak için bu polimere makroCTA1 adı verilmiştir. MakroCTA1'e ait IR ve ¹H-NMR spektrumları sırasıyla Şekil 4.13 ve 4.14'te verilmektedir.

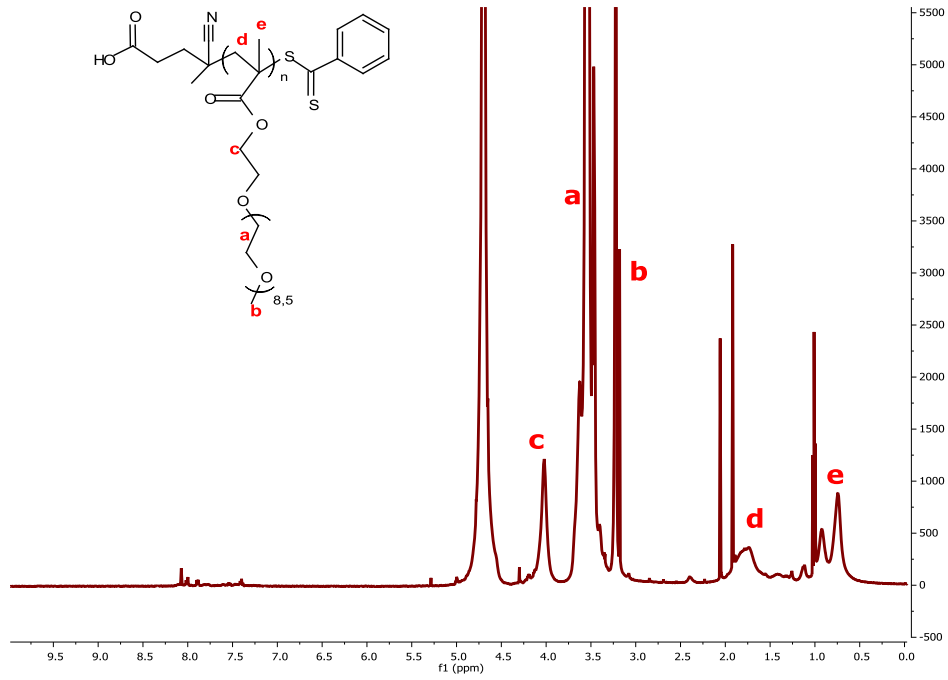


Şekil 4. 13 MakroCTA1'e ait FTIR spektrumu

¹ Polimerizasyon sonucunda oluşan ürünler tartılarak hesaplanmıştır.

² Dönüşüm değerleri Formül 2.1'e yerleştirilerek hesaplanmıştır.

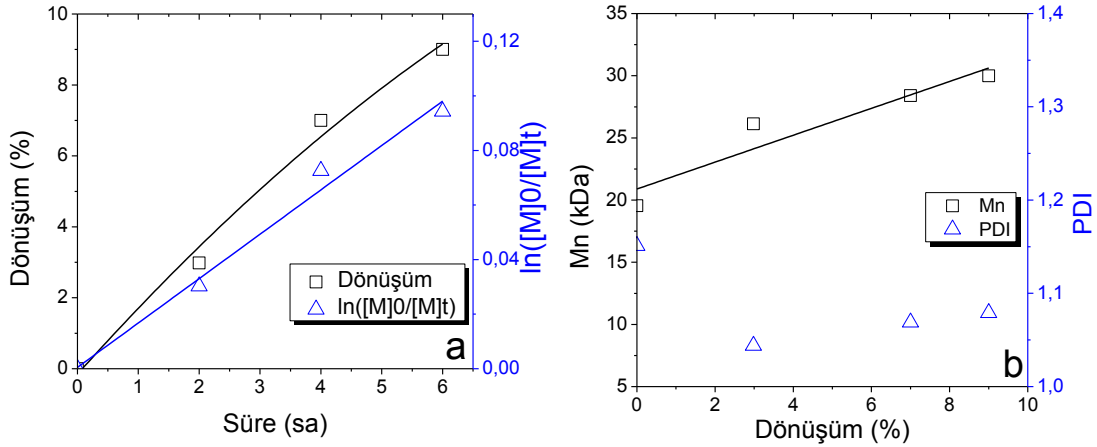
³ Polimerizasyon sonucunda oluşan ürünler boyut eleme kromatografisiyle incelenerek hesaplanmıştır.



Şekil 4. 14 MakroCTA1'e ait ^1H NMR spektrumu

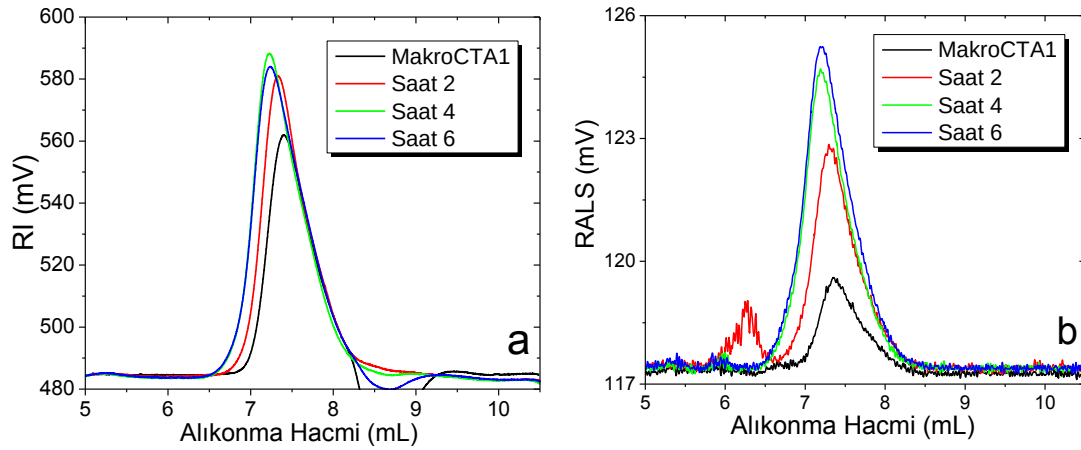
MakroCTA1'e ait FTIR spektrumu (Şekil 4.13) incelendiğinde $1727,59\text{ cm}^{-1}$ 'de çıkan keskin bant polimerdeki $\text{C}=\text{O}$ grubuna, $2866,77\text{ cm}^{-1}$ 'deki bant $-\text{CH}_2-$ ve $-\text{CH}_3$ gruplarına ve $1095,00\text{ cm}^{-1}$ 'de çıkan bant $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ grubuna aittir. ^1H -NMR spektrumunda (Şekil 4.14) ise $3,54$ ve $3,22\text{ ppm}$ 'de sırasıyla polimerin yan zincirindeki PEG zincirlerindeki metilen protonlarına ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$) (a) ve metil protonlarına ($-\text{O}-\text{CH}_3$) (b) aittir. $4,02\text{ ppm}$ 'de çıkan pik ise PEG zincirinin metakrilattaki $-\text{COO}-$ grubuyla bağlandığı yerdeki metilen protonlarına aittir. Polimerin ana zincirindeki metilen protonları $1,78\text{ ppm}$ 'de ve metakrilata ait metil protonları ise $0,75-0,92\text{ ppm}$ aralığında çıkmıştır. $4,7\text{ ppm}$ 'deki pik D_2O 'ya aittir.

MakroCTA1'in yapısı ispatlandıktan sonra diblok kopolimerin ikinci bloğu oluşturulmaya başlanmıştır. Bu amaçla makroCTA1 RAFT ajanı olarak kullanılmış ve $[\text{M}]_0/[\text{CTA}]_0/[\text{I}]_0=200/1/0,5$ oranında 4-VP polimerleştirilmiştir. Polimerizasyon sonucunda elde edilen kopolimerlere ait kinetik veriler ve molekül ağırlığı değerleri Şekil 4.15'te verilmektedir.



Şekil 4. 15 MakroCTA1 ile $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=200/1/0,5$ oranında 4-VP'nin polimerleştirilmesiyle sentezlenen poli(OEGMA₄₇₅)-b-poli(4-VP)'nin a) Zamana bağlı olarak monomer dönüşümü ve kinetiği, b) %Dönüşüme bağlı olarak molekül ağırlığında ve polidispersitesindeki değişim.

Şekil 4.15a'da görüldüğü üzere 4-VP monomerinin makroCTA1 kullanılarak gerçekleştirilen RAFT polimerizasyonunda monomer dönüşümü lineer olarak artmakta ve reaksiyon kinetiği 1. dereceden ilerlemektedir. Ancak polimerizasyon veriminin (en fazla %9 civarında) çok düşük olduğu görülmektedir. Şekil 4.15b'de ise molekül ağırlığının monomer dönüşümüyle beraber arttığı ve polidispersite değerlerinin 1,2'den küçük olduğu görülmektedir. Şekil 4.16'da ise bu kopolimerlerin ve makroCTA1'in Şart 4'te çalışan GPC cihazından alınan kromatogramları verilmektedir. Kırılma indisi kromatogramlarında kopolimerlerin piklerinin makroCTA1'den daha erken çıktığı görülmektedir. Ayrıca ışık saçılması kromatogramlarında da kopolimerlerin pik alanlarının reaksiyon süresiyle beraber net bir şekilde arttığı görülmektedir.



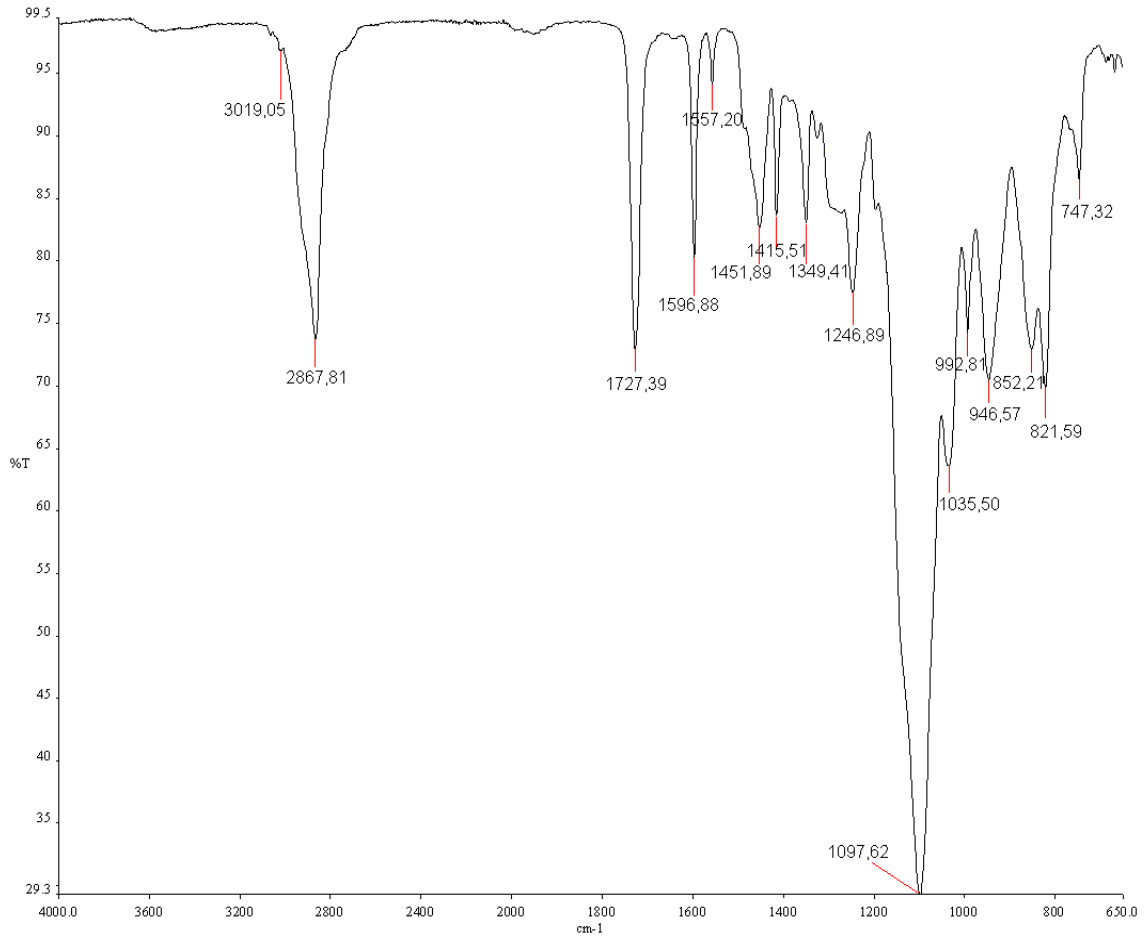
Şekil 4. 16 MakroCTA1 ile $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=200/1/0,5$ oranında 4-VP'nin polimerleştirilmesiyle sentezlenen poli(OEGMA₄₇₅)-b-poli(4-VP)'lerin GPC analizlerinden elde edilen farklı dedektörlere ait kromatogramları. a) Kırılma indisi kromatogramları, b) ışık saçılması kromatogramları.

Daha sonraki bölümlerde karışıklığa sebep olmamak için sentezlenen blok kopolimerlere ait veriler Çizelge 4.4'te gösterilmekte ve her bir kopolimer adlandırılmaktadır. Yapılan reaksiyon sonucunda aynı poli(OEGMA₄₇₅) bloğuna sahip ancak poli(4-VP) zincir uzunlukları birbirlerinden farklı üç farklı kopolimer elde edilmiştir.

Çizelge 4. 4 MakroCTA1 ile $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=200/1/0,5$ oranında 4-VP'nin polimerleştirilmesiyle sentezlenen poli(OEGMA₄₇₅)-b-poli(4-VP) kopolimerleri

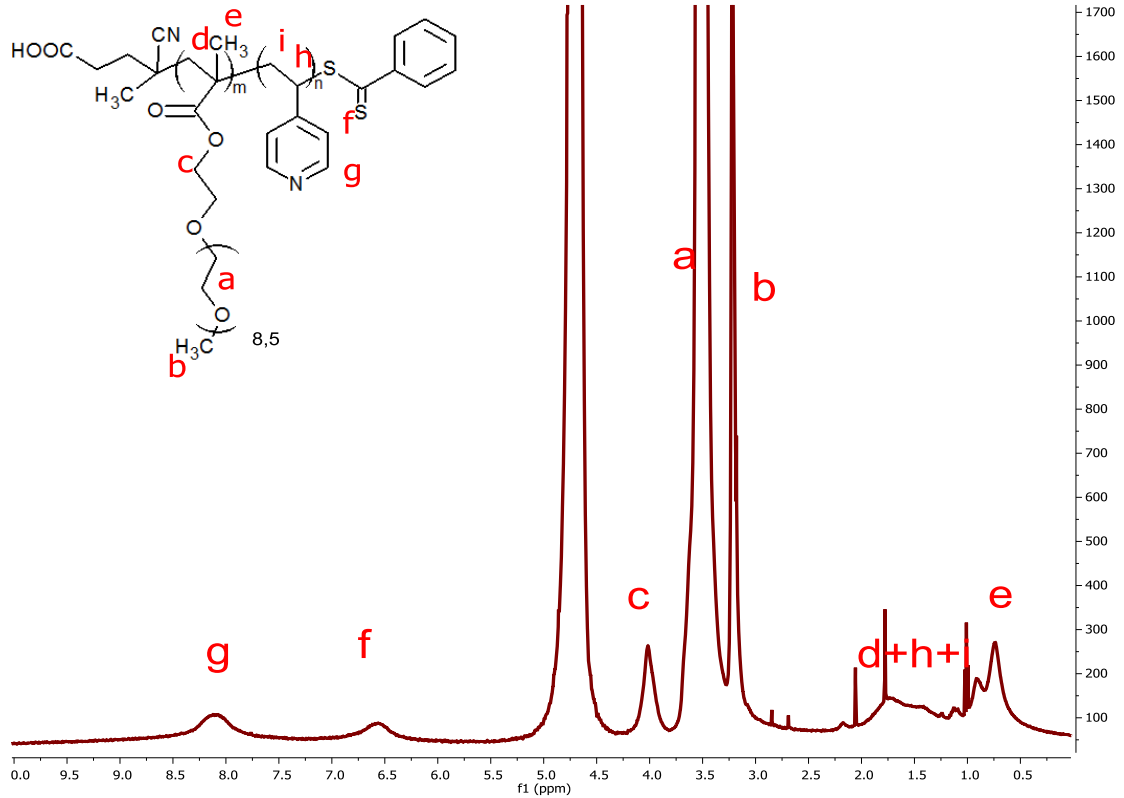
Polimerin Adı ve Kodu	Reaksiyon Süresi (sa)	Mn (Da)	PDI
Poli(OEGMA ₄₇₅) (MakroCTA1)	0	19550	1,15
Poli(OEGMA ₄₇₅)-b-poli(4-VP) (S1-O₄₇₅-V1)	2	26100	1,04
Poli(OEGMA ₄₇₅)-b-poli(4-VP) (S1-O₄₇₅-V2)	4	28400	1,07
Poli(OEGMA ₄₇₅)-b-poli(4-VP) (S1-O₄₇₅-V3)	6	30000	1,08

Kopolimerlerin kimyasal yapılarını doğrulamak için S1-O₄₇₅-V3 kopolimeri FTIR ve ¹H-NMR spektroskopi yöntemleriyle incelenmiştir. S1-O₄₇₅-V3 kopolimerine ait FTIR spektrumunda (Şekil 4.17) makroCTA1'den farklı olarak 1596,88 cm⁻¹'de ve 3019,05 cm⁻¹'de çıkan bantlar sırasıyla piridin halkasına (halka gerilmesi) ve piridin halkasındaki =C-H gruplarına aittir.



Şekil 4. 17 S1-O₄₇₅-V3 kopolimerine ait FTIR spektrumu

S1-O₄₇₅-V3 kopolimerinin ¹H NMR spektrumunda (Şekil 4.18) ise makroCTA1'den farklı olarak 8,10 ve 6,57 ppm'de çıkan pikler sırasıyla piridin halkasındaki "g" ve "f" protonlarına aittir. Poli(4-VP) bloğunun ana zincirindeki -CH₂- ve -CH- protonları ise 1,5-2 ppm aralığında çıkmıştır.



Şekil 4. 18 S1-O₄₇₅-V3 kopolimerinin ¹H-NMR spektrumu

Bu sonuçlar ışığında RAFT polimerizasyonu ile kontrollü olarak blok kopolimer üretildiği anlaşılmaktadır.

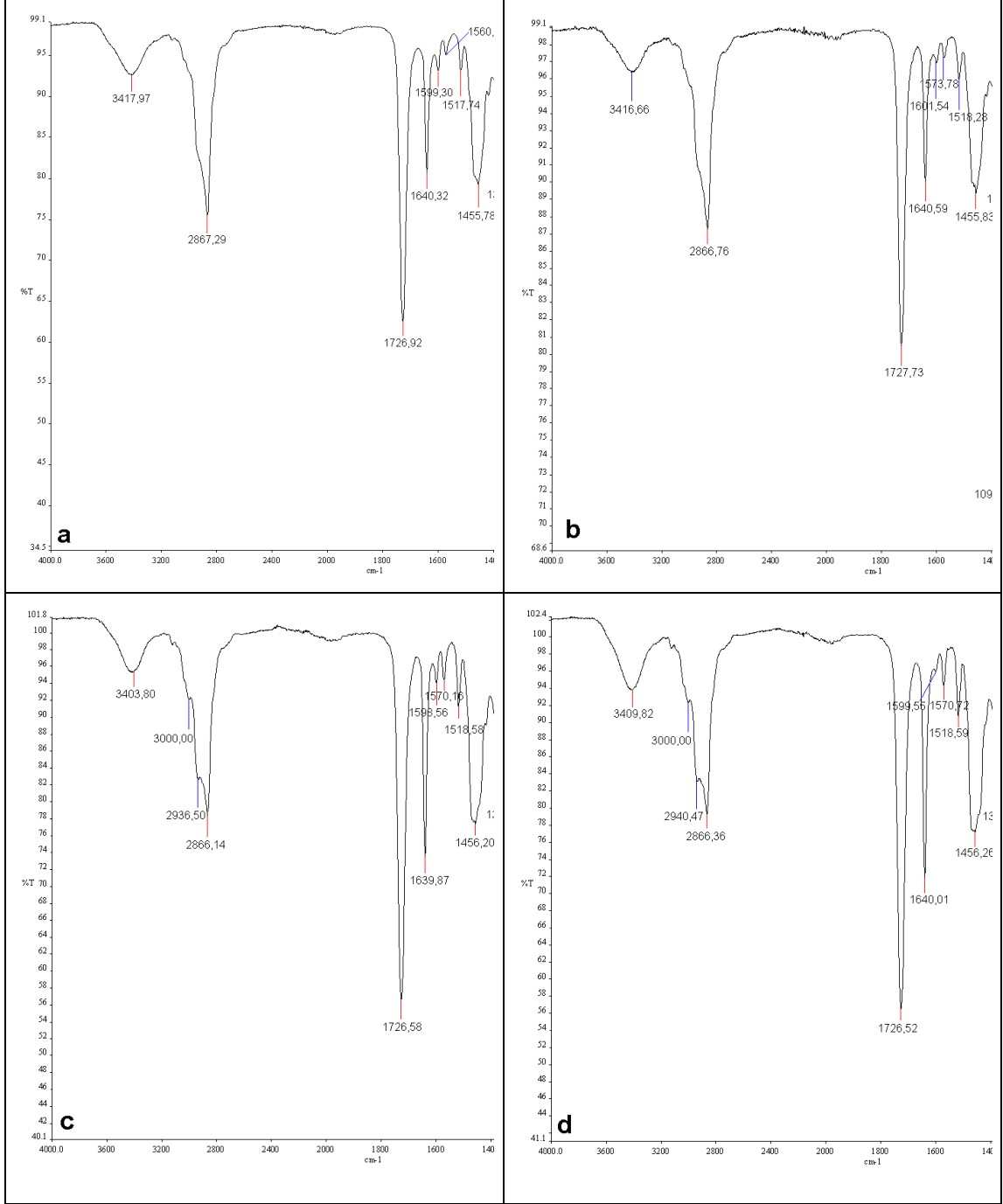
Çizelge 4. 5 S1-O₄₇₅-V1 ve S1-O₄₇₅-V3 kopolimerlerinin kuarternleşme dereceleri

Polimer	Kuarternleşme Süresi (sa)	Kuarternleşme Derecesi
S1-O ₄₇₅ -V1 → Q14- S1-O ₄₇₅ -V1	14	%75
S1-O ₄₇₅ -V1 → Q21- S1-O ₄₇₅ -V1	21	%77
S1-O ₄₇₅ -V3 → Q14- S1-O ₄₇₅ -V3	14	%83
S1-O ₄₇₅ -V3 → Q21- S1-O ₄₇₅ -V3	21	%88

Kopolimer sentezinin sonraki aşamasında S1-O₄₇₅-V1 ve S1-O₄₇₅-V3 kopolimerleri metil-6-bromohekzanoat kullanılarak 14 ve 21 saat süren reaksiyonlar sonucunda değişen oranlarda kısmen kuarternleştirilmiştir. Elde edilen kopolimerlerin kuarternleşme dereceleri ise Şekil 4.19’da verilen IR spektrumlarındaki 1600 ve 1640 cm⁻¹’de çıkan bantların şiddetleri oranlanarak bulunmuştur (Çizelge 4.5).

Şekil 4.19’daki spektrumlar incelendiğinde S1-O₄₇₅-V3 kopolimerinin spektrumundan farklı olarak yaklaşık 1640 cm⁻¹’de yeni bir bantın ortaya çıktığı piridin halkasına ait olan

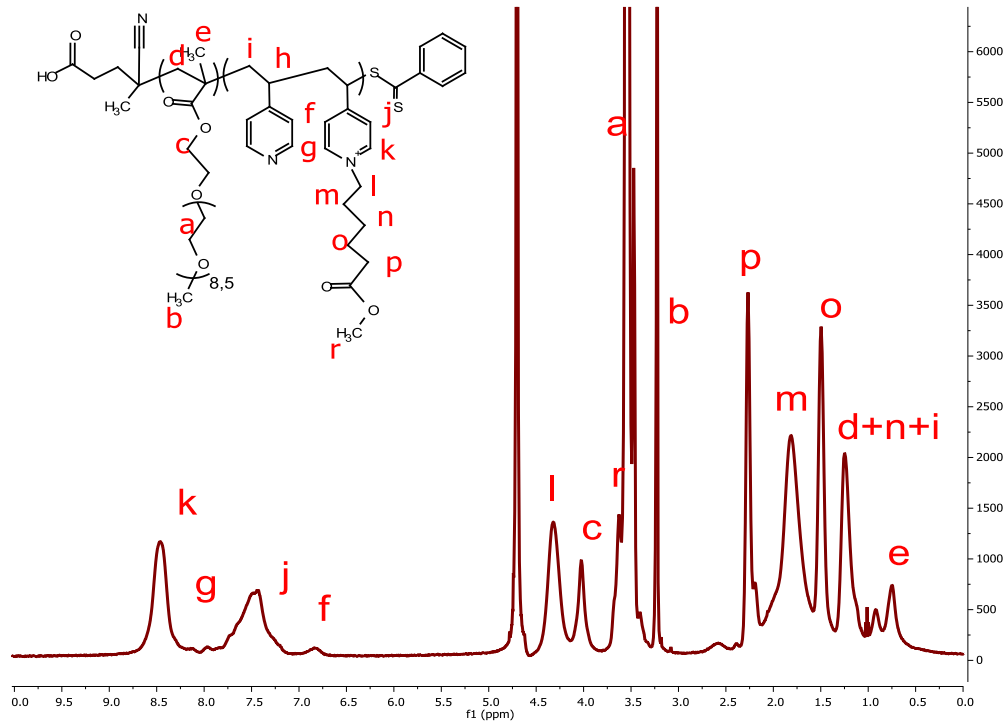
1600 cm^{-1} 'deki bantın ise şiddetinin azaldığı görülmektedir. 1640 cm^{-1} 'de çıkan bu bant kuarternerleştirilmiş piridin halkasına aittir. Spektrumlar analiz edildiğinde bulunan kuarternerleşme dereceleri Çizelge 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4. 19 Q14-S1-O₄₇₅-V1 (a), Q21-S1-O₄₇₅-V1 (b), Q14-S1-O₄₇₅-V3 (c) ve Q21-S1-O₄₇₅-V3 (d) kopolimerlerinin FTIR spektrumları

Şekil 4.20'de Q21-S1-O₄₇₅-V3 kopolimerinin ¹H-NMR spektrumu görülmektedir. Spektrumda S1-O₄₇₅-V3 kopolimerinin ¹H NMR spektrumundan farklı olarak 8,47 ve

7,48 ppm’de çıkan pikler sırasıyla “k” ve “j” protonlarına yani kuarterner piridin halkasına aittir. Ayrıca 4,32 ppm’de pik veren “l” protonları ise kuarterner amin atomuna bağlı -CH₂- protonlarına aittir. Kuarternerleşmede kullanılan metil-6-bromohekzanoatta ester grubundaki -CH₃ protonları ise 3,63 ppm’de pik vermiştir.



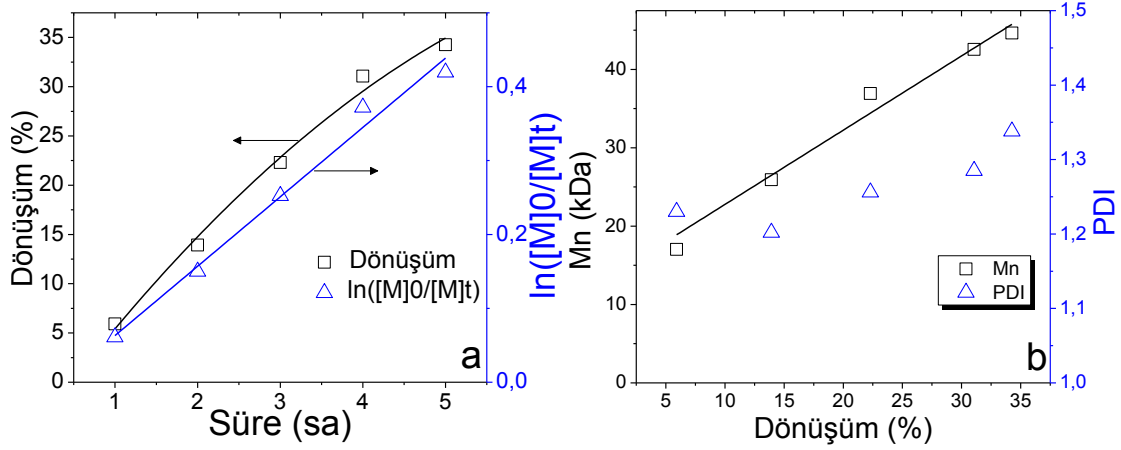
Şekil 4. 20 Q21-S1-O₄₇₅-V3 kopolimerinin ¹H-NMR spektrumu

4.2.1 Set 2 Kopolimerlerin Sentezi

Set 2 kopolimerleri OEGMA monomerinde bulunan oligo(etilen glikol) zincirinin uzunluğunun oluşan kopolimerin özelliklerine etkisini incelemek amacıyla sentezlenmiştir. Bu sebeple 3 farklı poli(OEGMA) polimeri makroCTA olarak üretilmiştir.

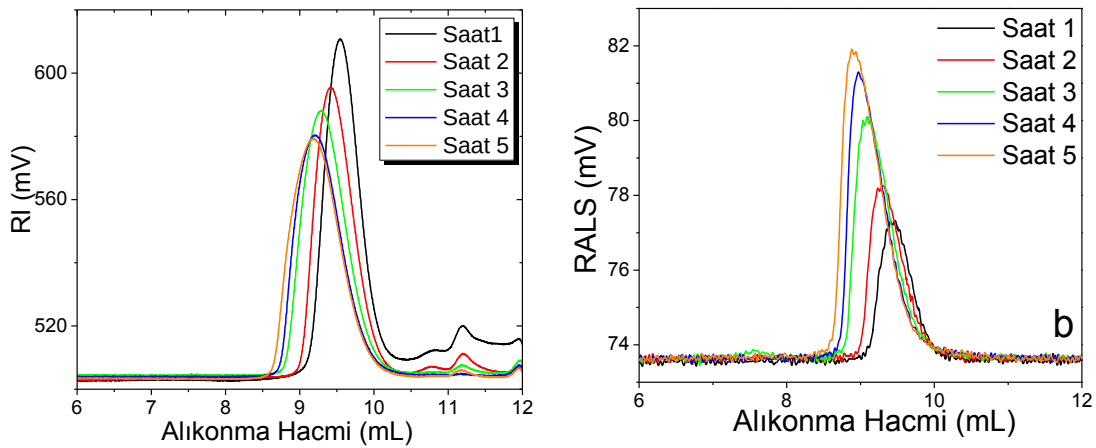
Bu set kopolimerlerin üretimi için ilk olarak OEGMA₉₅₀ monomeri CTA4 RAFT ajanı ile [M]₀/[CTA]₀/[I]₀=75/1/0.2 oranında 0,5 M monomer konsantrasyonu kullanılarak polimerleştirilmiştir (Çizelge 4.6). Monomer dönüşümü ve polimerizasyon kinetiği Şekil 4.21a’da verilmektedir. Monomer dönüşümünün zamanla arttığı ve ln([M]₀/[M]_t) değerinin süreyle beraber lineer olarak arttığı şekilde görülmektedir. Ancak monomer dönüşümü yüksek değerlere ulaşamamıştır. Bunun sebebi olarak monomerdeki uzun etilen glikol zincirinden kaynaklı sterik engelleme veya poli(OEGMA₉₅₀)’nin yüksek

viskozitesi olabilir. Şekil 4.21b’de ise molekül ağırlığının monomer dönüşümüyle beraber lineer artışı görülmektedir. PDI değerleri de, son örnek hariç, 1,3’ün altında bulunmaktadır.



Şekil 4. 21 CTA4 ile $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=75/1/0,2$ oranında sentezlenen poli(OEGMA₉₅₀)’in, a) zamana bağlı olarak dönüşümü ve kinetiği, b) %dönüşüme bağlı olarak molekül ağırlığında ve polidispersitesindeki değişim.

Poli(OEGMA₉₅₀)’nin RAFT polimerizasyonu sırasında saat başı alınan örneklerle ait GPC kromatogramları Şekil 4.22’de verilmektedir. Tüm örnekler Şart 2’de çalışan GPC cihazıyla analiz edilmiştir.



Şekil 4. 22 CTA4 ile $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=75/1/0,2$ oranında sentezlenen poli(OEGMA₉₅₀)’in GPC analizlerinden elde edilen farklı dedektörlere ait kromatogramları. a) Kırılma indisi kromatogramları, b) ışık saçılması kromatogramları.

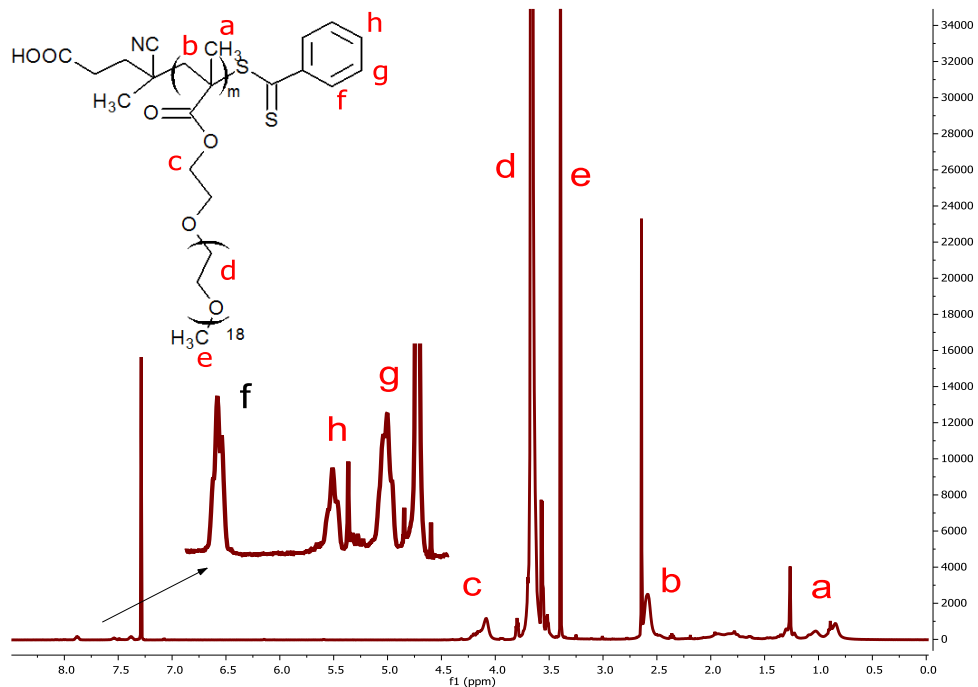
GPC kromatogramları incelendiğinde reaksiyon süresi ilerledikçe elde edilen polimerlerin daha erken çıktıkları görülmektedir. Ayrıca ışık saçılması dedektöründe de reaksiyon ilerledikçe elde edilen polimerlerin pik alanları artmaktadır. Ancak tüm

kromatogramlarda kuyruklanma gözlenmektedir. Bunun sebebi olarak polimerin yüksek viskozitesi veya kolona tutunma düşünülmektedir.

Çizelge 4. 6 OEGMA₉₅₀'nin RAFT polimerizasyonu sonucu elde edilen monomer dönüşümü, molekül ağırlığı ve polidispersite değerleri

RAFT Ajanı	[M] ₀ /[CTA] ₀ /[I] ₀	Süre (sa)	%Dönüşüm ¹	Mn _{Teorik} ² (Da)	Mn _{GPC} ³ (Da)	PDI
CTA4	75/1/0,2	1	5,92	4497	17000	1,23
		2	13,92	10197	25900	1,20
		3	22,30	16167	36900	1,26
		4	31,07	22416	42550	1,29
		5	34,26	24689	44650	1,34

Sonuçlar ışığında OEGMA₉₅₀'nin RAFT polimerizasyonuyla başarılı bir şekilde sentezlendiği söylenebilir. Bu polimerlerden birinci saatte çöken ve molekül ağırlığı Mn=17 kDa olan polimer, kopolimer sentezinde kullanılmak üzere makroCTA2 olarak belirlenmiştir. MakroCTA2'nin ¹H-NMR spektrumu Şekil 4.23'te verilmektedir.



Şekil 4. 23 MakroCTA2'nin (poli(OEGMA₉₅₀), Mn=17 kDa) ¹H-NMR spektrumu

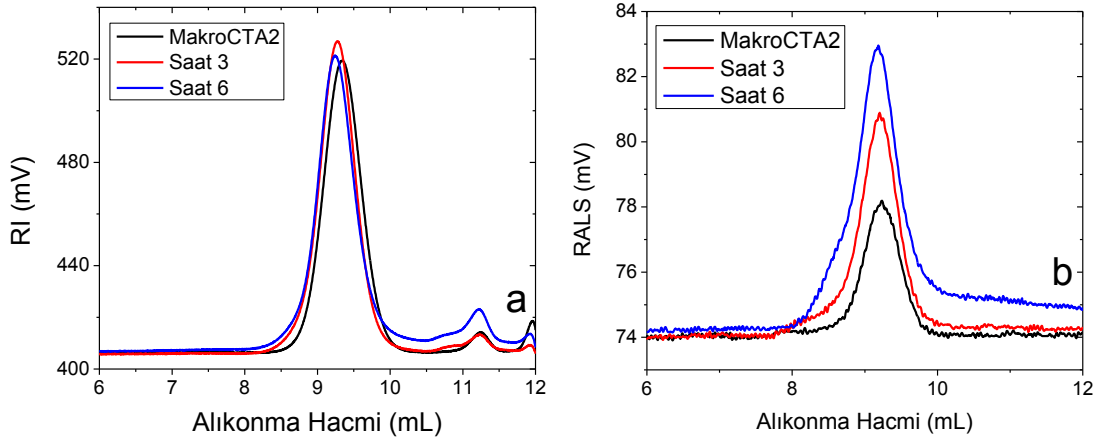
¹ Polimerizasyon sonucunda oluşan ürünler tartılarak hesaplanmıştır.

² Dönüşüm değerleri Formül 2.1'e yerleştirilerek hesaplanmıştır.

³ Polimerizasyon sonucunda oluşan ürünler boyut eleme kromatografisiyle incelenerek hesaplanmıştır.

MakroCTA2'nin $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda (Şekil 4.23) 3,66 ve 3,39 ppm'de çıkan pikler sırasıyla polimerin yan zincirindeki PEG zincirlerindeki metilen protonlarına ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$) (a) ve metil protonlarına ($-\text{O}-\text{CH}_3$) (b) aittir. 4,09 ppm'de çıkan pik ise PEG zincirinin metakrilattaki $-\text{COO}-$ grubuyla bağlandığı yerdeki metilen protonlarına aittir. Polimerin ana zincirindeki metilen protonları 2,64 ppm'de ve metakrilata ait metil protonları ise 0,84-0,89 ppm aralığında çıkmıştır. 7,28 ppm'deki pik CDCl_3 'e aittir.

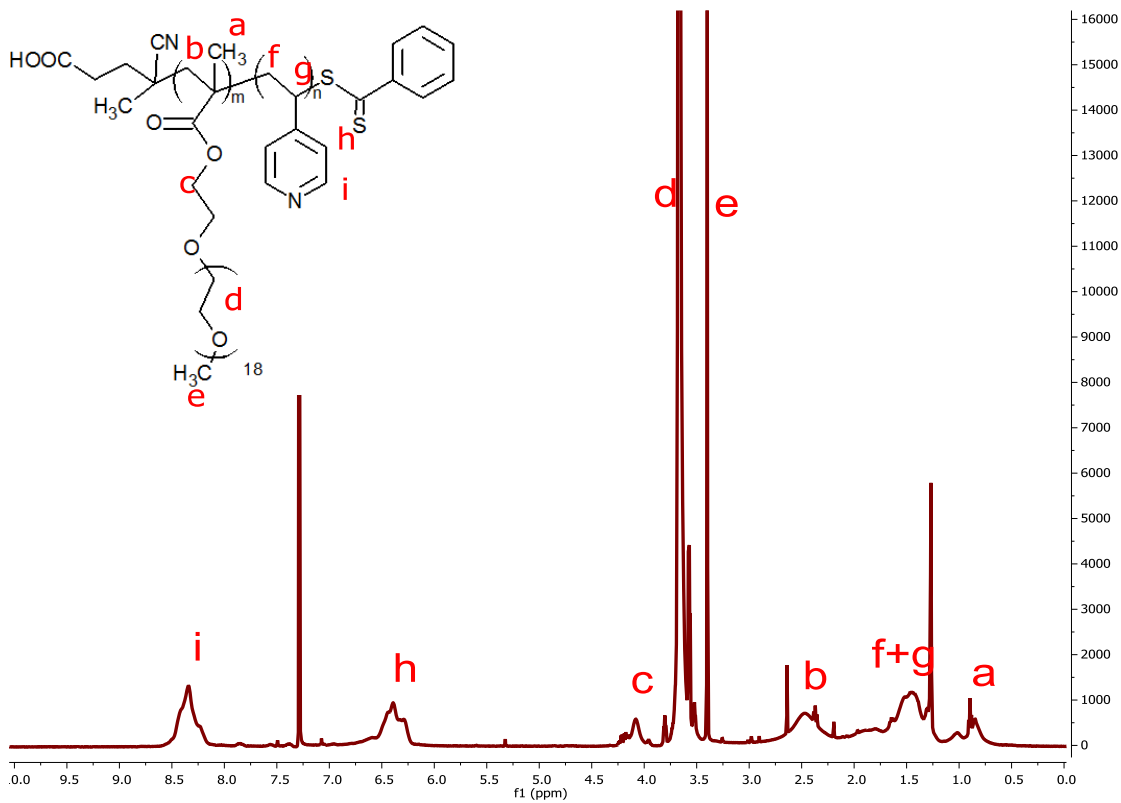
Poli(OEGMA₉₅₀) polimerinin zincir ucundan ikinci bloğu uzatmak için makroCTA2 olarak kullanılarak $[\text{M}]_0/[\text{CTA}]_0/[\text{I}]_0=200/1/0.2$ oranında ve 1,5 M monomer konsantrasyonunda 4-VP RAFT yöntemiyle polimerleştirilmiştir. 6 saat süren reaksiyonda 3. ve 6. saatlerde alınan örnekler çöktürülerek Şart 2'de çalışan GPC ile incelenmiştir. Şekil 4.24'te alınan kromatogramlar verilmektedir.



Şekil 4. 24 MakroCTA2 ile $[\text{M}]_0/[\text{CTA}]_0/[\text{I}]_0=200/1/0,5$ oranında 4-VP'nin polimerleştirilmesiyle sentezlenen poli(OEGMA₉₅₀)-b-poli(4-VP)'lerin GPC analizlerinden elde edilen farklı dedektörlere ait kromatogramları. a) Kırılma indisi kromatogramları, b) ışık saçılması kromatogramları.

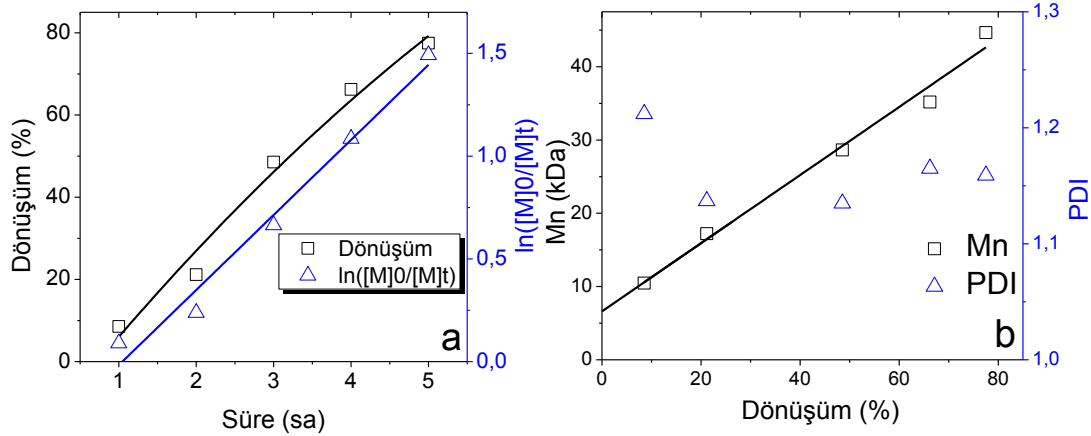
Kırılma indisi kromatogramlarında kopolimerlerin piklerinin makroCTA2'den az da olsa daha erken çıktığı görülmektedir. Ayrıca ışık saçılması kromatogramlarında da kopolimerlerin pik alanlarının reaksiyon süresiyle beraber arttığı görülmektedir. Işık saçılması dedektöründe kopolimerlere ait kromatogramların kuyruklanma yaptığı gözlenmektedir. Poli(4-VP), GPC'nin bu şartlarda mobil fazı olan THF'te çözünmemektedir. Bu sebeple kopolimerin yapısındaki poli(4-VP) bloğu kolonla etkileşimi arttırdığı için kuyruklanma oluşmaktadır. Bu kromatogramlardan alınan sonuçlara göre 3. saatte çöktürülen kopolimerin M_n değeri 30 kDa ($\text{PDI}=1,124$) ve 6.

saatte çöktürülen kopolimerin Mn değeri ise 46 kDa'dır (PDI=1,169). Molekül ağırlığı reaksiyon süresiyle beraber artmakta ve PDI değerleri de 1,2'nin altında bulunmaktadır. Şekil 4.28'de ise 6. saatte çöktürülen kopolimerin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu bulunmaktadır. Kopolimerin $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda (Şekil 4.25) makroCTA2'den farklı olarak 8,34 ve 6,39 ppm'de çıkan pikler sırasıyla piridin halkasındaki "i" ve "h" protonlarına aittir. Poli(4-VP) bloğunun ana zincirindeki $-\text{CH}_2-$ ve $-\text{CH}-$ protonları ise 1,4-1,7 ppm aralığında çıkmıştır.



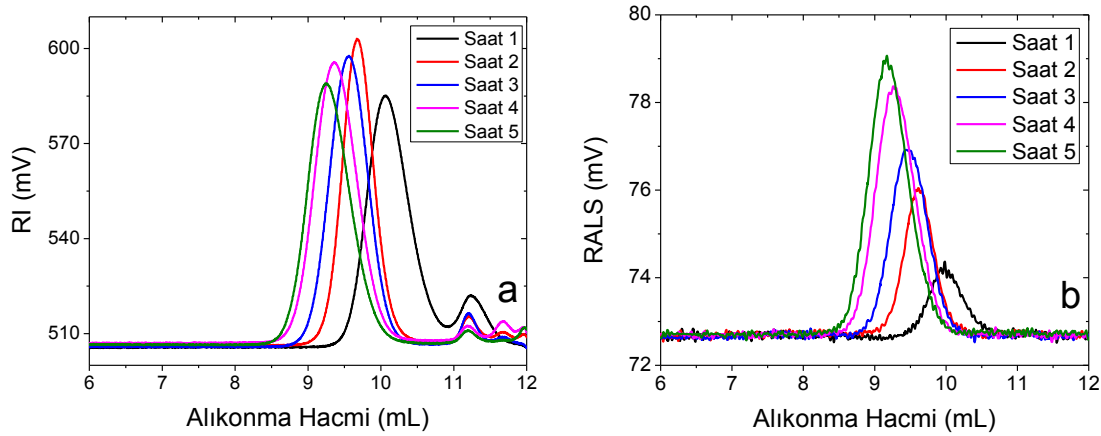
Şekil 4. 25 Polimerizasyonun 6. Saatinde çöktürülen poli(OEGMA₉₅₀)-b-poli(4-VP) kopolimerinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu

Poli(OEGMA₉₅₀)'den sonra poli(OEGMA₄₇₅) de Set 2 kopolimerlerinin üretimi için kullanılan diğer polimerdir. Set 1 kopolimerlerinin üretiminde kullanılan makroCTA1'le aynı şartlarda RAFT polimerizasyonu gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.26 ve Çizelge 4.7'de reaksiyon kinetiği, molekül ağırlığı ve PDI değerleri verilmektedir.



Şekil 4. 26 CTA4 ile $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=75/1/0,2$ oranında sentezlenen poli(OEGMA₄₇₅)'in, a) zamana bağlı olarak dönüşümü ve kinetiği, b) %dönüşüme bağlı olarak molekül ağırlığında ve polidispersitesindeki değişim.

MakroCTA1 sentezinde olduğu gibi burada da reaksiyon kinetiğinin 1. Dereceden ilerlediği görülmektedir. Molekül ağırlığı da dönüşümle beraber lineer olarak artmaktadır. PDI değerleri de 1,2'den küçük çıkmıştır. Bu polimerlere ait Şart 2'de çalışan GPC cihazından alınan kromatogramlar Şekil 4.27'de verilmiştir.



Şekil 4. 27 CTA4 ile $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=75/1/0,2$ oranında sentezlenen poli(OEGMA₄₇₅)'in GPC analizlerinden elde edilen farklı dedektörlere ait kromatogramları. a) Kırılma indisi kromatogramları, b) ışık saçılması kromatogramları.

GPC kromatogramları incelendiğinde reaksiyon süresi ilerledikçe elde edilen polimerlerin daha erken çıktıkları ve ışık saçılması dedektöründe de pik alanlarının arttığı görülmektedir. Sonuçlar ışığında OEGMA₄₇₅'in RAFT polimerizasyonu ile başarılı bir şekilde sentezlendiği söylenebilir. Bu polimerlerden ikinci saatte çöken ve molekül ağırlığı $M_n=17,2$ kDa olan polimer, kopolimer sentezinde kullanılmak üzere makroCTA3 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4. 7 OEGMA₄₇₅'in RAFT polimerizasyonu sonucu elde edilen monomer dönüşümü, molekül ağırlığı ve polidispersite değerleri

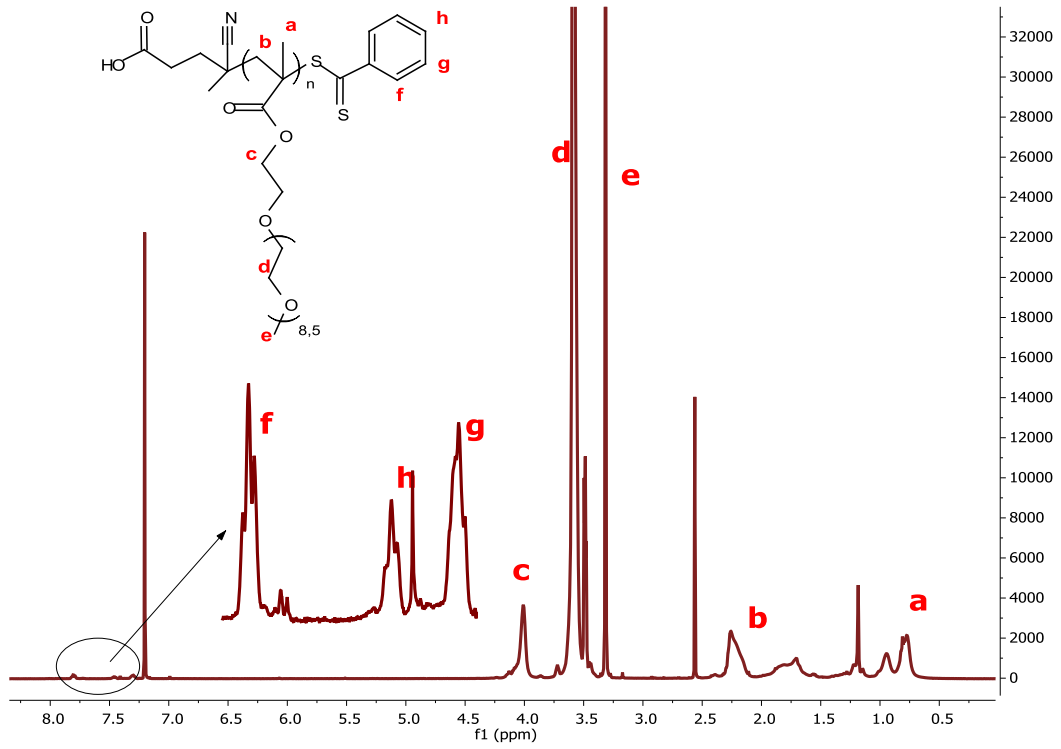
RAFT Ajanı	[M] ₀ /[CTA] ₀ /[I] ₀	Süre (sa)	%Dönüşüm ¹	Mn _{Teorik} ² (Da)	Mn _{GPC} ³ (Da)	PDI
CTA4	75/1/0,2	1	8,53	3317	10500	1,21
		2	21,17	7820	17200	1,14
		3	48,54	17571	28600	1,14
		4	66,23	23873	35200	1,17
		5	77,51	27891	44650	1,16

MakroCTA3'nin ¹H-NMR spektrumu Şekil 4.28'de verilmektedir. MakroCTA3'ün NMR spektrumu, aynı çözücü içinde NMR spektrumları alındığından, makroCTA2'nin spektrumuna benzemektedir. Ana zincirdeki -CH₂-'ye ait olan pik 2,26 ppm'de çıkmıştır. Aynı gruba ait pik makroCTA2'nin spektrumunda ise 2,64 ppm'de çıkmıştır. Bunun sebebi olarak poli(OEGMA₉₅₀) zincirinde daha az sayıda metakrilat birimi olduğundan RAFT ajanındaki güçlü elektron çekici grup olan siyano grubundan daha fazla etkilenmişlerdir ve yüksek ppm'de pik alınmıştır. Ayrıca her iki homopolimerin de sahip oldukları etilen glikol birimlerinin sayısı ve metakrilat birimlerinin sayısı farklı olduğundan pik alanları farklı çıkmıştır.

¹ Polimerizasyon sonucunda oluşan ürünler tartılarak hesaplanmıştır.

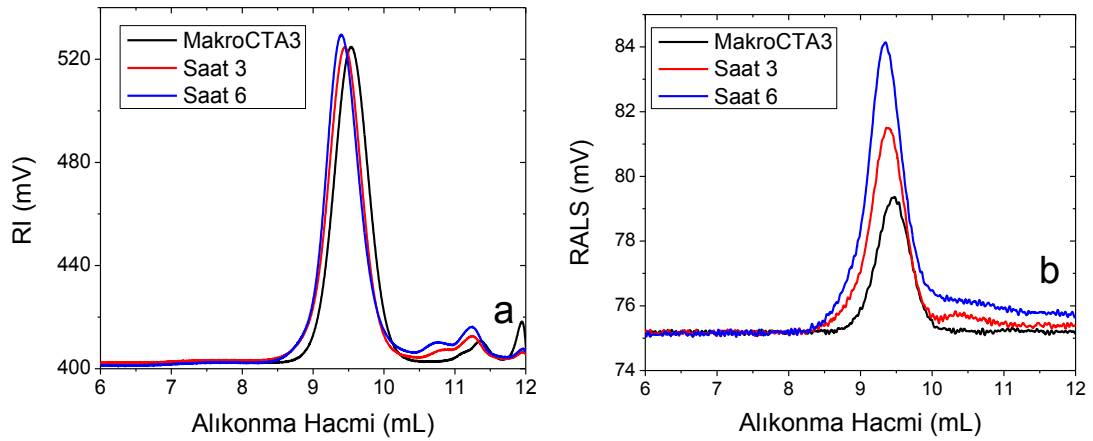
² Dönüşüm değerleri Formül 2.1'e yerleştirilerek hesaplanmıştır.

³ Polimerizasyon sonucunda oluşan ürünler boyut eleme kromatografisiyle incelenerek hesaplanmıştır.



Şekil 4. 28 MakroCTA3'ün (poli(OEGMA₄₇₅), Mn=17,2 kDa) ¹H-NMR spektrumu

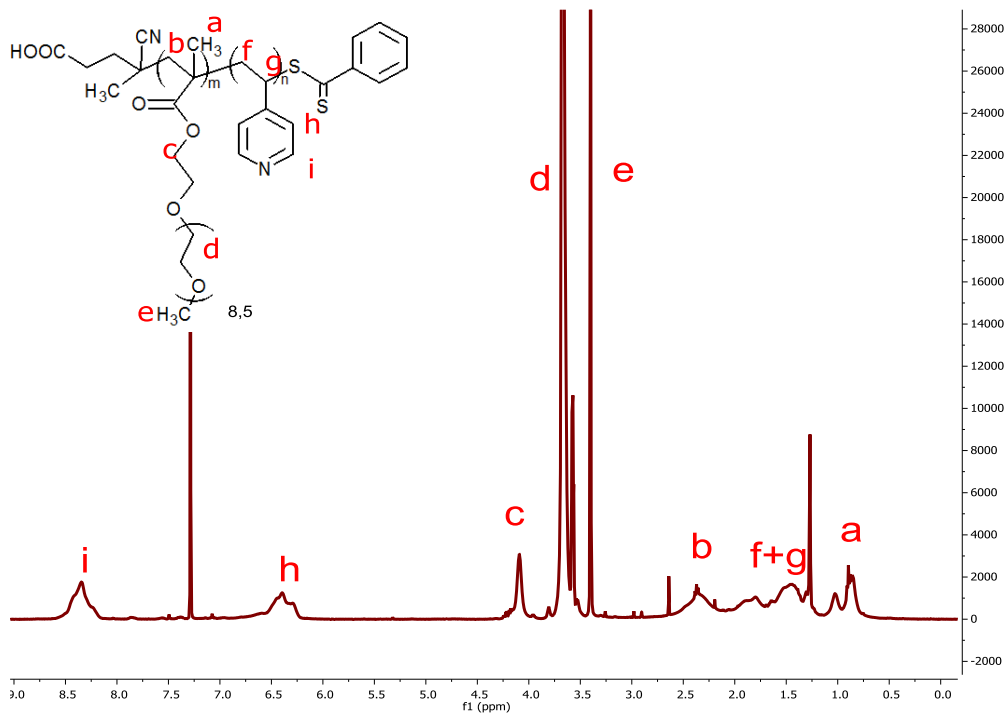
Poli(OEGMA₄₇₅) polimerinin zincir ucundan ikinci bloğu uzatmak için MakroCTA3 olarak kullanılarak yine $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=200/1/0.2$ oranında ve 1,5 M monomer konsantrasyonunda 4-VP RAFT yöntemiyle polimerleştirilmiştir. 6 saat süren reaksiyonda 3. ve 6. saatlerde alınan örnekler çöktürülerek Şart 2'de çalışan GPC ile incelenmiştir. Şekil 4.29'da bu kopolimerlere ait kromatogramlar verilmektedir.



Şekil 4. 29 MakroCTA3 ile $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=200/1/0,5$ oranında 4-VP'nin polimerleştirilmesiyle sentezlenen poli(OEGMA₄₇₅)-b-poli(4-VP)'lerin GPC analizlerinden elde edilen farklı dedektörlere ait kromatogramları. a) Kırılma indisi kromatogramları, b) ışık saçılması kromatogramları.

Kırılma indisi kromatogramlarında kopolimerlerin piklerinin makroCTA3'ten daha erken çıktığı görülmektedir. Ayrıca ışık saçılması kromatogramlarında da kopolimerlerin pik alanlarının reaksiyon süresiyle beraber arttığı görülmektedir. Işık saçılması dedektöründe makroCTA2'den üretilen kopolimerlerde olduğu gibi (Şekil 4.24) kromatogramların kuyruklanma yaptığı gözlenmektedir. Bu kromatogramlardan alınan sonuçlara göre 3. saatte çöktürülen kopolimerin Mn değeri 28,7 kDa (PDI=1,082) ve 6. saatte çöktürülen kopolimerin Mn değeri ise 38,2 kDa'dır (PDI=1,088). Molekül ağırlığı reaksiyon süresiyle beraber artmakta ve PDI değerleri de 1,2'nin altında bulunmaktadır.

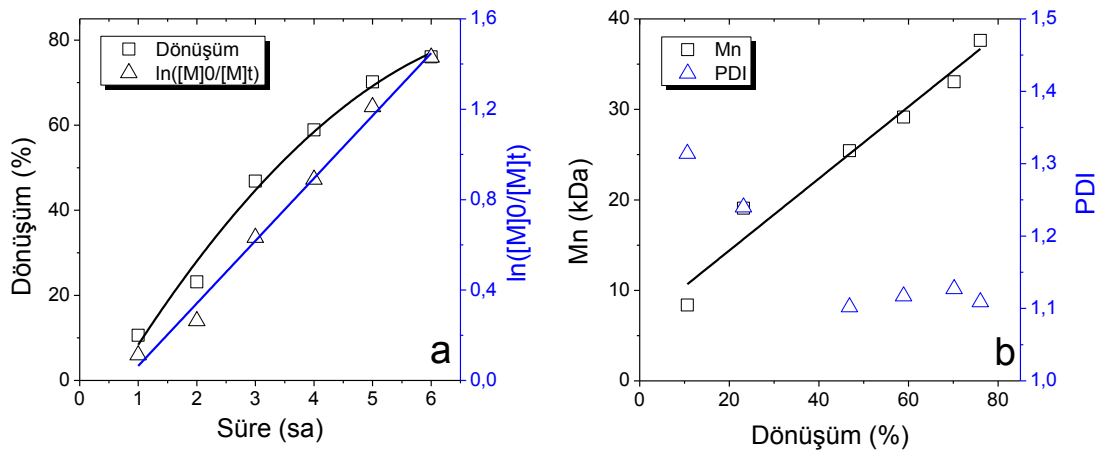
Şekil 4.30'da 6. saatte çöktürülen kopolimerin ^1H -NMR spektrumu bulunmaktadır. MakroCTA3'ün spektrumundan farklı olarak poli(4-VP) bloğuna ait pikler 8,35 ppm, 6,39 ppm ve 1,45 ppm'de net olarak görülmektedir.



Şekil 4. 30 Polimerizasyonun 6. saatinde çöktürülen poli(OEGMA₄₇₅)-b-poli(4-VP) kopolimerinin ^1H -NMR spektrumu

Bu set kopolimerlerde üçüncü bir makroCTA'dan daha kopolimerler üretilmiştir. Ancak bu sefer makroCTA homopolimer olarak değil, farklı uzunlukta etilen glikol zincir uzunluklarına sahip OEGMA monomerlerinin bir rasgele kopolimeri olarak sentezlenmiştir. Bu amaçla molce %8 OEGMA₄₇₅ ve %92 DEGMA içeren monomer

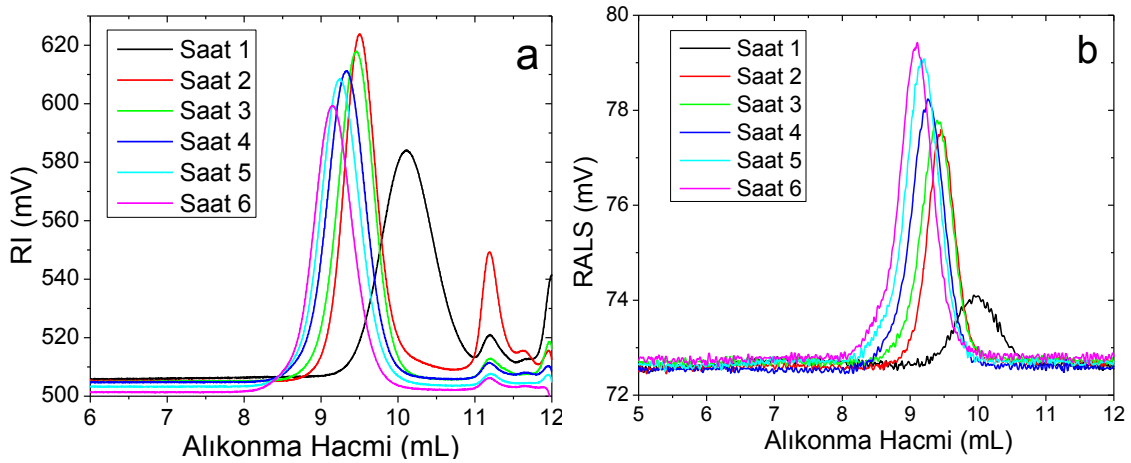
karışımı CTA4 ile $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=150/1/0,2$ oranında polimerleştirilmiştir. Monomerlerin 92-8 oranında karıştırılmasının sebebi ise oluşan kopolimerin sıcaklığa duyarlı ve LCST değerinin yaklaşık 37°C olmasını sağlamasıdır. Monomerlerin oranı değiştirilerek polimerin LCST değeri değiştirilebilmekte ve monomer oranı ile LCST değeri arasında lineer bir ilişki bulunmaktadır [161]. Diğer bir husus ise, reaksiyon başlangıcındaki monomer oranıyla oluşan polimer içindeki monomer oranı yaklaşık aynıdır. Çünkü her iki monomerin de aktif grupları aynıdır. OEGMA₄₇₅ ve DEGMA'nın RAFT polimerizasyonu sonucunda elde edilen veriler Şekil 4.31 ve Çizelge 4.8'de verilmektedir.



Şekil 4. 31 CTA4 ile $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=150/1/0,2$ oranında sentezlenen poli(DEGMA-OEGMA₄₇₅)'in GPC analizlerinden elde edilen farklı dedektörlere ait kromatogramları. a) Kırılma indisi kromatogramları, b) ışık saçılması kromatogramları.

Şekil 4.31a incelendiğinde yine 1. dereceden reaksiyon kinetiğiyle reaksiyonun ilerlediği görülmektedir. Ayrıca reaksiyon yine gecikmeli olarak başlamıştır. Şekil 4.34b'de ise molekül ağırlığının dönüşümle beraber lineer olarak arttığı ve polidispersitenin de reaksiyon ilerledikçe azaldığı görülmektedir. Reaksiyon başlangıcında yine yüksek molekül ağırlığına ulaşılmış ve daha sonra lineer olarak artmıştır. Reaksiyonun 2. Saatinde çöktürülen polimer makroCTA4 olarak belirlenmiştir. MakroCTA4'ün molekül ağırlığı $M_n=19$ kDa iken PDI değeri de 1,24'tür.

GPC kromatogramları (Şekil 4.32) incelendiğinde reaksiyon süresi ilerledikçe, elde edilen polimerlerin daha erken çıktıkları ve ışık saçılması dedektöründe de pik alanlarının arttığı görülmektedir.



Şekil 4. 32 CTA4 ile $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=150/1/0,2$ oranında sentezlenen poli(DEGMA-OEGMA₄₇₅)'in GPC analizlerinden elde edilen farklı dedektörlere ait kromatogramları. a) Kırılma indisi kromatogramları, b) ışık saçılması kromatogramları.

Çizelge 4. 8 DEGMA-OEGMA₄₇₅'in RAFT polimerizasyonu sonucu elde edilen monomer dönüşümü, molekül ağırlığı ve polidispersite değerleri

RAFT Ajanı	$[M]_0/[CTA]_0/[I]_0$	Süre (sa)	%Dönüşüm ¹	Mn_{Teorik} ² (Da)	Mn_{GPC} ³ (Da)	PDI
CTA4	150/1/0,2	1	10,63	3643	8400	1,31
		2	23,16	7609	19100	1,24
		3	46,84	15103	25400	1,10
		4	58,90	18920	29150	1,12
		5	70,19	22494	33050	1,13
		6	76,07	24355	37600	1,11

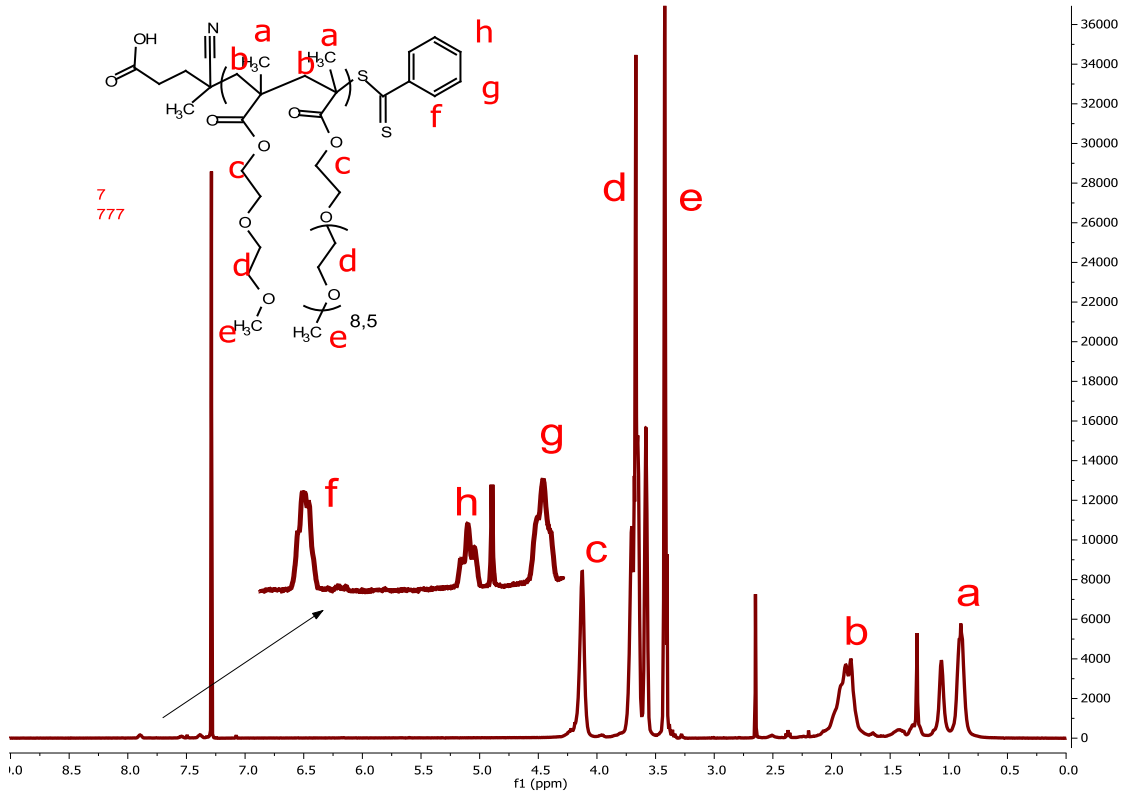
MakroCTA4 ¹H-NMR spektroskopisiyle incelendiğinde elde edilen spektrum Şekil 4.33'te verilmektedir. Önceki makroCTA'lara benzer bir spektrum alınmıştır. Polimerin ana zincirindeki -CH₂-'lere ait pikin daha düşük ppm değerine kaydığı (1.88 ppm) ve daha geniş bir alana sahip olduğu gözlenmektedir. Set 2 polimer serisinde tüm makroCTA'ların molekül ağırlıkları yaklaşık aynı fakat yan zincirlerindeki etilen glikol zincir uzunlukları farklı olduğu için her bir makroCTA'nın polimerleşme derecesi farklıdır. Bunların içinde en yüksek polimerleşme derecesine makroCTA4 sahiptir ve bu sebeple de 1,88 ppm'de çıkan ana zincirdeki metilene ait pik en yüksek alana sahiptir.

¹ Polimerizasyon sonucunda oluşan ürünler tartılarak hesaplanmıştır.

² Dönüşüm değerleri Formül 2.1'e yerleştirilerek hesaplanmıştır.

³ Polimerizasyon sonucunda oluşan ürünler boyut eleme kromatografisiyle incelenerek hesaplanmıştır.

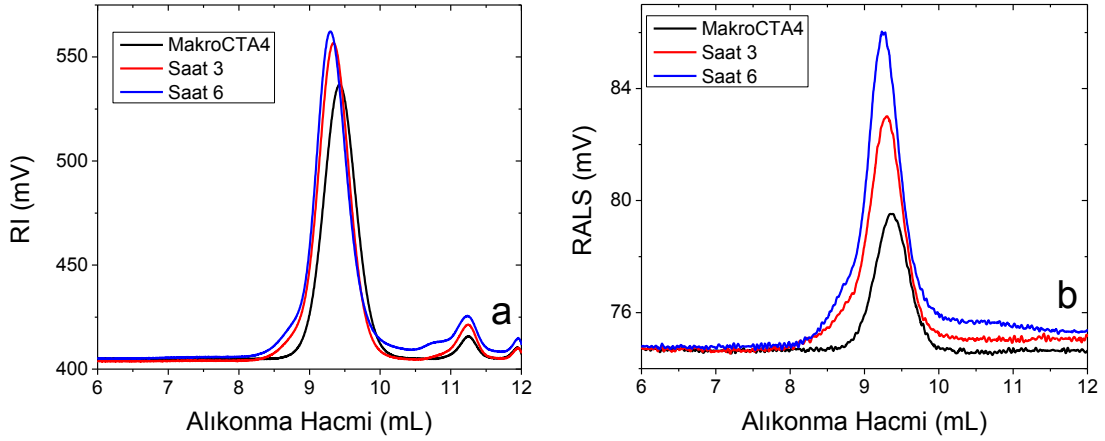
Ayrıca 3,67 ppm'de çıkan ve yan zincirin tekrarlayan etilen glikol birimlerinde bulunan $-\text{CH}_2-$ 'ye ait pikin de diğer makroCTA'lara kıyasla daha düşük alana sahip olduğu görülmektedir. Bunun sebebi de bu polimerde diğer makroCTA'lardan daha az sayıda etilen glikol biriminin olmasıdır. Polimerin yan zincirinin en ucunda bulunan $-\text{CH}_3$ 'e ait pikin alanı da diğer makroCTA'lardan daha fazladır, çünkü polimer zincirinde daha fazla sayıda monomer ve dolayısıyla daha fazla sayıda $-\text{CH}_3$ grubu bulunmaktadır.



Şekil 4. 33 MakroCTA4'ün (poli(DEGMA-OEGMA₄₇₅), Mn=19 kDa) ¹H-NMR spektrumu

Tüm makroCTA'ların yaklaşık aynı molekül ağırlığında olduğunu göz önünde tutarak her birinin NMR spektrumu birbiriyle karşılaştırılırsa; kullanılan monomerin yan zinciri uzadıkça spektrumda etilen glikol birimlerine ait piklerin şiddetlerinin arttığı ancak metakrilat grubu ve $-\text{CH}_3$ grubuna ait piklerin şiddetlerinin azaldığı görülmektedir. Bu durum beklenen yapıların oluştuğunu göstermektedir.

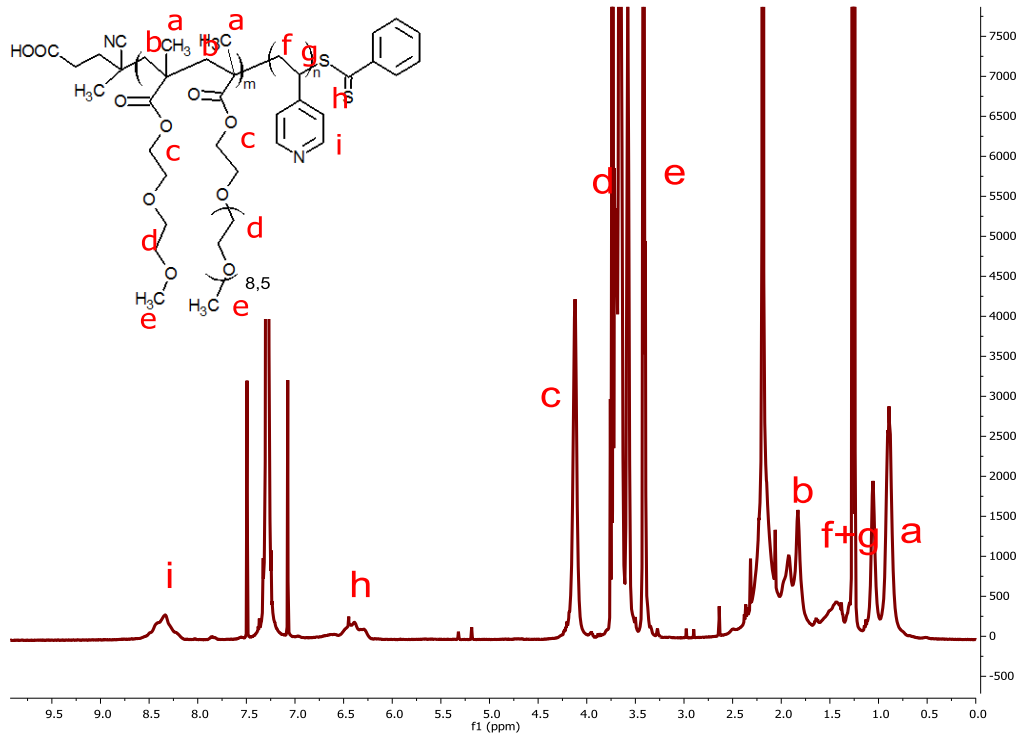
Sonraki aşamada poli(DEGMA-OEGMA₄₇₅) polimeri makroCTA4 olarak kullanılarak $[\text{M}]_0/[\text{CTA}]_0/[\text{I}]_0=200/1/0.2$ oranında ve 1,5 M monomer konsantrasyonunda 4-VP RAFT yöntemiyle polimerleştirilmiştir. 6 saat süren reaksiyonda 3. ve 6. saatlerde alınan örnekler çöktürülerek Şart 2'de çalışan GPC ile incelenmiştir. Şekil 4.34'te alınan kromatogramlar gösterilmektedir.



Şekil 4. 34 MakroCTA4 ile $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=200/1/0,5$ oranında 4-VP'nin polimerleştirilmesiyle sentezlenen poli(DEGMA-OEGMA₄₇₅)-b-poli(4-VP)'lerin GPC analizlerinden elde edilen farklı dedektörlere ait kromatogramları. a) Kırılma indisi kromatogramları, b) ışık saçılması kromatogramları.

Önceki kopolimerizasyonların reaksiyonlarında elde edilen kromatogramlara benzer sonuçlar bu reaksiyondan da elde edilmiştir. Reaksiyon ilerledikçe oluşan kopolimerler makroCTA4'ten daha erken çıkmakta ve ışık saçılması piklerinin alanları artmaktadır. Bu kromatogramlardan saat 3'te çöktürülen poli(OEGMA₄₇₅)-b-poli(4-VP) kopolimerinin molekül ağırlığı $M_n=26,5$ kDa ($PDI=1,114$) ve saat 6'da çöktürülen kopolimerin molekül ağırlığı ise $M_n=32,9$ kDa'dır ($PDI=1,067$).

Polimerizasyonun 3. Saatinde çöktürülen kopolimere ait 1H -NMR spektrumu ise Şekil 4.35'te verilmektedir. Spektrum diğer kopolimerlerin spektrumlarına benzerlik göstermekte ve poli(4-VP) bloğuna ait pikler (8,34 ppm; 6,45 ppm; 1,44 ppm) spektrumda gözükmemektedir. Elde edilen sonuçlar kopolimerin başarıyla sentezlendiğini göstermektedir.



Şekil 4. 35 Polimerizasyonun 3. saatinde çöktürülen poli(DEGMA-OEGMA₄₇₅)-b-poli(4-VP) kopolimerinin ¹H-NMR spektrumu

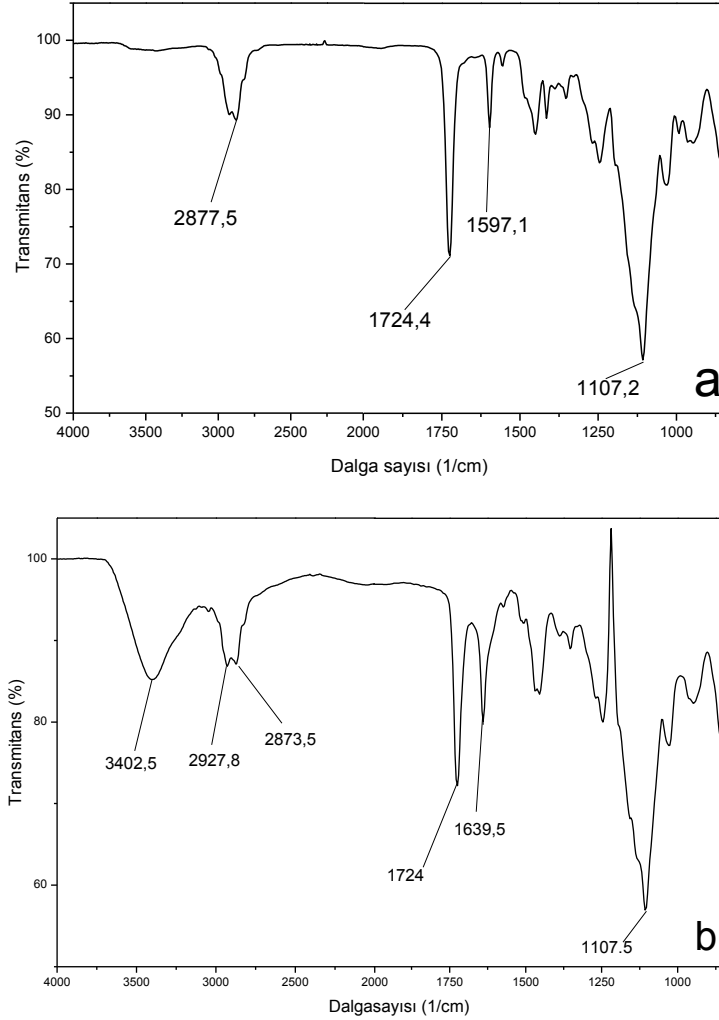
Çizelge 4.9’da sentezlenen Set 2 kopolimerler ve özellikleri listelenmektedir. Sonraki bölümlerde karışıklık olmasını önlemek amacıyla tüm kopolimerler Set 1’de olduğu gibi kodlanmıştır.

Çizelge 4. 9 Sentezlenen Set 2 polimerleri ve özellikleri

Polimer	Reaksiyon Süresi (sa)	Mn (Da)	PDI
Poli(OEGMA ₉₅₀) (MakroCTA2)	0	17000	1.23
Poli(OEGMA ₉₅₀)-poli(4-VP) (S2-O₉₅₀-V1)	3	30100	1.12
Poli(OEGMA ₉₅₀)-poli(4-VP) (S2-O₉₅₀-V2)	6	46000	1.17
Poli(OEGMA ₄₇₅) (MakroCTA3)	0	17200	1.14
Poli(OEGMA ₄₇₅)-poli(4-VP) (S2-O₄₇₅-V1)	3	28700	1.08
Poli(OEGMA ₄₇₅)-poli(4-VP) (S2-O₄₇₅-V2)	6	38200	1.09
Poli(DEGMA-OEGMA ₄₇₅) (MakroCTA4)	0	19100	1.24
Poli(DEGMA-OEGMA ₄₇₅)-poli(4-VP) (S2-DO-V1)	3	26650	1.11
Poli(DEGMA-OEGMA ₄₇₅)-poli(4-VP) (S2-DO-V2)	6	32900	1.07

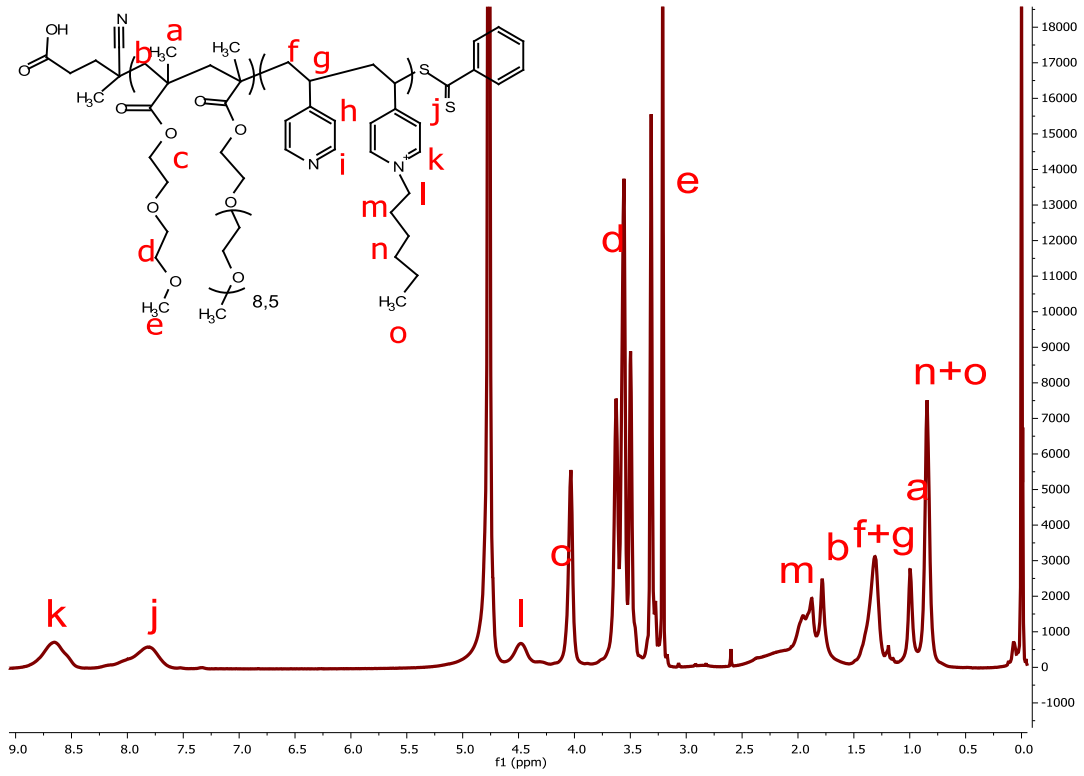
Set 2 kopolimerlerinden S2-DO-V2, gen transfer çalışmalarında kullanılmak üzere seçilmiştir ve c-myc genini inhibe edecek oligonükleotid ile etkileşebilmesi amacıyla

kvarternerleştirilerek pozitif yüklü hale getirilmiştir. Bu amaçla 1-bromohekzanla metanol içinde 6 günlük reaksiyon sonucu oluşan kopolimerin FTIR ve $^1\text{H-NMR}$ spektrumları sırasıyla Şekil 4.36 ve 4.37’de verilmektedir.



Şekil 4. 36 S2-DO-V2 (a) ve kvarternerleştirilmiş S2-DO-V2 (b) kopolimerlerinin FTIR spektrumları

Şekil 4.36’da verilen spektrumlar incelendiğinde S2-DO-V2 kopolimerinin piridin halkasına ait olan 1600 cm^{-1} ’de çıkan pikin kvarternerleştirilmiş S2-DO-V2’ye ait spektrumda olmadığı görülmektedir. Kopolimer kvarternerleştirildikten sonra 1639,5 cm^{-1} ’de pik çıktığı gözlenmektedir. Bu pik kvarterner piridine aittir. Spektrumların analizi sonucunda kopolimerin kvarternerleşme derecesinin %90’dan fazla olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 4. 37 Kuarternerleştirilmiş S2-DO-V2'ye ait ^1H -NMR spektrumu

Kuarternerleştirilmiş S2-DO-V2'nin NMR spektrumunda piridin halkasındaki protonlara ait piklerin daha yüksek değerlere kaydıkları görülmektedir. Bunun sebebi olarak da pozitif yüklenen azottaki elektron yoğunluğunun azalması verilebilir. Ayrıca kuarternerleştirici ajana ait pikler de 4,55 ppm'de ve 0,5-2,0 ppm aralığında görülmektedir. Sonuçlar ışığında, S2-DO-V2 kopolimerinin başarılı olarak kuarternerleştirildiğini söyleyebiliriz. Kuarterner S2-DO-V2 kopolimeri bundan sonra Q-S2-DO-V2 olarak isimlendirilecektir.

4.3 Kopolimerlerin Çözelti Davranışlarının İncelenmesi

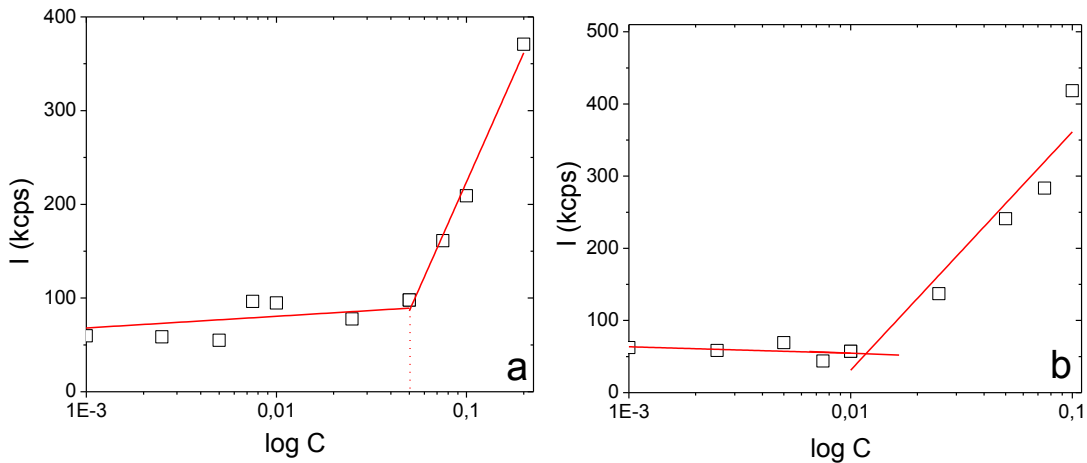
Kopolimerlerin sulu çözelti içindeki davranışları, pH değişimi ve sıcaklık değişimine karşı verdikleri cevap bu başlık altında incelenecektir. Kopolimerlerin çözelti davranışları temel olarak ışık saçılması ve floresans spektrofotometre cihazlarıyla incelenmiştir. Ayrıca oluşan yapıların şekilleri de AFM mikroskopuyla incelenmiştir.

4.3.1 Set 1 Kopolimerlerin İncelenmesi

Set 1 kopolimerlerinden S1-O₄₇₅-V1 ve S1-O₄₇₅-V3 bu başlıkta incelenecektir. S1-O₄₇₅-V2 ile S1-O₄₇₅-V3'ün molekül ağırlıkları yakın olduğu için S1-O₄₇₅-V2 ayrıca incelenmemiştir.

S1-O₄₇₅-V1 ve S1-O₄₇₅-V3 aynı makroCTA1 (Mn=19,5 kDa, PDI=1,15) kullanılarak sentezlenmişlerdir. S1-O₄₇₅-V1'in molekül ağırlığı Mn=26,1 kDa (PDI=1,04) iken S1-O₄₇₅-V3'ün molekül ağırlığı Mn=29,9 kDa'dır (PDI=1,08). Her iki polimerin poli(OEGMA₄₇₅) blok uzunlukları aynı fakat S1-O₄₇₅-V3'ün poli(4-VP) bloğu daha uzundur.

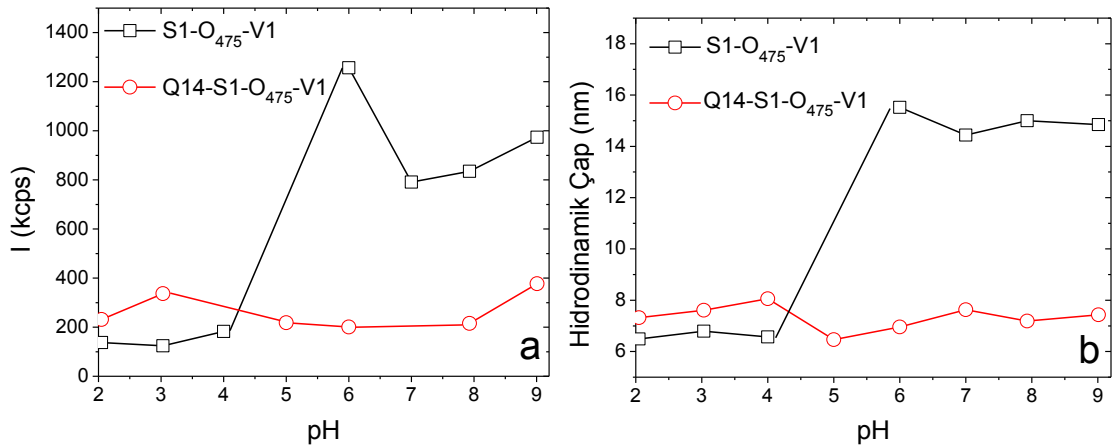
Şekil 4.38'de pH 7'de hazırlanmış S1-O₄₇₅-V1 ve S1-O₄₇₅-V3 kopolimer çözeltilerinin konsantrasyon artışına karşılık ışık saçılması şiddetlerindeki değişim görülmektedir. Işık saçılması şiddeti ile konsantrasyon arasında çizilen grafikte doğrunun eğiminde ani artışın meydana geldiği nokta kritik misel konsantrasyonunu (cmc) vermekte, yani bu konsantrasyonun üzerinde misel oluşmaktadır. Daha kısa poli(4-VP) zincirine sahip olan S1-O₄₇₅-V1 kopolimerinin cmc değeri yaklaşık 0,05 mg/mL iken daha uzun poli(4-VP) zincirine sahip olan S1-O₄₇₅-V3 kopolimerinin cmc değeri ise 0,012 mg/mL'dir. Aynı uzunlukta hidrofilik poli(OEGMA₄₇₅) bloğuna sahip iki kopolimerden uzun poli(4-VP) zincirine sahip kopolimer daha düşük konsantrasyonda bir araya gelerek misel oluşturmuştur.



Şekil 4. 38 S1-O₄₇₅-V1 (a) ve S1-O₄₇₅-V3 (b) kopolimerlerinin konsantrasyon-ışık saçılması şiddeti grafikleri (pH 7)

Kopolimer ve kuarterner kopolimerlerin pH değişimine karşı verdikleri yanıt ışık saçılması tekniğiyle incelendiğinde ise Şekil 4.39 ve 4.40'ta verilen grafikler elde

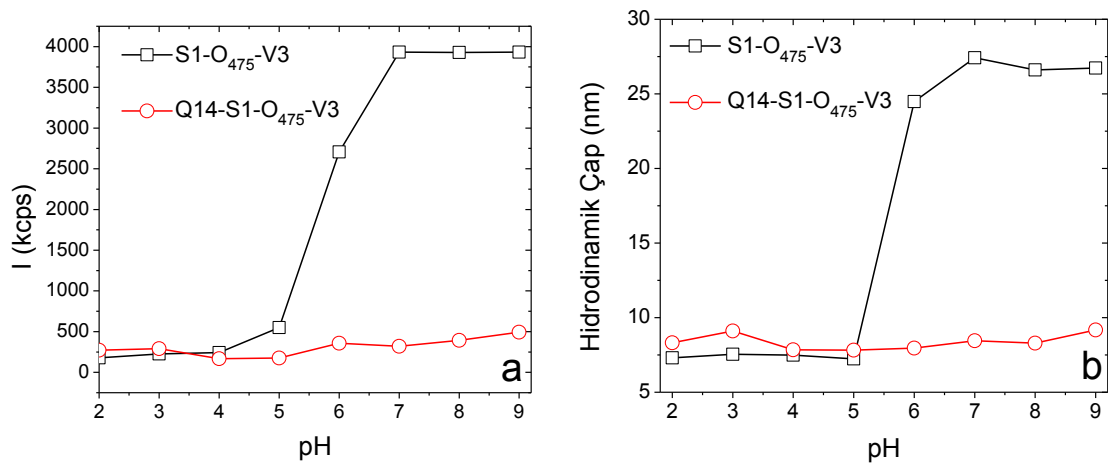
edilmiştir. Şekil 4.39'da aynı konsantrasyonda hazırlanmış (1 mg/mL) S1-O₄₇₅-V1 ve Q14-S1-O₄₇₅-V1 kopolimerlerinin pH değiştiğinde ışık saçılması şiddetlerinde ve hidrodinamik boyutlarındaki değişim gösterilmektedir. pH'nın 5 ve üzerindeki değerlerinde S1-O₄₇₅-V1 kopolimerinin ışık saçılması şiddetinde bir artış görülmekte ve pH yükseldikçe sabit kalmaktadır. Ayrıca S1-O₄₇₅-V1 kopolimerinin hidrodinamik çapı da pH 5'ten daha düşük değerlerde yaklaşık 7 nm iken pH 5 ve daha yüksek değerlerde yaklaşık 15 nm'dir. Kopolimerdeki piridin grupları pH 5'ten daha yüksek pH'larda nötrleşerek hidrofobik hale gelmekte ve hidrofobik etkileşimle kopolimerler bir araya gelip misel oluşturmaktadır. pH 5'in altındaki pH'larda ise piridin grubundaki azota proton bağlanarak kuarterner piridinyum oluşmakta polimer pozitif yüklenmektedir. Bu da kopolimerlerin misel oluşturmalarını engellemektedir. Buna karşın kuarterner kopolimer olan Q14-S1-O₄₇₅-V1'in ışık saçılması şiddeti tüm pH'larda yaklaşık aynıdır ve değişmemektedir. Ayrıca kuarterner kopolimerin boyutu da tüm pH'larda yaklaşık 7,5 nm'de sabit kalmaktadır. Kuarterner kopolimerdeki piridinyum tüm pH'larda pozitif yüklüdür ve bu sebeple kopolimerlerin birbirini iterek misel oluşturmalarını engellemiştir.



Şekil 4. 39 S1-O₄₇₅-V1 ve Q14-S1-O₄₇₅-V1 kopolimerlerinin pH-ışık saçılması şiddeti (a) ve pH-hidrodinamik boyut grafikleri (b)

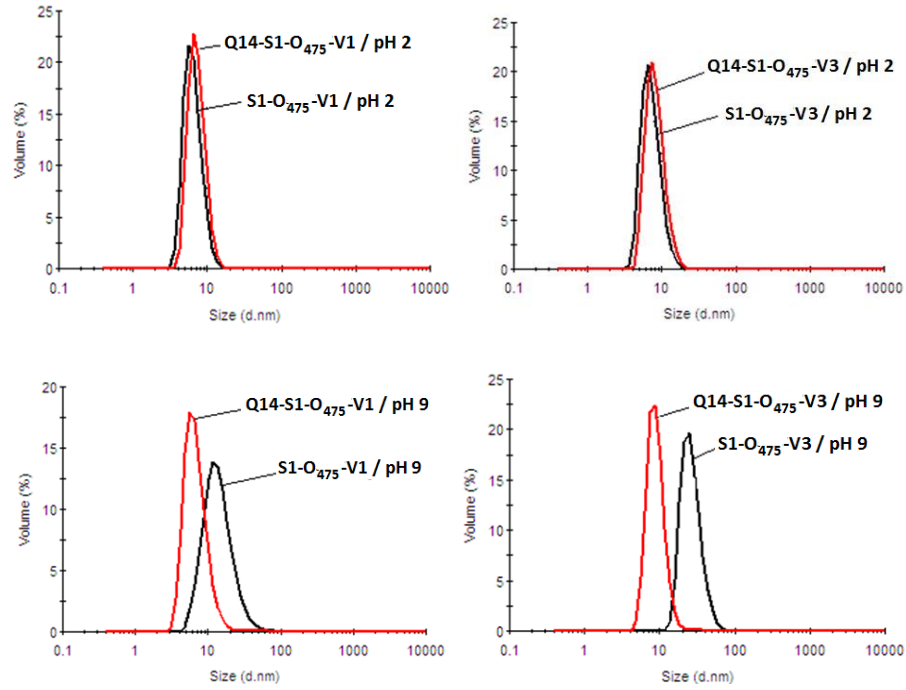
Şekil 4.40'ta ise S1-O₄₇₅-V1'den daha uzun poli(4-VP) zincirine sahip olan S1-O₄₇₅-V3 ve Q14-S1-O₄₇₅-V3 kopolimerlerinin pH-ışık saçılması şiddeti ve pH-hidrodinamik boyut grafikleri verilmektedir. S1-O₄₇₅-V3 kopolimerinin ışık saçılması şiddeti de pH 5'ten başlayarak pH arttıkça artmakta ve daha sonra sabit kalmaktadır. pH5 ve daha düşük pH'larda yaklaşık 7,5 nm çapındaki kopolimerlerin boyutları da aynı şekilde pH 5'ten

yukarı pH'larda artmakta ve sonra yaklaşık 28 nm'de sabit kalmaktadır. Kuarterner kopolimerler ise tüm pH'larda yaklaşık aynı ışık saçılması şiddetini göstermekte ve boyutları da yaklaşık 8 nm'de sabit kalmaktadır. S1-O₄₇₅-V1 kopolimerindeki gibi S1-O₄₇₅-V3 kopolimerinde de piridin grupları asidik pH'larda pozitif yüklenerek kopolimerlerin misel oluşturmalarını engellemekte ve nötralle bazik pH'larda ise hidrofobik hale geçerek misel oluşmasını sağlamaktadır. S1-O₄₇₅-V3 kopolimerindeki hidrofobik zincir daha uzun olduğu için daha güçlü hidrofobik etki gösterip daha fazla sayıda kopolimerin bir araya gelmesini sağlayarak daha büyük misellerin oluşmasına sebep olmuştur.



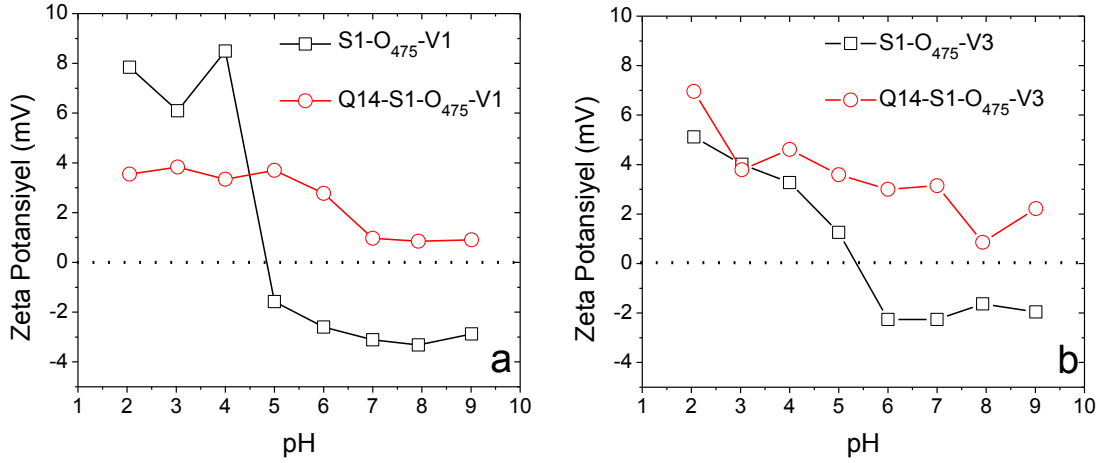
Şekil 4. 40 S1-O₄₇₅-V3 ve Q14-S1-O₄₇₅-V3 kopolimerlerinin pH-ışık saçılması şiddeti (a) ve pH-hidrodinamik boyut grafikleri (b)

Şekil 4.41'de kopolimer ve kuarterner kopolimerlerin farklı pH'lardaki %hacimce boyut dağılımları verilmektedir. Tüm pH'larda her kopolimer tek pik olarak görülmektedir. pH 9'da misel oluşturduğu düşünülen S1-O₄₇₅-V1 ve S1-O₄₇₅-V3 kopolimerlerinin de tek pik olduğu görülmektedir. Yani ortamdaki tüm kopolimerler misel yapısına katılmışlar ve ikincil agregasyon olmamıştır. Kuarterner kopolimerler ise yukarıdaki grafiklerde de görüldüğü üzere hem pH 2'de hem de pH 9'da aynı boyut dağılımlarını göstermektedirler.



Şekil 4. 41 S1-O₄₇₅-V1, S1-O₄₇₅-V3, Q14-S1-O₄₇₅-V1 ve Q14-S1-O₄₇₅-V3 kopolimerlerinin pH 2 ve pH 9'daki %-hacimce boyut dağılım grafikleri

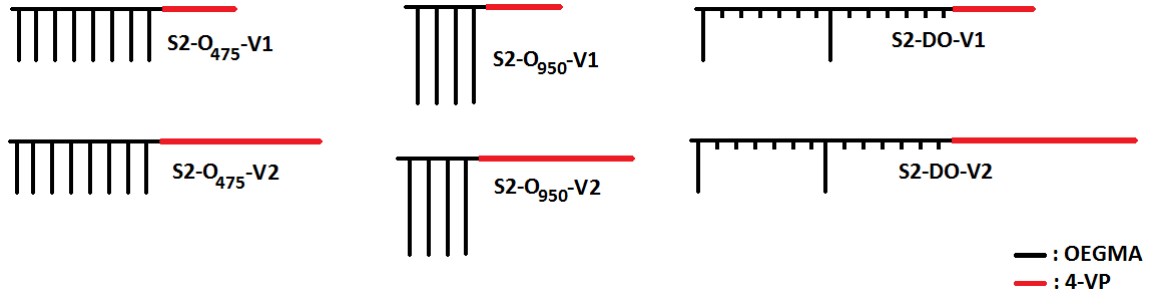
Kopolimerlerin ve kuarterner kopolimerlerin yüzey yükleri (zeta potansiyelleri) çözelti içindeki davranışlarını ve biyolojik aktivitelerini etkileyen en önemli özelliklerinden biridir. Zetasizer cihazı ile her kopolimer ve kuarterner kopolimerin zeta potansiyeli değişen pH'larda incelenmiştir ve Şekil 4.42'de verilen grafikler elde edilmiştir. Kuarterner kopolimerlerin pH-ışık saçılması grafiklerinden de anlaşıldığı üzere tüm pH'larda pozitif yüklü olarak bulunmaktadır. Piridin grupları metil-6-bromohekzanoat ile kalıcı olarak kuarternerleştirildiğinden kopolimer tüm pH'larda pozitif yüklüdür. Kopolimerlerden S1-O₄₇₅-V1 pH 5'e kadar, S1-O₄₇₅-V3 ise pH 6'ya kadar pozitif yüklenmiştir. Bu pozitif yükün sebebi kopolimerin yapısındaki piridin gruplarının asidik pH'larda protonlanarak kuarterner hale geçip pozitif yüklenmesidir.



Şekil 4. 42 S1-O₄₇₅-V1 ve Q14-S1-O₄₇₅-V1 (a) ile S1-O₄₇₅-V3 ve Q14-S1-O₄₇₅-V3 (b) kopolimerlerinin pH'a bağlı olarak zeta potansiyellerindeki değişim

4.3.2 Set 2 Kopolimerlerin İncelenmesi

Bu set kopolimerler dahilinde 6 farklı kopolimer bulunmaktadır ve Şekil 4.43'te yapıları şematik olarak gösterilmektedir. Bu kopolimerlerin her birinde yaklaşık olarak eşdeğer molekül ağırlığında poli(OEGMA) bloğu bulunmaktadır. Ancak bu poli(OEGMA) bloklarının yan zincir uzunlukları ve dolayısıyla metakrilat ana zincir uzunlukları da birbirlerinden farklıdır. Her makroCTA'ya farklı uzunluklarda poli(4-VP) bloğu eklenerek 6 farklı kopolimer elde edilmiştir.



Şekil 4. 43 Set 2 kopolimerlerin şematik gösterimi

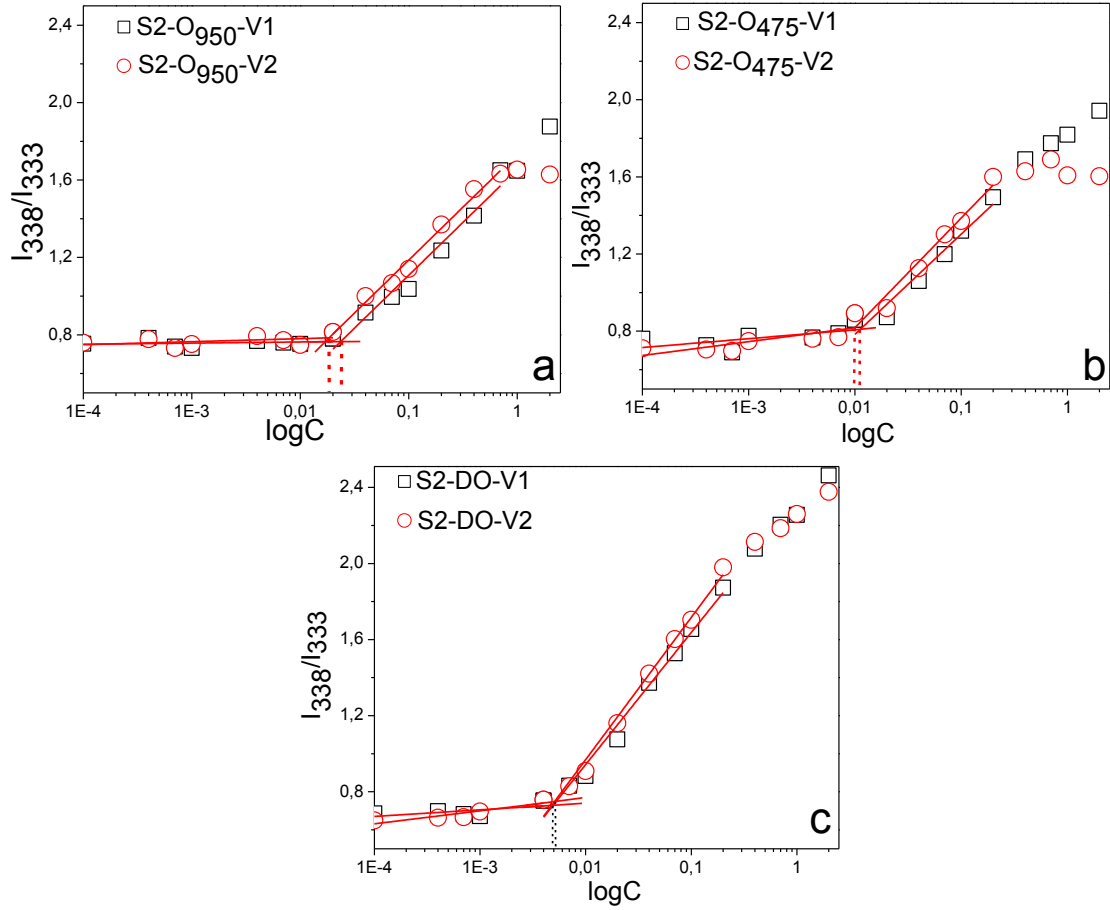
Bu setteki kopolimerlerin kritik misel konsantrasyonu (cmc) floresans spektrofotometre kullanılarak bulunmuştur. Bu amaçla $6 \cdot 10^{-7}$ M piren içeren tuzsuz fosfat tamponunda 0,0001-1 mg/mL konsantrasyon aralığında kopolimer çözeltileri hazırlanmıştır. Piren molekülünün floresans spektrumu mikroçevresinin polaritesine göre değişmektedir. Pirenin bu özelliği kullanılarak kopolimerlerden misel oluşumu gözlenmektedir. Piren molekülü miselin hidrofobik çekirdeğine hapsediğinde verdiği floresans spektrumu, pirenin su içinde serbest halde çözündüğünde verdiği floresans

spektrumundan farklıdır. Şekil 4.44'te piren içeren Set 2 kopolimer çözeltilerinin floresans spektrumlarından elde edilen I_{338}/I_{333} değerleri konsantrasyona karşı grafik olarak gösterilmiş ve her kopolimerin cmc değeri bulunmuştur.

Şekil 4.44 incelendiğinde cmc değeri en yüksek olan kopolimerlerin S2-O₉₅₀-V1 ve S2-O₉₅₀-V2 kopolimerleri olduğu görülmektedir. En düşük cmc değerine ise S2-DO-V1 ve S2-DO-V2 kopolimerleri sahiptir. Bu grafiklerden elde edilen tüm kopolimerlere ait cmc değerleri Çizelge 4.10'da verilmektedir. OEGMA bloğunun yan zincirindeki etilen glikol birimlerinin sayısı arttıkça poli(OEGMA) bloğunun hidrofilikliği artmaktadır. Bu sebeple de poli(OEGMA₉₅₀) bloğuna sahip S2-O₉₅₀-V kopolimerleri daha hidrofilik olmakta ve daha yüksek konsantrasyonlarda bir araya gelerek misel oluşturmaktadırlar. Buna karşın, OEGMA monomerlerinin yapısındaki metakrilat grubu hidrofobiktir. Bu sebeple de poli(DEGMA-OEGMA) bloğuna sahip kopolimerlerde metakrilat grubu daha fazla bulunmakta ve bu bloğun daha hidrofobik olmasına sebep olarak cmc değerini düşürmektedir.

Çizelge 4. 10 Set 2 kopolimerlerin kritik misel konsantrasyonları

Kopolimer	Kritik Misel Konsantrasyonu (mg/mL)
S2-O ₉₅₀ -V1	0,025
S2-O ₉₅₀ -V2	0,019
S2-O ₄₇₅ -V1	0,012
S2-O ₄₇₅ -V2	0,01
S2-DO-V1	0,0051
S2-DO-V2	0,0048



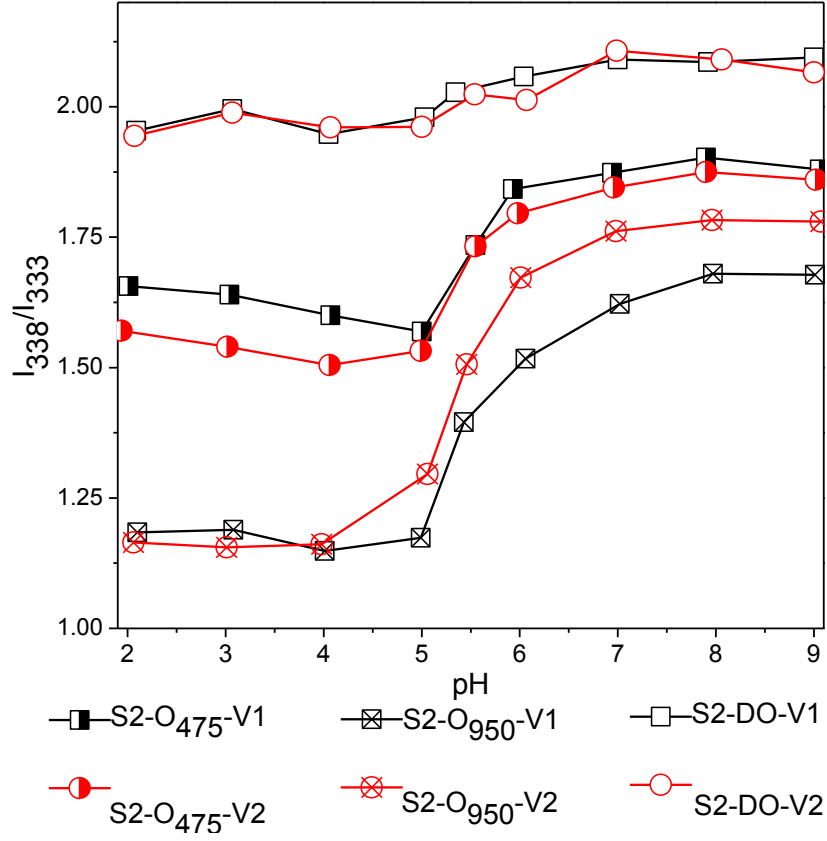
Şekil 4. 44 Set 2 kopolimerlerinin konsantrasyon değişimine karşı floresans şiddeti oranlarında (I_{338}/I_{333}) meydana gelen değişim

Çizelge 4.10 incelendiğinde aynı poli(OEGMA) bloğuna sahip ancak daha uzun poli(4-VP) zinciri bulunan kopolimerlerin cmc değerlerinin daha düşük olduğu görülmektedir. Poli(4-VP) hidrofobik karakterdedir ve bu polimerin zinciri uzadıkça kopolimerin hidrofobik özelliği arttığından sulu çözeltide daha düşük konsantrasyonda bir araya gelmektedirler. Ancak burada unutulmaması gereken nokta şudur: kopolimerlerin cmc değerlerini belirleyen blok OEGMA bloğudur. Zira OEGMA'nın yapısında meydana gelen değişim cmc değeri üzerinde poli(4-VP) zincir uzunluğunda meydana gelen değişimden daha etkilidir.

Set 2 kopolimerlerinin pH değişimine karşı verdikleri cevap floresans spektrofotometre ve ışık saçılması yöntemleriyle ayrı ayrı incelenmiştir. Bu amaçla, $6 \cdot 10^{-7}$ M piren içeren tuzsuz fosfat tamponunda pH değerleri 2-9 arasında değişen 1 mg/mL konsantrasyonda Set 2 kopolimer örnekleri hazırlanmıştır ve aynı örnekler her iki yöntemle de analiz edilmiştir.

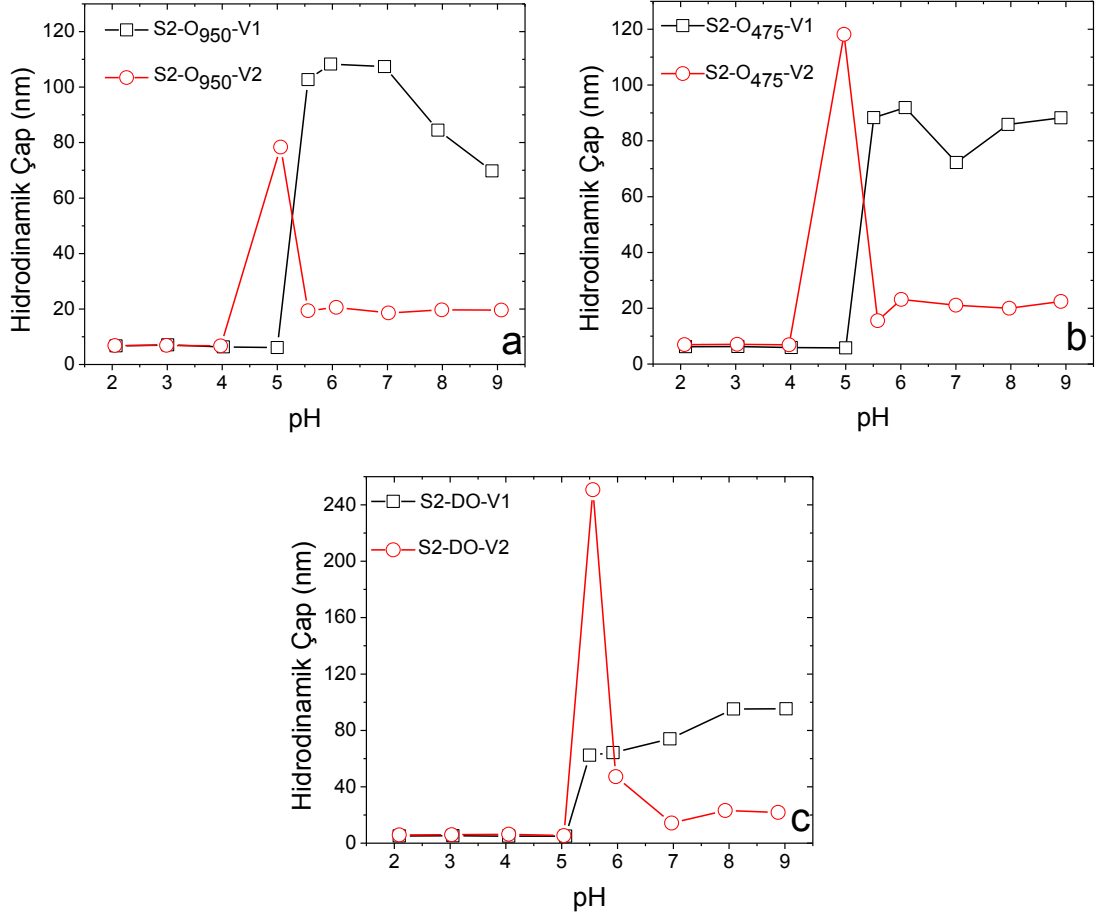
Şekil 4.45 farklı pH'larda hazırlanmış Set 2 kopolimerlerinin pH değişimine karşı floresans şiddeti oranlarında meydana gelen değişimi göstermektedir. Şekil incelendiğinde tüm kopolimerlerin I_{338}/I_{333} oranlarında pH 5'ten sonra ani bir artış olduğu görülmektedir. Bunun sebebi poli(4-VP) bloğunun pH 5'in üzerinde nötrleşerek hidrofoblaşmasıdır. Hidrofob poli(4-VP) blokları kopolimerlerin sulu çözelti içinde bir araya gelmesini sağlayarak misel yapıların oluşmasını sağlamaktadır. Misel çekirdeğinde hapsolan piren molekülerinin de floresans şiddeti oranları bu sebeple değişmiştir. pH 5 ve altındaki değerlerde ise poli(4-VP) bloğu pozitif yüklenerek kopolimerlerin bir araya gelmesini engellemektedir.

Şekil 4.45'te pH 5 ve daha düşük pH değerlerinde floresans şiddeti oranlarının farklı kopolimerler için farklı değerlerde sabit kaldığı görülmektedir. Poli(OEGMA₉₅₀) bloğuna sahip S2-O₉₅₀-V kopolimerlerinin bu alanda en düşük floresans değerine sahip olduğu, buna karşın poli(DEGMA-OEGMA₄₇₅) bloğuna sahip S2-DO-V kopolimerlerinin ise en yüksek değere sahip olduğu görülmektedir. pH'ın bu aralığında poli(4-VP) pozitif yüklü olduğundan piren moleküllerinin poli(OEGMA) blokları tarafından hapsedildiği anlaşılmaktadır. Şekil 4.46'daki verilerden de bu pH aralığında misel oluşmadığı gözlenmektedir. Poli(OEGMA) bloğunun hidrofob karakteri arttıkça, yani yan zincirlerindeki etilen glikol zinciri kısalдықça, piren molekülünün floresans şiddeti oranı artmaktadır.



Şekil 4. 45 Set 2 kopolimerlerinin pH değişimine karşı floresans şiddeti oranlarında (I_{338}/I_{333}) meydana gelen değişim

Şekil 4.46'da ise aynı çözeltilerin dinamik ışık saçılması spektroskopisi ile analizi sonucu elde edilen boyut değerleri verilmektedir. Boyut değerleri hacimce dağılımda en yüksek alana sahip pik değerine göre belirlenmiştir. Çoğu örnekte tek pik gözlenirken bazı örneklerde ikinci pikler gözlenmiştir. Bu durum ileride açıklanacaktır. Şekil 4.46'daki grafiklerde pH 5'e kadar olan boyut değerleri 7-8 nm aralığında değişmektedir. Bu değer tek başına polimerin boyutudur. pH değeri 5'in üstüne çıktığında boyut değerlerinin birden arttığı görülmektedir. Bu durum kopolimerlerin bir araya gelerek misel oluşturduğunu göstermektedir.

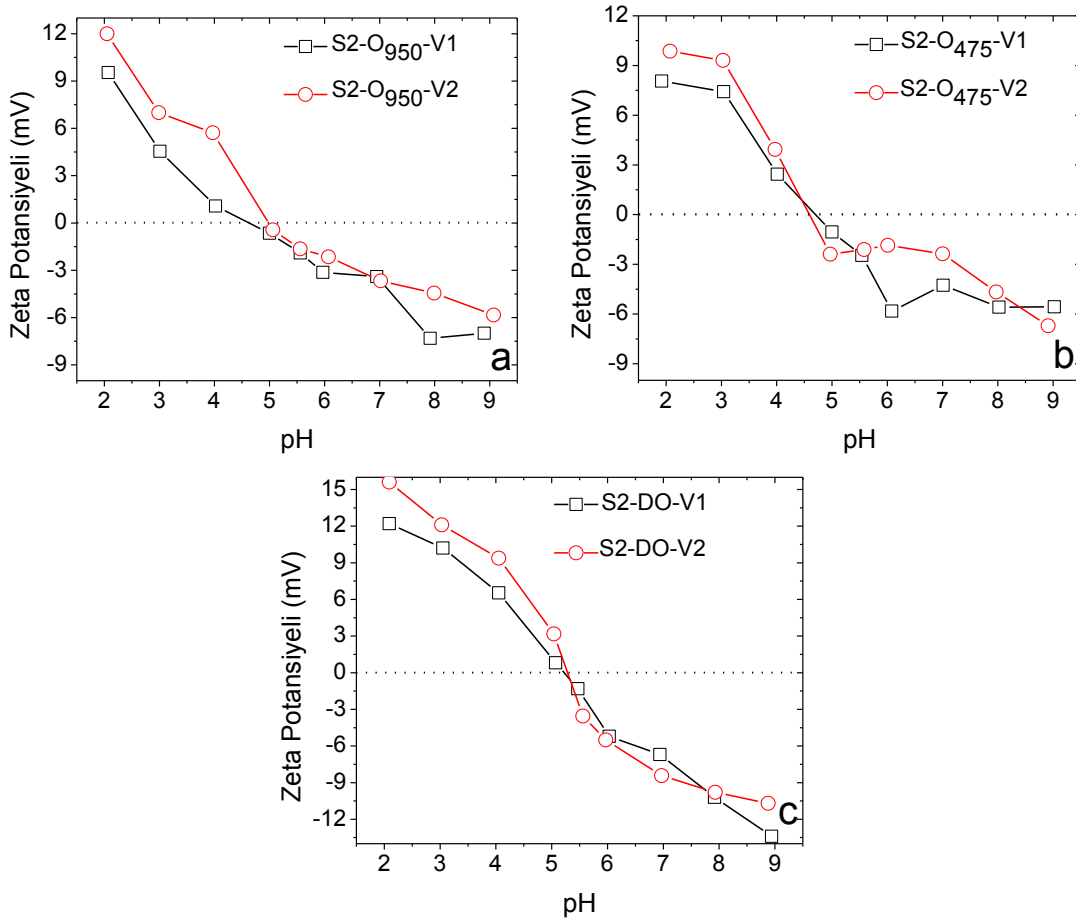


Şekil 4. 46 Set 2 kopolimerlerinin pH değişimine karşı hidrodinamik boyutlarında meydana gelen değişim

Şekil 4.46'daki grafiklerde aynı poli(OEGMA) zincirine sahip ancak daha uzun poli(4-VP) zincirine sahip kopolimerlerin kısa poli(4-VP) zincirli kopolimerlere kıyasla daha küçük boyutlara sahip olduğu net bir şekilde görülmektedir. Bunun, uzun zincirli poli(4-VP) bloklarının kooperatif etkiden dolayı birbirleriyle daha kuvvetli ve daha sıkı hidrofobik bağlar oluşturmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Diğer bir husus ise, aynı poli(OEGMA) bloğuna sahip ancak daha kısa poli(4-VP) zinciri bulunan kopolimerlerin pH 5'in üstü değerlerinde grafikte gösterilen değerlerden daha büyük boyutta ama düşük alana sahip ilave pikler görülmüştür. Bu ikinci piklerin misellerin ikincil agregasyonu sonucu oluşmuş yapılar olabileceği düşünülmektedir.

Oluşan yapıların elektroforetik ışık saçılması spektroskopisiyle ölçülen zeta potansiyel değerleri ise Şekil 4.47'de verilmiştir. Genel olarak tüm kopolimerlerin pH 5'e kadar pozitif yüklü olduğu ve pH arttıkça yük değerinin azaldığı görülmektedir. pH 5'te ve üstündeki değerlerde ise oluşan yapılar negatif yüklüdür. Bunun sebebi ise

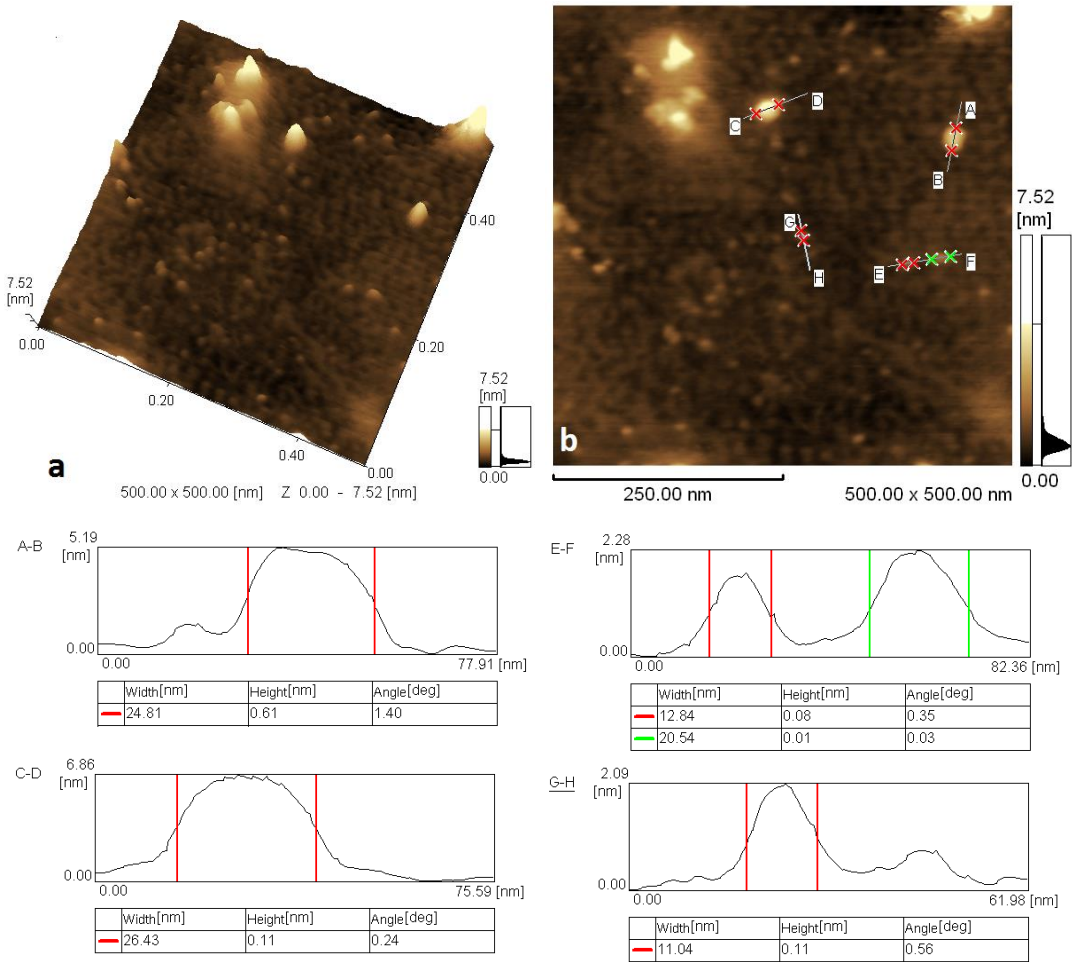
kopolimerlerin poli(OEGMA) bloğunun zincir ucunda RAFT ajanının karboksilik asit grubu bulunmaktadır. Bu pH'larda (pH 5-9) misel oluştuğunda poli(OEGMA) blokları sulu fazda kaldığından ve misel çok sayıda kopolimerden meydana geldiğinden net olarak negatif yüklü partiküller oluşmuştur.



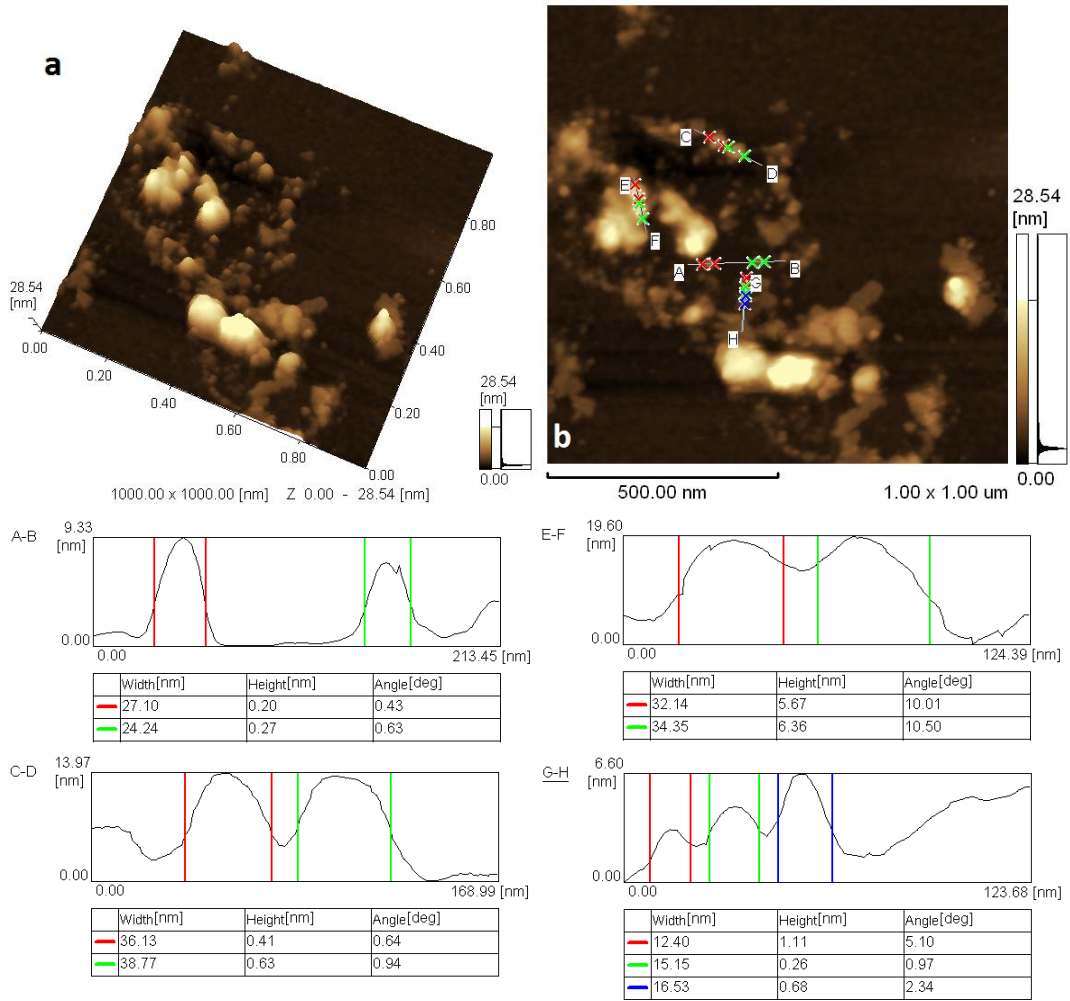
Şekil 4. 47 Set 2 kopolimerlerinin pH değişimine karşı zeta potansiyel değerlerinde meydana gelen değişim

Şekil 4.48 ve 4.49'da S2-O₄₇₅-V1 ve S2-O₄₇₅-V2 kopolimerlerinin AFM görüntüleri verilmektedir. Kopolimerlerin pH 7'de çözeltileri hazırlanarak AFM cihazının mika yüzeylerine uygulanmıştır. Görüntüler ve çizgi profilleri incelendiğinde, bu pH'ta oluşan misellerin küresel şekle sahip oldukları ve poli(4-VP) zinciri uzadıkça da yapının şeklinin değişmediği anlaşılmaktadır. Çizgi profillerinden elde edilen boyut değerleri ışık saçılması spektroskopisinde elde edilen boyut değerleriyle karşılaştırıldığında çıkan sonuçlar şöyledir. Işık saçılması ölçümü S2-O₄₇₅-V1 kopolimerini yaklaşık 70 nm çapa sahip gösterirken AFM görüntüsünde ortalama 19 nm çapında partiküller görülmüştür. Aynı şekilde, S2-O₄₇₅-V2 kopolimeri ışık saçılması ölçümünde yaklaşık 20 nm

boyutundayken AFM görüntüsünde ortalama 26 nm çapa sahiptir. S2-O₄₇₅-V2 kopolimeri için iki yöntemde de tutarlı sonuçlar alınmışken S2-O₄₇₅-V1 kopolimerinde bu sağlanamamıştır. Bunun sebebinin, AFM yönteminde kurutulmuş örneklerle çalışılması ve örneğin bir yüzey üzerine tutturulmasından kaynaklı hataların olabileceği düşünülmektedir. Ancak önemli olan nokta, kopolimer misellerin şeklinin her iki örnekte de küresel olmasıdır. Zira kopolimer içindeki hidrofobik bloğun uzunluğu arttıkça miselin şeklinin küreselden çubuk şekline ve hatta vesiküle dönüşebileceği bilinmektedir [132].

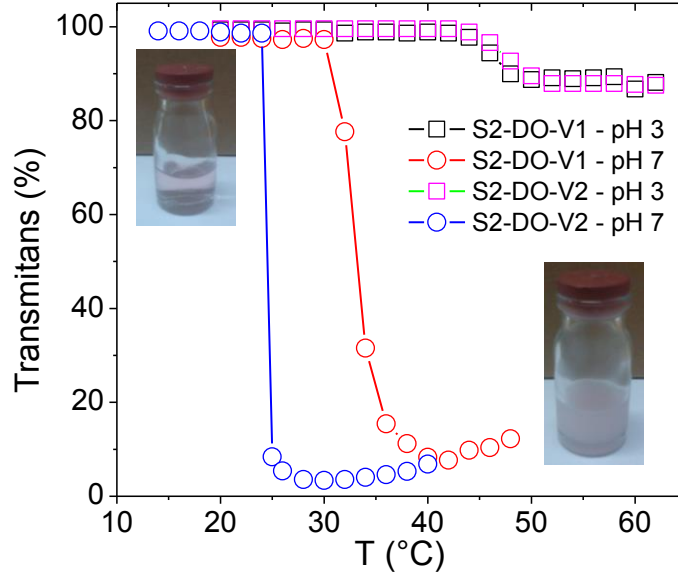


Şekil 4. 48 S2-O₄₇₅-V1 kopolimerinin AFM görüntüleri ve çizgi profilleri



Şekil 4. 49 S2-O₄₇₅-V2 kopolimerinin AFM görüntüleri ve çizgi profilleri

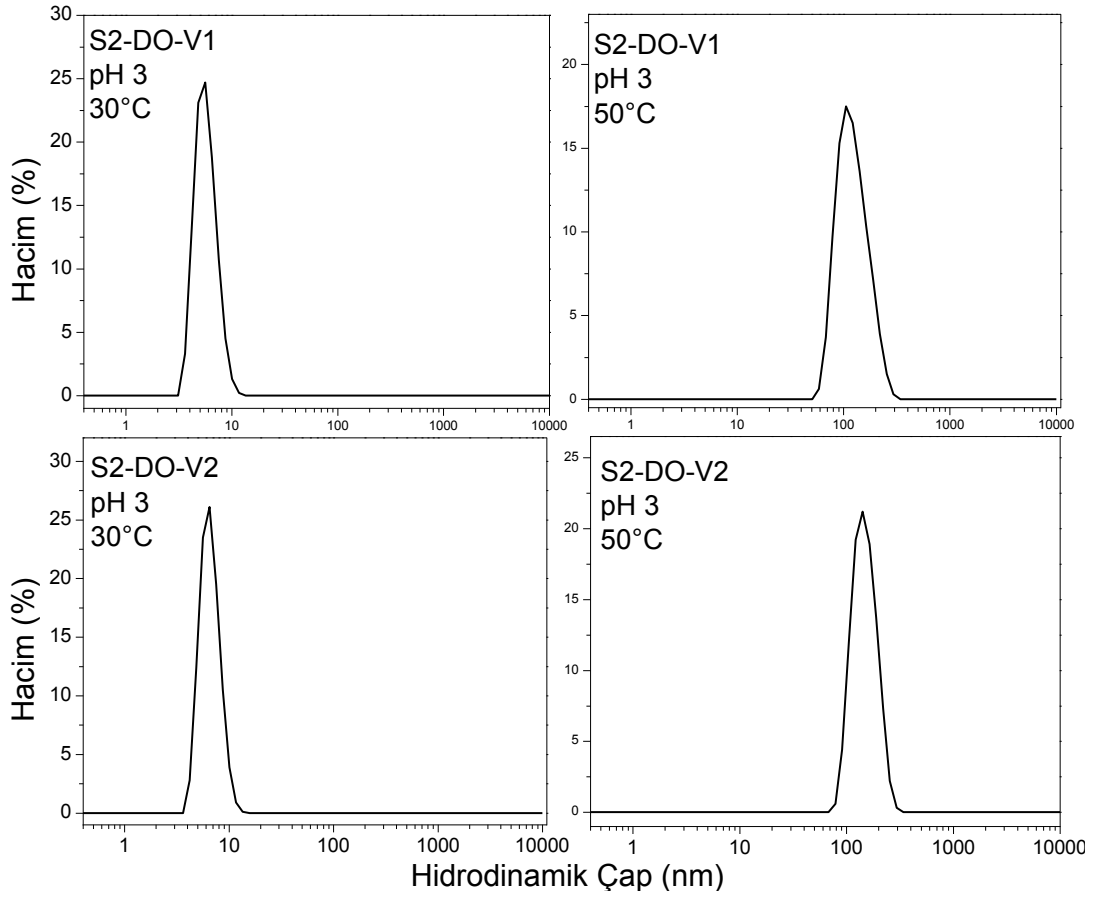
Sonraki aşamada sıcaklık değişimine karşı kopolimerlerin verdiği yanıtı incelemek amacıyla değişen sıcaklıklarda UV-görünür bölge spektroskopisi ve ışık saçılması spektroskopisi yöntemleriyle analizler gerçekleştirilmiştir. Kopolimerlerden sadece poli(DEGMA-OEGMA₄₇₅) bloğunu içeren S2-DO-V1 ve S2-DO-V2 kopolimerlerinin farklı sıcaklıklarda analizleri gerçekleştirilmiştir. Çünkü diğer kopolimerlerin içerdiği poli(OEGMA) bloklarının LCST değerleri biyolojik uygulamalar için çok yüksektir [162]. Yapılan çalışmalarda, molce %8 OEGMA₄₇₅ ve %92 DEGMA monomeri içeren bir poli(DEGMA-OEGMA₄₇₅) kopolimerinin LCST değerinin 37°C olduğu gösterilmiştir [162]. S2-DO-V1 ve S2-DO-V2 kopolimerleri, pH 3 ve pH 7'de hazırlanmış tampon çözeltilerde 1 mg/mL konsantrasyonda çözülmüşlerdir. Ardından çözelti sıcaklıkları 2'şer °C artırılıp çözelti kararlı hale geldikten sonra analizler yapılmıştır.



Şekil 4. 50 S2-DO-V1 ve S2-DO-V2 kopolimerlerinin sıcaklık değişimine karşı türbiditelerinde meydana gelen değişim

Şekil 4.50’de, UV-görünür bölge spektroskopisiyle 550 nm’de kopolimerlerin çözelti transmittans değerlerinde artan sıcaklıkla beraber meydana gelen değişim gösterilmektedir. İlk olarak pH 7’deki kopolimerlerden bahsedecek olursak, S2-DO-V1 kopolimerinin transmittans değeri 32°C’den itibaren azalmaktadır, yani çözelti bulanıklaşmaktadır. S2-DO-V2 kopolimerinin pH 7’de hazırlanan çözeltisi de 25°C’den itibaren bulanıklaşmaktadır. Bu kopolimerlerin LCST değerleri 25 ve 32°C’dir. Bu LCST değerleri, LCST değeri 37°C olan molce %8 OEGMA₄₇₅ içeren poli(DEGMA-OEGMA₄₇₅) polimerine kıyasla daha düşüktür. Ayrıca kopolimerlerin LCST değerleri kopolimerdeki poli(4-VP) zinciri uzadıkça düşmektedir. Bunun sebebi, artan poli(4-VP) zincir uzunluğunun kopolimeri daha hidrofobik hale getirmesidir. Daha hidrofobik olan kopolimerin suyla değil de molekül içi etkileşimleri artacağından daha düşük sıcaklıkta kopolimerler bir araya gelerek çökmektedirler.

pH 3’te ise kopolimerlerin 46°C’den itibaren transmittans değerlerinde azalma görülmektedir. Ancak bu azalma pH 7’deki kopolimerlerde görülen kadar şiddetli değildir. Ayrıca pH 7’deki kopolimerlere ve poli(DEGMA-OEGMA₄₇₅)’in kendisine göre pH 3’teki kopolimerler daha yüksek sıcaklıkta bulanıklaşmaya başlamışlardır. Oluşan yapıları daha iyi anlamak için pH 3’teki kopolimer çözeltileri LCST değerinin altında ve üstündeki sıcaklıklarda dinamik ışık saçılması spektroskopisiyle incelenmiştir ve Şekil 4.51’deki grafikler elde edilmiştir.



Şekil 4. 51 S2-DO-V1 ve S2-DO-V2 kopolimerlerinin pH 3'te LCST değerlerinin üstü ve altındaki sıcaklıklardaki hacimce boyut dağılımları

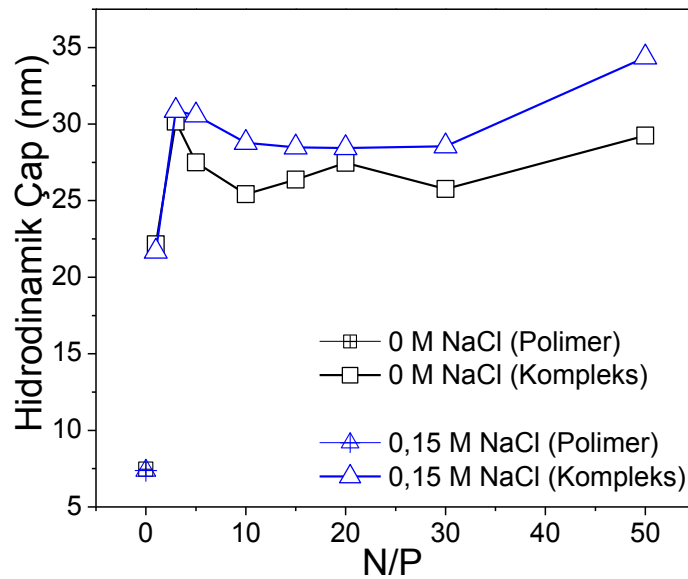
Şekil 4.51 incelendiğinde LCST değerinin altındaki bir sıcaklıkta pH 3'te hazırlanmış S2-DO-V1 ve S2-DO-V2 kopolimerleri tek başına kopolimerlerin verdiği boyut değerlerinde boyuta sahipler. Ancak aynı pH'ta sıcaklık LCST değerinin üstüne çıkarıldığında S2-DO-V1 ve S2-DO-V2 kopolimerleri sırasıyla 126,0 ve 150,5 nm çaplarında partiküller oluşturmaktadırlar. Burada yine misel yapıları olduğu düşünülmektedir.

4.4 Kuarterner Kopolimerlerin ODN ile Komplekslerinin İncelenmesi

Sentezlenen tüm kopolimerlerden Q-S2-DO-V2 kopolimeri, c-myc genini inhibe eden antisens oligonükleotid (ODN) ile kompleksleştirmek için seçilmiştir. Bu polimerin seçilme sebebi, hem tek bir kopolimer üzerinden daha ayrıntılı bir analiz gerçekleştirebilmek hem de bu kopolimerin sıcaklığa duyarlı olmasıdır.

İlk olarak, kopolimerin ODN ile kompleks oluşturabildiğini göstermek amacıyla değişen N/P oranlarında Q-S2-DO-V2 ve ODN 25°C'de karıştırılmıştır. Burada N/P oranı

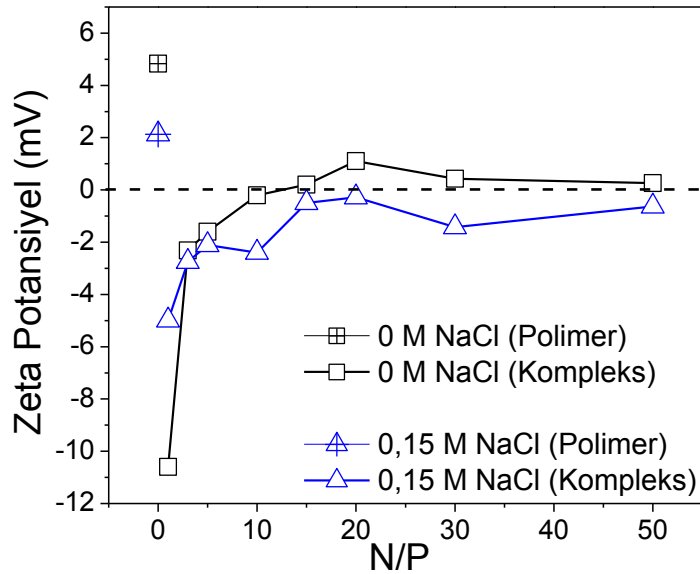
kopolimerdeki kuarterner azot sayısının ODN'deki fosfat grubu sayısına oranını göstermektedir. Bu çözeltiler hem tuzsuz fosfat tamponunda (pH 7) hem de 0,15 M NaCl içeren fosfat tamponunda (pH 7) hazırlanmıştır. Karışımların dinamik ışık saçılması spektroskopisi ile analizi sonucunda oluşan yapıların hacimce boyut değerleri Şekil 4.52'de verilmektedir. Bu şekle göre hem tuzlu hem de tuzsuz tamponda polimer tek başına 7,5 nm hidrodinamik çapa sahiptir. Kopolimerin ODN ile karıştırılması sonucunda minimum 22 nm hidrodinamik çapa sahip partiküller oluşmaktadır. Hem tuzlu hem de tuzsuz kopolimer-ODN çözeltilerinde N/P oranı artmasıyla beraber boyut değerinde çok büyük değişiklikler olmamaktadır. Tuzsuz çözeltide oluşan yapıların boyutları 22-29 nm arasında değişirken, 0,15 M NaCl içeren çözeltilerde boyut değerleri 22-34 nm arasında değişmektedir. Sonuç olarak kopolimerle ODN'nin elektrostatik kuvvetle birleşerek kompleks oluşturduğunu bu sonuçlara bakarak söyleyebiliriz. Ayrıca 0,15 M NaCl içeren çözeltilerde hazırlanan çözeltilerdeki sonuçlar fizyolojik şartlarda mevcut olan tuzun kompleks oluşumunu engellemediği görülmektedir.



Şekil 4. 52 Polimer ve farklı N/P oranlarındaki polimer-ODN komplekslerinin 25°C'de farklı tuz konsantrasyonlarındaki hidrodinamik çapları

Aynı çözeltilerin elektroforetik ışık saçılması spektroskopisi incelenmesiyle elde edilen zeta potansiyel değerleri Şekil 4.53'te verilmektedir. Partiküllerin yüzey yük değeri, hücre içine alınma prosesinin en çok etkileyen parametrelerden birisidir. Tek başına kopolimerin zeta potansiyel değerleri hem tuzsuz hem de 0,15 M NaCl içeren

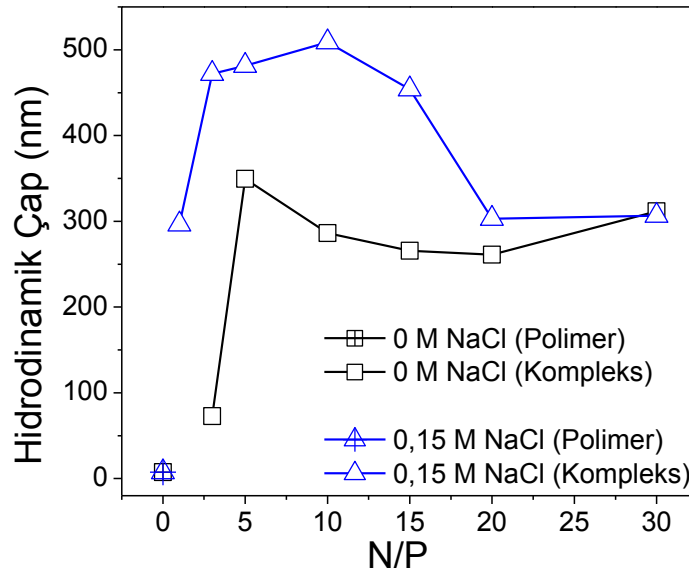
çözeltilerde pozitif yüklü kuarterner 4-VP birimlerinden ötürü pozitif çıkmıştır. Ancak kopolimere ODN eklenmesiyle beraber oluşan kompleksin yükü düşük N/P oranlarında negatifken oran arttıkça, tuzsuz çözeltilerde pozitive, 0,15 M NaCl içeren çözeltilerde nötre yakın negatif değerlere artmıştır. N/P oranı arttıkça oluşan yapıdaki kopolimer oranı arttığından komplekslerin yükü negatiften pozitive doğru değişmektedir.



Şekil 4. 53 Polimer ve farklı N/P oranlarındaki polimer-ODN komplekslerinin 25°C’de farklı tuz konsantrasyonlarındaki zeta potansiyel değerleri

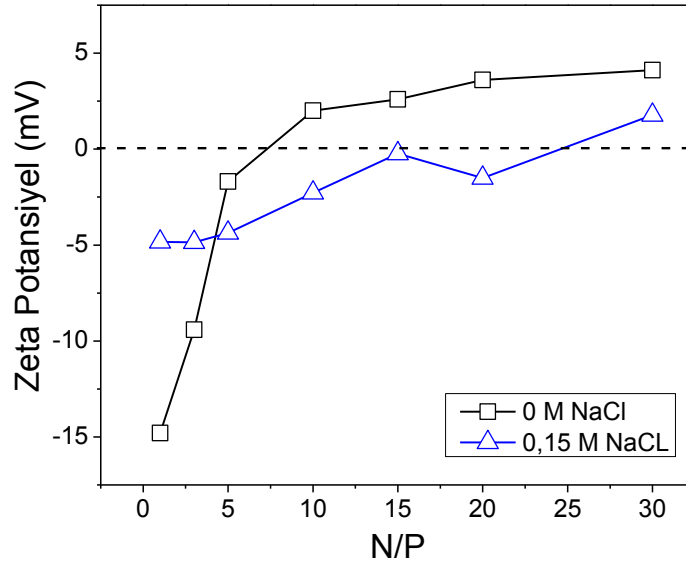
Yukarıda incelenen çözeltiler aynı şartlarda ancak farklı olarak 42°C’de ışık saçılması spektroskopisi ile incelendiğinde elde edilen veriler Şekil 4.54 ve 4.55’te verilmektedir. Çalışma sıcaklığı olarak 42°C’nin seçilmesinin nedeni bu sıcaklığın lokal hipertermi çalışmalarında kullanılıyor olmasıdır. Ancak sonraki şekillerde de görüleceği üzere 42°C’de polimer ve polimer-ODN kompleksleri çökmektedirler. 42°C’de boyut değişiminin daha doğru incelenebilmesi için örneklerin seyreltilerek ölçülmesi gerekmektedir. Bu sebeple 25°C için hazırlanmış çözeltiler 1/16 oranında seyreltilerek 42°C’ye ısıtılmıştır ve analiz edilmişlerdir. Şekil 4.54’te kopolimerin boyutu hem tuzlu hem de tuzsuz çözeltilerde 7,5 nm’dir. S2-DO-V1 ve S2-DO-V2 kopolimerlerinin pH 3’teki sıcaklık davranışlarıyla karşılaştırıldığında kuarterner kopolimerin bu sıcaklıkta tek başına kopolimer boyutunda olması normaldir. Zira pozitif yüklü kuarternerleştirilmiş poli(4-VP) bloğu kopolimerin LCST değerinin daha yüksek değerlere kaymasına sebep olmuştur. Kopolimer tuzsuz çözeltide ODN ile değişen N/P oranlarında karıştırıldığında önce 72 nm çapında bir kompleks oluşmuş ve oran

arttırıldıkça 260-350 nm arsında değişen çaplarda kompleks partikülleri oluşmuştur. 0,15 M NaCl içeren tamponda hazırlanmış komplekslerin boyutu ise oranla beraber önce artmış daha sonra azalmıştır. Tuzlu tamponda hazırlanan komplekslerin boyutları 300-500 nm gibi çok geniş bir aralıktadır değişmektedir.



şekil 4. 54 Farklı N/P oranlarındaki ve 1/16 oranında seyreltilmiş kopolimer-ODN komplekslerinin ve kopolimerin 42°C’de farklı tuz konsantrasyonlarındaki hidrodinamik çapları

Yukarıda bahsedilen 1/16 oranında seyreltilmiş kopolimer eltilerin elektroforetik ışık saçılması spektroskopisi ile incelenmesi sonucunda şekil 4.55’te verilen zeta potansiyel değerleri elde edilmiştir. N/P’nin düşük oranlarında negatif yüklü olan kopolimer-ODN kompleksleri oran arttık yapıdaki kopolimer miktarı arttığı için yük değerleri pozitif’e doğru değişmektedir. Tuzsuz tamponda hazırlanan komplekslerin yükleri oran 10’dan daha yüksek oranlarda net pozitifken tuzlu tamponda hazırlanan komplekslerin yükü ancak oran 30’da pozitif olmuştur. Ancak tuzlu tamponda hazırlanan komplekslerin yükü oran 10’dan sonra nötrale yakın negatiftir.

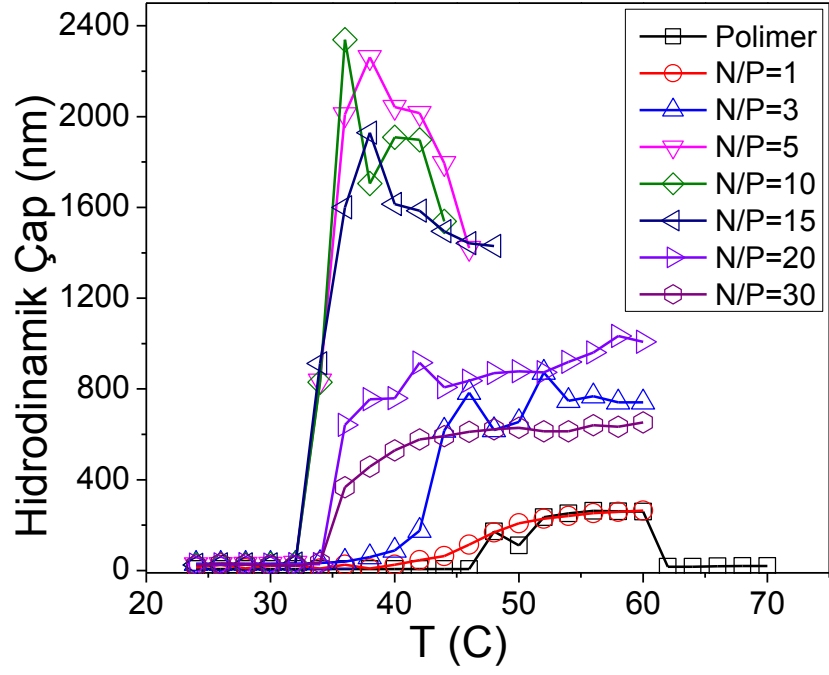


Şekil 4. 55 Farklı N/P oranlarındaki ve 1/16 oranında seyreltilmiş kopolimer-ODN komplekslerinin ve kopolimeri 42°C’de farklı tuz konsantrasyonlarındaki zeta potansiyel değerleri

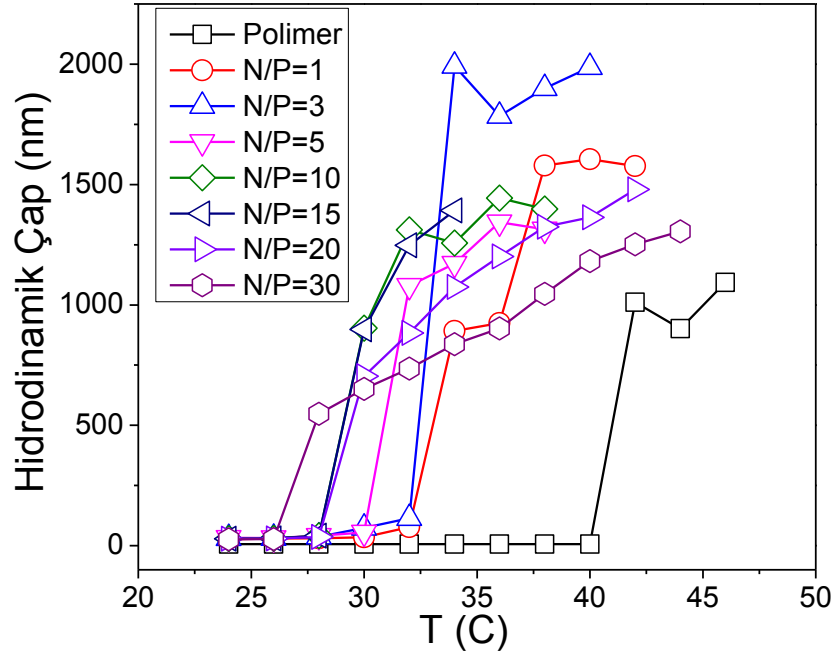
Kopolimerin ODN ile kompleksleştirilmesi sonucunda LCST değerinde herhangi bir değişme olup olmadığı incelenmiştir. Bu amaçla tuzsuz ve 0,15 M NaCl içeren tamponda (pH 7) farklı N/P oranlarında hazırlanmış kopolimer-ODN kompleksleri değişen sıcaklıklarda incelenmiştir. Elde edilen veriler Şekil 4.56 ve 4.57’de verilmektedir.

Tuzsuz tamponda hazırlanan kopolimerin LCST değeri 48°C’dir (Şekil 4.56). Kopolimer ODN ile karıştırıldığında LCST değerinin 34°C’ye kadar kaydığı görülmektedir. Ayrıca çok daha büyük yapıların oluştuğu da Şekil 4.56’dan anlaşılmaktadır. LCST değerinin düşmesinin sebebi olarak pozitif yüklü kuarternar 4-VP gruplarının ODN’de bulunan zıt yüklü fosfat gruplarıyla birleşerek nötralleşip hidrofob hale dönüşmesi verilebilir. Yapının hidrofoblaşması da LCST değerinin daha düşük değerlere kaymasına yol açmaktadır.

0,15 M NaCl içeren tamponda hazırlanan kopolimerin LCST değeri 42°C’ye düşmüştür. Bunun sebebi, çözeltide bulunan tuz konsantrasyonunun artması hidrofob etkileşimlerin artmasına sebep olmasıdır. Bu yüzden de kopolimerin LCST değeri daha düşük değerlere kaymaktadır. Aynı etki komplekslerde de görülmektedir. Komplekslerin LCST değerlerinin 28°C’ye kadar düştüğü Şekil 4.57’de görülmektedir.



Şekil 4. 56 NaCl içermeyen tamponda hazırlanmış kopolimer ve kopolimer-ODN komplekslerinin sıcaklık değişimine karşı hidrodinamik çaplarında meydana gelen değişim

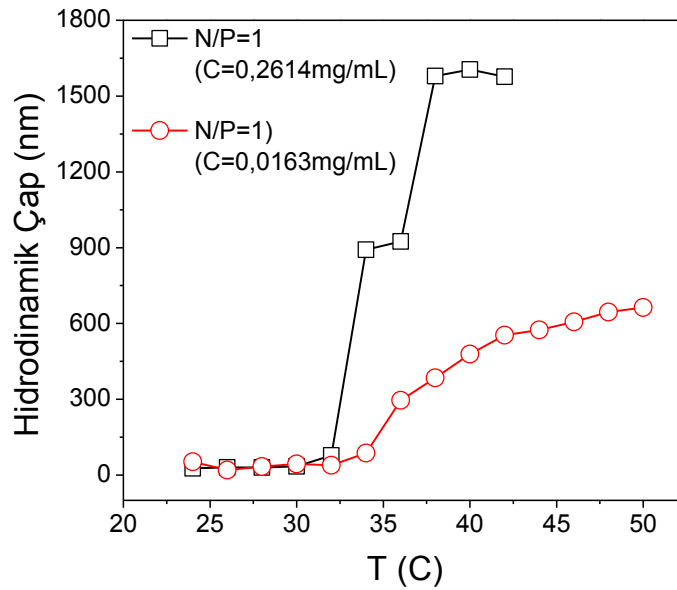


Şekil 4. 57 0,15 M NaCl içeren tamponda hazırlanmış kopolimer ve kopolimer-ODN komplekslerinin sıcaklık değişimine karşı hidrodinamik çaplarında meydana gelen değişim

Bu noktaya kadar yapılan analizlerden, toplam çözelti konsantrasyonunun kopolimer-ODN komplekslerinin özelliklerine etki ettiği anlaşılmaktadır. Konsantrasyonla ilgili

diğer önemli bir husus da bu komplekslerin vücuda verildiğinde yüksek oranda seyreilmeye uğrayacaklarıdır. Bu sebeple seyreltik kopolimer-ODN karışımlarında kompleks oluşumunun gerçekleştiğini göstermek amacıyla kopolimer-ODN kompleksleri değişen oranlarda seyreltilerek ışık saçılması spektroskopisiyle incelenmiştir.

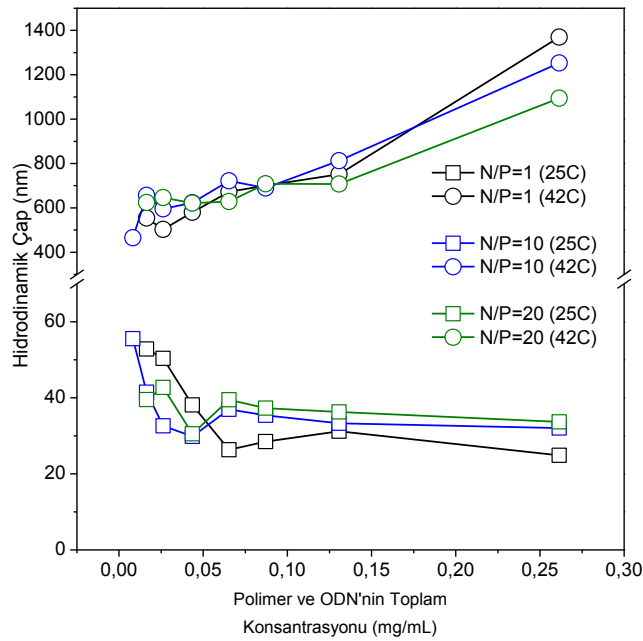
Şekil 4.58’de aynı oranda ($N/P=1$) hazırlanmış fakat toplam konsantrasyonları farklı iki kopolimer-ODN kompleksinin (0,15 M NaCl içeren tamponda hazırlanmış) sıcaklık değişimine bağlı olarak boyutlarında meydana gelen değişim görülmektedir. Derişik hazırlanan kompleksin yaklaşık 2°C daha düşük LCST’ye sahip olduğu ve çok daha büyük çapa sahip partiküllerin oluştuğu görülmektedir. Ancak önemli olan nokta kompleks çözeltisi 1/16 gibi bir oranda bile seyreltilse de kopolimer-ODN kompleksi bileşenlerine ayrılmamakta ve sıcaklık değişimine duyarlılığı devam etmektedir.



Şekil 4. 58 Farklı konsantrasyonda ama aynı N/P oranında hazırlanmış polimer-ODN komplekslerinin sıcaklık değişimine karşı hidrodinamik çaplarında meydana gelen değişim

Şekil 4.58 ile ilgili diğer bir konu ise Şekil 4.54 ile karşılaştırıldığında ortaya çıkmaktadır. $N/P=1$ ve 1/16 seyreltmeyle 0,15 M NaCl içeren tamponda hazırlanıp 42°C 'ye ısıtılan kopolimer-ODN kompleksinin çapı Şekil 4.54'te 296 nm iken Şekil 4.58'de 554 nm'dir. Komplekslerin tekrarlanabilir boyutlarda hazırlanamamasının sebebi olarak; kopolimer ve ODN arasındaki elektrostatik etkileşim ve ayrıca LCST değerinin üzerinde ortaya çıkan hidrofobik etkileşimden dolayı bileşenlerin stokiometrik oranlarda

birleşmemesi ve rasgele bir araya gelmeleri verilebilir. Ancak bu durum özellikle LCST değerinin üzerinde sıcaklıklarda hazırlanan komplekslerde gözlenmiştir.



Şekil 4.59 Farklı N/P oranlarında hazırlanmış polimer-ODN komplekslerinin LCST değerlerinin üstü ve altındaki sıcaklıklarda konsantrasyon seyrelmesine karşı boyutlarında meydana gelen değişim

Konsantrasyon etkisinin daha iyi anlaşılabilmesi için LCST değerlerinin altında ve üstündeki sıcaklıklarda farklı N/P oranlarında hazırlanan kompleksler dinamik ışık saçılması spektroskopisi ile incelenmiştir (Şekil 4.59). LCST değerinin üzerindeki sıcaklıkta hazırlanan komplekslerin boyutları çözelti seyreltildikçe önemli derecede küçülmektedir. Kompleksler seyreltildikçe boyutları ufalmakta ancak bileşenlerine ayrılmamaktadırlar.

LCST değerinin altındaki sıcaklıkta hazırlanan komplekslerin boyutları ise çözelti seyreltildikçe artmaktadır. Burada da kompleksin bileşenlerine ayrılmadığı görülmektedir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1 Homopolimer Sentezi

Tez çalışmasında hedeflenen kopolimeri sentezlemek üzere seçilen RAFT polimerizasyonu yönteminde serbest radikal polimerizasyondan farklı olarak zincir transfer ajanları (CTA, RAFT ajanı) kullanılmaktadır. Blok kopolimer sentezlerken kopolimerdeki her monomerin polimerizasyonunda kullanılabilecek ortak bir RAFT ajanı seçilmelidir. Bu amaçla tez çalışmasına, hedeflenen blok kopolimerdeki poli(OEGMA) ve poli(4-VP) bloklarının sentezinde kullanılabilecek 4 farklı RAFT ajanından birini seçmekle başlanmıştır. Farklı RAFT ajanları ve farklı $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0$ oranları denendikten sonra CTA4 kullanılarak yapılan OEGMA₄₇₅ (Şekil 4.5, 4.6) ve 4-VP (Şekil 4.10) polimerizasyonlarında $\ln([M]_0/[M]_t)$ 'nin reaksiyon süresiyle lineer olarak arttığı, molekül ağırlığının (M_n) monomer dönüşümüyle birlikte lineer olarak arttığı ve PDI değerlerinin 1-1,2 aralığında olduğu görülmüştür. Bu sebeple CTA4'ün her iki monomerin polimerizasyonunda kullanılabilecek RAFT ajanı olduğuna karar verilmiştir. Ancak özellikle OEGMA monomerlerinin (OEGMA₄₇₅, OEGMA₉₅₀ ve DEGMA) CTA4 ile RAFT polimerizasyonunda reaksiyonun gecikmeli olarak başladığı ve reaksiyon başlangıcında yüksek molekül ağırlığına ulaşıldığı görülmüştür. Reaksiyonun geç başlaması, ditiyobenzoatla yapılan polimerizasyonlarda görülen gecikme etkisinden kaynaklandığı bilinmektedir [163]. Reaksiyonun başlangıç basamağında ulaşılan yüksek molekül ağırlığı ise Pietsch ve arkadaşları tarafından hibrit davranış olarak tanımlanmıştır [164]. Hibrit davranışta, reaksiyonun ön dengelenme basamağında hem serbest radikal polimerizasyon hem de RAFT polimerizasyonu beraber ilerlemektedir.

5.2 Blok Kopolimer Sentezi ve Blok Kopolimer Miseller

Çalışmanın sonraki aşamasında hedef polimerlerin sentezinin ilk basamağı olan makroCTA sentezi gerçekleştirilmiştir. 3 farklı makroCTA sentezlenmiştir. Bunlar poli(OEGMA₄₇₅), poli(OEGMA₉₅₀) ve poli(DEGMA-OEGMA₄₇₅)'tir. MakroCTA'ların yaklaşık 20 kDa molekül ağırlığında olmasına dikkat edilmiştir. Bu makroCTA'lar kullanılarak sonraki aşamada 2 set halinde kopolimerler sentezlenmiştir

5.2.1 Set 1 Kopolimerleri

Set 1 kopolimerleri sadece makroCTA1 (poli(OEGMA₄₇₅)) kullanılarak sentezlenmiştir (Şekil 4.11-4.14). MakroCTA1 zincirinin ucundan farklı uzunluklarda poli(4-VP) bloğu uzatılarak iki farklı kopolimer sentezlenmiştir (Şekil 4.15). Bu sayede hidrofilik kısımları aynı ama hidrofobik kısımlarının uzunluğu farklı iki kopolimer sentezlenmiştir. NMR ve FTIR spektrumlarıyla da kopolimerin yapısı doğrulanmıştır (Şekil 4.17, 4.18). Set 1 kopolimerlerinin poli(4-VP) blokları 6-bromohekzanoat kullanılarak farklı oranlarda kuarternleştirilmiştir. Elde edilen yapılar FTIR (Şekil 4.19) ve NMR (Şekil 4.20) spektrumlarıyla doğrulanmış, kuarternleştirme dereceleri hesaplanmıştır.

Set 1 kopolimerlerinin çözelti davranışları ışık saçılması spektroskopisi ile incelenmiştir (Şekil 4.38-4.42). Blok kopolimerlerin kritik misel konsantrasyonu birçok yöntemle bulunabilmektedir. Ancak bunlardan en çok kullanılanları floresans spektrometre ve ışık saçılması spektrometresi yöntemleridir. Set 1 kopolimerlerinin cmc değerleri blok kopolimerlerin ışık saçılması şiddetlerinde ani artışın meydana geldiği konsantrasyon bulunarak gerçekleştirilmiştir. S1-O₄₇₅-V1 ve S1-O₄₇₅-V3 kopolimerlerinin cmc değerleri sırasıyla 0,05 ve 0,012 mg/mL olarak belirlenmiştir. Sonuçlardan anlaşıldığı üzere poli(4-VP) zinciri uzadıkça cmc değeri küçülmektedir. Artan hidrofobik zincir uzunluğu hidrofobik etkileşimin kuvvetini arttırarak kopolimerlerin daha düşük konsantrasyonda bir araya gelmesini sağlamıştır.

Set 1 kopolimerlerinin pH değişimine karşı yapılarında meydana gelen değişim dinamik ve elektroforetik ışık saçılması yöntemleriyle incelenmiştir. Dinamik ışık saçılmasıyla kopolimerler incelendiğinde kopolimerlerin boyutlarının pH 2-5 aralığında sabit kaldığı ve 6,5-7 nm aralığında hidrodinamik çapa sahip oldukları görülmektedir. pH 5'in

üzerine çıkarıldığında kopolimerlerin boyutları artmaktadır. Kısa poli(4-VP) bloğu içeren S1-O₄₇₅-V1 kopolimerinin boyutu 15 nm'ye ulaşırken, uzun poli(4-VP) zincirine sahip kopolimerin boyutu 26 nm'ye ulaşmıştır. Uzun poli(4-VP) zincirinin kuvvetli hidrofobik etkisinden dolayı daha fazla sayıda kopolimerin bir araya geldiği düşünülmektedir. Kopolimerlerin zeta potansiyelleri incelendiğinde ise pH arttıkça kopolimerlerin yüzey yüklerinin azaldığı görülmektedir. Yaklaşık olarak pH 5'e kadar pozitif olarak kalan kopolimerler pH 5'in üstündeki değerlerde negatif yüklü hale gelmektedirler. pH 5'in altındaki değerlerde poli(4-VP) bloğu pozitif yüklenmektedir ve misel oluşumunu engellemektedir. pH 5'in üstündeki değerlerde ise kopolimerler bir araya gelmektedirler. Poli(OEGMA₄₇₅) bloğunun zincir ucunda bulunan -COOH grubu bu pH'ta iyonlaşarak negatif yüklenmektedir. Kopolimerler bir araya gelerek misel oluşturdıklarında poli(OEGMA₄₇₅) bloğu ve bu bloğun zincir ucu sulu fazda kalmaktadırlar. Bu da misellerin negatif yüklenmesine sebep olmaktadır.

Set 1 kopolimerlerinin kuarternerleştirilmesiyle oluşan kopolimerler de aynı yöntemlerle incelendiğinde hiçbir pH değerinde misel oluşturmamaları görülmektedir. pH 2-9 aralığında boyut değerleri 6,4-9,2 nm arasında değişmektedir. Zeta potansiyel değerlerinde ise pH değeri arttıkça bu kopolimerlerinde yüzey yük değerlerinin azaldığı gözlenmektedir. Ancak incelenen pH skalasının hiçbir noktasında nötral veya negatif yüklü kuarterner kopolimer bulunmamaktadır. Kuarterner kopolimerlerin zeta potansiyel değerlerinin pH artışıyla beraber azalmasının sebebi ise kopolimerlerin kısmen kuarternerleştirilmiş olmasıdır. Kuarterner olmayan 4-VP birimleri asidik pH'ta pozitif yüklenmekte ancak nötral ve bazik pH değerlerinde ise yüksüz hale gelerek kopolimerin toplam pozitif yükünün azalmasına sebep olmaktadır.

5.2.2 Set 2 Kopolimerleri

Set 2 kopolimerleri 3 farklı makroCTA kullanılarak sentezlenmiştir. Yaklaşık 20 kDa molekül ağırlığına sahip poli(OEGMA₄₇₅), poli(OEGMA₉₅₀) ve poli(DEGMA-OEGMA₄₇₅) polimerlerinin zincir uçlarından RAFT polimerizasyonu ile poli(4-VP) zincirleri uzatılmıştır. Her bir makroCTA'dan farklı uzunluklarda poli(4-VP) zinciri içeren iki kopolimer sentezlenmiştir. Toplamda 6 farklı kopolimer sentezlenerek analiz edilmiştir. Kopolimerler sentezlenirken her birinin poli(OEGMA) bloklarının molekül ağırlıklarının

eşdeğer olmasına ve farklı poliOEGMA bloğu içeren kopolimerlerden de en az birer tanesinin poli(4-VP) bloklarının da eşdeğer uzunluğa sahip olmasına dikkat edilmiştir. Bu sayede poliOEGMA bloğunun yan zincir uzunluğunun oluşan yapıya etkisi daha iyi anlaşılabilir.

Kopolimerlerin RAFT tekniğiyle başarılı bir şekilde sentezlendikleri kinetik grafikleri, molekül ağırlığı ve polidispersite grafikleri ile NMR spektrumlarından anlaşılmaktadır. Ancak kopolimer sentezinde ikinci aşamada poli(4-VP) zinciri uzatılırken elde edilen ürünlerde verim çok düşük olmaktadır. Bu durumla Set 1 kopolimerlerin sentezinde de karşılaşmıştır (Şekil 4.15).

Set 2 kopolimerlerinin ilk olarak cmc değerleri saptanmıştır. Floresans spektrometre kullanılarak gerçekleştirilen analizlerde prob olarak hidrofobik piren molekülü kullanılmıştır. Bu yöntemin diğer bir avantajı da misel çekirdeğine hidrofobik moleküllerin yüklenebildiğinin gösterilmesidir. 0,0001-1 mg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan kopolimer çözeltilerinin cmc değerlerinin 0,0048-0,025 mg/mL arasında değiştiği bulunmuştur (Şekil 4.44 ve Çizelge 4.10). cmc değeri en yüksek olan kopolimerler poli(OEGMA₉₅₀) bloğuna sahip olan kopolimerlerken, cmc değeri en düşük olanlar ise poli(DEGMA-OEGMA₄₇₅) bloğuna sahip olan kopolimerler olduğu görülmektedir. PoliOEGMA bloğundaki yan zincirler kıaldıkça bu blok hidrofoblaşarak kopolimerlerin daha düşük konsantrasyonlarda misel oluşturmaya sebep olmaktadır. Artan etilen glikol zincir uzunluğu da kopolimerin hidrofilikliğini arttırmaktadır. Aynı poliOEGMA bloğuna sahip kopolimerlerden de poli(4-VP) zinciri daha uzun olanların cmc değerlerinin daha düşük olduğu görülmüştür. Bu durum Set 1 kopolimerlerle de uyumludur.

Set 2 kopolimerlerin pH değişimine karşı cevapları önce floresans spektrometre ile incelenmiştir (Şekil 4.45). Kopolimerlerin hepsinin floresans şiddeti oranları pH 5'e kadar sabitken daha yukarıdaki pH değerlerinde floresans şiddeti oranlarında ani bir artış olmaktadır. Bu durum pirenin hidrofobik mikroçevre içine yerleştiğini göstermektedir. Burada hidrofobik mikroçevre, oluşan blok kopolimer misellerin çekirdeğidir. Ancak Şekil 4.45 incelendiğinde ilginç bir durum gözlenmektedir. pH 5'in altındaki floresans şiddeti değerleri sabit olmasına rağmen, özellikle poli(DEGMA-

OEGMA₄₇₅) içeren kopolimerler için oldukça yüksek değerlerdir. Bu durum boyut grafiğiyle beraber incelendiğinde tek başına kopolimerlerin de piren molekülünü hapsedebildiği anlaşılmaktadır. Poli(OEGMA₉₅₀) en hidrofilik karakterdeki poliOEGMA bloğu olmasına karşın onun kopolimerlerinin bile asidik pH değerlerinde yaptığı floresans emisyonu piren moleküllerinin yapıda az da olsa hapsedildiğini göstermektedir.

Işık saçılması yöntemleriyle incelendiklerinde Set 2 kopolimerlerinin boyut değişimleri floresans ölçümleriyle uyumludur. pH 5'in yukarıdaki değerlerde kopolimerlerin boyutu artmaktadır. Ancak pH 5'in altındaki değerlerde 7-8 nm aralığındadır. Ancak boyut analizleri incelendiğinde Set 1 kopolimerleriyle bir farklılık olduğu görülmektedir. Set 2 kopolimerlerinde pH 5'in üstündeki değerlerde uzun poli(4-VP) zincirine sahip kopolimerlerin boyutu kısa olanlardan daha ufakken, bu durum Set 1 kopolimerlerde tam tersidir. Ancak burada şu unutulmamalıdır ki Set 1 ve Set 2'deki poli(OEGMA₄₇₅) bloğu içeren blok kopolimerlerin molekül ağırlıkları birbirlerinden farklıdır. Bu sebeple de farklı karakterde davranış göstermiş olabilirler. Set 2 kopolimerlerinin zeta potansiyel değerleri ise Set 1 kopolimerleriyle uyumludur.

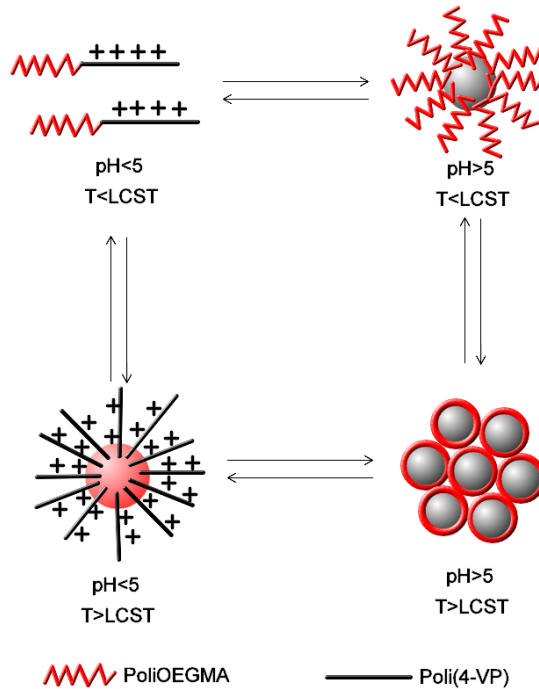
AFM görüntüleri sentezlenen blok kopolimerlerin misellerin küresel yapıda olduklarını göstermektedir.

Set 2 kopolimerleri içinde poli(DEGMA-OEGMA₄₇₅) bloğu içeren kopolimerler sıcaklığa duyarlıdırlar. Bu özelliklerini incelemek amacıyla UV spektrometre ile turbidimetrik ölçümleri yapılmıştır. Kopolimerler pH 3 ve pH 7'de hazırlanarak artan sıcaklık değerlerinde incelenmişlerdir. pH 7'deki kopolimerlerin LCST değerleri uzun poli(4-VP) zincirli kopolimer için 25°C bulunurken kısa poli(4-VP) zincirli kopolimer için 32°C olarak bulunmuştur. Burada poli(4-VP) zincirinin kopolimerin LCST değerine etkisi çok net görülmektedir. Kopolimerdeki artan hidrofobik karakter LCST değerinin daha düşük değerlere kaymasına sebep olmuştur. Çözeltilerde LCST değerinin üstündeki sıcaklıklarda ışık saçılması yöntemiyle incelenemeyecek çökeltiler oluşmuştur. pH 7'de hidrofobik halde bulunan poli(4-VP)'nin yanında poliOEGMA bloğu da LCST değerinin üzerindeki sıcaklıklarda hidrofoblaşarak polimerin suda çözünmesini engellemiş ve kopolimerler çökmüştür.

pH 3'te ise LCST değerleri uzun ve kısa poli(4-VP) zincirli kopolimerler için 46°C olarak bulunmuştur. pH 3'teki kopolimerlerin LCST değerinin üstündeki sıcaklıklarda pH 7'deki kopolimerler kadar bulanık çözeltiler oluşmamıştır. Bu sebeple, pH 3'teki kopolimerlerin dinamik ışık saçılması yöntemiyle boyut analizleri yapıldığında 126 ve 150 nm çapında partiküller oldukları görülmüştür. pH 3'te poli(4-VP) blokları pozitif yüklüdürler. LCST değerinin üstündeki sıcaklıklarda poliOEGMA bloğu hidrofoblaşmaktadır. Bu sıcaklık ve pH'taki S2-DO-V kopolimerleri poliOEGMA bloklarının hidrofobik etkileşimle birleşmesiyle ters misel oluşturmuşlardır. Miselin çekirdeğini poliOEGMA bloğu, miselin kabuğunu ise pozitif yüklü poli(4-VP) bloğu oluşturmaktadır.

pH 3'te LCST değerinin üstündeki sıcaklıklarda oluşan yapıların şekilleri saptanamamıştır.

PoliOEGMA-b-poli(4-VP) blok kopolimerlerinin çözelti davranışları Şekil 5.1 de şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 5. 1 Poli(OEGMA)-b-poli(4-VP) blok kopolimerlerinin farklı pH ve sıcaklık değerlerinde sulu çözeltide oluşturduğu yapıların şematik gösterimi

Tez çalışmasında sentezlenen tüm poliOEGMA-b-poli(4-VP) kopolimerlerinin pH 5'in üstündeki değerlerde misel yapılar oluşturduğu gözlenmiştir. Oluşan misellerin boyutları 30 nm civarındadır. Bu boyut değeri hücre içine yönelik ilaç salım sistemlerinde kullanıma aday bir taşıyıcı elde ettiğimizi göstermektedir. Zira yapılan çalışmalarda 10-100 nm aralığında boyuta sahip nanopartiküllerin hücre içine girme oranlarının daha yüksek olduğu gösterilmiştir [71]. Floresans spektrometre deneylerinde kullanılan hidrofob piren molekülü de misellerin etkin olarak hidrofobik molekülle yüklenebildiklerini göstermiştir. Ayrıca asidik pH değerlerinde bile hidrofobik ilaç taşınması farklı amaçlar için kullanılabilir. Örneğin pH 3'te polimerin farklı bir ilaç yüklenip pH 5'in üstünde farklı bir ilaç yüklenerek iki farklı ilaç molekülü aynı taşıyıcıda taşınabilir. İlaçlardan biri pH'a duyarlı olarak vücut içinde salım yapılırken poli(OEGMA) bloğuna yüklü ilaç molekülleri difüzyon gibi yollarla vücut içine salım yapılabilir.

Sentezlenen kopolimerlerin etkiye duyarlı yapıda oldukları da alınan sonuçlarda net olarak gösterilmiştir. Tüm kopolimerler pH'a duyarlı olarak çözelti içindeki davranışlarını değiştirmektedir. Asidik pH'ta çözeltide tek başlarına bulunan kopolimerler nötral ve bazik pH değerlerinde misel oluşturmaktadırlar. Bu sayede pH değişimine bağlı olarak ilaç salımı yapan taşıyıcı sistemler olarak kullanılabilirler.

Poli(DEGMA-OEGMA₄₇₅) bloğuna sahip kopolimerler ise hem pH hem de sıcaklığa duyarlıdırlar. Bu durum literatürde polimerlerde "şizofrenik" davranış, diğer bir deyişle çift kişilikli davranış olarak bahsedilmektedir. Zira sıcaklık değiştiğinde oluşan yapılarla pH değiştiğinde oluşan yapılar birbirlerinden farklıdır. Böyle bir kopolimerin farklı pH ve sıcaklık değerlerinde oluşturabileceği 4 farklı yapı Şekil 5.1'de şematik olarak gösterilmektedir. Polimerin çift etkiye duyarlı olması, taşıyıcı olarak kullanıldığında doku ve hücre hedefleme ile kontrollü salım etkinliğini arttıracaktır. Örneğin, lokal hipertermi çalışmalarında bu kopolimer kullanılarak sadece ısıtılan dokuya hedefleme yapılabilir.

Sentezlenen kopolimer miseller hakkında bahsedilmesi gereken diğer bir husus da kopolimer zincirlerinin ucunda bulunan karboksilik asit gruplarıdır. Karboksilik asit grubu, miselin dış kabuğuna çeşitli hedefleyici veya işaretleyici moleküllerin

bağlanmasına imkan vermektedir. Bu sayede, kopolimerler ilaç taşıyıcı olarak daha etkin bir şekilde kullanılabileceklerdir.

Sıcaklığa ve pH'a duyarlı olmaları, hedefleyici moleküllerin bağlanabileceği fonksiyonel grup taşımaları, hücre içine girişe uygun boyut ve yüzey özelliklerine sahip olmaları gibi birçok avantajlı özelliğe sahip bu kopolimerlerin ilaç taşıyıcı sistem olarak önemli bir potansiyele sahip oldukları düşünülmektedir.

5.3 Kuarterner Kopolimer-ODN Kompleksleri

Kuarternerleştirilmiş poli(DEGMA-OEGMA₄₇₅)-b-poli(4-VP) kopolimeri c-Myc antisens oligonükleotidi (ODN) ile N/P=1-50 arasında değişen oranlarda karıştırıldığında oluşan yapıların boyutları tüm oranlarda kompleks oluşumunu göstermiştir. Kopolimer-ODN çözeltileri tuz içermeyen ve fizyolojik şartlarda tuz içeren tamponlarda hazırlanmış ve analiz edilmiştir. Her iki tampon çözeltide de oluşan yapıların boyutları kompleks oluşumunu göstermiştir. Bu durum komplekslerin kanda kararlı olacağını göstermektedir.

Oluşan yapıların zeta potansiyel değerleri incelendiğinde artan N/P oranıyla beraber nötrale yakın veya pozitif yüklü partiküller oldukları anlaşılmıştır. Partiküllerin hücre içine girişini etkileyen en önemli parametrelerden biri partikülün yüzey özellikleri ve yüküdür. Hücre içine en yüksek oranda girmeyi pozitif yüklü partiküller başarmaktadır [71], [72]. Negatif yüklü partiküllerin hücre içine girme başarımı ise düşüktür. Bu sebeple oluşan komplekslerin hücre içine girişte yüksek etkinlik göstereceği düşünülmektedir.

Kopolimer-ODN kompleksi vücuda verildiğinde kanda yüksek oranda seyreleceğinden kompleksin seyreilmeye karşı kararlılığı araştırılmıştır. Bu amaçla, 25°C'de farklı oranlarda seyreltilen kompleks çözeltileri analiz edildiğinde kompleksin bileşenlerine ayrılmadığı görülmüştür. Ancak boyutunda değişiklik olmuştur. Bu sonuç da kompleksin damarlar içindeki kan akışında kararlı halde kalacağını göstermektedir.

Kullanılan kopolimer sıcaklığa duyarlı davranış gösterdiğinden oluşan komplekslerin sıcaklık değişimine cevap verip vermeyecekleri araştırılmıştır. Farklı oranlarda hazırlanan komplekslerin LCST değerleri ışık saçılması yöntemiyle saptanmıştır.

Komplekslerin LCST deęerlerinin tek bařına polimerden daha dūřuk olduęu ve bileřenlerin oranının LCST deęerine etki ettięi gōrūlmūřtır. Ayrıca oluřan yapıların boyutları 25°C'deki komplekslerden çok daha būyūktūr ve ōkelti oluřumu gerçekleřebilmektedir. Komplekslerin zeta potansiyelleri de nōtrale yakın veya pozitif çıkmıřtır. Bu sonuçlar, miseller gibi komplekslerin de lokal hipertermi çalıřmalarında kullanılabileceęini ve bileřenlerin oranı deęiřtirilerek farklı sıcaklıklardaki uygulamalar için uygun tařıyıcılar hazırlanabileceęini gōstermektedir.

LCST deęerinin ūstūnde hazırlanan komplekslerin de seyrelmeye karřı kararlılıęı incelenmiřtir. 42°C'de hazırlanan kompleks ōzeltilei seyreltildiklerinde kompleks partikūlleri bileřenlerine ayrılmamıřtır. Ancak boyutlarında 25°C'de hazırlanan ōrneklere kıyasla çok daha būyūk bir deęiřim olduęu gōzlenmiřtir.

Sonuç olarak, gen terapi çalıřmalarında kullanılma potansiyeline sahip ve yūksek etkinlięe sahip olacaęını dūřūndūęūmūz bir kopolimer tez çalıřmasında sentezlenmiřtir. Sıcaklıęa duyarlı olan bu kopolimer ayrıca hedefleyici molekūllerin baęlanabileceęi karboksilik asit grubuna sahiptir. Kopolimer-ODN komplekslerinin gen terapi çalıřmalarında kullanılabilmesi için ilerleyen sūrete komplekslerin hūcrelerle etkileřimlerinin ve hūcre içine giriř etkinliklerinin incelenmesi gerekmektedir. Bu amaçla yapılan hūcre çalıřmaları halen devam etmektedir.

- [1] Duncan, R., (2003). "The dawning era of polymer therapeutics", *Nature Reviews Drug Discovery*, 2: 347-360.
- [2] Galvin, P. Thompson, D. Ryan, K.B. McCarthy, A. Moore, A.C. Burke, C.S. Dyson, M. MacCraith, B.D. Gun'ko, Y.K. Byrne, M.T. Volkov, Y. Keely, C. Keehan, E. Howe, M. Duffy, C. ve MacLoughlin, R., (2012). "Nanoparticle-based drug delivery: case studies for cancer and cardiovascular applications", *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69: 389-404.
- [3] Joo, W.S. Jeong, J.H. Nam, K. Blevins, K.S. Salama, M.E. ve Kim, S.W., (2012). "Polymeric delivery of therapeutic RAE-1 plasmid to the pancreatic islets for the prevention of type 1 diabetes", *Journal of Controlled Release*, 162: 606-611.
- [4] Pangburn, T.O. Georgiou, K. Bates, F.S. ve Kokkoli, E., (2012). "Targeted Polymersome Delivery of siRNA Induces Cell Death of Breast Cancer Cells Dependent upon Orai3 Protein Expression", *Langmuir*, 28: 12816-12830.
- [5] Shalviri, A. Raval, G. Prasad, P. Chan, C. Liu, Q. Heerklotz, H. Rauth, A.M. ve Wu, X.Y., (2012). "pH-Dependent doxorubicin release from terpolymer of starch, polymethacrylic acid and polysorbate 80 nanoparticles for overcoming multi-drug resistance in human breast cancer cells", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 82: 587-597.
- [6] Kwon, G.S., (2005). *Polymeric Drug Delivery Systems*, Boca Raton: Taylor & Francis Group.
- [7] York, A.W. Kirkland, S.E. ve McCormick, C.L., (2008). "Advances in the synthesis of amphiphilic block copolymers via RAFT polymerization: Stimuli-responsive drug and gene delivery", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60: 1018-1036.
- [8] Allen, C. Maysinger, D. ve Eisenberg, A., (1999). "Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery", *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 16: 3-27.
- [9] Jeong, Y.I. Nah, J.W. Lee, H.C. Kim, S.H. ve Cho, C.S., (1999). "Adriamycin release from flower-type polymeric micelle based on star-block copolymer composed of poly(γ -benzyl L-glutamate) as the hydrophobic part and poly(ethylene oxide) as the hydrophilic part", *International Journal of Pharmaceutics*, 188: 49-58.

- [10] Jeong, J.H. Kim, S.W. ve Park, T.G., (2007). "Molecular design of functional polymers for gene therapy", *Progress in Polymer Science*, 32: 1239-1274.
- [11] Kaiser, J., (2003). "Gene therapy - Seeking the cause of induced leukemias in X-SCID trial", *Science*, 299: 495-495.
- [12] Marshall, E., (1999). "Clinical trials - Gene therapy death prompts review of adenovirus vector", *Science*, 286: 2244-2245.
- [13] Marshall, E., (2000). "Clinical research - FDA halts all gene therapy trials at Penn", *Science*, 287: 565-+.
- [14] Marshall, E., (2002). "Clinical research - Gene therapy a suspect in leukemia-like disease", *Science*, 298: 34-35.
- [15] Piskin, E. Dincer, S. ve Turk, M., (2004). "Gene delivery: intelligent but just at the beginning", *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, 15: 1181-1202.
- [16] Nishiyama, N. Kato, Y. Sugiyama, Y. ve Kataoka, K., (2001). "Cisplatin-loaded polymer-metal complex micelle with time-modulated decaying property as a novel drug delivery system", *Pharmaceutical Research*, 18: 1035-1041.
- [17] Nishiyama, N. Yokoyama, M. Aoyagi, T. Okano, T. Sakurai, Y. ve Kataoka, K., (1999). "Preparation and characterization of self-assembled polymer-metal complex micelle from cis-dichlorodiammineplatinum(II) and poly(ethylene glycol)-poly(alpha,beta-aspartic acid) block copolymer in an aqueous medium", *Langmuir*, 15: 377-383.
- [18] Yokoyama, M. Okano, T. Sakurai, Y. Suwa, S. ve Kataoka, K., (1996). "Introduction of cisplatin into polymeric micelle", *Journal of Controlled Release*, 39: 351-356.
- [19] Harada, A. ve Kataoka, K., (1995). "Formation of Polyion Complex Micelles in An Aqueous Milieu From A Pair of Oppositely-Charged Block-Copolymers with Poly(Ethylene Glycol) Segments", *Macromolecules*, 28: 5294-5299.
- [20] Kabanov, A.V. Bronich, T.K. Kabanov, V.A. Yu, K. ve Eisenberg, A., (1996). "Soluble stoichiometric complexes from poly(N-ethyl-4-vinylpyridinium) cations and poly(ethylene oxide)-block-polymethacrylate anions", *Macromolecules*, 29: 6797-6802.
- [21] Kataoka, K. Togawa, H. Harada, A. Yasugi, K. Matsumoto, T. ve Katayose, S., (1996). "Spontaneous formation of polyion complex micelles with narrow distribution from antisense oligonucleotide and cationic block copolymer in physiological saline", *Macromolecules*, 29: 8556-8557.
- [22] Katayose, S. ve Kataoka, K., (1997). "Water-soluble polyion complex associates of DNA and poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer", *Bioconjugate Chemistry*, 8: 702-707.
- [23] Katayose, S. ve Kataoka, K., (1998). "Remarkable increase in nuclease resistance of plasmid DNA through supramolecular assembly with

- poly(ethylene glycol) poly(L-lysine) block copolymer", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87: 160-163.
- [24] Wolfert, M.A. Schacht, E.H. Toncheva, V. Ulbrich, K. Nazarova, O. ve Seymour, L.W., (1996). "Characterization of vectors for gene therapy formed by self-assembly of DNA with synthetic block co-polymers", *Human Gene Therapy*, 7: 2123-2133.
 - [25] Kakizawa, Y. ve Kataoka, K., (2002). "Block copolymer micelles for delivery of gene and related compounds", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54: 203-222.
 - [26] Kwon, G.S. ve Kataoka, K., (1995). "Block-Copolymer Micelles As Long-Circulating Drug Vehicles", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 16: 295-309.
 - [27] Kataoka, K. Harada, A. ve Nagasaki, Y., (2001). "Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47: 113-131.
 - [28] Kataoka, K. Kwon, G.S. Yokoyama, M. Okano, T. ve Sakurai, Y., (1993). "Block-Copolymer Micelles As Vehicles For Drug Delivery", *Journal of Controlled Release*, 24: 119-132.
 - [29] Cabane, E. Zhang, X.Y. Langowska, K. Palivan, C.G. ve Meier, W., (2012). "Stimuli-Responsive Polymers and Their Applications in Nanomedicine", *Biointerphases*, 7.
 - [30] Horter, D. ve Dressman, J.B., (2001). "Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46: 75-87.
 - [31] Ganta, S. Devalapally, H. Shahiwala, A. ve Amiji, M., (2008). "A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery", *Journal of Controlled Release*, 126: 187-204.
 - [32] Meyer, D.E. Shin, B.C. Kong, G.A. Dewhirst, M.W. ve Chilkoti, A., (2001). "Drug targeting using thermally responsive polymers and local hyperthermia", *Journal of Controlled Release*, 74: 213-224.
 - [33] Ali, M. ve Brocchini, S., (2006). "Synthetic approaches to uniform polymers", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58: 1671-1687.
 - [34] Boyer, C. Bulmus, V. Davis, T.P. Ladmiral, V. Liu, J.Q. ve Perrier, S., (2009). "Bioapplications of RAFT Polymerization", *Chemical Reviews*, 109: 5402-5436.
 - [35] Chiefari, J. Chong, Y.K. Ercole, F. Krstina, J. Jeffery, J. Le, T.P.T. Mayadunne, R.T.A. Meijs, G.F. Moad, C.L. Moad, G. Rizzardo, E. ve Thang, S.H., (1998). "Living free-radical polymerization by reversible addition-fragmentation chain transfer: The RAFT process", *Macromolecules*, 31: 5559-5562.
 - [36] Allison, B.C. Applegate, B.M. ve Youngblood, J.P., (2007). "Hemocompatibility of hydrophilic antimicrobial copolymers of alkylated 4-vinylpyridine", *Biomacromolecules*, 8: 2995-2999.

- [37] Stratton, T.R. Rickus, J.L. ve Youngblood, J.P., (2009). "In Vitro Biocompatibility Studies of Antibacterial Quaternary Polymers", *Biomacromolecules*, 10: 2550-2555.
- [38] Borchert, U. Lipprandt, U. Bilanz, M. Kimpfler, A. Rank, A. Peschka-Suss, R. Schubert, R. Lindner, P. ve Forster, S., (2006). "pH-induced release from P2VP-PEO block copolymer vesicles", *Langmuir*, 22: 5843-5847.
- [39] Izumrudov, V.A. Domashenko, N.I. Zhiryakova, M.V. ve Davydova, O.V., (2005). "Interpolyelectrolyte reactions in solutions of polycarboxybetaines, 2: Influence of alkyl spacer in the betaine moieties on complexing with polyanions", *Journal of Physical Chemistry B*, 109: 17391-17399.
- [40] Li, Y.Y. Dai, Y. Zhang, X.Z. ve Zhuo, R.X., (2008). "The tuned-morphology studies of the complexes between poly(N-isopropylacrylamide)-b-poly(vinylpyridine) and poly(N-isopropylacrylamide-co-hydroxyethyl methacrylate)-b-poly(vinylphenol)", *Journal of Colloid and Interface Science*, 328: 211-215.
- [41] Martin, T.J. Prochazka, K. Munk, P. ve Webber, S.E., (1996). "pH-dependent micellization of poly(2-vinylpyridine)-block-poly(ethylene oxide)", *Macromolecules*, 29: 6071-6073.
- [42] San Juan, A. Letourneur, D. ve Izumrudov, V.A., (2007). "Quaternized poly(4-vinylpyridine)s as model gene delivery polycations: Structure-function study by modification of side chain hydrophobicity and degree of alkylation", *Bioconjugate Chemistry*, 18: 922-928.
- [43] Zeng, J.G. Shi, K.Y. Zhang, Y.Y. Sun, X.H. Deng, L. Guo, X.Z. Du, Z.J. ve Zhang, B., (2008). "Synthesis of poly(N-isopropylacrylamide)-b-poly(2-vinylpyridine) block copolymers via RAFT polymerization and micellization behavior in aqueous solution", *Journal of Colloid and Interface Science*, 322: 654-659.
- [44] Badi, N. ve Lutz, J.F., (2009). "PEG-based thermogels: Applicability in physiological media", *Journal of Controlled Release*, 140: 224-229.
- [45] Fechner, N. Badi, N. Schade, K. Pfeifer, S. ve Lutz, J.F., (2009). "Thermogelation of PEG-Based Macromolecules of Controlled Architecture", *Macromolecules*, 42: 33-36.
- [46] Hussain, H. Mya, K.Y. ve He, C.B., (2008). "Self-Assembly of Brush-Like Poly poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate Synthesized via Aqueous Atom Transfer Radical Polymerization", *Langmuir*, 24: 13279-13286.
- [47] Rossi, N.A.A. Jadhav, V. Lai, B.F.L. Maiti, S. ve Kizhakkedathu, J.N., (2008). "Stimuli-responsive cationic terpolymers by RAFT polymerization: Synthesis, characterization, and protein interaction studies", *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry*, 46: 4021-4029.
- [48] Yu, Q. Xu, S.H. Zhang, H.W. Ding, Y.H. ve Zhu, S.P., (2009). "Comparison of reaction kinetics and gelation behaviors in atom transfer, reversible addition-fragmentation chain transfer and conventional free radical copolymerization of

oligo(ethylene glycol) methyl ether methacrylate and oligo(ethylene glycol) dimethacrylate", *Polymer*, 50: 3488-3494.

- [49] Chang, C.W. Bays, E. Tao, L. Alconcel, S.N.S. ve Maynard, H.D., (2009). "Differences in cytotoxicity of poly(PEGA)s synthesized by reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization", *Chemical Communications*: 3580-3582.
- [50] Saraswat, P. Soni, R.R. Bhandari, A. ve Nagori, B.P., (2009). "DNA as therapeutics; an update", *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71: 488-498.
- [51] Gao, X. Kim, K.S. ve Liu, D.X., (2007). "Nonviral gene delivery: What we know and what is next", *Aaps Journal*, 9: E92-E104.
- [52] Besic, E., (2007). "Physical mechanisms and methods employed in drug delivery to tumors", *Acta Pharmaceutica*, 57: 249–268.
- [53] Webster, D.M. Sundaram, P. ve Byrne, M.E., (2013). "Injectable nanomaterials for drug delivery: Carriers, targeting moieties, and therapeuti cs", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*.
- [54] Jagur-Grodzinski, J., (1999). "Biomedical application of functional polymers", *Reactive & Functional Polymers*, 39: 99-138.
- [55] Mahapatro, A. ve Kulshrestha, A.S., (2008). *Polymers for Biomedical Applications: American Chemical Society*.
- [56] Hamidi, M. Azadi, A. ve Rafiei, P., (2008). "Hydrogel nanoparticles in drug delivery", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60: 1638-1649.
- [57] Paleos, C.M. Tsiourvas, D. ve Sideratou, Z., (2007). "Molecular engineering of dendritic polymers and their application as drug and gene delivery systems", *Molecular Pharmaceutics*, 4: 169-188.
- [58] Smart, T. Lomas, H. Massignani, M. Flores-Merino, M.V. Perez, L.R. ve Battaglia, G., (2008). "Block copolymer nanostructures", *Nano Today*, 3: 38-46.
- [59] Bertrand, N. ve Leroux, J.C., (2012). "The journey of a drug-carrier in the body: An anatomo-physiological perspective", *Journal of Controlled Release*, 161: 152-163.
- [60] Kutscher, H.L. Chao, P. Deshmukh, M. Singh, Y. Hu, P. Joseph, L.B. Reimer, D.C. Stein, S. Laskin, D.L. ve Sinko, P.J., (2010). "Threshold size for optimal passive pulmonary targeting and retention of rigid microparticles in rats", *Journal of Controlled Release*, 143: 31-37.
- [61] Huang, L. Hung, M.-C. ve Wagner, E., (2005). *Non-Viral Vectors for Gene Therapy, Second Edition Part I: Academic Press*.
- [62] Kim, S. Shi, Y.Z. Kim, J.Y. Park, K. ve Cheng, J.X., (2010). "Overcoming the barriers in micellar drug delivery: loading efficiency, in vivo stability, and micelle-cell interaction", *Expert Opinion on Drug Delivery*, 7: 49-62.

- [63] Riess, G., (2003). "Micellization of block copolymers", *Progress in Polymer Science*, 28: 1107-1170.
- [64] Wisse, E. Braet, F. Luo, D.Z. DeZanger, R. Jans, D. Crabbe, E. ve Vermoesen, A., (1996). "Structure and function of sinusoidal lining cells in the liver", *Toxicologic Pathology*, 24: 100-111.
- [65] Bae, Y. ve Kataoka, K., (2009). "Intelligent polymeric micelles from functional poly(ethylene glycol)-poly(amino acid) block copolymers", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61: 768-784.
- [66] Geng, Y. Dalhaimer, P. Cai, S.S. Tsai, R. Tewari, M. Minko, T. ve Discher, D.E., (2007). "Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery", *Nature Nanotechnology*, 2: 249-255.
- [67] Johnston, A.P.R. Such, G.K. Ng, S.L. ve Caruso, F., (2011). "Challenges facing colloidal delivery systems: From synthesis to the clinic", *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 16: 171-181.
- [68] Bae, Y.H. ve Park, K., (2011). "Targeted drug delivery to tumors: Myths, reality and possibility", *Journal of Controlled Release*, 153: 198-205.
- [69] Seymour, L.W., (1992). "Passive tumor targeting of soluble macromolecules and drug conjugates", *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 9: 135-187.
- [70] Matsumura, Y. ve Maeda, H., (1986). "A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: Mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs.", *Cancer Research*, 46: 6387-6392.
- [71] Sahay, G. Alakhova, D.Y. ve Kabanov, A.V., (2010). "Endocytosis of nanomedicines", *Journal of Controlled Release*, 145: 182-195.
- [72] Hillaireau, H. ve Couvreur, P., (2009). "Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery", *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66: 2873-2896.
- [73] Li, Y.H. Wang, J. Wientjes, M.G. ve Au, J.L.S., (2012). "Delivery of nanomedicines to extracellular and intracellular compartments of a solid tumor", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64: 29-39.
- [74] Bareford, L.A. ve Swaan, P.W., (2007). "Endocytic mechanisms for targeted drug delivery", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59: 748-758.
- [75] Doherty, G.J. ve McMahon, H.T., (2009). *Mechanisms of Endocytosis*, ed. Annual Review of Biochemistry. Palo Alto: Annual Reviews, 857-902.
- [76] Carver, L.A. ve Schnitzer, J.E., (2003). "Caveolae: Mining little caves for new cancer targets", *Nature Reviews Cancer*, 3: 571-581.
- [77] Kerr, M.C. ve Teasdale, R.D., (2009). "Defining Macropinocytosis", *Traffic*, 10: 364-371.

- [78] Swanson, J.A., (2008). "Shaping cups into phagosomes and macropinosomes", *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9: 639-649.
- [79] Cannon, G.J. ve Swanson, J.A., (1992). "The macrophage capacity for phagocytosis", *Journal of Cell Science*, 101: 907-913.
- [80] Gratton, S.E.A. Ropp, P.A. Pohlhaus, P.D. Luft, J.C. Madden, V.J. Napier, M.E. ve DeSimone, J.M., (2008). "The effect of particle design on cellular internalization pathways", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 11613-11618.
- [81] Rejman, J. Bragonzi, A. ve Conese, M., (2005). "Role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes", *Molecular Therapy*, 12: 468-474.
- [82] Song, Q.X. Wang, X.L. Hu, Q.Y. Huang, M. Yao, L. Qi, H. Qiu, Y. Jiang, X.G. Chen, J. Chen, H.Z. ve Gao, X.L., (2013). "Cellular internalization pathway and transcellular transport of pegylated polyester nanoparticles in Caco-2 cells", *International Journal of Pharmaceutics*, 445: 58-68.
- [83] Verma, A. Uzun, O. Hu, Y.H. Hu, Y. Han, H.S. Watson, N. Chen, S.L. Irvine, D.J. ve Stellacci, F., (2008). "Surface-structure-regulated cell-membrane penetration by monolayer-protected nanoparticles", *Nature Materials*, 7: 588-595.
- [84] Freichels, H. Jerome, R. ve Jerome, C., (2011). "Sugar-labeled and PEGylated (bio)degradable polymers intended for targeted drug delivery systems", *Carbohydrate Polymers*, 86: 1093-1106.
- [85] Steichen, S.D. Caldorera-Moore, M. ve Peppas, N.A., (2013). "A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48: 416-427.
- [86] Jaracz, S. Chen, J. Kuznetsova, L.V. ve Ojima, L., (2005). "Recent advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates", *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13: 5043-5054.
- [87] Champion, J.A. ve Mitragotri, S., (2006). "Role of target geometry in phagocytosis", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 4930-4934.
- [88] Geng, Y. Dalhaimer, P. Cai, S. Tsai, R. Tewari, M. Minko, T. ve Discher, D.E., (2007). "Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery", *Nat Nano*, 2: 249-255.
- [89] Li, Z. Ma, J. Lee, N.S. ve Wooley, K.L., (2011). "Dynamic Cylindrical Assembly of Triblock Copolymers by a Hierarchical Process of Covalent and Supramolecular Interactions", *Journal of the American Chemical Society*, 133: 1228-1231.
- [90] Sahay, G. Kim, J.O. Kabanov, A.V. ve Bronich, T.K., (2010). "The exploitation of differential endocytic pathways in normal and tumor cells in the selective targeting of nanoparticulate chemotherapeutic agents", *Biomaterials*, 31: 923-933.

- [91] Alberts, B. Johnson, A. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K. ve Walter, P., (2008). *Molecular Biology of the Cell*, New York: Garland science, Taylor & Francis Group, LLC.
- [92] Boussif, O. Lezoualch, F. Zanta, M.A. Mergny, M.D. Scherman, D. Demeneix, B. ve Behr, J.P., (1995). "A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo - polyethyleneimine", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92: 7297-7301.
- [93] Liang, W. ve Lam, J.K.W., (2012). *Endosomal Escape Pathways for Non-Viral Nucleic Acid Delivery Systems*.
- [94] Zelphati, O. ve Szoka, F.C., (1996). "Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 11493-11498.
- [95] Hoon Jeong, J. Christensen, L.V. Yockman, J.W. Zhong, Z. Engbersen, J.F.J. Jong Kim, W. Feijen, J. ve Wan Kim, S., (2007). "Reducible poly(amido ethylenimine) directed to enhance RNA interference", *Biomaterials*, 28: 1912-1917.
- [96] Yang, X. Grailer, J.J. Pilla, S. Steeber, D.A. ve Gong, S., (2010). "Tumor-targeting, pH-responsive, and stable unimolecular micelles as drug nanocarriers for targeted cancer therapy", *Bioconjugate Chemistry*, 21: 496-504.
- [97] Sui, M. Liu, W. ve Shen, Y., (2011). "Nuclear drug delivery for cancer chemotherapy", *Journal of Controlled Release*, 155: 227-236.
- [98] Lukacs, G.L. Haggie, P. Seksek, O. Lechardeur, D. Freedman, N. ve Verkman, A., (2000). "Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus", *Journal of Biological Chemistry*, 275: 1625-1629.
- [99] Sarko, D. Beijer, B. Boy, R.G. Nothelfer, E.-M. Leotta, K. Eisenhut, M. Altmann, A. Haberkorn, U. ve Mier, W., (2010). "The pharmacokinetics of cell-penetrating peptides", *Molecular Pharmaceutics*, 7: 2224-2231.
- [100] Sethuraman, V.A. ve Bae, Y.H., (2007). "TAT peptide-based micelle system for potential active targeting of anti-cancer agents to acidic solid tumors", *Journal of Controlled Release*, 118: 216-224.
- [101] Lee, E.S. Gao, Z. Kim, D. Park, K. Kwon, I.C. ve Bae, Y.H., (2008). "Super pH-sensitive multifunctional polymeric micelle for tumor pH specific TAT exposure and multidrug resistance", *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 129: 228.
- [102] Suh, J. Wirtz, D. ve Hanes, J., (2003). "Efficient active transport of gene nanocarriers to the cell nucleus", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100: 3878-3882.
- [103] Shen, Y. Zhou, Z. Sui, M. Tang, J. Xu, P. Van Kirk, E.A. Murdoch, W.J. Fan, M. ve Radosz, M., (2010). "Charge-reversal polyamidoamine dendrimer for cascade nuclear drug delivery", *Nanomedicine*, 5: 1205-1217.

- [104] Melville, H.W., (1941). "Some themes in the chemistry of macromolecules", *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 0: 414-426.
- [105] Otsu, T. ve Yoshida, M., (1982). "Role of initiator-transfer agent-terminator (iniferter) in radical polymerizations - Polymer design by organic disulfides as iniferters", *Makromolekulare Chemie-Rapid Communications*, 3: 127-132.
- [106] Braunecker, W.A. ve Matyjaszewski, K., (2007). "Controlled/living radical polymerization: Features, developments, and perspectives", *Progress in Polymer Science*, 32: 93-146.
- [107] Charleux, B. ve Faust, R., (1999). *Synthesis of branched polymers by cationic polymerization*, ed. Branched Polymers I. Springer, 1-69.
- [108] Cohen, P. Abadie, M. Schue, F. ve Richards, D., (1982). "Block copolymerization by a cation to anion transformation process: 2. Polymerization of styrene by polyTHF possessing terminal secondary nitranions", *Polymer*, 23: 1105-1107.
- [109] Hawker, C.J. Hedrick, J.L. Malmström, E.E. Trollsås, M. Mecerreyes, D. Moineau, G. Dubois, P. ve Jérôme, R., (1998). "Dual Living Free Radical and Ring Opening Polymerizations from a Double-Headed Initiator", *Macromolecules*, 31: 213-219.
- [110] Berger, G. Levy, M. ve Vofsi, D., (1966). "Mutual termination of anionic and cationic "living" polymers", *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Letters*, 4: 183-186.
- [111] Verma, A. Nielsen, A. McGrath, J. ve Riffle, J., (1990). "Preparation of ester terminated poly (alkyl vinyl ether) oligomers and block copolymers using a combination of living cationic and group transfer polymerization", *Polymer Bulletin*, 23: 563-570.
- [112] Gaucher, G. Dufresne, M.-H. Sant, V.P. Kang, N. Maysinger, D. ve Leroux, J.-C., (2005). "Block copolymer micelles: preparation, characterization and application in drug delivery", *Journal of Controlled Release*, 109: 169-188.
- [113] Hoes, C. Potman, W. Van Heeswijk, W. Mud, J. De Grooth, B. Greve, J. ve Feijen, J., (1985). "Optimization of macromolecular prodrugs of the antitumor antibiotic adriamycin", *Journal of Controlled Release*, 2: 205-213.
- [114] Duncan, R. Kopeckova-Rejmanova, P. Strohalm, J. Hume, I. Cable, H. Pohl, J. Lloyd, J. ve Kopecek, J., (1987). "Anticancer agents coupled to N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymers. I. Evaluation of daunomycin and puromycin conjugates in vitro", *British journal of cancer*, 55: 165.
- [115] Allen, C. Han, J. Yu, Y. Maysinger, D. ve Eisenberg, A., (2000). "Polycaprolactone-b-poly(ethylene oxide) copolymer micelles as a delivery vehicle for dihydrotestosterone", *Journal of Controlled Release*, 63: 275-286.
- [116] Zintchenko, A. Rother, G. ve Dautzenberg, H., (2003). "Transition Highly Aggregated Complexes Soluble Complexes via Polyelectrolyte Exchange Reactions: Kinetics, Structural Changes, and Mechanism", *Langmuir*, 19: 2507-2513.

- [117] Chelushkin, P.S. Lysenko, E.A. Bronich, T.K. Eisenberg, A. Kabanov, V.A. ve Kabanov, A.V., (2007). "Polyion Complex Nanomaterials from Block Polyelectrolyte Micelles and Linear Polyelectrolytes of Opposite Charge: 1. Solution Behavior†", *The Journal of Physical Chemistry B*, 111: 8419-8425.
- [118] Topuzoğulları, M. Çimen, N.S. Mustafaeva, Z. ve Mustafaev, M., (2007). "Molecular-weight distribution and structural transformation in water-soluble complexes of poly (acrylic acid) and bovine serum albumin", *European polymer journal*, 43: 2935-2946.
- [119] Du, W. ve Wang, Y., (2013). "Self-assembly of bovine serum albumin and poly (acrylic acid) induced by noncovalent bonds", *Journal of Applied Polymer Science*, 127: 4256-4261.
- [120] Tsuchida, E. ve Osada, Y., (1974). "The role of the chain length in the stability of polyion complexes", *Die Makromolekulare Chemie*, 175: 593-601.
- [121] Katayose, S. ve Kataoka, K., (1998). "Remarkable increase in nuclease resistance of plasmid DNA through supramolecular assembly with poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87: 160-163.
- [122] Oupický, D. Koňák, Č. Ulbrich, K. Wolfert, M.A. ve Seymour, L.W., (2000). "DNA delivery systems based on complexes of DNA with synthetic polycations and their copolymers", *Journal of Controlled Release*, 65: 149-171.
- [123] Oupický, D. Carlisle, R. ve Seymour, L., (2001). "Triggered intracellular activation of disulfide crosslinked polyelectrolyte gene delivery complexes with extended systemic circulation in vivo", *Gene therapy*, 8: 713.
- [124] O'Reilly, R.K. Hawker, C.J. ve Wooley, K.L., (2006). "Cross-linked block copolymer micelles: functional nanostructures of great potential and versatility", *Chemical Society Reviews*, 35: 1068-1083.
- [125] Rösler, A. Vandermeulen, G.W. ve Klok, H.-A., (2001). "Advanced drug delivery devices via self-assembly of amphiphilic block copolymers", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 53: 95-108.
- [126] Kakizawa, Y. Harada, A. ve Kataoka, K., (1999). "Environment-sensitive stabilization of core-shell structured polyion complex micelle by reversible cross-linking of the core through disulfide bond", *Journal of the American Chemical Society*, 121: 11247-11248.
- [127] Huang, H. Remsen, E.E. Kowalewski, T. ve Wooley, K.L., (1999). "Nanocages derived from shell cross-linked micelle templates", *Journal of the American Chemical Society*, 121: 3805-3806.
- [128] Stewart, S. ve Liu, G., (1999). "Hollow Nanospheres from Polyisoprene-b lock-poly (2-cinnamoyl ethyl methacrylate)-b lock-poly (tert-butyl acrylate)", *Chemistry of materials*, 11: 1048-1054.
- [129] Astafieva, I. Zhong, X.F. ve Eisenberg, A., (1993). "Critical micellization phenomena in block polyelectrolyte solutions", *Macromolecules*, 26: 7339-7352.

- [130] Wilhelm, M. Zhao, C.L. Wang, Y. Xu, R. Winnik, M.A. Mura, J.L. Riess, G. ve Croucher, M.D., (1991). "Poly (styrene-ethylene oxide) block copolymer micelle formation in water: a fluorescence probe study", *Macromolecules*, 24: 1033-1040.
- [131] Topel, Ö. Çakır, B.A. Budama, L. ve Hoda, N., (2013). "Determination of critical micelle concentration of polybutadiene-block-poly(ethyleneoxide) diblock copolymer by fluorescence spectroscopy and dynamic light scattering", *Journal of Molecular Liquids*, 177: 40-43.
- [132] Blanazs, A. Madsen, J. Battaglia, G. Ryan, A.J. ve Armes, S.P., (2011). "Mechanistic Insights for Block Copolymer Morphologies: How Do Worms Form Vesicles?", *Journal of the American Chemical Society*, 133: 16581-16587.
- [133] LaRue, I. Adam, M. da Silva, M. Sheiko, S.S. ve Rubinstein, M., (2004). "Wormlike Micelles of Block Copolymers: Measuring the Linear Density by AFM and Light Scattering", *Macromolecules*, 37: 5002-5005.
- [134] Elsabahy, M. ve Wooley, K.L., (2012). "Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications", *Chemical Society Reviews*, 41: 2545-2561.
- [135] Gil, E.S. ve Hudson, S.M., (2004). "Stimuli-responsive polymers and their bioconjugates", *Progress in Polymer Science*, 29: 1173-1222.
- [136] Uchida, K. Sakai, K. Ito, E. Hyeong Kwon, O. Kikuchi, A. Yamato, M. ve Okano, T., (2000). "Temperature-dependent modulation of blood platelet movement and morphology on poly (N-isopropylacrylamide)-grafted surfaces", *Biomaterials*, 21: 923-929.
- [137] Meyer, D.E. Kong, G.A. Dewhirst, M.W. Zalutsky, M.R. ve Chilkoti, A., (2001). "Targeting a genetically engineered elastin-like polypeptide to solid tumors by local hyperthermia", *Cancer Research*, 61: 1548-1554.
- [138] Schmaljohann, D., (2006). "Thermo-and pH-responsive polymers in drug delivery", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58: 1655-1670.
- [139] Dautzenberg, H. Gao, Y. ve Hahn, M., (2000). "Formation, structure, and temperature behavior of polyelectrolyte complexes between ionically modified thermosensitive polymers", *Langmuir*, 16: 9070-9081.
- [140] Kuckling, D. Adler, H.J.P. Arndt, K.F. Ling, L. ve Habicher, W.D., (2000). "Temperature and pH dependent solubility of novel poly(N-isopropylacrylamide) copolymers", *Macromolecular Chemistry and Physics*, 201: 273-280.
- [141] Lutz, J.-F. Akdemir, Ö. ve Hoth, A., (2006). "Point by Point Comparison of Two Thermosensitive Polymers Exhibiting a Similar LCST: Is the Age of Poly(NIPAM) Over?", *Journal of the American Chemical Society*, 128: 13046-13047.
- [142] Kurisawa, M. Yokoyama, M. ve Okano, T., (2000). "Gene expression control by temperature with thermo-responsive polymeric gene carriers", *Journal of Controlled Release*, 69: 127-137.

- [143] Meyer, D.E. Shin, B. Kong, G. Dewhurst, M. ve Chilkoti, A., (2001). "Drug targeting using thermally responsive polymers and local hyperthermia", *Journal of Controlled Release*, 74: 213-224.
- [144] Liu, S. Weaver, J.V.M. Tang, Y. Billingham, N.C. Armes, S.P. ve Tribe, K., (2002). "Synthesis of Shell Cross-Linked Micelles with pH-Responsive Cores Using ABC Triblock Copolymers", *Macromolecules*, 35: 6121-6131.
- [145] Matyjaszewski, K. ve Davis, T.P., (2002). *Handbook of radical polymerization*, Hoboken: John Wiley and Sons, Inc.
- [146] Matyjaszewski, K., (2001). "Macromolecular engineering by controlled/living ionic and radical polymerizations": Wiley Online Library.
- [147] "Reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization", http://apps.webofknowledge.com/summary.do?SID=N1i%40I4Ja%40AMJ0dhin8a&product=WOS&qid=1&search_mode=GeneralSearch, 09.05.2013.
- [148] Barner-Kowollik, C., (2008). *Handbook of RAFT polymerization*: Wiley-VCH.
- [149] Favier, A. ve Charreyre, M.T., (2006). "Experimental Requirements for an Efficient Control of Free-Radical Polymerizations via the Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT) Process", *Macromolecular Rapid Communications*, 27: 653-692.
- [150] Buback, M. Egorov, M. Gilbert, R.G. Kaminsky, V. Olaj, O.F. Russell, G.T. Vana, P. ve Zifferer, G., (2002). "Critically Evaluated Termination Rate Coefficients for Free-Radical Polymerization, 1. The Current Situation", *Macromolecular Chemistry and Physics*, 203: 2570-2582.
- [151] Arita, T. Buback, M. Janssen, O. ve Vana, P., (2004). "RAFT-Polymerization of Styrene up to High Pressure: Rate Enhancement and Improved Control", *Macromolecular Rapid Communications*, 25: 1376-1381.
- [152] Albertin, L. Stenzel, M.H. Barner-Kowollik, C. ve Davis, T.P., (2006). "Effect of an added base on (4-cyanopentanoic acid)-4-dithiobenzoate mediated RAFT polymerization in water", *Polymer*, 47: 1011-1019.
- [153] Liu, J.Q. Liu, H.Y. Bulmus, V. Tao, L. Boyer, C. ve Davis, T.P., (2010). "A Simple Methodology for the Synthesis of Heterotelechelic Protein-Polymer-Biomolecule Conjugates", *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry*, 48: 1399-1405.
- [154] Kakwere, H. ve Perrier, S.b., (2009). "Orthogonal "Relay" Reactions for Designing Functionalized Soft Nanoparticles", *Journal of the American Chemical Society*, 131: 1889-1895.
- [155] Boyer, C. Granville, A. Davis, T.P. ve Bulmus, V., (2009). "Modification of RAFT-Polymers via Thiol-Ene Reactions: A General Route to Functional Polymers and New Architectures", *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry*, 47: 3773-3794.

- [156] Benaglia, M. Chiefari, J. Chong, Y.K. Moad, G. Rizzardo, E. ve Thang, S.H., (2009). "Universal (Switchable) RAFT Agents", *Journal of the American Chemical Society*, 131: 6914-6915.
- [157] Xu, J. He, J. Fan, D. Tang, W. ve Yang, Y., (2006). "Thermal Decomposition of Dithioesters and Its Effect on RAFT Polymerization", *Macromolecules*, 39: 3753-3759.
- [158] Quinn, J.F. Barner, L. Barner-Kowollik, C. Rizzardo, E. ve Davis, T.P., (2002). "Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer Polymerization Initiated with Ultraviolet Radiation", *Macromolecules*, 35: 7620-7627.
- [159] Vana, P. Albertin, L. Barner, L. Davis, T.P. ve Barner-Kowollik, C., (2002). "Reversible addition–fragmentation chain-transfer polymerization: Unambiguous end-group assignment via electrospray ionization mass spectrometry", *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 40: 4032-4037.
- [160] Theisen, A. Johann, C. Deacon, M.D. ve Harding, S.E., (1999). *Refractive Index Increment Databook for Polymer and Biomolecular Scientists*: Nottingham University Press.
- [161] Badi, N. ve Lutz, J.-F., (2009). "PEG-based thermogels: Applicability in physiological media", *Journal of Controlled Release*, 140: 224-229.
- [162] Lutz, J.-F., (2008). "Polymerization of oligo(ethylene glycol) (meth)acrylates: Toward new generations of smart biocompatible materials", *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 46: 3459-3470.
- [163] Barner-Kowollik, C. Buback, M. Charleux, B. Coote, M.L. Drache, M. Fukuda, T. Goto, A. Klumperman, B. Lowe, A.B. ve Mcleary, J.B., (2006). "Mechanism and kinetics of dithiobenzoate-mediated RAFT polymerization. I. The current situation", *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 44: 5809-5831.
- [164] Pietsch, C. Fijten, M.W. Lambermont-Thijs, H.M. Hoogenboom, R. ve Schubert, U.S., (2009). "Unexpected reactivity for the RAFT copolymerization of oligo (ethylene glycol) methacrylates", *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 47: 2811-2820.

HESAPLAMALAR**CTA4 ile Poli(OEGMA₄₇₅) Sentezi için Hesaplamalar:**

Başlangıç oranları $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=75/1/0,2$; monomerin başlangıç konsantrasyonu 0,5 M ve çözelti hacmi 10 mL için;

0,5 M OEGMA₄₇₅ → $0,5 \text{ mol/L} \times 0,01 \text{ L} \times 475 \text{ g/mol} = 2,375 \text{ g OEGMA } 475$

$0,5/75=0,0067 \text{ M CTA4}$ → $0,0067 \text{ mol/L} \times 0,01 \text{ L} \times 279,38 \text{ g/mol} = 0,0186 \text{ g CTA4}$ → 18,6 mg CTA4

$0,0067/5=0,0013 \text{ M başlatıcı (AIBN)}$ → $0,0013 \text{ mol/L} \times 0,01 \text{ L} \times 164,21 \text{ g/mol} = 0,0022 \text{ g AIBN}$ → 2,2 mg AIBN

CTA4 ile Poli(4-VP) Sentezi için Hesaplamalar:

Başlangıç oranları $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=200/1/0,5$; monomerin başlangıç konsantrasyonu 2 M ve çözelti hacmi 10 mL için;

2 M 4-VP → $2 \text{ mol/L} \times 0,01 \text{ L} \times 105,14 \text{ g/mol} = 2,103 \text{ g 4-VP}$

$2/200=0,01 \text{ M CTA4}$ → $0,01 \text{ mol/L} \times 0,01 \text{ L} \times 279,38 \text{ g/mol} = 0,0279 \text{ g CTA4}$ → 27,9 mg CTA4

$0,01/2=0,005 \text{ M başlatıcı (AIBN)}$ → $0,005 \text{ mol/L} \times 0,01 \text{ L} \times 164,21 \text{ g/mol} = 0,0082 \text{ g AIBN}$ → 8,2 mg AIBN

MakroCTA Halindeki Poli(OEGMA₄₇₅)i Kullanarak Poli(OEGMA₄₇₅)-b-poli(4-VP) Sentezi için Hesaplamalar:

Başlangıç oranları $[M]_0/[CTA]_0/[I]_0=200/1/0,5$; monomerin başlangıç konsantrasyonu 1,5 M ve çözelti hacmi 3 mL için;

$$1,5 \text{ M 4-VP} \rightarrow 1,5 \text{ mol/L} \times 0,003 \text{ L} \times 105,14 \text{ g/mol} = 0,473 \text{ g 4-VP}$$

$$1,5/200=0,0075 \text{ M MakroCTA1} \rightarrow 0,0075 \text{ mol/L} \times 0,003 \text{ L} \times 19548 \text{ g/mol} = 0,440 \text{ g makroCTA1}$$

$$0,0075/2=0,00375 \text{ M başlatıcı (AIBN)} \rightarrow 0,00375 \text{ mol/L} \times 0,003 \text{ L} \times 164,21 \text{ g/mol} = 0,0018 \text{ g AIBN} \rightarrow 1,8 \text{ mg AIBN}$$

Poli(OEGMA₄₇₅)-b-poli(4-VP) Blok Kopolimerinin Kuarternizasyonu

0,05 g poli(OEGMA₄₇₅)-b-poli(4-VP) ($M_n=29989 \text{ g/mol}$) kopolimer; kopolimerdeki her bir mol 4-VP monomeri için 5 katı oranda metil-6-bromohekzanoat ($M=209,08 \text{ g/mol}$, $d=1,316 \text{ g/mL}$) için;

Kopolimerin toplam M_n değeri 29989 g/mol , içeriğindeki poli(OEGMA₄₇₅) bloğunun molekül ağırlığı 19548 g/mol ise kopolimerdeki poli(4-VP) bloğunun molekül ağırlığı 10441 g/mol olur.

$$0,05 \text{ g poli(OEGMA}_{475}\text{)-b-poli(4-VP)} / 29989 \text{ g/mol} \times 10441 \text{ g/mol} = 0,017 \text{ g poli(4-VP) bloğu} \rightarrow 0,017 \text{ g} / 105,14 \text{ g/mol} = 0,000166 \text{ mol 4-VP}$$

$$0,000166 \text{ mol} \times 5 = 0,00083 \text{ mol} \rightarrow 0,00083 \text{ mol} \times 209,08 \text{ g/mol} / 1,316 \text{ g/mL} = 0,13 \text{ mL metil-6-bromohekzanoat}$$

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Murat TOPUZOĞULLARI
Doğum Tarihi ve Yeri : 1981, İstanbul
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : mtopuzoullar@yahoo.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2006
Lisans	Kimya	Yıldız Teknik Üniversitesi	2003
Lise	Tekstil	Zeytinburnu Tekstil Anadolu Meslek Lisesi	1999

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2008	Y.T.Ü. Biyomühendislik Bölümü	Araş. Gör.
2007	1.Ordu A Tipi Gıda Kontrol Müfreze Komutanlığı	Analist
2005	Y.T.Ü. Biyomühendislik Bölümü	Araş. Gör.

YAYINLARI

Makale

1. M. Topuzogullari, R. Cakir Koc, S. Dincer Isoglu, M. Bagirova, Z. Akdeste, S. Elcicek, O.N. Oztel, S. Yesilkir Baydar, S. Canim Ates, A. Allahverdiyev, "Conjugation, characterization and toxicity of lipophosphoglycan-polyacrylic acid conjugate for vaccination against leishmaniasis", *Journal of Biomedical Science* 2013, 20:35.
2. Z. Özdemir, M. Topuzoğulları, İ.A. İsoğlu, S. Dinçer, "RAFT-mediated synthesis of N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide-b-4-vinylpyridine by conventional and microwave heating", *Polymer Bulletin*, 2013, doi: 10.1007/s00289-013-0993-1.
3. M. Topuzoğulları, N.S. Çimen, Z. Mustafaeva, M. Mustafaev, "Molecular weight distribution and structural transformation in water-soluble complexes of poly(acrylic acid) and bovine serum albumin", *European Polymer Journal*, 43, 7, 2935-2946, (2007)

Bildiri

1. M. Topuzoğulları, E. Dalgakıran, M. Türk, S. Dinçer, "Thermo- and pH-responsive carriers: Physicochemical characterization and gene delivery activity", The European Chapter Meeting of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS-EU 2013), 2013
2. M. Topuzoğulları, S. Dinçer, "pH and Temperature Responsive Nano-Sized Block Copolymer-Oligonucleotide Polyplexes for Gene Therapy", VIII. Türkiye Nanobilim-Nanoteknoloji Kongresi ve IANM 3rd World Congress, (2012)
3. Z. Özdemir, M. Topuzoğulları, S. Dinçer, 17th International Biomedical Science and Technology Symposium, (2011)
4. M. Topuzoğulları, S. Dinçer, "RAFT polymerization and characterization of poly(4-

vinylpyridine)-b-poly(oligoethyleneglycol methyl ether methacrylate) diblock copolymers”, 16th Biomedical Science and Technology Symposium, pp. 65, (2010)

5. M. Topuzoğulları, H. Kuzu, Z. Akdeste, M. Mustafaev, “Poliakrilik Asitin Bovin Serum Albumin ile Etkileşimlerinin Dört Detektörlü Moleküler Eleme Kromatografisi ile İncelenmesi”, XX. Ulusal Kimya Kongresi, (2006)
6. M. Altıkatoğlu, C. Arıöz, Y. Başaran, M. Topuzoğulları, Y. Budama Battal, H. Kuzu, “Horseradish Peroksidaz (HRP)-Dekstran Sülfat Konjugatları ve Karakterizasyonu”, XX. Ulusal Kimya Kongresi, (2006)
7. N. Akkılıç, Y. Budama Battal, N.S. Çimen, E. Dalgakıran, M. Topuzoğulları, Z. Mustafaeva, M. Mustafaev, “Development of nanoparticles based on polyanion-protein complexes”, XII. International Biomedical Science and Technology Symposium, (2005)
8. A. Arslan, N. Akkılıç, M. Altıkatoğlu, Y. Budama Battal, L. Karagöz, Ö. Öztolan, Y. Öztürk, M. Topuzoğulları, H. Kuzu, M. Mustafaev, “Covalent complexes of enzymes with dextran and dextran sulphate”, XII. International Biomedical Science and Technology Symposium, (2005)