



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



ÇEKİRDEK KABUK TİPİ POLİAKRİLAT HİDROKSİ APATİT İLAÇ TAŞIYICILARIN KONTROLLÜ POLİMERİZASYON İLE SENTEZİ ve KARAKTERİZASYON ÇALIŞMALARI

GAMZE KOÇAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Organik Kimya Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Nilhan KAYAMAN APOHAN

EŞ DANIŞMAN

Öğr. Gör. Dr. Burcu OKTAY

İSTANBUL, 2020



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



ÇEKİRDEK KABUK TİPİ POLİAKRİLAT HİDROKSİ APATİT İLAÇ TAŞIYICILARIN KONTROLLÜ POLİMERİZASYON İLE SENTEZİ ve KARAKTERİZASYON ÇALIŞMALARI

GAMZE KOÇAL

(520816006)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Organik Kimya Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Nilhan KAYAMAN APOHAN

EŞ DANIŞMAN

Öğr. Gör. Dr. Burcu OKTAY

İSTANBUL, 2020



MARMARA UNIVERSITY
INSTITUTE FOR GRADUATE
STUDIES



**PREPARATION OF CORE SHELL TYPE
POLYACRYLATE HYDROXYAPATITE DRUG
CARRIERS BY CONTROLLED
POLYMERIZATION AND THEIR
CHARACTERIZATIONS**

GAMZE KOÇAL
(520816006)

MASTER THESIS

Department of Chemistry

Thesis Supervisor

Prof. Dr. Nilhan KAYAMAN APOHAN

Thesis CO- Supervisor

P.h.D. Burcu OKTAY

ISTANBUL, 2020

MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans öğrencisi Gamze KOÇAL'ın "Çekirdek Kabuk Tipi Poliakrilat Hidroksi Apatit İlaç Taşıyıcıları Kontrollü Polimerizasyon ile Sentezi ve Karakterizasyon Çalışmaları" başlıklı tez çalışması, ~~23.01.2020~~ tarihinde savunulmuş ve jüri üyeleri tarafından başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Nilhan Kayaman Apohan (Danışman)

Marmara Üniversitesi



Prof.Dr. M.Vezir Kahraman (Üye)

Marmara Üniversitesi



Dr. Öğr. Üyesi Aslı Beyler Çiğil (Üye)

Amasya Üniversitesi

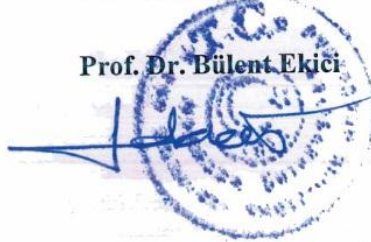


ONAY

Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ~~05.02.2020~~ tarih ve ~~2020/05-02~~ sayılı kararı ile Gamze KOÇAL'ın Kimya Anabilim Dalı Organik Kimya Programında Yüksek Lisans derecesi alması onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Bülent Ekici



TEŞEKKÜR

Bu yüksek lisans tez çalışması, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalı, Organik Kimya programında gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, ortaya çıkan problemlerde gerekli desteği hiçbir zaman esirgemeyen ve kılavuzluk eden tez danışmanlarım sayın Prof. Dr. Nilhan Kayaman Apohan'a, sayın Öğr.Gör.Dr. Burcu Oktay'a,

Yüksek lisans tez çalışmamı FEN-C-YLP-131217-0674 numaralı proje kapsamında destekleyen Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

İhtiyaç duyduğum her anda yanımda olup bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan hocalarım sayın Doç. Dr. Emrah Çakmakçı'ya, sayın Doç. Dr. Serap Gürbüz Demir'e, sayın Doç.Dr.Soner Çubuk'a,

Bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan ve benden yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Serap Erdem Kuruca ve Sayın Güneş Özen Eroğlu'ya,

Hayatım boyunca yanımda olan beni maddi ve manevi destekleyen canım aileme,

Her durum ve koşulda desteğini benden esirgemeyen ve bana güç veren sevgili nişanlım Ersoy Gümüş'e,

Her zaman neşe ve güç kaynağım olan sevgili yeğenim Güney Tuna Seday'a,

Lisans eğitiminden beri yanımda olan sevgili arkadaşlarım Beyza Hamur ve İlknur Yıldız'a, ayrıca çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen tüm laboratuvar arkadaşlarıma sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SEMBOLLER	vi
KISALTMALAR	vii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ	xi
1.GİRİŞ	1
1.1.Giriş ve Amaç	1
1.2.Hidroksiapatit(HAp)	3
1.3.Hidroksiapatit Sentez yöntemleri	4
1.4.Hidrotermal Yöntem ve Özellikleri	5
1.4.1.Hidrotermal Yöntemi Etkileyen Faktörler	6
1.4.2.Hidrotermal Yöntemin Avantajları	7
1.5.Hap/MHAp Kullanım Alanları	7
1.6.Kontrollü İlç Salım Sistemleri	8
1.7.Kontrollü İlaç Salım Sistemlerinin Global Pazardaki Yeri	11
1.8.Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu (ATRP)	12
1.8.1.Monomerler	14
1.8.2.Başlatıcılar	15
1.8.3.Katalizörler	16
1.8.4.Ligandlar	16
1.8.5.Çözücüler	17
1.8.6.Sıcaklık ve Reaksiyon Süresi	17
1.8.7.ATRP'nin Kinetiği	17
2.MATERYAL VE YÖNTEM	19
2.1.Deneyde Kullanılan Kimyasallar	19
2.2.Deneyde Kullanılan Cihazlar ve Karakterizasyon Metodları	23
2.3.Mezo Gözenekli Hidroksiapatitin Yüzey Modifikasyonu	24
2.3.1.Gözenekli Hidroksiapatit (MHAp) Sentezi	24
2.3.2.Bifonksiyonel ATRP başlatıcısı (MHAp-Br) Sentezi	25

2.3.3. MHAp Yüzeyine ATRP Başlatıcının Bağlanması	26
2.3.4.MHAp Yüzeyinin ATRP ile Modifikasyonu	26
2.3.4.1. MHAp Yüzeyinde ATRP	27
2.3.5.İlaç Yükleme ve İn vitro İlaç Salımı Denemeleri	29
2.3.6.Hücre Kültürü	31
2.3.6.1. MTT testi ile Sitotoksite Analizi	31
3.BULGULAR VE TARTIŞMA	33
3.1. MHAp ve MHAp–Br Yapısal Analizi	33
3.2. Blok-MHAp-P[PEGMA-DMAPMA-FMA] ve rastgele-MHAp-P[PEGMA-DMAPMA-FMA] Yapısal Karakterizasyonu	33
3.2.1. FTIR Sonuçları	33
3.2.2. ¹ H-NMR Sonuçları	35
3.2.3. XPS Sonuçları	37
3.3 Termal Karakterizasyon	38
3.4 Morfolojik Karakterizasyon	40
3.5 DLS Analizi	42
3.6. Zeta Potansiyel Sonuçları	43
3.7. İlaç Salımı Sonuçları	44
3.8. Sitotoksite çalışmaları ve Hücre Kültürü	46
SONUÇLAR	50
KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ	60

ÖZET

Çekirdek Kabuk Tipi Poliakrilat Hidroksi Apatit İlaç Taşıyıcıları Kontrollü Polimerizasyon ile Sentezi ve Karakterizasyon Çalışmaları

Mezo gözenekli hidroksiapatitin (MHAp), mükemmel biyouyumluluk, biyobozunurluk ve biyoaktiviteye gibi üstün özelliklere sahip olmasının yanında toksik olmama, geniş yüzey alanı, yüksek yükleme kapasitesine sahip olması da onları iyi bir ilaç taşıyıcısı olarak sistem haline getirmektedir. Fakat MHAp'in kırılğan yapısı onun kullanım alanlarını sınırlandırmaktadır. Biyouyumlu polimerler ile çeşitli modifikasyon işlemleri uygulanarak elde edilen kompozit MHAp, sert ve kırılğan yapısının oluşturduğu dezavantajları ortadan kaldırmaktadır.

Yapılan bu tez çalışmasında, hidrotermal yöntem kullanılarak sentezlenen MHAp kontrollü polimerizasyon yöntemi olan atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP) ile modifiye edildi. Öncelikle, MHAp bir ATRP makro-başlatıcısına dönüştürüldü. 3-aminopropil trietoksisilan ile bromoisobütiril bromür arasında reaksiyonla elde edilen bi-fonksiyonel başlatıcı hem MHAp yüzeyine bağlandı hem de ucundaki C-Br bağı üzerinde kontrollü polimerizasyon gerçekleştirildi.

Çalışmanın ikinci kısmında, poli(etilenglikol)metakrilat (PEGMA), N-[3-(dimetilamino)propil]metakrilamit (DMAPMA), floresin-o-metakrilat (FMA) monomerlerinin MHAp yüzeyinde başlatılan ATRP ile modifikasyonu gerçekleştirildi. Sentezlenen tüm yapıların yapısal, termal, morfolojik karakterizasyonu için FT-IR, XPS, SEM, DLS, Zeta potansiyel ve TGA analizleri yapıldı. Yapılan analizler sonucunda modifikasyon işlemlerinin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği kanıtlandı.

Son kısımda, hücre kültürü ve ilaç salınım çalışmaları gerçekleştirildi. Model ilaç olarak kemoterapite tedavisinde kullanılan bir anti-kanser ilacı olan doksorubisin (DOX) kullanıldı. Hücre kültürü çalışmalarında saos-2 insan osteosarkoma hücre hattı kullanıldı. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda poliakrilat-hidroksiapatit doku iskelelerinin DOX için iyi bir ilaç taşıyıcı sistem olduğu belirlendi.

ABSTRACT

Preparation of Core Shell Type Polyacrylate Hydroxyapatite Drug Carriers by Controlled Polymerization and Their Characterizations

Meso-porous hydroxyapatite (MHAp) has superior properties such as excellent biocompatibility, biodegradability and bioactivity, as well as its non-toxic, large surface area and high loading capacity make it a good drug carrier system. However, the brittle nature of MHAp restricts its usage applications. Composite MHAp obtained by various modification processes with biocompatible polymers, which eliminates the disadvantages of its hard and brittle structure.

In this thesis study, MHAp prepared using hydrothermal method, which is modified by atom transfer radical polymerization (ATRP) that is one of the controlled polymerization. Firstly, MHAp was converted to an ATRP macro-initiator. The bi-functional initiator obtained by reaction between 3-aminopropyl triethoxysilane and bromoisobutyryl bromide, which bounded to both the MHAp surface and also controlled polymerization was performed on the C-Br bond at the end.

In the second part of the study, MHAp surface was modified by surface initiated ATRP of poly (ethylene glycol) methacrylate (PEGMA), N- [3- (Dimethylamino) propyl] methacrylamide (DMAPMA), Fluorescent o-methacrylate (FMA) monomers. FT-IR, XPS, SEM, DLS, Zeta potential and TGA analyzes were performed for structural, thermal, morphological characterization of all synthesized structures. As a result of the analysis, it was proved that the modification procedures were performed successfully.

In the final part, drug release and cell culture studies were performed. Doxorubicin (DOX), an anti-cancer drug, was used as a model drug. Saos-2 human osteosarcoma cell line was used in cell culture studies. According to the results, polyacrylate-hydroxyapatite scaffolds were found to be a good drug delivery system for DOX.

SEMBOLLER

k_a	: aktivasyon hız sabiti
k_d	: deaktivasyon hız sabiti
k_p	: hız sabiti
R	: Radikal
P	: Polimerizasyon
λ	: Dalga boyu
μg	: Mikro gram
μL	: Mikro litre
nm	: Nanometre
ng	: Nanogram

KISALTMALAR

HAp	: Hidroksiapatit
MHAp	: Mezo gözenekli Hidroksiapatit
İDS	: İlaç Dağıtım Sistemi
CRP	: Kontrollü Radikal Polimerizasyonu
ATRP	: Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu
CTAB	: Cetyltrimetilamonyum Bromid
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
MAP	: Mono-Alkil Fosfat
PM/HA/CS	: Polimer Misel/Hidroksiapatit/Kitosan
CC	: Sileksetil
PNIPAAM	: Poli(N-izopropilakrilamit)
SIM	: Simvastatin
PMDETA	: N,N,N',N',N'''-pentametil dietilen triamin
TMEDA	:Tetrametilendiamin
DMF	: Dimetil Formamid
APTES	: (3-Aminopropil) trietoksisilan
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
XPS	: X-ray Fotoelektron Spektroskopisi
TGA	: Termal Gravimetrik Analiz
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
DLS	: Dinamil Işık Saçılımı
DCM	: Diklorometan
BIBB	: 2-bromoizobütiril bromür
TEA	: Ttietilenamin
p-TSA	: para Toluen Sulfonik Asit
PEGMA	: Poli (Etilen Glikol) Metakrilat

DMAPMA	: N-[3-(Dimetilamino)propil]Metakrilamit
FMA	: Floresan o-Metakrilat
DOX	: Doksorubisin
PBS	: Fosfat Tampon Çözeltilisi
MTT	: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide



ŞEKİL LİSTESİ

SAYFA

Şekil 1.1.HAp'ın kristal ve genel yapısı	4
Şekil 1.2.HAp'ın biyomedikal uygulamaları	8
Şekil 1.3.Geleneksel ve kontrollü ilaç dağıtımının karşılaştırılması	9
Şekil 1.4.Plazmadaki ilaç konsantrasyonunun zamanla değişimi	10
Şekil 1.5.İlaç dağıtım sisteminin bölgelere göre pazar-büyüme oranı	12
Şekil 1.6.2014-2025 avrupa kontrollü salım ilaç dağıtım pazarının büyüklüğü	12
Şekil 1.7.Geçiş-Metal-Katalizli ATRP	13
Şekil 1.8.ATRP'nin genel mekanizması	14
Şekil 1.9.ATRP monomerleri	15
Şekil 1.10.ATRP başlatıcıları	15
Şekil 1.11.ATRP katalizörleri olarak kullanılan bakır kompleksleri	16
Şekil 1.12.ATRP ligand çeşitleri	16
Şekil 2.1.MHAp sentez şeması	25
Şekil 2.2.Bifonksiyonel ATRP başlatıcısı (MHAp-Br) sentez şeması	25
Şekil 2.3.MHAp-Br hidroliz reaksiyonu şeması	26
Şekil 2.4.MHAp-Br yüzeyine ATRP başlatıcısının bağlanması	26
Şekil 2.5.MHAp yüzeyinin ATRP ile modifikasyonun genel şekli	28
Şekil 2.6.pH=7,4 ve pH=5,5 teki DOX standart kalibrasyon eğrileri	30
Şekil 2.7.a) Rastgele-MHAp-P[PEGMA-DMAM-FMA]-DOX, b)Blok-MHAp-P[PEGMA-DMA-PMA-FMA]-DOX	31
Şekil 3.1. a)MHAp ve b) MHAp-Br FT-IR spektrumları	33
Şekil 3.2. Rastgele-MHAp-P[PEGMA-DMA-PMA-FMA] FT-IR spektrumu	34
Şekil 3.3. Blok-MHAp-P[PEGMA-DMA-PMA-FMA] FT-IR spektrumu	34
Şekil 3.4. Kopolimerler ve monomerlerin çakışık FT-IR spektrumları	35
Şekil 3.5. Bifonksiyonel ATRP başlatıcısı ¹ H-NMR spektrumu	36
Şekil 3.6. Rastgele-MHAp-P[PEGMA-DMA-PMA-FMA] ¹ H NMR spektrumu	37
Şekil 3.7. Blok-MHAp-P[PEGMA-DMA-PMA-FMA] ¹ H NMR spektrumu	37
Şekil 3.8. XPS spektrumu a) MHAp-Br, b) blok-MHAp-P[PEGMA-DMA-PMA-FMA] ve c) rastgele-MHAp-P[PEGMA-DMA-PMA-FMA]	38

Şekil 3.9. (A)MHAp, (B)MHAp-Br, (C)Rastgele-MHAp-P[PEGMA-DMAPMA-FMA]çakışık TGA termogramları	39
Şekil 3.10. (A)MHAp, (B)MHAp-Br, (C)Blok-MHAp-P[PEGMA-DMAPMA-FMA]çakışık TGA termogramları	39
Şekil 3.11. (a) 25000 ve (b) 50000X büyütmede MHAp SEM görüntüleri	40
Şekil 3.12. MHAp-Br 50000x büyütmede a) SEM ve b) STEM görüntüleri	41
Şekil 3.13. Rastgele-MHAp-P[PEGMA-DMAPMA-FMA]'ın a) 200000x SEM, b)200000x ve c) 200000x STEM görüntüleri	41
Şekil 3.14. Blok-MHAp-P[PEGMA-DMAPMA-FMA](2)'in a)100000x SEM, b)50000x ve c)200000x STEM görüntüleri	42
Şekil 3.15. MHAp-Br DLS sonuçları	42
Şekil 3.16. Rastgele-MHAp-P[PEGMA-DMAPMA-FMA] DLS sonuçları	43
Şekil 3.17. Blok-MHAp-P[PEGMA-DMAPMA-FMA] DLS sonuçları	43
Şekil 3.18. Rastgele-MHAp-P[PEGMA-DMAPMA-FMA]'ın pH= 5,5'te DOX salımı	45
Şekil 3.19. Rastgele- MHAp-P[PEGMA-DMAPMA-FMA]'ın pH= 7,4'te DOX salımı	45
Şekil 3.20. HUVEC MTT %canlılık sonuçları	46
Şekil 3.21. MTT % hücre canlılık sonuçları	47
Şekil 3.22. Hücre Kültürü	48

TABLO LİSTESİ**SAYFA**

Tablo 1.1. Başlıca kalsiyum fosfat tuzları	3
Tablo 2.1. ATRP formülasyon tablosu	27
Tablo 3.1. MHAp ve türevlerinin TGA sonuçları	40
Tablo 3.2. Zeta potansiyel sonuçları	44



1. GİRİŞ

1.1. Giriş ve Amaç

Osteosarkoma en sık görülen pediatrik kemik kanseri türüdür. Birincil osteosarkoma, akciğerlere ilk aşamadan itibaren yayılma eğilimi gösterir ve hayatta kalma oranı oldukça düşüktür [1]. Genellikle ameliyat, kemoterapi ve radyasyon terapisi ile tedavi edilebilir. Anti-kanser ilaçlar, normal dokulardaki toksik yan etkilere ve çoklu ilaç direncine neden olur ve bu durum kemoterapi etkinliğini olumsuz etkiler. Ayrıca, yüksek toksisite, zayıf oral biyoyararlanım, suda çözünürlüğünün olmaması, normal hücrelere ve kanser hücrelerine anti-kanser ilacın verilmesi geleneksel kanser tedavilerinin ana problemlerini oluşturmaktadır [2,3]. Bu problemlerin giderilmesi için, yüksek konsantrasyonlu anti-kanser ilacın sadece hedeflenen bölgeye salımının kontrol edilmesi gereklidir. Lokal ilaç uygulamasında, ilacın zararlı yan etkileri en aza indirgenerek tümör dokusuna yeterli miktarda ilaç verilir. Bu nedenle akıllı ilaç dağıtım sistemleri (İDS) kanser tedavisi için ideal bir yöntemdir. İDS'nin kullanılması ile ilaç verimliliği artar, toksik yan etkiler önlenir, ilaç emilimi ve ilacın hedef bölgeye erişimi kolaylaşır. Akıllı İDS'ler çevresel duyarlılıklarının yardımıyla pH, sıcaklık gibi normal ve tümör hücreleri arasındaki fizyolojik ve patolojik farklılıklardan dolayı anti-kanser ilaçları esas olarak tümör hücrelerine serbest bırakır [4].

Kemiklerin inorganik kısmını oluşturan hidroksiapatit [HAp , $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$], iyi protein afinitesi, gözenekli yapısı, toksik olmayışı ve biyouyumluluğundan dolayı, kontrollü ilaç salım sistemi olarak büyük ilgi görmektedir [5]. HAp, korozif vücut sıvısı ortamında biyolojik olarak uyumlu olması, toksik olmaması ve atıl olmasından dolayı bir ilaç taşıyıcısı olarak tasarlanır. HAp mikro kürelerinin gözenekli yapısı, ilaçların yüklenmesini ve kontrollü salımlarını kolaylaştırmaktadır. Mezo-gözenekli hidroksiapatitin (MHAp), geleneksel HAp nanoparçacıklarına kıyasla ilaç salımını stabilize etmenin yanı sıra ilaç adsorpsiyon kapasitesini arttırdığı kanıtlanmıştır [6]. MHAp, ıslak kimyasal yöntemlerle, yani hidrotermal, sol-jel, kimyasal çökeltme, çoklu emülsiyon ve biyomimetik çökeltme gibi metodlarla sentezlenebilir. Hidrotermal çöktürme ve kalsinasyon işleminin bir kombinasyonunun uygulandığı şablonlar kullanılarak MHAp nanopartikülleri sentezlenir [7,8,9]. Hidrotermal yöntem, MHAp bazlı malzemelerin sentezi ve boyutlarını ve morfolojilerini kontrol etmek için geliştirilen en etkili yöntemlerden biridir. Kırılgan ve sert bir yapıya sahip olan MHAp, polimerler ile kompozit olarak kullanıldığında yapısından kaynaklı dezavantajları iyileştirilebilir. Bu tür modifiye

edilmiş HAp bazlı kompozitler sadece iyi biyouyumluluğa sahip olmakla beraber, aynı zamanda hem su hem de organik çözücüler içinde iyi bir şekilde dağılabilir.

Kontrollü /yaşayan radikal polimerizasyonu (CRP) polimer sentezi ve modifikasyonu ile ilgili uygulamalar için ideal yöntemlerdir [10]. En çok kullanılan CRP yöntemleri; atom transferi radikal polimerizasyonu (ATRP), nitroksit aracılı polimerizasyon (NMP), ve tersinir katılma/ayrılma transfer polimerizasyonudur (RAFT). Bu yöntemler arasında ATRP en etkili ve kullanışlı CRP yöntemidir.

Bu tez çalışmasında hidrotermal yöntem ile sentezlenen mezo gözenekli hidroksiapatitin ATRP yöntemi ile yüzeyinin fonksiyonellendirilmesi ve hazırlanan poliakrilat hidroksi apatitin ilaç taşıyıcısı olarak biyoteknoloji alanında kullanılması hedeflenmiştir. İlk aşamada, MHAp hidrotermal metod ile sentezlenerek gözenek boyutunun büyük olması hedeflenmiştir. Çalışmanın ikinci bölümünde, MHAp yüzeyinde yüzeyde başlatılmış atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP) ile düzenli poliakrilat zincirlerinin oluşturulması hedeflenmiştir. Son bölümde, sentezlenen poliakrilat hidroksiapatitin ilaç salımı ve hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

1.2. Hidroksiapatit (HAp)

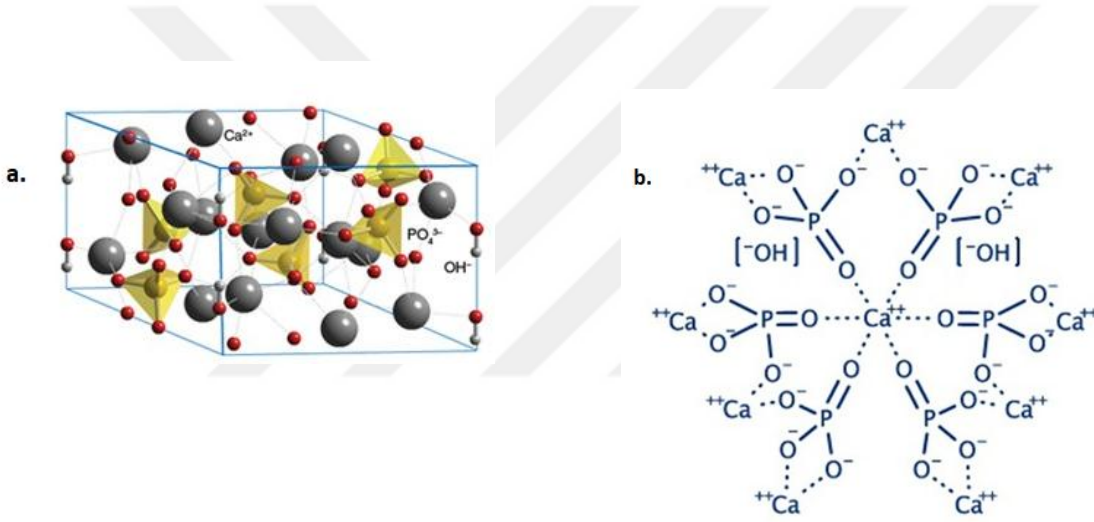
Hidroksiapatit (HAp), termodinamik olarak kararlı, vücut sıvısı içerisinde kristalin halde bulunan ve kemik mineral kompozisyonuna çok benzer özellikler gösteren bir yapıdır. HAp kimyasal olarak kalsiyum (Ca) ve fosfat (P) elementlerinden oluşur. Tüm inorganik kalsiyum-fosfat tuzları (CaP); Ca/P oranı, kristallik oranı farklı olduğu için benzer biyoaktivite veya bozulma oranı göstermezler. Bu yüzden CaP türevleri kimyasal içerik ve çözünürlük değerlerine göre farklı isimler alırlar (Tablo 1.1).

Tablo 1.1. Başlıca kalsiyum fosfat tuzları[11].

İsim	Sembol	Formül	Ca/P
Monokalsiyum fosfat monohidrat	MCPM ve MCPH	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4) \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.5
Monokalsiyum fosfat susuz	MCPA ve MCP	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0.5
Dikalsiyum fosfat dihidrat (Brushite)	DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.0
Dikalsiyum fosfat susuz (Monetite)	DCPA ve DCP	CaHPO_4	1.0
Oktakalsiyum fosfat	OCP	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.33
α -Trikalsiyum fosfat	α -TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5
β -Trikalsiyum fosfat	β -TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5
Amorf kalsiyum fosfat	ACP	$\text{Ca}_x(\text{PO}_4)_y \cdot n\text{H}_2\text{O}$	1.2-2.2
Hidroksiapatit	HA ve HAp	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1.67

Biyolojik apatit; ana mineral formunda Ca/P oranı 1,67'den düşük, hidroksil eksikliği olan ve karbonat bakımından zengin olan bir apatit yapısıdır. Kemik ve diş gibi omurgalı sert dokuların önemli bir inorganik bileşeni olan hidroksiapatitin (HAp, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) ve Ca/P oranı 1.67'dir. HAp'nın biyoaktivite, bozunma, osteokondüktif ve osteoindüktif özellikleri ve ayrıca

konak kemik dokusu ile güçlü bir bağ oluşturma [12,13] özelliklerinden dolayı kalsiyum fosfatın en kararlı halidir ve ayrıca su içerisinde az çözünür [14,15]. Stokiyometri, yüzey alanı, kristallik, morfoloji, partükül büyüklüğü, partükül dağılımı ve aglomerasyon gibi karakteristik özellikleri kontrol edilerek HAp'nın hem mekanik hem de biyolojik performansını geliştirmek mümkündür[16,17]. Son zamanlarda, yüksek yüzey alanı, ayarlanabilir gözenek boyutu ve yüksek gözenek hacmi gibi çeşitli alternatif özellikleri sayesinde, mezo-gözenekli hidroksiapatitin (MHAp) sentezi üzerine yoğun araştırmalar yapılmaktadır [11]. MHAp'nın, geleneksel HAp nanoparçacıklarına kıyasla ilaç salınımını stabilize etmenin yanı sıra ilaç adsorpsiyon kapasitesini arttırdığı kanıtlanmıştır[18]. Gözenekli HA, hedeflenen moleküllere ve kontrol edilebilir adsorpsiyon kinetiğine karşı daha iyi adsorpsiyon kapasitesini destekleyebilir.



Şekil 1.1. HAp'nın a) kristal ve b) genel yapısı [19,20]

1.3.Hidroksiapatitin (HAp) Sentez Yöntemleri

HAp, doğal kaynaklardan elde edilebildiği gibi kimyasal yöntemlerle de sentezlenebilir[21]. Doğal HAp, memeli kemiklerinden (büyükbaş, deve veya at), deniz veya su kaynaklarından (balık kemiği, balık pulu), kabuklulardan (balık yumurtası, deniz kabuğu), bitki ve alglerden aynı zamanda da mineral kaynaklardan (kireç taşı) izole edilebilir.

HAp'nın kimyasal sentezinde birçok yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemler dört ana başlık altında toplanabilir. Bunlar;

- Islak Kimyasal Sentez
- Kuru Kimyasal Sentez

- Buhar Fazı Reaksiyonlar
- Yeni Teknikler

Kuru kimyasal metodlar katı hal ve mekanokimyasal olmak üzere ikiye ayrılır. Katı faz metodu genellikle stokiyometrik ve iyi kristalleşmiş bir ürün verir, ancak nispeten yüksek sıcaklıklar ve uzun ısıtma süreleri gerektirir.

Bu yöntemler arasında ıslak kimyasal metodlar kolay, basit ve ucuz olmasından dolayı en çok tercih edilen sentez yöntemleridir. Islak kimyasal yöntem kendi içerisinde; kimyasal çöktürme, sol-jel prosesi, kimyasal buhar depolama, hidrotermal ve ters mikro-emülsiyon tekniklerine ayrılır. Islak proses ile yan ürün olarak başlıca su oluşur ve başka bir yan ürün oluşma olasılığı çok düşüktür.

Kullanılan tekniğe bağlı olarak, farklı morfoloji, stokiyometri ve kristallik oranına sahip HAp elde edilebilir. Kimyasal çöktürme yönteminde, nanometre boyutlarında HAp kristalleri elde edilir ve bunlar çubukla şekline sahiptir. Diğer ıslak kimyasal metodlar içerisinde hidrotermal yöntem, nispeten hafif reaksiyon koşulları altında tek bir adımda kristalin HAp verdiği için HAp eldesi için en uygun yöntemdir [22].

1.4.Hidrotermal yöntem ve özellikleri

Hidrotermal proses HAp sentezi için en yaygın kullanılan metottur. Bu yöntem, özellikle 1970'lerde seramik işleme teknolojisinin başarılı bir şekilde geliştirilmesinden sonra popüler bir araştırma alanı haline gelmiştir. 1990'dan itibaren de karbon polimorfları ve hibrit nanomalzemeler dahil olmak üzere gelişmiş nanomalzemelerin işlenmesi için daha verimli bir teknik haline gelmiştir [23]. Hidrotermal teknik nanoteknoloji için önemli bir yöntemdir. Bu teknik kullanılarak farklı boyut, şekil ve yüzey özelliklerine sahip yüksek kaliteli çeşitli nanokompozit malzemeler hazırlanmaktadır [23]. Hidrotermal yöntem ile kimyasal homojenlik, yüksek kalitede büyük kristallerin üretimi, katalizör ve pahalı yüzey aktif maddeleri kullanmaya gerek kalmadan nanomalzeme sentezini gerçekleştirilir [24]. Bu özellikler göz önüne alındığında, hidrotermal yöntem, MHAp kristallerinin büyük ölçekli ve düşük maliyetli üretimi için ümit verici bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir. Çeşitli Ca/P oranlarına (1.50-1.67) sahip HAp tozları hidrotermal sentezden kolayca elde edilebilir. Genellikle yüksek kristallik dereceli ve stokiyometrik değere yakın Ca/P oranına sahip malzemeler hidrotermal yöntemle elde edilebilir. Kalsiyum ve fosfat kaynakları içeren sulu

bir çözelti kullanarak biyoaktif kaplamalar hazırlamak için üstün bir teknik olarak da dikkat çekmektedir.

1.4.1. Hidrotermal Yöntemi Etkileyen Faktörler

Reaksiyon süresi, reaksiyon sıcaklığı, konsantrasyon ve pH değerleri gibi farklı sentez koşulları tipik bir hidrotermal sentezde kontrol edilebilen önemli parametrelerdir. Özellikle pH parametresi, HAp'ın son morfolojisini ve yapısını doğrudan etkilediği için sentez sırasında önemli bir parametre olarak kabul edilmektedir.

pH değeri ~10-12 aralığında, küresel HAp nanoparçacıkları, pH değeri ~4-6 aralığında ise laminer ve tübüler HAp nanoyapıların oluşması pH parametresinin sonuçta ortaya çıkan HAp'ın morfolojik ve yapısal özelliklerini etkilediğini göstermektedir [25].

Bir HAp sentezinde yüzey aktif maddeler (diğer bir adıyla sürfaktan), nanokristallerin büyüklüğü ve morfolojisi üzerinde kontrol sağlayan en iyi yönlendirici ajanlardır [26]. Yüzey aktif maddeler, endüstrilerde ve laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Yüzey aktif madde, hidrofilik, hidrofobik, lipofobik veya lipofilik özellikler kullanılarak iki fiziksel faz arasında bir bağlantı kuran aktif bir yüzeye veya arayüze sahip kimyasaldır [27]. Yüzey aktif maddeler iki ana gruba ayrılır; (i) Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) gibi anyonik yüzey aktif maddeler. [28] (ii) Cetyltrimetilamonyum bromür (CTAB) gibi katyonik yüzey aktif maddeler [29].

Hidrotermal çökeltme ve kalsinasyon işleminin bir kombinasyonu ile Pluronic P123, CTAB, Pluronic F127 ve mono-alkil fosfat (MAP) ve kazein içeren şablonlar kullanılarak mezo gözenekli HAp nanopartikülleri sentezlenebilir [30,31]. Bunlar arasında CTAB, birçok sulu sentetik yöntemde katkı maddesi olarak kullanılabilecek biyo-uyumlu bir katyonik yüzey aktif maddedir [32-33]. CTAB sulu çökeltide iyonize olan monomerleri oluşturur. Bunlar bir çökeltme prosesinde mHAp kristalleri üretmek için yüzeylerinde $(PO_4)_3$ ve Ca^{2+} iyonları için çekirdeklenme bölgeleri gibi davranan miseller halinde kendiliğinden birleşir [33]. Wang ve arkadaşları, katyonik yüzey aktif madde CTAB ilave edilerek HAp kristallerinin büyümesini düzenlemeyi kontrol etmişlerdir [34].

Solvotermal bir süreci yöneten temel değişkenler arasında (reaktanlar, çözücü, sıcaklık, basınç, pH ve zaman), soğutma oranının uygunluğuna ciddi bir dikkat gösterilmemiştir. Bununla birlikte, hızlı soğutmanın daha küçük boyutlarda ve daha yüksek konsantrasyonlarda yüzey kusurlarına sahip parçacıklara yol açtığı gösterilmiştir [22].

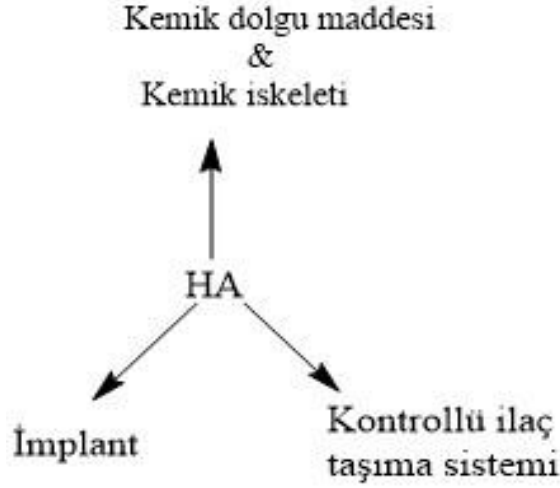
1.4.2.Hidrotermal Yöntemin Avantajları

Hidrotermal yöntemin diğer yöntemlere göre avantajları şu şekilde sıralanabilir [23],

- Elde edilen ürünler homojendir, yapının saflığını, bileşimini, boyutunu ve kristal şeklini kontrol etmek kolaydır.
- Partikül büyüklüğü sıcaklık ile kontrol edilebilir.
- Kristallik derecesi, morfoloji ve parçacıkların boyutu kontrol edilebilir.
- Daha düşük kalsinasyon sıcaklığında çalışılır.
- Tozlar kalsinasyon sırasında oldukça reaktiftir.
- Çok çeşitli kimyasal bileşimler oluşur.
- Düşük enerji ihtiyacı vardır.
- Reaksiyon süresi kısadır.
- Tozların öğütme işlemine ihtiyacı yoktur.
- Küreler, iğneler, çubuklar, lifler ve plakalar gibi farklı morfolojilere sahip nanoparçacıklar elde edilebilir.

1.5. HAp/MHAp Kullanım Alanları

İnsan kemiğine benzer kimyasal bileşimi, toksik özellik göstermemesi, yüksek kimyasal kararlılığı, enflamatuar ve antijenik reaksiyonlara neden olmamasından dolayı sentetik mHAp en sık kullanılan biyomalzemelerden birisidir. Aynı zamanda mHAp, geniş yüzey alanı, yüksek yükleme kapasitesi ve hücre içi nakil kabiliyetine sahip olduğu için kontrollü ilaç salınım sistemlerinde de en yaygın kullanılan biyomalzemelerden birisidir. Çok çeşitli uygulanabilir ilaçlar ve bunların etkili dozajlarının hedeflenen ve kontrollü HAp/ilaç kompozisyonlarına bağlanmasında, HAp'in fonksiyonel gruplarının varlığı bu teknolojiler için sınırsız sayıda değişken oluşturmaktadır. Bu nedenle HAp sentetik biyomalzeme uygulamaları için "altın anahtar" haline gelmektedir [35]. Aynı zamanda HAp metalik protezler ve seramik-polimer kompozit biyomalzemeler için inorganik dolgu maddesi ve küçük kemik kusurlarını tamir etmek için de bir materyal olarak biyoaktif kaplamalarda kullanılmaktadır [36] .



Şekil 1.2. HAp'nın biyomedikal uygulamaları[37].

İmplantların çoğu yüksek mekanik dayanım, düşük yoğunluk ve vücut sıvısı içerisinde kimyasal kararlılıklarından dolayı titanyum veya alaşımlarından yapılmaktadır. Metalik implantlar sertlik ve yüksek mekanik dayanım göstermelerine rağmen biyouyumlulukları oldukça zayıftır. Genellikle metal implantların bu zayıflıklarını gidermek için, biyouyumluluğu ve kimyasal kararlılığı yüksek olan HAp ile kaplanması daha uygundur.

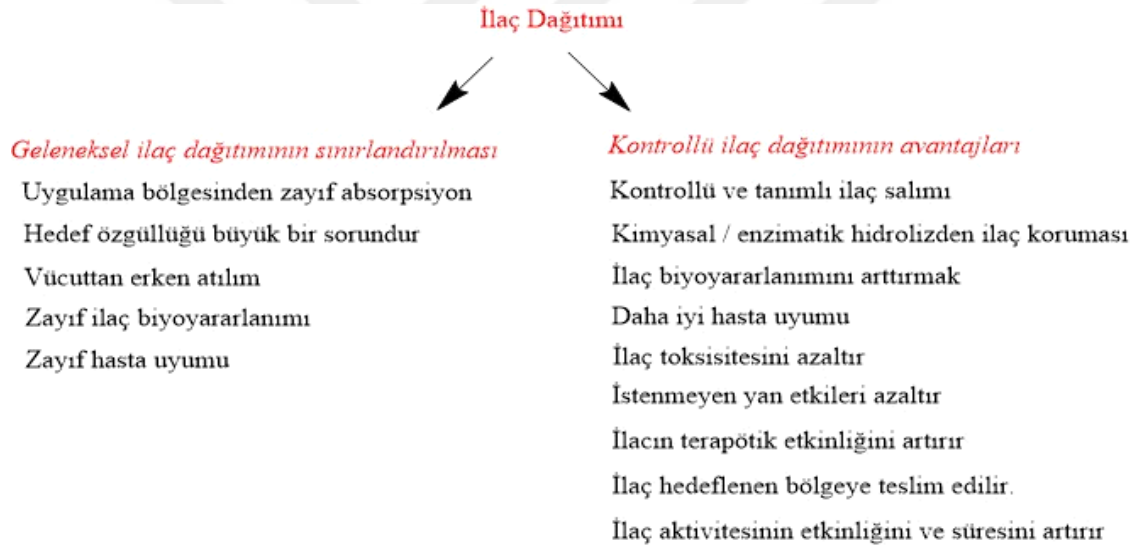
1.6. Kontrollü İlaç Salım Sistemleri

İlerleyen teknolojik gelişmeler, insan hastalıklarını iyileştirmek için kullanılan ilaçların başarısını arttırmakta ve hata payını azalmaktadır. Geleneksel hastalıkların tedavilerinde, ilaçlar genellikle ağız yoluyla verilir veya enjekte edilir. Böylece ilaçlar sadece hastalıklı bölgeye değil tüm insan vücuduna geniş ölçüde dağılır. Bu durum vücudun normal hücrelerine ve dokularına zarar verir ve bazı istenmeyen yan etkilere sebep olarak hastalarda ciddi problemler oluşturabilir.

Bir ilacın alınma şekli, onun etkinliği üzerinde çok önemli bir etkiye sahiptir. Bazı ilaçlar, maksimum yararın elde edildiği optimum konsantrasyon aralığına sahiptir ve bu aralığın üstündeki veya altındaki konsantrasyonlar toksik olabilir veya hiçbir terapötik fayda sağlamayabilir. Örneğin, kemik enfeksiyonları rutin olarak uzun sürelerde uygulanan antibiyotik ilaçlarla tedavi edilir. Antibiyotiklerin etkilenen kemik bölgesine girmesinin, enfeksiyon bölgesinde lokal ilaç konsantrasyonunun düşük olması ilaca dirençli enfeksiyonların gelişme riskini artırır. Hedefe yönelik ilaç dağıtımı, hastalığa sadece etkili bir şekilde müdahale ettiği, aynı zamanda dozajı ve yan etkileri de azalttığı için bu soruna iyi bir çözümdür.

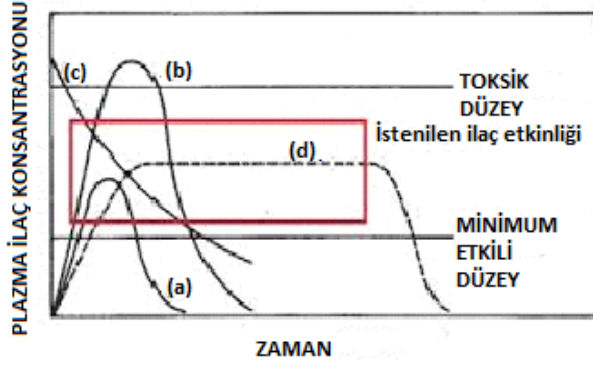
İlaç bozulmasını ve kaybını en aza indirmek, zararlı yan etkileri önlemek, ilaç biyoyararlanımını ve istenen bölgede biriken ilacın fraksiyonunu artırmak için çeşitli ilaç dağıtım ve ilaç hedefleme sistemleri geliştirilmektedir. Kontrollü ve hedefli ilaç dağıtım sistemleri (İDS); arzu edilen terapötik etkileri güvenli ve verimli bir şekilde elde etmek ve terapötiklerin vücutta taşınması için gerekli yaklaşımları, formülasyonları, teknolojileri ve sistemleri içerir. İDS'lerin kullanımı, ilaçların farmakokinetiğini ve dağılımını değiştirerek ilaçların farmakolojik özelliklerini geliştirebilir [38].

İDS, kanser, sinir sistemi hastalıkları, diyabet vb. gibi hastalıkların tedavisi için özellikle önemlidir. Mevcut ilaç dağıtım teknolojilerinin kanser terapisinde kullanılması, ilacın hastalıklı dokunun hedef bölgesinde bölgeye özel kontrollü salımını gerektirir. Günümüzdeki anti-kanser ilaçlarının çoğu kanserli ve normal hücreler arasında büyük farkı görememektedir. Kanserli hücrelerin yanında normal hücrelere de zarar vermektedir.



Şekil 1.3. Geleneksel ve kontrollü ilaç dağıtımının karşılaştırılması[39].

Geleneksel ilaç dağıtım sistemleri, zayıf çözünürlük, dar terapötik pencere ve normal dokularda yoğun sitotoksikite gibi, kanser tedavisinde başarısız sonuçlara sebep olmaktadır. Bu nedenle özellikle tümör bölgelerine kimyasal ajanlar ve diğer terapötik materyaller sunabilen yeni terapötik stratejilere büyük ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sebeple gelişen kontrollü salınım teknolojisi ve hedeflenen ilaç dağıtım kombinasyonu, geleneksel kemoterapide bulunan sınırlamaların üstesinden gelmek için daha verimli ve daha az zararlı bir çözüm sağlamaktadır. İDS, kemoterapi ilacının hedef bölgelerde günlerce ve hatta haftalar boyunca sürekli ve kontrollü salınımını mümkün kılmaktadır [40].



Şekil 1.4 .Plazmadaki ilaç konsantrasyonunun

zamanla değişimi, a) Ağızdan kullanım (normal doz), b) Ağızdan kullanım (aşırı doz), c) Enjeksiyon ,d) Kontrollü ilaç salınımı ideal doz[41].

Biyobozunur ve toksik olmayan yapısıyla HAp, kontrollü ilaç salım sistemleri için çok işlevli bir materyal olarak büyük bir potansiyele sahiptir. Gözenekli içi boş MHAp, aşağıdaki avantajlardan dolayı ideal bir kontrollü ilaç salım sistemi olarak görev yapabilir:

- Mükemmel biyouyumluluk, biyobozunurluk ve biyoaktiviteye sahip olması [42,43],
- Çok sayıda ilacın yüklenmesini ve sabit, yavaş ve kontrollü bir oranda salınmasını mümkün kılan muntazam gözenek büyüklüğü ve yüksek gözenek hacmi [44,45],
- MHAp içindeki hidroksil grupları, hidroksil grupları içeren ilaç moleküllerini hidrojen bağları ile bağlaması ve böylece ilaç yükleme kapasitesinin ve salım özelliğinin geliştirebilmesi.

Fakat, HAp'in yapısı kırılgan ve sert olduğu için tek başına kullanımı sınırlıdır. Bu yüzden polimer ile kompozit halinde kullanılarak bu dezavantajı ortadan kaldırılarak mekanik özellikleri iyileştirilmektedir [46]. Aynı zamanda HAp/polimer kompozitlerinin HAp'e göre avantajlarından birisi de bileşimlerdeki değişikliklerle biyobozunurluk ve biyoaktivitesinin geliştirme imkanı bulunmaktadır.

Son yıllarda akrilik esaslı HAp/polimer ilaç taşıyıcı sistemlerini hazırlanması, karakterizasyonu ve ilaç salım özelliklerinin incelenmesi ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır [47,48]. Demirtaş ve diğerleri akrilik HAp süper-gözenekli hidrojel olarak hazırlayarak fibroblast hücreleri için biyo-uyumluluk çalışmaları yapmışlardır. Aynı zamanda şişme ve ilaç salımı süreçlerini incelemişlerdir [49]. Sailaja ve diğerleri fosforlanmış hidroksietil (metakrilat-ko-

metil metakrilat) üzerinde kalsiyum fosfatın biyo-mineralizasyonunu gerçekleştirmişlerdir [50]. Zhanga ve diğerleri çözünürlüğü düşük olan ilaçların çözünürlüğünü ve oral biyoyararlanımını arttırmak için polimer misel/hidroksiapatit/kitosan (PM/HA/CS) esaslı oral ilaç salım sistemi geliştirmişlerdir. PM/HA/CS, sileksetil (CC) gibi zayıf çözünür bir ilacın çözünürlüğünü ve oral biyoyararlanımını arttırdığını gözlemlemişlerdir. Bu HAp/polimer yapısının bir ilaç salım sistemi olarak büyük bir potansiyele sahip olduğu sonucuna varılmıştır [51]. Wu ve diğerleri MHAp'in osteojenik potansiyelini ve poli(N-izopropilakrilamit)'in (PNIPAAM) sürekli salım özelliklerini bir araya getirerek bir kolestrol düşürücü bir ilaç olan simvastatin (SIM) için ilaç salım sistemi hazırlamışlardır. SIM'in MHAp-PNIPAAM'den etkili bir konsantrasyonda sürekli salınımı, 37 °C'de 16 gün sürmüştür. MHA-SIM-PNIPAAM'ın mHAp'e göre daha iyi osteojenik özellikler sergilediğini tespit etmişlerdir [52]. Couce ve diğerleri HAp-poli(hidroksietil akrilat/akrilamit) kompozitleri yeni kontrollü ilaç salınım sistemi olarak tasarlamışlardır. Deneysel ve matematiksel analizler sonucunda, HAp'in dahil edilmediği formülasyonların şişme kapasitesini azaldığı fakat mekanik özelliklerin hidrojellerdeki benzer bileşime kıyasla önemli ölçüde arttığını görmüşlerdir[53].

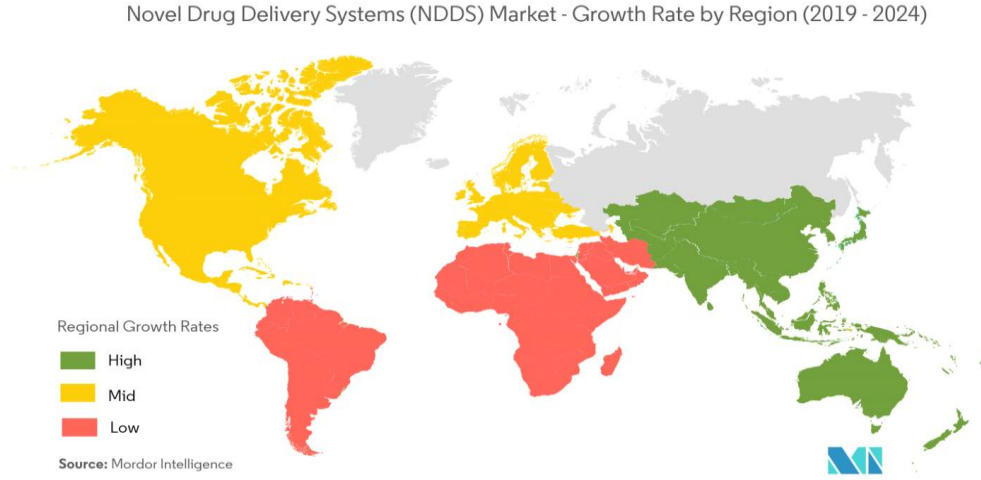
1.7. Kontrollü İlaç Salımın Sistemlerinin Global Pazardaki Yeri

İlaç şirketleri, mevcut ve yeni ortaya çıkan ilaç teknolojilerini hastalar için ilaç yönetimini artıracak şekilde sunar. İlaç şirketleri ve enstitüleri, yeni ilaç salınım sistemlerinin keşfi ve geliştirilmesi için sürekli çalışmaktadır. İlaç salınım sistemleri küresel pazarının 2016 yılında yaklaşık 510 milyar ABD Doları değerinde olduğu ve 2025 yılına kadar yaklaşık 900 milyar ABD Doları'na ulaşması ve 2017'den 2025'e kadar % 6,9'un üzerinde yıllık büyüme oranı ile artması beklenmektedir[54].

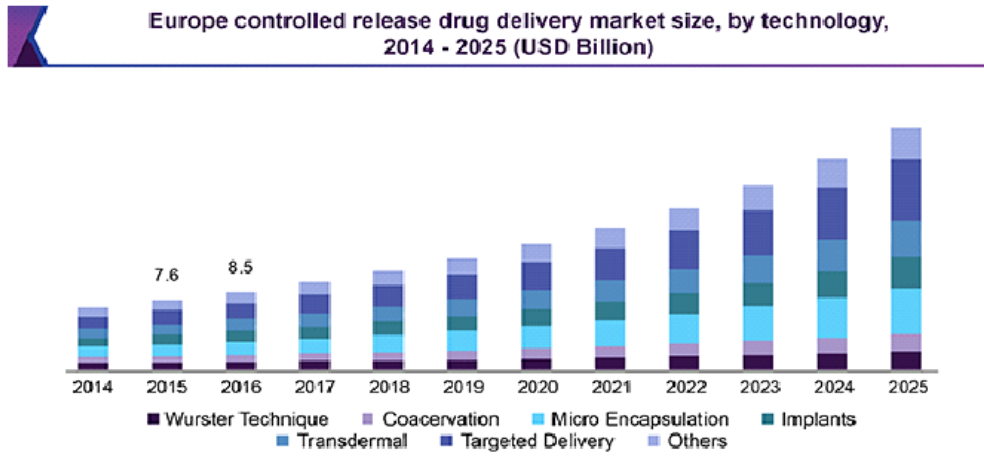
Coğrafi kapsamda; Kuzey Amerika'nın (ABD, Kanada) teknolojik açıdan gelişmiş altyapısı, Ar-Ge faaliyetlerinin artması ve bölgedeki ilaç şirketlerinin varlığı nedeniyle, ilaç dağıtım sistemleri pazarında lider bir paya sahiptir. Onu takip eden ülkeler; Avrupa (İsviçre, Almanya, Fransa, İtalya, İspanya, İngiltere ve Avrupa'nın geri kalanı), Asya-Pasifik (Çin, Hindistan, Japonya, Güney Kore ve Asya-Pasifik'in geri kalanı) ve diğer ülkelerdir (Brezilya, Güney Afrika ve Orta Doğu) [55].

Johnson & Johnson (Amerika), F. Hoffman-La Roche (İsviçre), Merck & Co. (Amerika), Bayer (Almanya), Pfizer (Amerika), Novartis (İngiltere), 3M Company (Amerika), Becton, Dickinson and Company (Amerika), Glaxo Smith Kline, (İngiltere), Sanofi (Fransa), ve

Antares Pharma (Amerika) ,Allergan (İrlanda), SKY Pharmaceuticals Pvt. Ltd. (Çin) kontrollü ilaç salınımı pazarında faaliyet gösteren lider ilaç firmalarından bazılarıdır [56,57].



Şekil 1.5. İlaç dağıtım sisteminin bölgelere göre pazar-büyüme oranı[55].



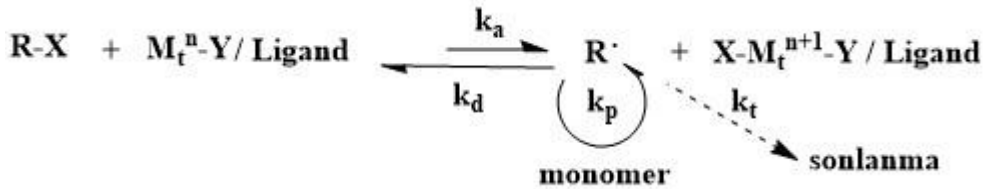
Şekil 1.6. 2014-2025 Avrupa kontrollü salınım ilaç dağıtım pazarının büyüklüğü[58].

1.8. Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu (ATRP)

Sonlanma reaksiyonlarından dolayı katılma ve yer değiştirme ürünlerinin düşük verimli olması sebebiyle radikal reaksiyonları organik sentezlerde sınırlı bir uygulama alanı bulmaktadır. Ortamdaki kararlı radikal miktarını düşürerek sonlanma reaksiyonlarının etkisini en aza indiren özel tekniklerin kullanılması daha yüksek verimli ürünlerin elde edilmesini sağlamıştır. Bu özel teknikler kontrollü/yaşayan serbest radikal polimerizasyonu teknikleridir. Bu prosese dayanarak geliştirilen ve en çok kullanılan kontrollü/yaşayan radikal polimerizasyon

yöntemlerinden biri olan atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP), Mitsuo Sawamoto ve Krzysztof Matyjaszewski tarafından 1995 yılında keşfedilmiştir [59,60]. ATRP, başlangıç monomer/başlatıcı oranını değiştirerek mükemmel yapılı polimerlerin ve kopolimerlerin sentezlenmesi için etkili bir yöntem olup, sonuçta elde edilen polimerin öngörülebilir bir moleküler ağırlık ve dar moleküler ağırlık dağılımına sahip olmasını sağlamaktadır [61]. Şimdiye kadar pekçok akrilat ve metakriat monomerlerinin (stiren, akrilatlar, metakrilatlar, akrilonitril gibi) ATRP ile kontrollü polimerizasyonu başarıyla uygulanmıştır [61].

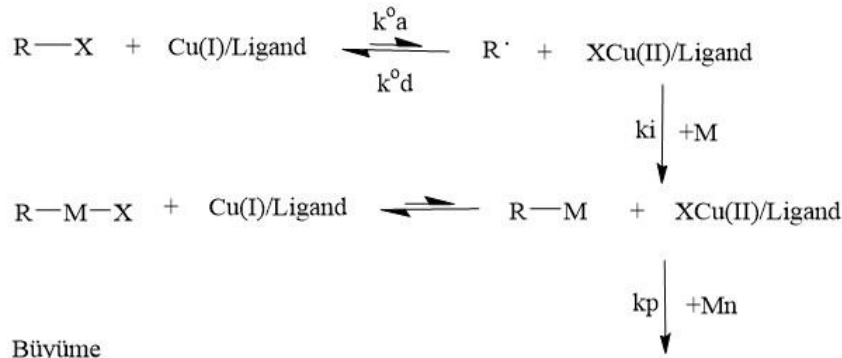
Bir ATRP sistemi, başlatıcı olarak kullanılan alkil halojenür, amin içeren ligand ve elbette monomerden oluşur. ATRP, transfer edilebilir halojene sahip bir alkil halojenür ve ligand ile kompleks oluşturmuş bir geçiş metali (Cu, en sık kullanılan geçiş metali olmuştur, ancak diğer kullanılan metaller arasında Ru, Fe, Mo, Os bulunur) arasındaki redoks reaksiyonu ile C-X bağının homolitik parçalanması ile gerçekleşir. Başlama basamağı çoğalma basamağı ile karşılaştırıldığında çok daha hızlı olmalıdır. Ortamdaki tüm türler arasındaki denge sebebiyle, polimerizasyon sırasında radikallerin konsantrasyonu azalır ve bu durum çoğalma basamağının hızını azaltır. Radikallerin aynı anda oluşmasına bağlı olarak polimer zincirlerinin oluşumu ve büyümesi de aynı anda olur. Aktivasyon/deaktivasyon dönüşümü tekrarlandığı sürece polimer zincirlerinin büyümesi devam eder.



Şekil 1.7. Geçiş-Metal-Katalizli ATRP[62].

Radikaller veya aktif türler, bir geçiş metali kompleksi ($M_t^n-Y/Ligand$ buradaki Y, başka bir ligand veya karşı iyon olabilir) tarafından katalizlenen tersinir indirgenme-yükseltgenme reaksiyonu ile üretilir; bu aktif olmayan türden ($R-X$) bir halojen atomunun (X) eş zamanlı ayrılması ($R\cdot$) ve bir elektron yükseltgenmesiyle ($X-M_t^{n+1}-Y/Ligand$) oluşur. Bu işlem, aktivasyon (k_a) ve deaktivasyon (k_d) hızı sabiti ile gerçekleşir. Polimer zincirleri k_p hız sabitiyle, ara radikallerin monomerlere, normal bir radikal polimerizasyonuna benzer bir şekilde eklenmesiyle büyür. Sonlandırma reaksiyonları (k_t) ayrıca ATRP'de, esasen radikal birleştirme yoluyla meydana gelir; bununla birlikte, iyi kontrol edilen bir ATRP'de, polimer zincirlerinin yüzde birkaçından daha fazlası sonlandırılmaya uğramaz.

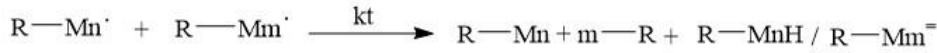
Başlama



Büyüme



Sonlanma



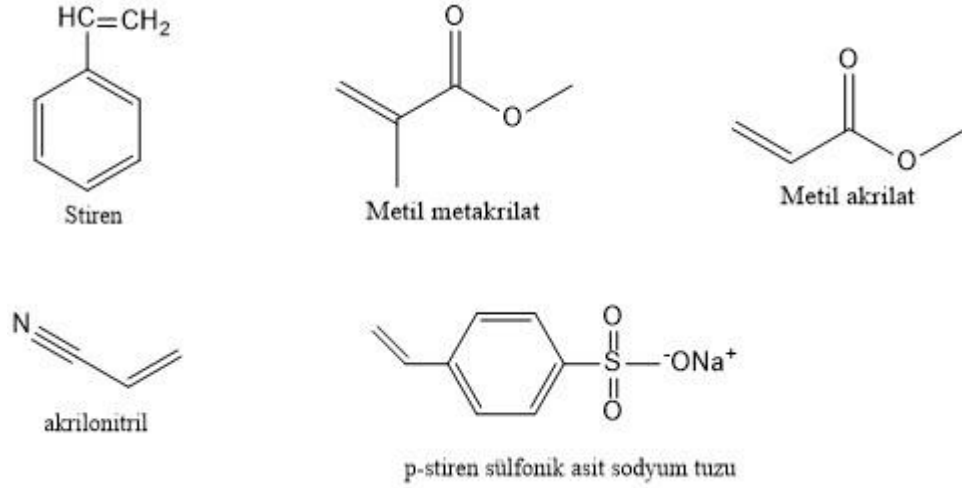
Şekil 1.8. ATRP'nin genel mekanizması[63].

Başarılı bir ATRP için çözücü ve sıcaklık gibi ortam parametreleri gibi diğer faktörler de dikkate alınmalıdır.

1.8.1. Monomerler

ATRP tekniği kullanılarak çeşitli monomerlerden hedeflenen özelliklere sahip polimerler başarıyla elde edilebilir. Tipik monomerler arasında stirenler, (met)akrilatlar, (met)akrilamitler ve akrilonitril bulunur. Aynı katalizörü kullanarak aynı koşullar altında bile, her monomer, aktif ve aktif olmayan türleri için kendi spesifik atom transfer denge sabitine (K_{denge}) sahiptir. Denge sabitinin ($K_{\text{denge}} = k_{\text{act}} / k_{\text{deact}}$) büyüklüğü polimerizasyon hızını belirler [64]. Denge sabiti çok küçükse, ATRP çok yavaş gerçekleşir veya gerçekleşmez. Buna karşılık, çok büyük bir denge sabiti, yüksek radikal konsantrasyonu nedeniyle büyük miktarda sonlanmaya yol açacaktır. Her monomer kendine özgü radikal çoğalma hızına sahiptir. Bu nedenle, belirli bir monomer için, çoğalma radikallerinin konsantrasyonunun ve radikal deaktivasyon hızının polimerizasyon kontrolünü sürdürmesi için ayarlanması gerekir. Bununla birlikte, ATRP katalitik bir işlem olduğundan, dengenin genel konumu sadece monomer ve aktif olmayan türlere bağlı değildir, aynı zamanda eklenen geçiş metali katalizörünün konsantrasyonu ve reaktivitesi ile de değişebilir.

Şekil 1.9 da en sık kullanılan monomerler gösterilmiştir.

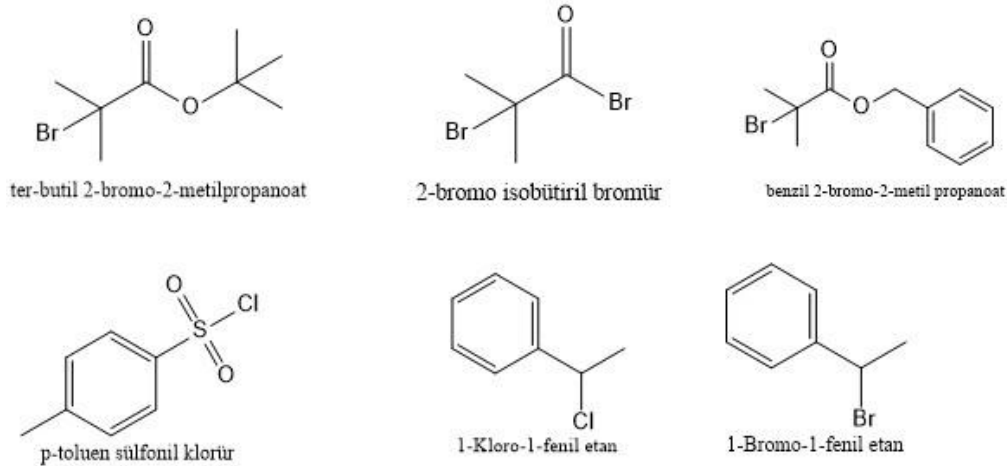


Şekil 1.9. ATRP monomerleri [63].

1.8.2. Başlatıcılar

ATRP başlatıcısı büyüyen polimer zincirlerinin sayısını belirler. Eğer başlama aşaması hızlı ve transfer ve sonlandırma ihmal edildiğinde büyüyen zincirlerin sayısı sabittir ve başlangıçtaki başlatıcı konsantrasyonuna eşittir. ATRP'de, tipik başlatıcı olarak alkil halojenürler (R-X) kullanılır ve polimerizasyon oranı, R-X konsantrasyonuna göre birinci mertebededir. Halojen olarak (X) brom veya klor kullanıldığı durumda moleküler ağırlık kontrolü daha iyidir [65]. Flor kullanıldığı durumda C-F bağı homolitik olarak bölünemeyecek kadar güçlüdür. İyi bir ATRP başlatıcısı ile polimerizasyonu hızlı bir şekilde başlatmalıdır. Genel olarak, aril, karbonil veya allil grupları gibi α -karbonu üzerinde aktifleştirici olan herhangi bir alkil halojenür, potansiyel olarak ATRP başlatıcısı olarak kullanılabilir [65].

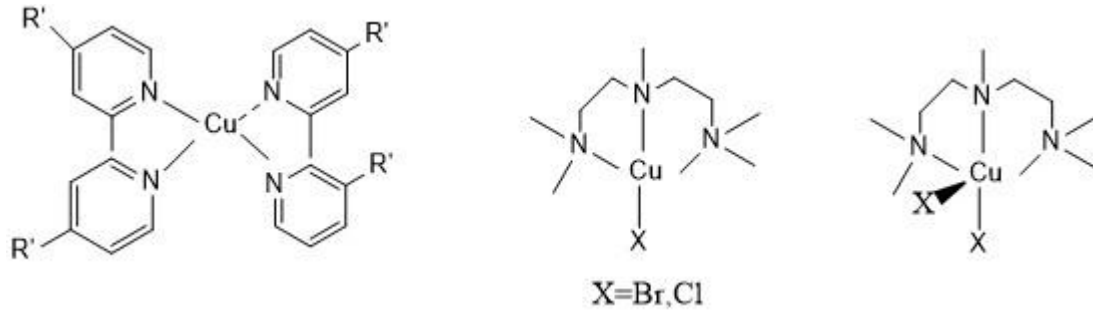
Şekil 1.10 da en sık kullanılan ATRP başlatıcıları gösterilmiştir.



Şekil 1.10. ATRP başlatıcıları [63,66].

1.8.3. Katalizörler

ATRP'nin en önemli bileşeni katalizördür. Atom transfer dengesinin konumunu ve tüm türler arasındaki değişimin dinamiklerini belirlediği için ATRP'nin anahtarıdır [65]. Bu nedenle, katalizör atom transferinde yüksek bir seçicilikte olmalı ve metal halojen atomuna karşı yüksek bir afinitiyeye sahip olmalıdır. ATRP'de geçiş metali olarak en yaygın kullanılan metal bakırdır. Şekil 1.11 de en çeşitli ATRP katalizör sistemleri gösterilmiştir.



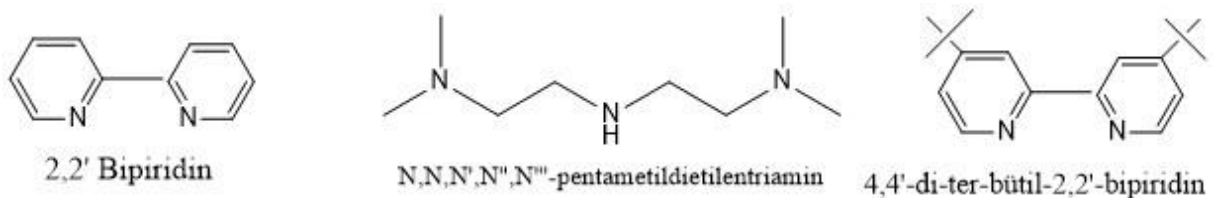
Şekil 1.11. ATRP katalizörleri olarak kullanılan bakır kompleksleri [65].

1.8.4. Ligandlar

Ligandın görevlerinde birincisi çözünür geçiş metali tuzları meydana getirmektir. Aynı zamanda metal merkez ile aktif olmayan türler veya kalıcı radikal arasındaki uygun reaktivite ve dinamik halojen değişimini düzenlemektir [67]. Geçiş metali ve ligand arasında etkili bir kompleks oluşmalıdır. Ligandların elektron verici olması, metalin oksidasyon aşamasını daha kararlı hale getirip polimerizasyonu hızlandırır [63].

ATRP de genellikle 2,2-bipiridin türevleri, azot esaslı N,N,N',N',N''''-pentametil dietilen triamin (PMDETA), tetrametilendiamin (TMEDA) gibi ligandlar sıklıkla kullanılır.

Şekil 1.12 de sıkça kullanılan ligandlar gösterilmiştir.



Şekil 1.12. ATRP ligand çeşitleri[66].

1.8.5. Çözücüler

Benzen, toluen, anisol, difenil eter, etil asetat, aseton, dimetil formamid (DMF), etilen karbonat, alkol, su, karbon dioksit gibi çeşitli çözücüler farklı monomerler için kullanılabilir. Çözücü seçimini birkaç faktör etkiler. Çözücüye zincir transferi minimum düzeyde olmalıdır. Ek olarak, çözücü ile katalitik sistem arasındaki etkileşimler göz önünde bulundurulmalıdır. Katalizörün yapısının farklı çözücüler içinde değişebilme olasılığı da dikkate alınmalıdır. Bakır bazlı ATRP'deki karboksilik asitler veya fosfin grupları katalizörün bozulmasına neden olabilir[63,65].

1.8.6. Sıcaklık ve reaksiyon süresi

ATRP'deki polimerizasyon hızı, hem radikal yayılma hız sabitinin hem de atom transfer denge sabitinin artmasından dolayı artan sıcaklıkla artar. Yüksek sıcaklıklarda daha yüksek k_p/k_t oranı olduğundan polimerizasyonun kontrolünün sağlanması daha basit olur. Genel olarak, katalizörün çözünürlüğü yüksek sıcaklıklarda artar ve çoğalma basamağındaki aktivasyon enerjisi sonlanma basamağından daha yüksek olur. Ancak çok yüksek sıcaklıklar katalizörün yapısında bozabileceğinden ideal sıcaklık 20-150 ° C arasındır [63].

Artan monomer dönüşümlerinde, çoğalma hızı monomer miktarına bağlı olarak önemli ölçüde yavaşlar, bununla birlikte reaksiyonun oranı monomer konsantrasyonundan bağımsız olduğundan önemli ölçüde değişmez.

1.8.7. ATRP'nin Kinetiği

Polimerizasyon hızı, monomer, alkil halojenür (başlatıcı) ve ligand ile geçiş metali kompleksleri bakımından birinci derecedendir. Hız denklemi[68],

$$K_{\text{denge}} = k_{\text{act}}/k_{\text{deact}} = [P] [Cu(II)X_2] / [Cu(I)X][RX]$$

$$R_p = k_p [P] [M] = k_p K_{\text{denge}} [Cu(I)X][RX] / [Cu(II)X_2] [M]$$

Burada;

[M]: Monomer konsantrasyonu,

[RX]: Başlatıcı konsantrasyonu,

[Cu(I)X]: Aktivatör konsantrasyonu,

[P]: Alkil radikalının konsantrasyonu,

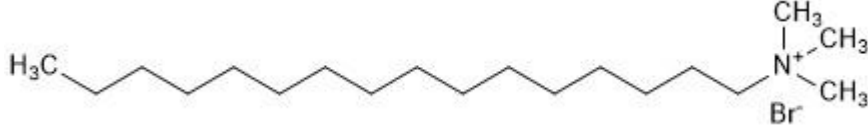
[Cu(II)X₂]: Deaktivatör konsantrasyonu.



2.MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Deneyde Kullanılan Kimyasallar

Setiltrimetilamonyum bromür

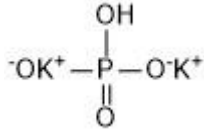


Sigma-Aldrich firmasından temin edildi.Herhangi bir işlem yapılmadan kullanıldı.

Kapalı Formülü: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{Br})(\text{CH}_3)_3$

Molekül Ağırlığı: 364.45 g/mol

Dipotasyum fosfat

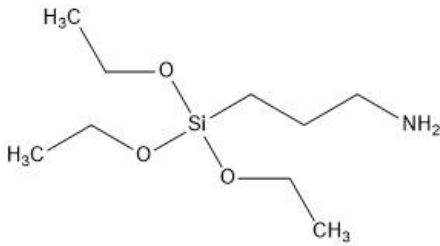


Sigma-Aldrich firmasından temin edildi.Herhangi bir işlem yapılmadan kullanıldı.

Kapalı Formülü: K_2HPO_4

Molekül Ağırlığı: 174.18 g/mol

(3-Aminopropil) trietoksisilan

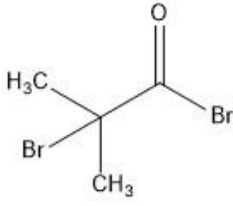


Sigma-Aldrich firmasından temin edildi.Herhangi bir işlem yapılmadan kullanıldı.

Kapalı Formülü: $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$

Molekül Ağırlığı: 221.37g/mol

2-bromoizobütiril bromür

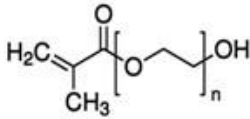


Sigma-Aldrich firmasından temin edildi. Herhangi bir işlem yapılmadan kullanıldı.

Kapalı Formülü: $(\text{CH}_3)_2\text{CBrCOBr}$

Molekül Ağırlığı: 229.90g/mol

Poli (etilen glikol) metakrilat

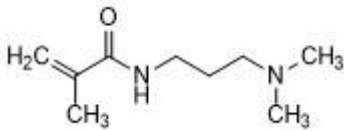


Sigma-Aldrich firmasından temin edildi. Herhangi bir işlem yapılmadan kullanıldı.

Kapalı Formülü: $\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CO}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$

Molekül Ağırlığı: 360 g/mol

N-[3-(Dimetilamino)propil]metakrilamit

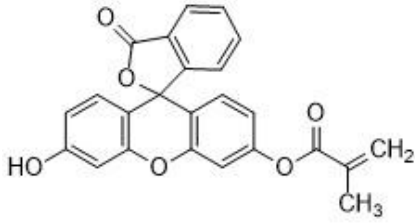


Sigma-Aldrich firmasından temin edildi. Herhangi bir işlem yapılmadan kullanıldı.

Kapalı Formülü: $\text{H}_2\text{C}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CONH}(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_3)_2$

Molekül Ağırlığı: 170.25 g/mol

Fluoresan o-metakrilat



Sigma-Aldrich firmasından temin edildi. Herhangi bir işlem yapılmadan kullanıldı.

Kapalı Formülü: $C_{24}H_{16}O_6$

Molekül Ağırlığı: 400.38 g/mol

Bakır(I)Bromür (CuBr)

Aldrich firmasından temin edildi.

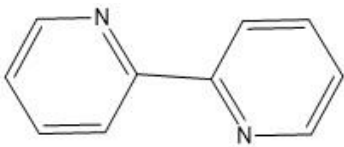
Molekül Ağırlığı: 143.45 g/mol

Bakır(II)Bromür (CuBr₂)

Aldrich firmasından temin edildi.

Molekül Ağırlığı: 223.35g/mol

2,2'-Bipiridin (Bpy)



Aldrich firmasından temin edildi.

Kapalı Formülü: $C_{10}H_8N_2$

Molekül Ağırlığı: 156.19g/mol

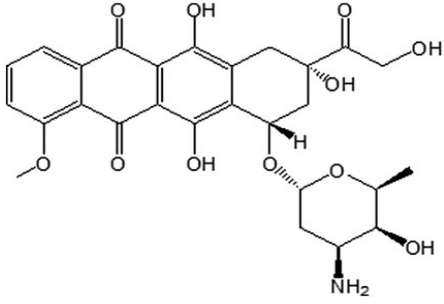
Metanol

Aldrich firmasından temin edildi.

Diklorometan

Aldrich firmasından temin edildi.

Doksorubisin.HCl (DOX)



Aldrich firmasından temin edildi.

Kapalı Formülü: $C_{27}H_{29}NO_{11} \cdot HCl$

Molekül Ağırlığı: 579.98 g/mol

2.2. Deneyde Kullanılan Cihazlar ve Karakterizasyon Metodları

FT-IR Spektrofotometre

Perkin Elmer Spectrum 100 model FT-IR spektrofotometre cihazı kullanılmıştır.

Nükleer Manyetik Rezonans (NMR)

NMR spektrumları Varian Mercury-VX 400 BB NMR cihazı ile alındı

X-ray Fotoelektron Spektroskopisi (XPS)

Malzemelerin XPS ölçümleri Thermo Scientific K-Alpha X-ray Fotoelektron Spektrometresi kullanılarak yapılmıştır.

Termal Gravimetrik Analiz Cihazı (TGA)

Hazırlanan malzemelerin termo-oksidatif kararlılığını belirlemek amacıyla, Perkin Elmer STA 6000 model TGA cihazı kullanılmıştır.

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Hidrotermal yöntemle hazırlanmış HA'nın modifikasyondan öncesinde ve sonrasında yüzey özellikleri Phillips XL 30 ESEM-FEG cihazı kullanılarak belirlenmiştir.

Dinamik Işık Saçılımı (DLS)

Çözelti içindeki polimerlerin boyut dağılımını belirlemek amacıyla Brookhaven 90Plus Nano Partikül Boyut / Zeta Potansiyel analiz cihazı kullanıldı.

2.3. MEZO GÖZENEKLİ HİDROKSİAPATİTİN YÜZEY MODİFİKASYONU

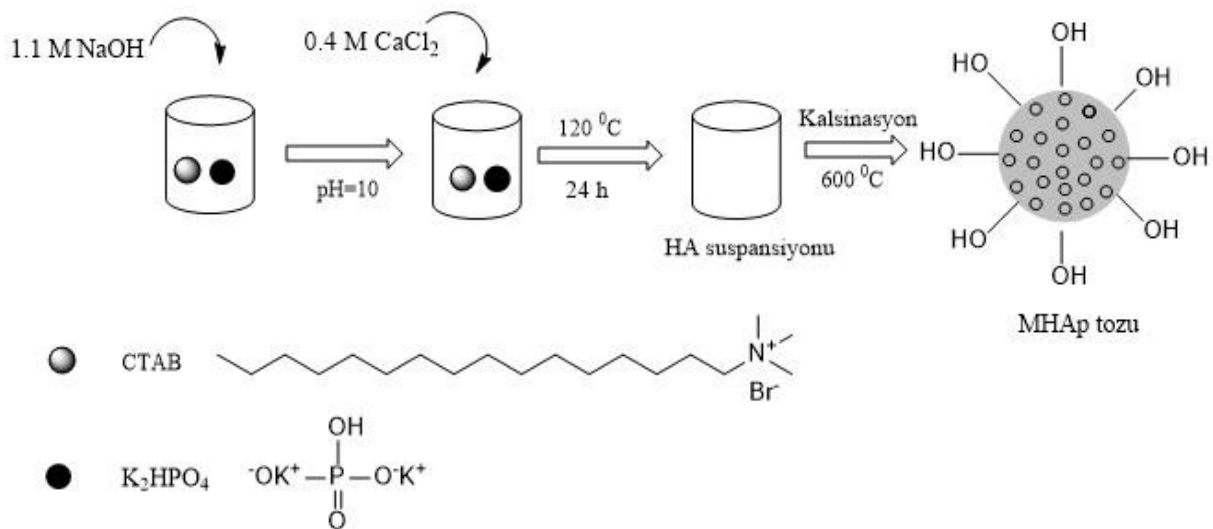
2.3.1. Gözenekli Hidroksiapatit (MHAp) Sentezi

MHAp hidrotermal yöntemle sentezlendi ve şablon olarak setil trimetil amonyum bromür (CTAB) kullanıldı.

250 ml'lik balon, mekanik karıştırıcı ve geri soğutucudan oluşan reaksiyon düzeneği hazırlandı. Balonun içerisine 5.5 gr dipotasyum fosfat (K_2HPO_4), 8.7 gr CTAB ve 100 ml destile su konuldu. Mekanik karıştırıcı 300 devir/dk hızla çalıştırılarak çözelti 1 saat karıştırıldı ve yüzey aktif maddenin tamamen çözünmesi sağlandı.

Reaksiyon karışımının pH=10 yapılmak üzere 1.1 M NaOH çözeltisi hazırlandı; 100 ml'lik balon jojeye 4.4392 gr NaOH eklendi ve üzeri destile su ile tamamlandı. Hazırlanan 100 ml'lik 1.1M NaOH çözeltisinden 30 ml alındı ve karışıma damla damla eklendi. 0.4 M $CaCl_2$ çözeltisi hazırlandı; 100 ml'lik balon jojeye 4.4392 gr $CaCl_2$ eklendi ve üzeri destile su ile tamamlandı. Hazırlanan 100 ml'lik 0.4 M $CaCl_2$ çözeltisinden 60 ml alındı balonun içerisine damla damla eklendi. Reflux düzeneği kurularak çözeltinin sıcaklığı $120^\circ C$ ye ayarlandı ve çözelti yağ banyosunda 24 saat karıştırıldı. 24 saatin sonunda karışım oda sıcaklığında soğutuldu. Oluşan MHAp suspansiyonu süzülerek birkaç defa destile suyla yıkandı ve bir gün boyunca vakum etüvünde $40^\circ C$ kurutuldu. Kalan CTAB'ı uzaklaştırmak için ürün 6 saat $600^\circ C$ 'de kalsine edildi. 2 gr MHAp toz halinde elde edildi.

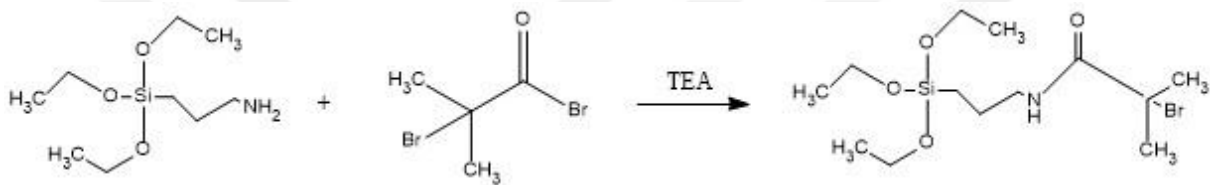
Şekil 2.1 de MHAp sentezi verilmiştir.



Şekil 2.1. MHAp sentez şeması.

2.3.2. Bifonksiyonel ATRP başlatıcısı (MHAp-Br) Sentezi

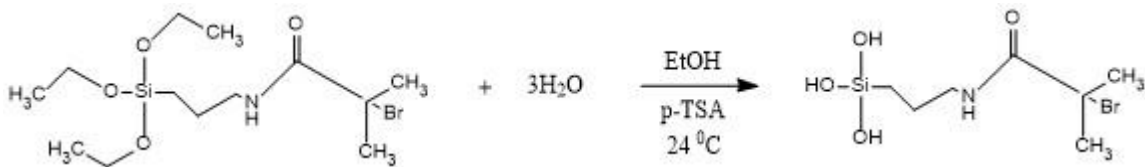
100 ml'lik 3 boyunlu balon, damlatma hunisi, manyetik karıştırıcı ve azot girişinden oluşan reaksiyon düzeneği hazırlandı. Ortamdaki nemin reaksiyonları olumsuz yönde etkilememesi için reaksiyon düzeneği bek alevi ile kurutuldu. Balon içine azot atmosferi altında 2.5 g (3-aminopropil)triethoksi silan (APTES), 4.5 gr trietilamin (TEA) ve 30 ml diklorometan (DCM) yüklendi. Damlatma hunisine 30 ml diklorometan içerisinde çözünmüş 2.8 ml 2-bromoizobütiril bromür (BIBB) 30 dakika boyunca ilave edildi. Reaksiyon karışımı 200 dev/dk hızla mekanik karıştırıcı ile 0 °C karıştırıldı. Ekleme işlemi bittikten sonra reaksiyon azot atmosferinde 24 saat 23 °C de karıştırıldı. 24 saat bittiğinde çözelti süzüldü ve çöken trietilamin tuzları uzaklaştırıldı. Reaksiyon şeması şekil 2.2 de verilmiştir.



Şekil 2.2. Bifonksiyonel ATRP başlatıcısı (MHAp-Br) sentez şeması.

Çözelti 50 ml % 5 'lık NaHCO₃ çözeltisi yıkandı. Na₂SO₄ üzerinden kurutuldu. diklorometan rotary evaporatör ile uzaklaştırıldı. Elde edilen ürün vakum etüvünde 30 °C de bir gün süre ile kurutuldu.

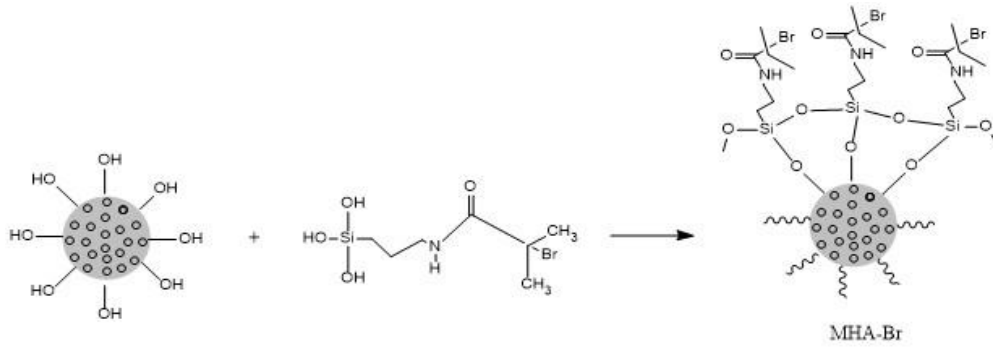
Silan gruplarının hidrolizi için bifonksiyonel ATRP başlatıcısı tek boyunlu balona konuldu. 0.1458 g (0.008 mol) H₂O, 0.0013 g p-TSA (0.0075x10⁻³ mol) ve 0.704 g etil alkol (0.01528 mol) ilave edildi. 1 gece boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Reaksiyon şeması şekil 2.3 de verilmiştir.



Şekil 2.3. MHAp-Br hidroliz reaksiyonu şeması.

2.3.3. MHAp Yüzeyine ATRP Başlatıcısının Bağlanması

1 g (0,0001 mol) MHAp, 2.5 ml (0,13877 mol) H₂O ve 7.5 ml (0,00228 mol) etil alkol içerisinde ultrasonikatörde tamamen çözününceye kadar karıştırıldı. Homojen bir çözelti elde edildikten sonra bifonksiyonel ATRP başlatıcısı (0,0158 g) bu çözeltiye eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra kademeli olarak 50 °C de 30 dakika, 100 °C de 30 dakika ve 120 °C de 15 dakika olmak üzere karıştırıldı. Elde edilen ürün MHAp-Br süzüldü ve su ve etanol ile 3 kez yıkandı. 40 °C de vakum etüvünde bir gün boyunca kurutuldu. Reaksiyon şeması şekil 2.4 de vermiştir.



Şekil 2.4. MHAp-Br yüzeyine ATRP başlatıcısının bağlanması

2.3.4. MHAp Yüzeyinin ATRP ile Modifikasyonu

Hidrotermal yöntemle sentezlenen MHAp'ın yüzeyinde atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP) yöntemi ile poli(etilen glikol) metakrilat (PEGMA), N-[3-(dimetilamino)propil]metakrilamit (DMAPMA), floresan o-metakrilat (FMA) monomerlerinin polimerizasyonu gerçekleştirildi. Monomerlerin eklenme sırasına göre iki farklı seri hazırlandı. Birinci seride 3 monomer aynı anda eklendi, ikinci seride ise monomerler sırasıyla eklenerek polimerizasyon gerçekleştirildi.

2.3.4.1. MHAp Yüzeyinde ATRP

[Monomer]:[CuBr]:[CuBr₂]:[Ligand] mol oranları 100: 1:0.2:2 olarak kullanıldı (Tablo 2.1). Yapılan tartım ve karıştırma işlemlerinin hepsi inert bir gaz olan argon ile doldurulmuş glove box (Argon kabini) içerisinde gerçekleştirildi. Polimerizasyon genel ATRP prosedürü takip edilerek yapıldı. Temiz ve kuru 10 ml lik tek boyunlu balona sıra sıra bulunan miktarlarda 6 ml metanol, yüzeyine başlatıcı bağlanmış MHAp (MHAp-Br), Cu(I)Br ve Cu(II)Br konuldu. Homojen bir çözelti elde etmek için çözelti 1 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Daha sonra çözeltiye 2,2'-Bipiridin (Bpy) (ligand), PEGMA, DMAPMA ve FMA monomerleri eklenerek

30 dk daha karıştırma işlemine devam edildi. Daha sonra balonun ağzı hava geçirmeyecek şekilde kapatılıp glove boxtan çıkarıldı ve oda sıcaklığında 24 saat karıştırıldı. 24 saatin sonunda balonun kapağı açılarak polimerizasyon sonlandırıldı. Düzenli polimer zincirleri ile modifiye edilen MHAp süzüldü ve temiz metanol ile yıkanarak 30 °C’ de vakum etüvünde kurutuldu.

İkinci seri, monomerlerin sıra sıra eklenmesiyle hazırlandı. Monomerlerin PEGMA, DMAPMA ve FMA eklenme sırası ile polimerizasyona katıldı. Hazırlanan birinci seri rastgele MHAp-P[PEGMA-DMAPMA-FMA] ve ikinci seri blok-(MHAp-P[PEGMA-DMAPMA-FMA])’nın yapısal karakterizasyonda FTIR- ¹H-NMR ve XPS spektroskopi metodları kullanıldı.

Şekil 2.5 de yüzeyde başlatılan ATRP ile MHAp modifikasyonu gösterilmiştir.

Tablo 2.1. ATRP formülasyon tablosu

MHAp- Br (g)	CuBr (g)	CuBr ₂ (g)	Bpy (g)	PEGMA (g)	DMAPMA (g)	FMA (g)
0.5	0.00588	0.0001	1.28	1.5	0.795	0.035

2.3.5. İlaç Yükleme ve In-vitro İlaç Salımı Çalışmaları

Rastgele-MHAp-P[PEGMA-DMAPMA-FMA] ve blok-MHAp-P[PEGMA-DMAPMA-FMA]'ın ilaç salınımı özelliğinin incelenmesi için model ilaç olarak kanser ilacı doksorubisin (DOX) kullanıldı. İlaç salınım denemelerinde kullanılan DOX antrasiklin kemoterapötik bir ilaçtır ve osteosarkoma tümör tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır [69,70]. İyi floresans özelliklere sahip olan DOX ilaç salımın çalışmalarında kullanılmak için iyi bir model ilaçtır [71,72]. Floresans Spektroskopisinde DOX'un uyarılma dalga boyu 590 nm dir.

İlaç salınımı pH= 7,4 (fosfat tampon çözeltisi) ve pH=5,5 de (asetat tampon çözeltisi) çalışıldı.

pH=7,4 fosfat tampon çözeltisi (PBS) aşağıdaki gibi hazırlandı:

0.8 g sodyum klorür (NaCl) ,0.02 g potasyum klorür (KCl) ,0.144 g sodyum fosfat dibazik (Na_2HPO_4) ve potasyum fosfat dibazik (K_2HPO_4) 100 ml destile suda çözüldü.

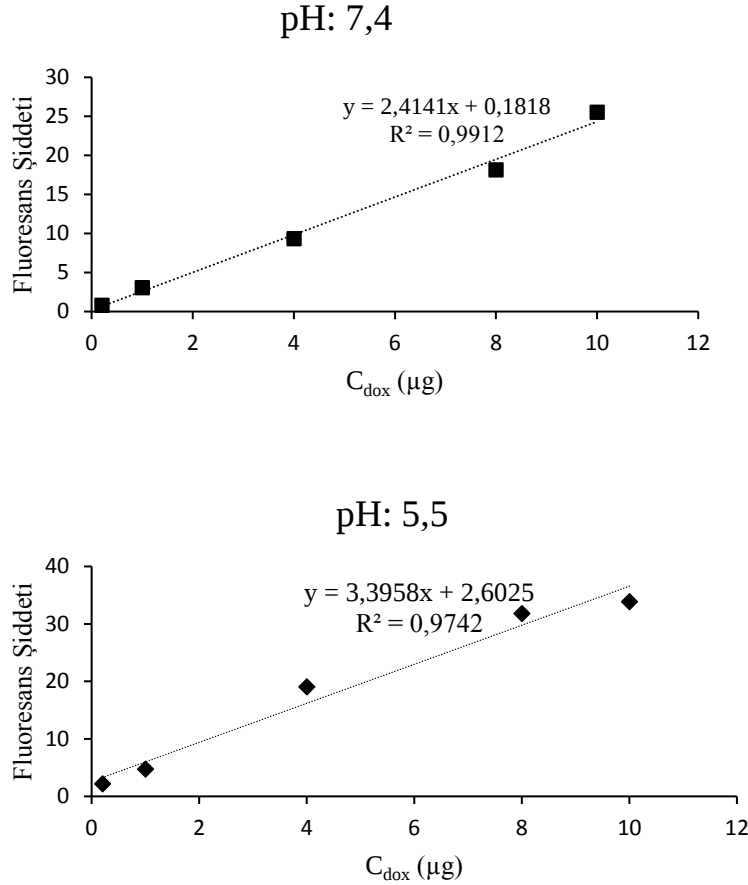
pH=5,5 asetat tampon çözeltisi aşağıdaki gibi hazırlandı:

54.4 g sodyum asetat 50 ml distile su ile çözüldü. Daha sonra 10 ml susuz asetik asit yavaşça çözeltiye eklendi. Ve çözelti distile su ile 100 ml ye seyreltili.

DOX standart grafiği 200 µg DOX/1000 µl PBS stok çözeltisi kullanılarak aşağıda gösterildiği gibi farklı konsantrasyonlarda ilaç çözeltileri hazırlandı:

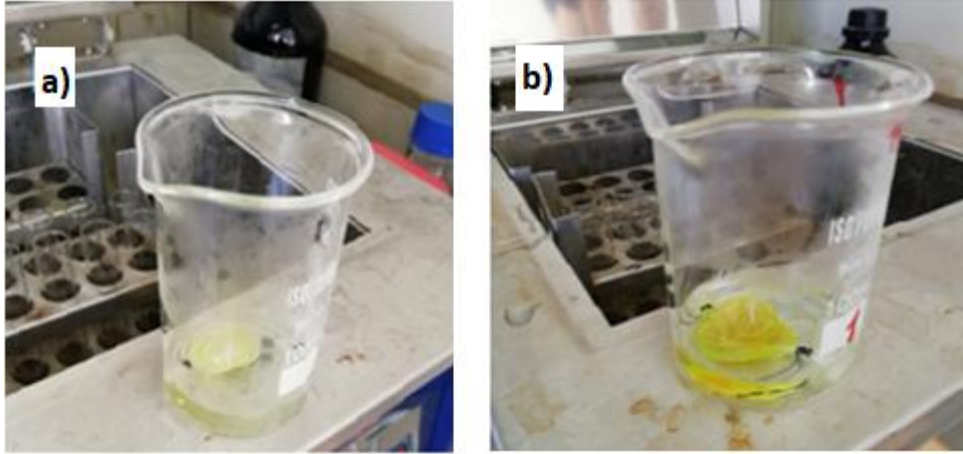
1. 1 µL (0.2 µg DOX) ilaç çözeltisi
2. 5 µL (1 µg DOX) ilaç çözeltisi
3. 20 µL (4 µg DOX) ilaç çözeltisi
4. 40 µL (8 µg DOX) ilaç çözeltisi
5. 50 µL (10 µg DOX) ilaç çözeltisi

Numune ve standartların son hacmi 1000 µl'ye PBS ile tamamlandı. Köre karşı (PBS) 590 nm'de uyarılarak floresans şiddetlerinin ölçümü gerçekleştirildi.



Şekil 2.6. pH=7,4 ve pH=5,5 teki DOX standart kalibrasyon eğrileri.

DOX'un salınım profili diyaliz metodu kullanılarak takip edildi. İlaç salımı 10 µg DOX kullanılarak deneysel çalışmalar yapıldı. Kısaca, 5 mg ilaç yüklü numune 1 mL PBS içerisinde dağıtıldı ve içerik diyaliz torbasına aktarıldı. Daha sonra 10 mL PBS içerisine daldırıldı ve 37 ° C'de inkübe edildi. Periyodik olarak; 1 mL çözelti alınarak 590 nm deki floresans şiddetleri ölçüldü. Her ölçümden sonra 1 mL taze PBS çözeltisi ilave edildi. Salınan DOX miktarı standart grafiği kullanılarak hesaplandı. Bu işlemler iki seri polimer içinde ayrı ayrı gerçekleştirildi. Aynı işlemler pH=5,5 için de tekrarlandı.



Şekil 2.7.a)
Rastgele-MHAp-

P[PEGMA-DMAM-FMA]-DOX, b)Blok -MHAp-P[PEGMA-DMAFMA-FMA]-DOX.

2.3.6.Hücre Kültürü

In-vitro hücre kültürü çalışmaları için Saos-2 insan osteosarkoma hücre hattı kullanıldı. Hücreler, %5 CO₂ içeren 37 °C sıcaklığında bulunan inkübatörde, düşük glukoz içeriğine sahip DMEM hücre kültür ortamı ile idame ettirildi. Hücrelerin 2-3 günlük takiplerinde ortamları değiştirildi ve tripsin ile pasajlama işlemleri gerçekleştirildi. Saos-2 hücreleri hücre kabı içerisinde %80 konfluent olduklarında deney için hücre sayma aşamasına geçildi.

2.3.6.1.MTT testi ile sitotoksite analizi

MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide), hücrede metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı, en sık kullanılan hücre canlılığı veya sitotoksite testidir [73]. MTT pozitif yüklü bir bileşik olarak hücre membranını kolaylıkla geçmekte ve hücre içinde indirgenebilmektedir. Bu indirgenme sonucunda suda çözünmeyen formazan oluşmakta ve bu da mor kristal şeklinde çökmektedir. Mor kristallerin çözünme işlemi sonrasında elde edilen boya yoğunluğu, canlı hücre sayısı ile korelasyon göstermektedir.

Doksorubisin ve polimerler ve nanoformülasyonları belirli konsantrasyonlarda hazırlandı. Maddelerin her biri etanolde çözündüğünden tüm kuyucuklara 20 µl olarak konuldu ve etanolün uçması için laminar kabin içerisinde 1 saat bekletildi. Etanol tamamen uçurulduktan sonra hücrelerin tripan mavisini ile sayımları yapıldı. Hücre sayısı 10⁵ hücre/mL olacak şekilde 96 kuyucuklu plaklara 100 µl hacminde ekimleri yapıldı. Polimerlerin floresans özellikleri de dikkate alınarak negatif kontrol örnekleri eklendi. Ardından hücreler %5 CO₂ içeren 37 °C sıcaklığında bulunan inkübatörde 72 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi tamamlandığında hücrelerin üzerine 5 mg/mL MTT/PBS reaktifinden 10'ar µL ilave edilerek 3-3,5 saat inkübe edildi. Süre sonunda kültür ortamının uzaklaştırılmasının ardından kuyucuk

tabanında canlı hücreler üzerinde oluşan formazan kristallerinin 100 µL DMSO ile çözünme işlemi gerçekleştirildi. Örneklerdeki absorbans değerleri spektrofotometrik olarak 630 nm referans dalga boyunda 570 nm’de ölçüldü. % canlılık değerleri kontrole oranlanarak Student’s t testi ile Graphpad Prism programından yararlanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi.

Yapılan çalışmada ilk denemelere göre doksorubisin konsantrasyonu ve polimer konsantrasyonu hücre kültürü açısından yüksek bulunduğundan daha düşük konsantrasyonların çalışılmasına karar verildi.

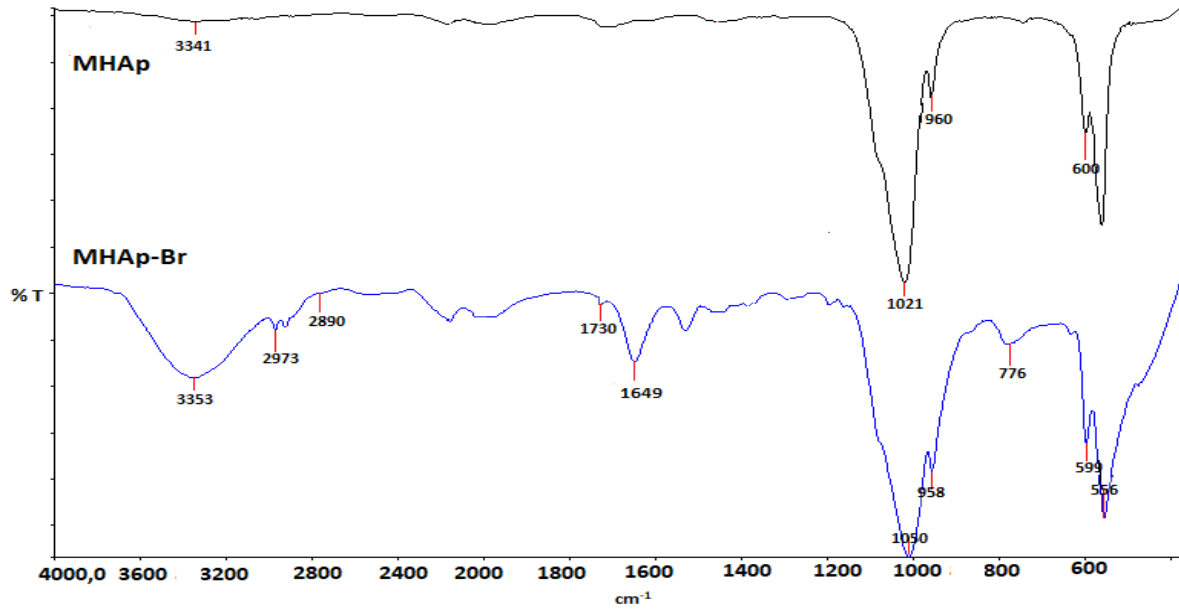
Başlangıçta 10mg/mL olarak kullanılması öngörülen polimer örneği 1 mg/Ml konsantrasyonda hücre çalışmaları gerçekleştirildi. Doxorubisin için 5 farklı 0.1 µg, 1 µg, 10 µg, 20 µg ve 40 µg konsantrasyonlarda denemeler gerçekleştirildi. Belirtilen konsantrasyonlar etanol içerisinde nanoformülasyonları hazırlanarak 96 kuyucuklu plaklara 20 µL hacminde konuldu.

Polimer ve doksorubisin formülasyonunun çözünme işlemi gece boyu oda sıcaklığında karıştırılarak gerçekleştirildi.

3.BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. MHAp ve MHAp–Br Yapısal Analizi

MHAp ve MHAp–Br yapısal karakterizasyonu ^1H -NMR ve FT-IR spektroskopisi ile teknikleri kullanılarak gerçekleştirildi. MHAp'nın FTIR spektrumu incelendiğinde (Şekil 3.1a); tipik -OH gerilme titreşim piki 3341 cm^{-1} de gözlemlendi. Karakteristik PO_4^{3-} iyonun P-O germe titreşim pikleri ise 1021 , 960 ve 600 cm^{-1} gözlenmiştir. Aminopropil silana ait Si-O-Si gerilmesi 1050 cm^{-1} , Si-O-C gerilmesi 776 cm^{-1} , -CH titreşimleri 2973 ve 2890 cm^{-1} de yer almaktadır. 1730 cm^{-1} de ait C=O gerilmesi ve 1649 cm^{-1} de CONH gerilmesi başlatıcının MHAp'e kovalent olarak bağlandığını göstermektedir.



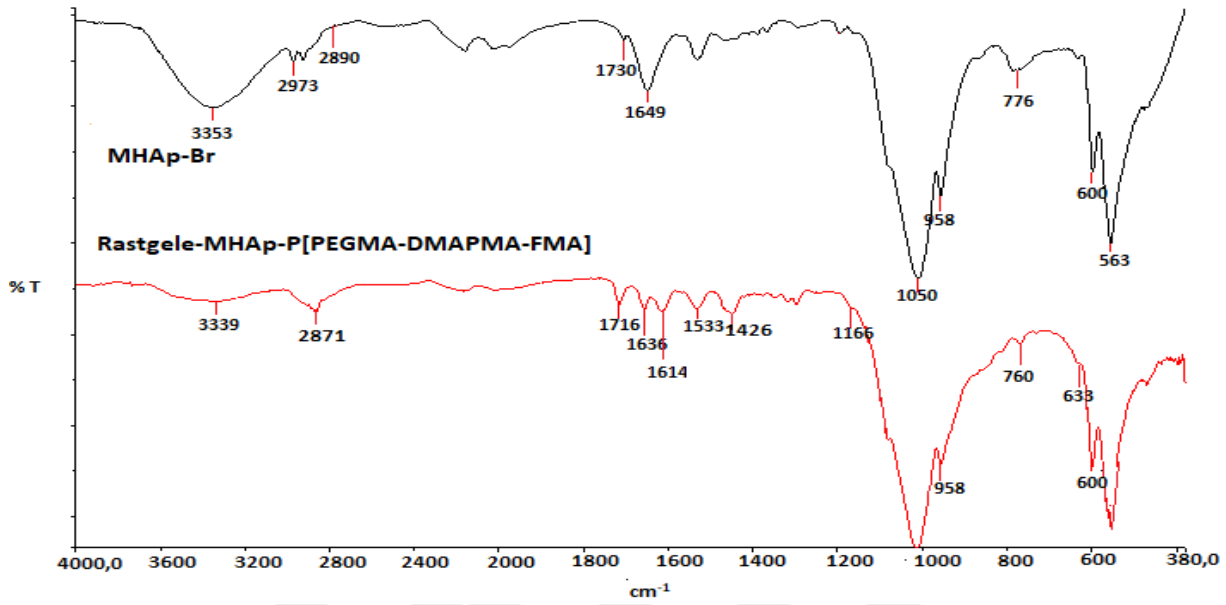
Şekil 3.1. a)MHAp ve b) MHAp-Br FT-IR spektrumları.

3.2.Rastgele-MHAp-P[PEGMA-DMApMA-FMA] ve blok-MHAp-P[PEGMA-DMApMA-FMA] Yapısal Karakterizasyonu

3.2.1. FTIR Sonuçları

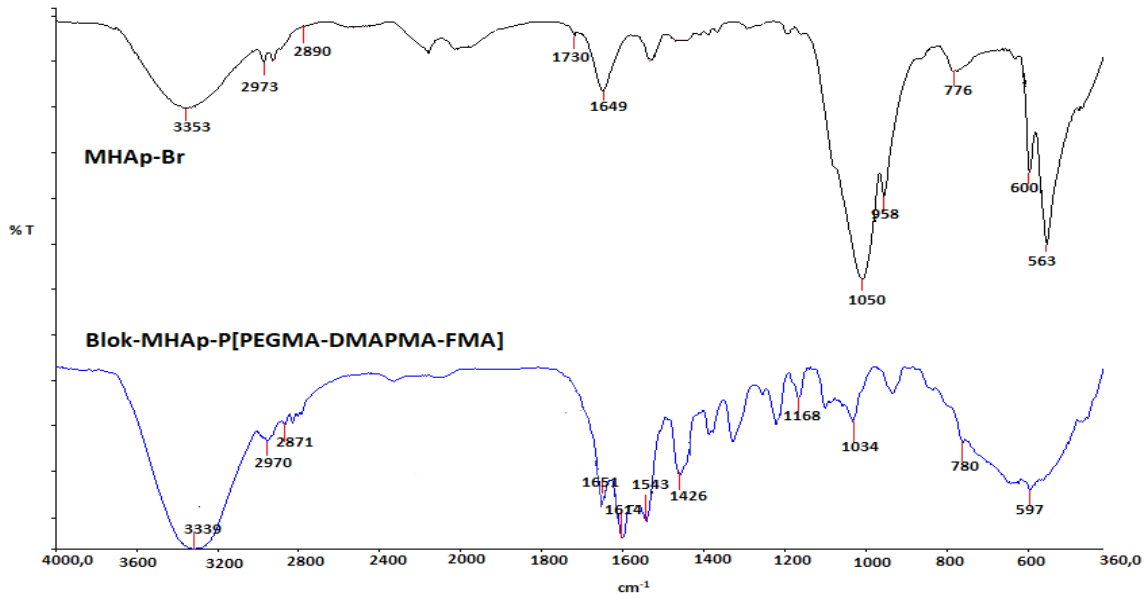
Rastgele ve blok-MHAp-P[PEGMA-DMApMA-FMA] örneklerinin yapısal analizi FT-IR, ^1H -NMR ve XPS spektroskopi teknikleri kullanılarak gerçekleştirildi. Şekil 3.2'deki rastgele kopolimere ait çakışık FT-IR spektrumu yer almaktadır. Spektrum incelendiğinde; karakteristik PEGMA pikleri; C=O gerilmesi 1716 cm^{-1} , C-O-C eter piki 1034 cm^{-1} ve alifatik C-H grupları 2970 - 2870 cm^{-1} de gözlenmektedir. DMApMA'nın karakteristik N-H gerilmesi geniş O-H gerilme bandının altında kalmıştır. 1636 cm^{-1} de gözlenen pik amid bandını göstermektedir.

1426 cm^{-1} da gözlenen pik FMA'daki aromatik halkayı ve 1166-1168 cm^{-1} de gözlenen bant is C-O gerilmesini göstermektedir.



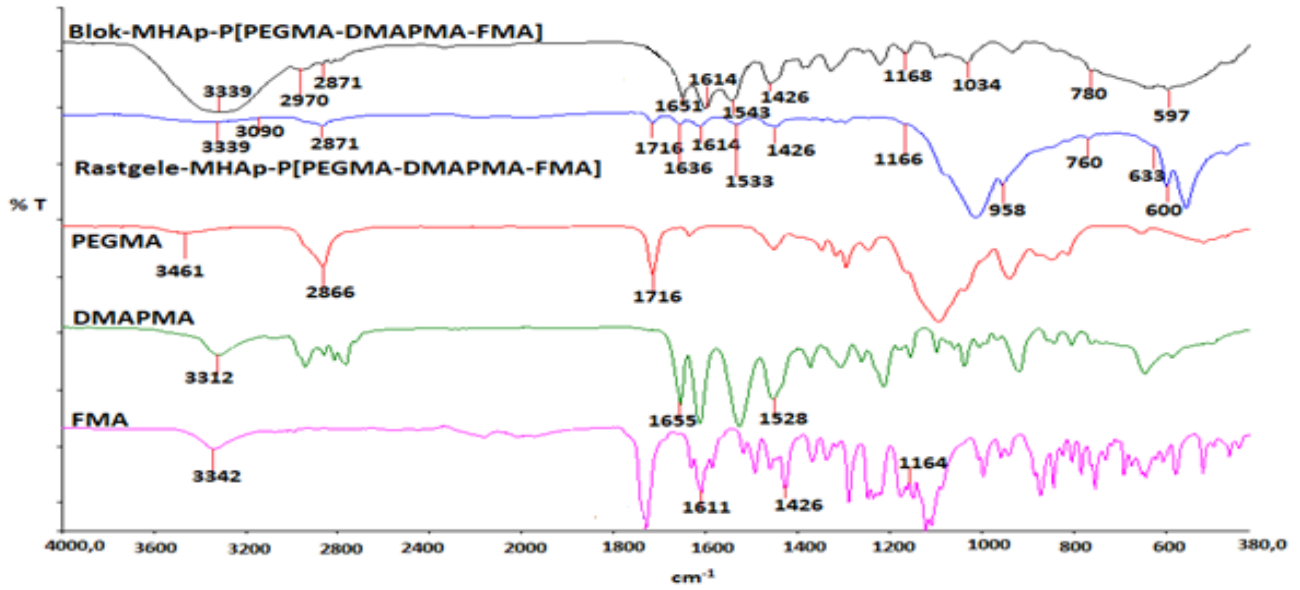
Şekil 3.2. Rastgele-MHAp-P[PEGMA-DMA-PMA-FMA] FT-IR spektrumu.

Şekil 3.3de ise blok kopolimerin çakışık FTIR spektrumu yer almaktadır. Bu spektrumda da polimerizasyona giren monomerlerin karakteristik pikleri görülmektedir.



Şekil 3.3. Blok-MHAp-P[PEGMA-DMA-PMA-FMA] FT-IR spektrumu.

Şekil 3.4de rastgele ve blok kopolimerler ve polimerizasyona katılan monomerlerin çakışık FTIR spektrumları yer almaktadır.

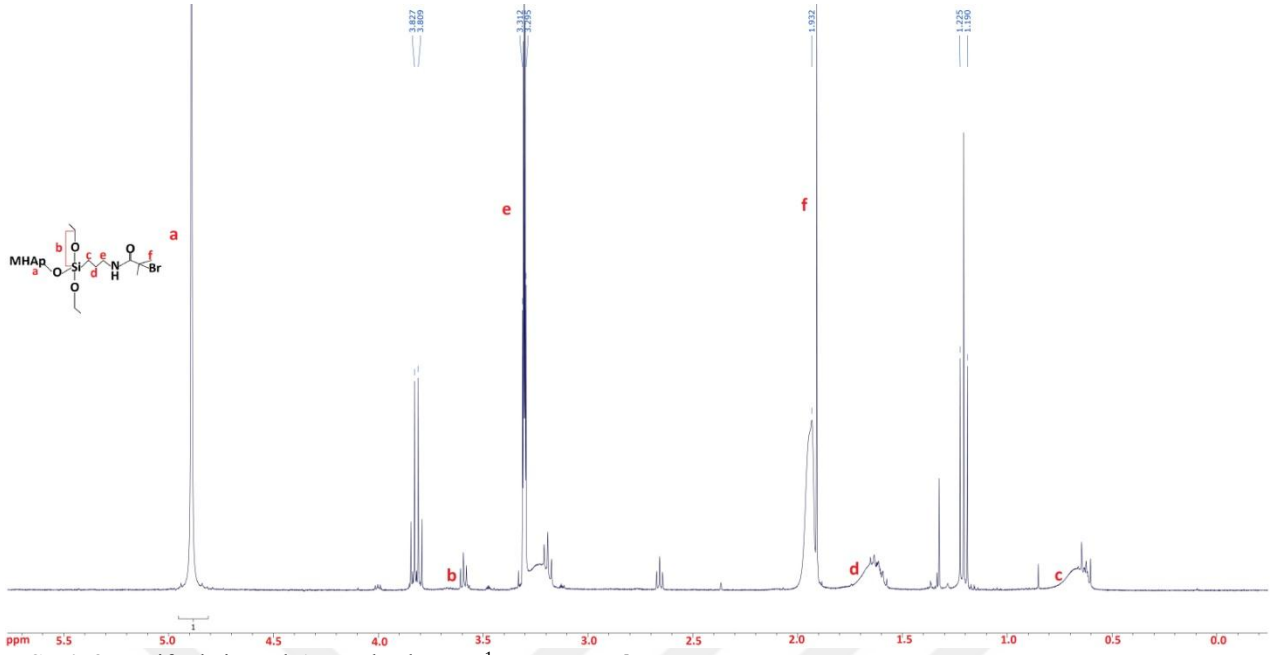


Şekil 3.4. Kopolimerler ve monomerlerin çıkışık FT-IR spektrumları.

3.2.2. ^1H -NMR Sonuçları

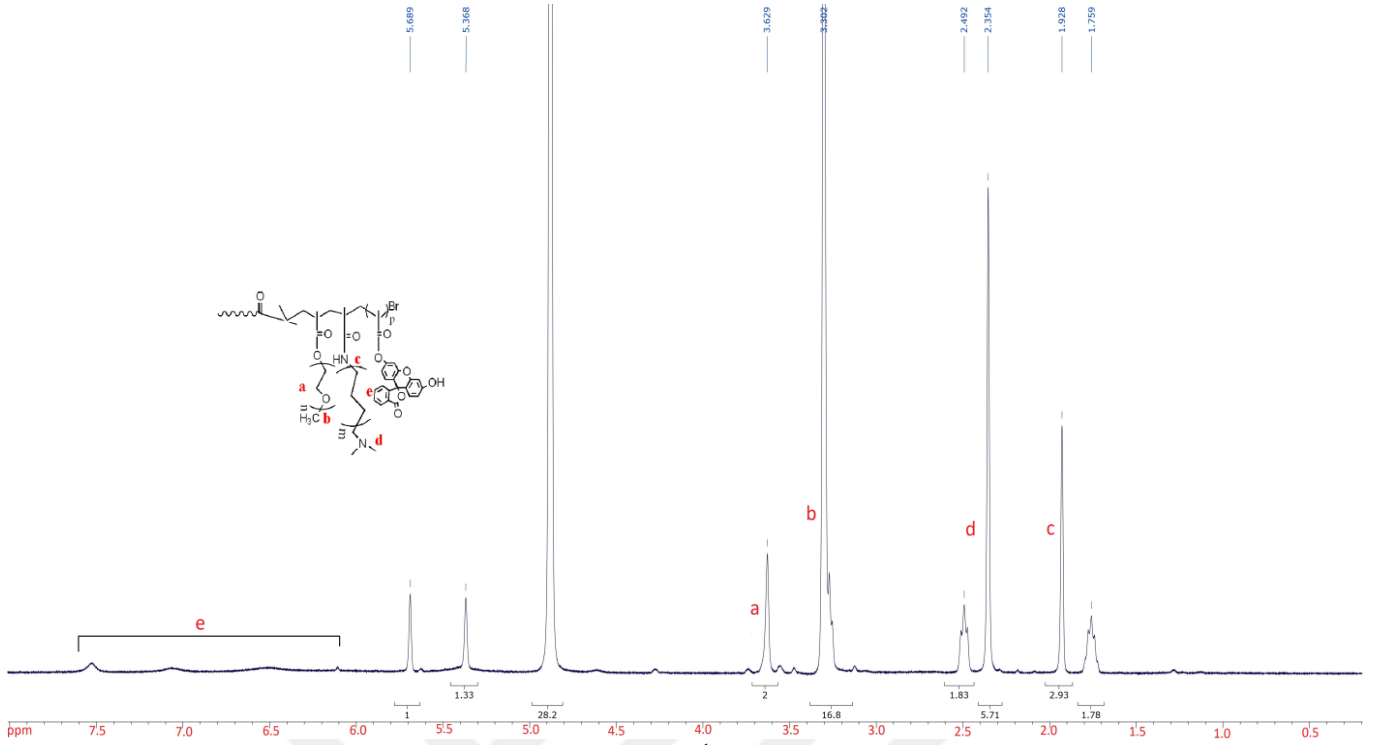
MHAp-Br, rastgele ve blok-MHAp-P[PEGMA-DMAPMA-FMA] kimyasal yapı aydınlatması ^1H -NMR tekniği kullanılarak gerçekleştirildi.

Şekil 3.5 de MHAp-Br'a ait ^1H -NMR spektrumu yer almaktadır. 0.6 ve 4.8 ppm'deki sinyaller hidroksiapatit ve suyun karakteristik piklerini göstermektedir[74]. Aminopropil silana ait Si-OCH₂CH₃ protonları 1.31 ppm ve Si-OCH₂CH₃ protonları 3.39 ppm de görülmektedir. Silisyuma bağlı CH₂ gruplarına ait protonlar 1.19 ppm, azota bağlı CH₂ gruplarına ait protonlar ise 3,28 ppm de görülmektedir. 1.90 ppm BiBB'nin komşu metilen protonları C(CH₃)₂ protonlarını göstermektedir.



Şekil 3.5. Bifonksiyonel ATRP başlatıcısı ¹H-NMR spektrumu.

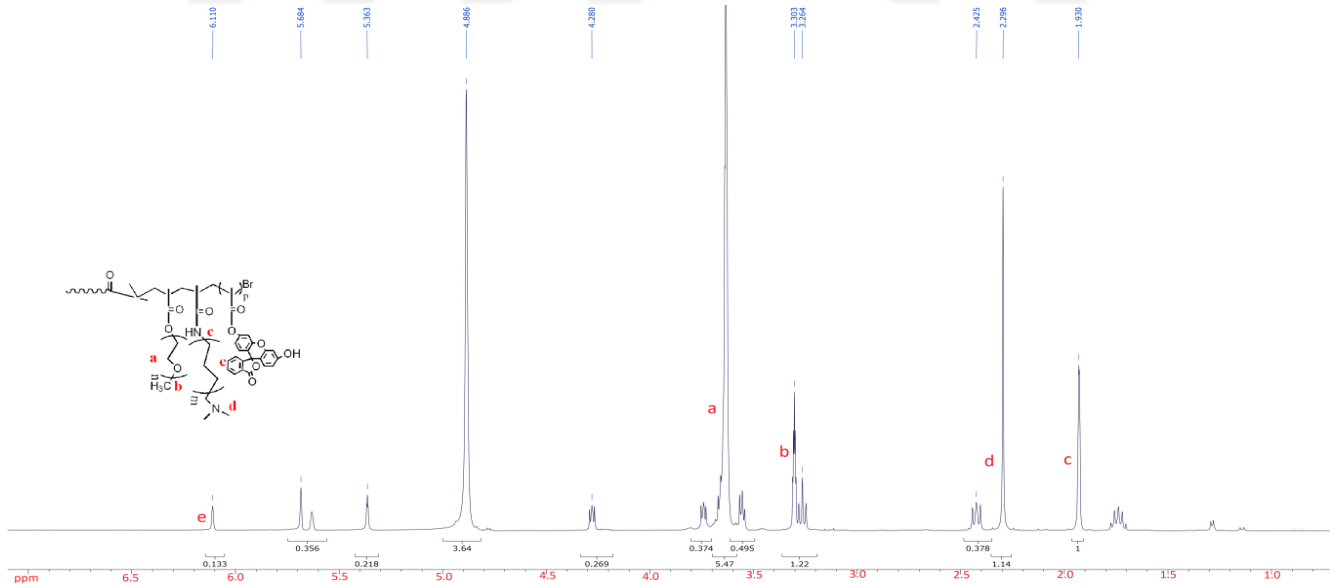
Rastgele kopolimerin ¹H-NMR spektrumu Şekil 3.6 da gösterilmiştir. 3.65 ppm de PEGMA OCH₂- grubundaki protonlara ait kayma gözlenmektedir. Aynı zamanda oksijene bağlı metil gruplarına ait protonlar (-OCH₃-) 3.3 ppm de görülmektedir. 1.9-2.4 ppm bölgesindeki kimyasal kaymalar, DMAPMA birimlerinin (N-CH₂) ve (N-CH₃) protonları ile ilişkilendirilebilir. 6.0-7.5 ppm aralığındaki kimyasal kaymalar ise FMA'nın aromatik protonlarını göstermektedir.



Şekil 3.6. Rastgele-MHAp-P[PEGMA-DMApMA-FMA] ^1H NMR spektrumu.

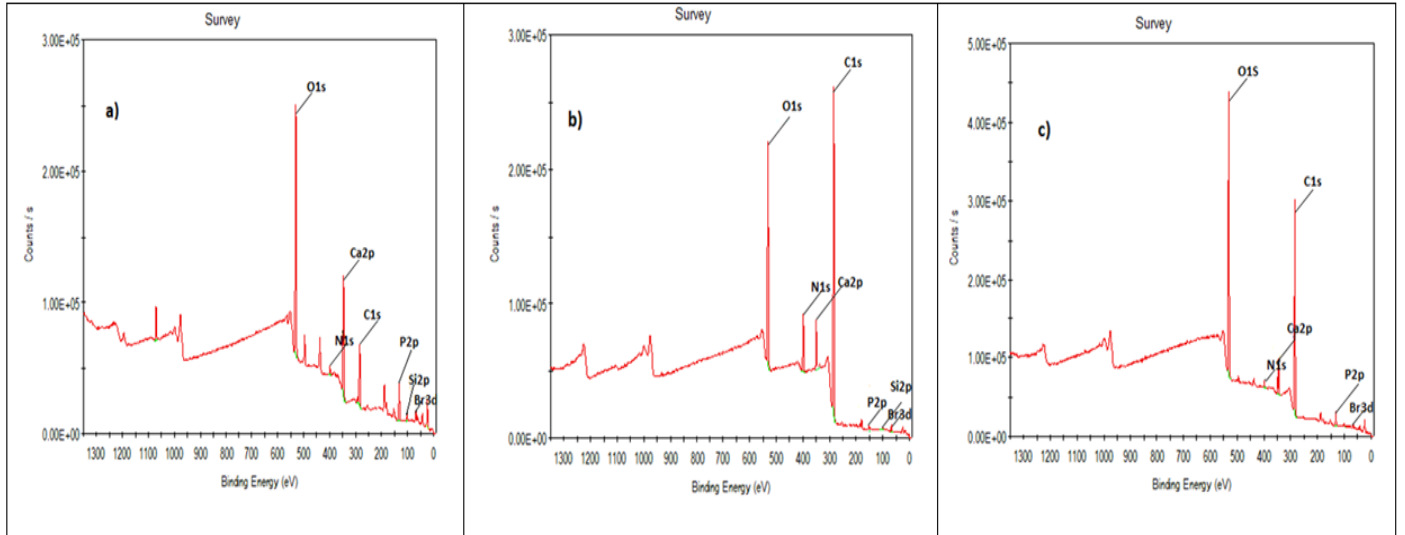
Şekil 3.7de blok kopolimerin ^1H -NMR spektrumu yer almaktadır. Bu spektrum incelendiğinde polimerizasyona katılan monomerlere ait karakteristik piklerin yer aldığı görülmektedir.

Şekil 3.7. Blok-MHAp-P[PEGMA-DMApMA-FMA] ^1H NMR spektrumu.



3.2.3. XPS Sonuçları

Yüzeyi modifiye edilen MHAp'in yüzey özellikleri kimyasal olarak X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) tekniği kullanılarak analiz edildi. XPS ile MHAp yüzeyine kovalent olarak bağlanan grup ve polimerlerin karakterizasyonunda sıklıkla başvurulanan bir yöntemdir.



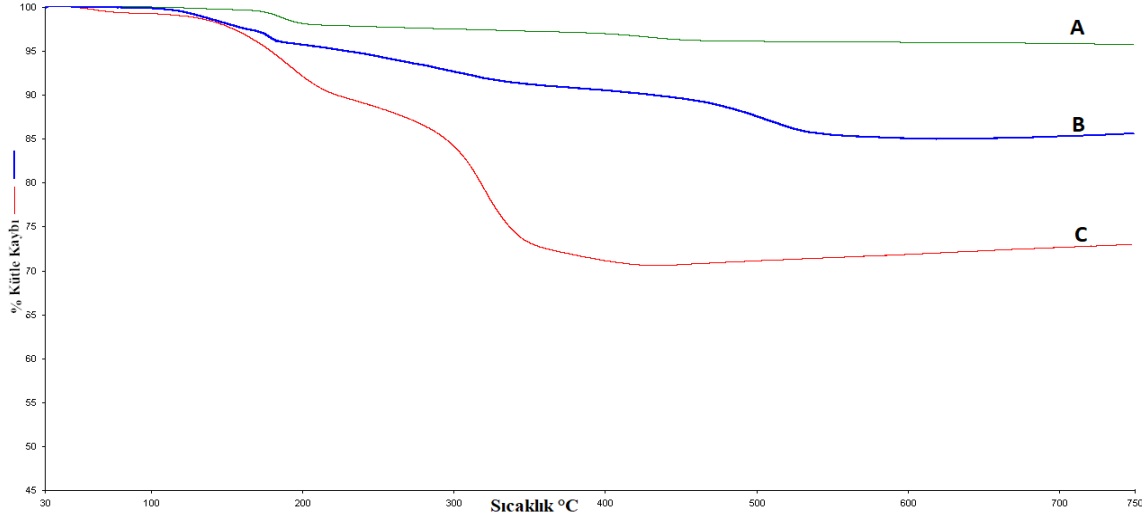
Şekil 3.8. XPS spektrumu a) MHAp-Br, b) blok-MHAp-P[PEGMA-DMAFMA-FMA] ve c) rastgele-MHAp-P[PEGMA-DMAFMA-FMA].

Şekil 3.8 MHAp modifikasyon öncesi ve sonrası genel taramaya spektrumlarını göstermektedir. Şekil 3.8a da 536 eV O1s bağlanma enerjisi, 400 eV N1s bağlanma enerjisi, 285 eV C1s bağlanma enerjisi, 101 eV Si2p bağlanma enerjisi ve 67 eV Br3d5 bağlanma enerjisi görülmektedir. Ca, P ve O elementlerinin sinyalleri, MHAp yapısının oluştuğunu kanıtlamaktadır. XPS spektrumunda 400, 101, 67 eV'de görülen N, Si ve Br pikleri başlatıcı (BiBBR) ve aminopropil silanın kovalent olarak MHAp'ya başarılı bir şekilde bağlandığını göstermektedir. Düzenli polimer fırçaları bağlanmış MHAp'ın XPS spektrumları Şekil 3.8b ve 3.8c de gösterilmiştir. MHAp-Br XPS spektrumu ile karşılaştırıldığında, MHAp-P[PEGMA-DMAFMA-FMA]'ın C ve N yüzdeleri artarken, Ca ve P yüzdelерinin düzenli polimer fırçalarının MHAp yüzeyini kaplanmasından dolayı azaldığı görülmektedir.

4.3. Termal Karakterizasyon

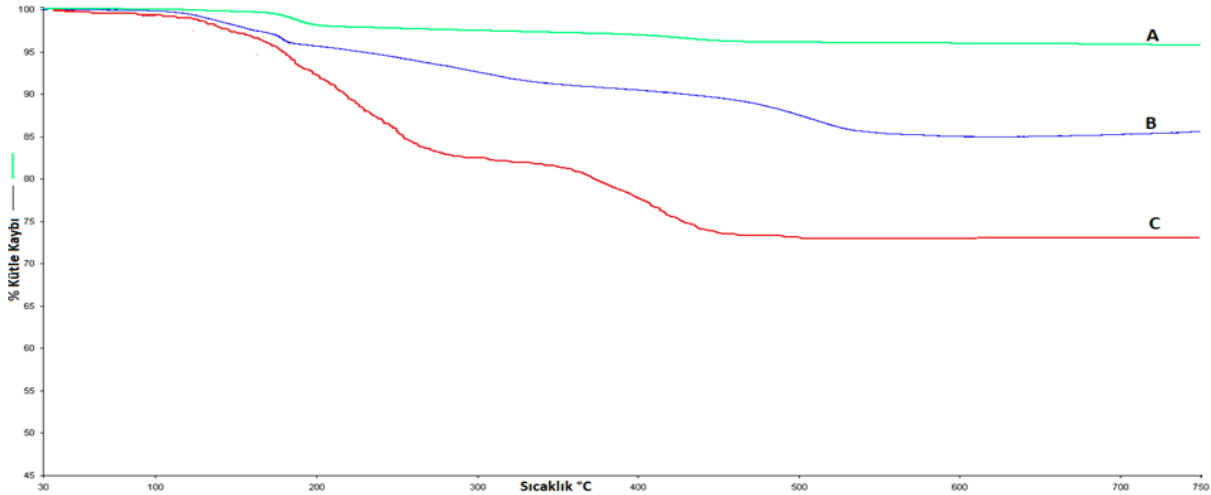
Saf MHAp, MHAp-Br ve polimer fırçaları bağlanmış MHAp'ın termo-oksidatif kararlılıkları hava atmosferinde TGA ile belirlendi. Çakışık termogramlar Şekil 3.9 ve 3.10 de gösterilmiştir. Sentezlenen MHAp, yaklaşık 200 °C de tek kütle kaybı göstererek yüksek termal stabiliteye sahip olduğunu göstermiştir. 30-750 °C arasında gerçekleşen kütle kaybı %4.4 olarak ölçülmüştür. Saf MHAp'ın amino silan ve ATRP başlatıcısı ile modifiye edilmesiyle sonra iki aşamalı bozunma eğrisi görülmüştür. Birinci aşama yaklaşık 200 °C civarında yapı içerisinde bulunan organik kısımların parçalanmasıyla oluşmuştur. İkinci bozunma bölgesinde (300-550 °C arası) yapıya kovalent olarak bağlanan silan gruplarının degradasyonu ile meydana gelmiştir. Kütle kaybı %10.4 artarak %14.8'e yükselmiştir. Aynı zamanda aradaki %10.4 değerindeki fark MHAp'ın

modifikasyon yüzdesini de göstermektedir. Düzenli polimer zincirlerinin MHAp yüzeyine kovalent olarak bağlanması elde edilen rastgele kopolimerde 180-350 °C arasında kütle kaybı gözlenmiştir. Bu bölgedeki %20.6 kütle kaybı değeri yapıya bağlanan polimer zincirlerinin degradasyonundan kaynaklanmaktadır. Bu durum MHAp'e üzerine monomerlerin başarılı bir şekilde ATRP ile bağlandığını göstermektedir.



Şekil 3.9. (A)MHAp, (B)MHAp-Br, (C)Rastgele-MHAp-P[PEGMA-DMAFMA-FMA] çakışık TGA termogramları.

Şekil 3.10 deki blok-kopolimerin TGA termogramı incelendiğinde 180-350 °C arasında kütle kaybı gözlenmiştir. Bu bölgedeki kütle kaybı %22.5 dir.



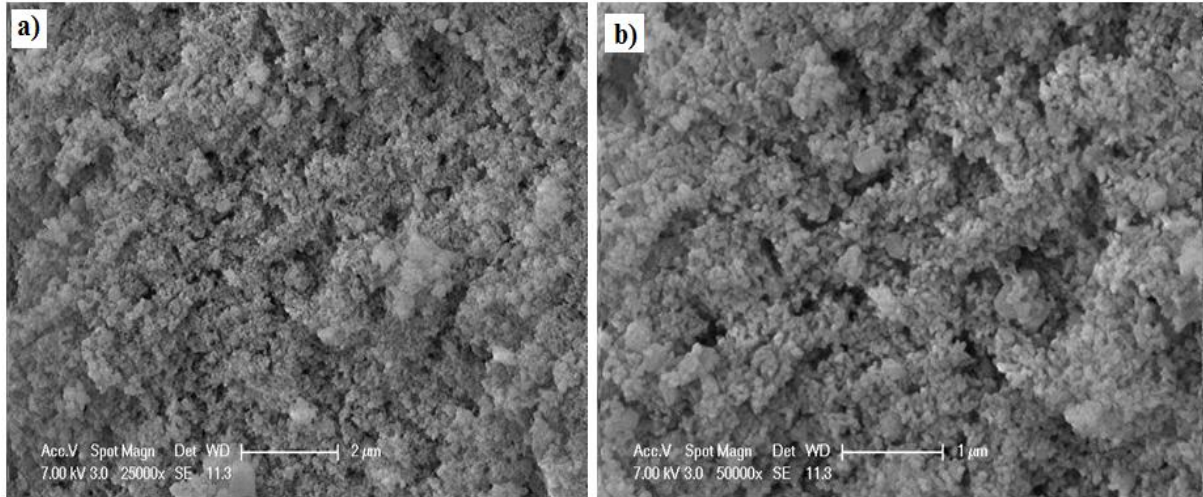
Şekil 3.10. (A)MHAp, (B)MHAp-Br, (C)Blok-MHAp-P[PEGMA-DMAFMA-FMA] çakışık TGA termogramları.

Tablo 3.1. MHAp ve türevlerinin TGA sonuçları.

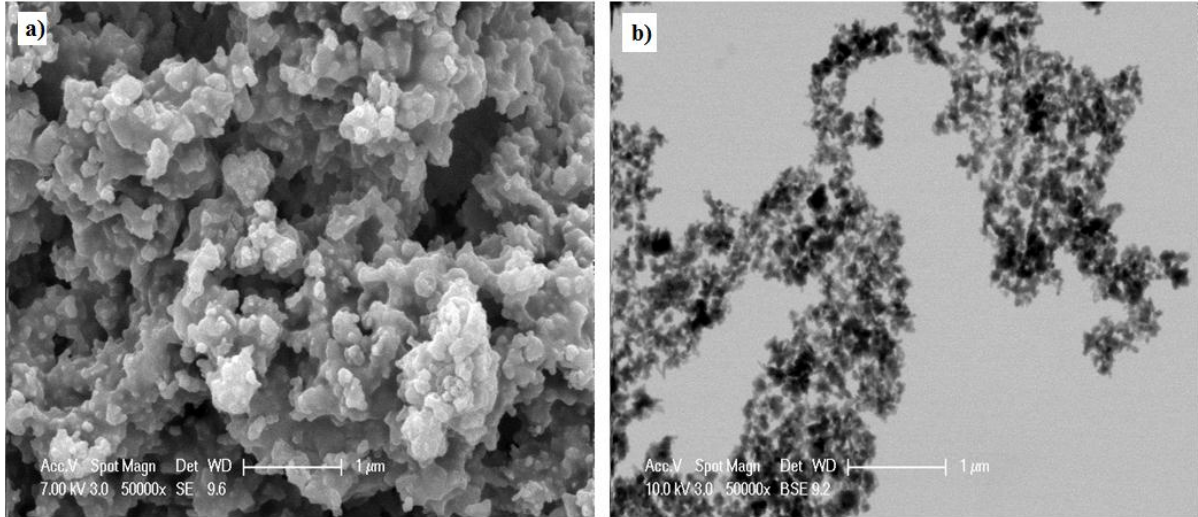
	T%5 (°C)	Kül (%)
MHAp	603	95,6
MHAp-Br	227	85,2
Blok-MHAp-P[PEGMA-DMAPMA-FMA]	198	75,0
Rastgele-MHAp-P[PEGMA-DMAPMA-FMA]	186	73,1

3.4.Morfolojik Karakterizasyon

Hidrotermal yöntemle hazırlanan MHAp'nın ve MHAp-P[PEGMA-DMAPMA-FMA]'nın morfolojik karakterizasyonu SEM ve STEM ile analiz gerçekleştirildi. Saf MHAp ve MHAp-Br SEM ve ESEM görüntüleri Şekil 3.11 ve Şekil 3.12 de gösterilmektedir. HAp parçacıklarında gözenekli yapı, yüzey aktif maddenin (CTAB) kalsinasyon işlemi sırasında uzaklaşmasıyla meydana gelmektedir [75].

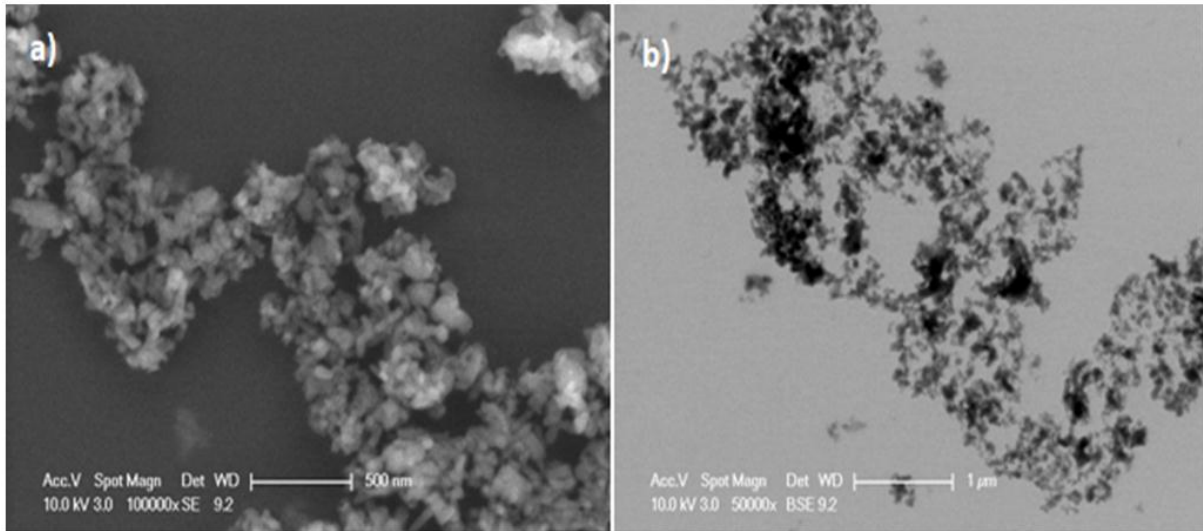


Şekil 3.11. (a) 25000 ve (b) 50000X büyütmede MHAp SEM görüntüleri.

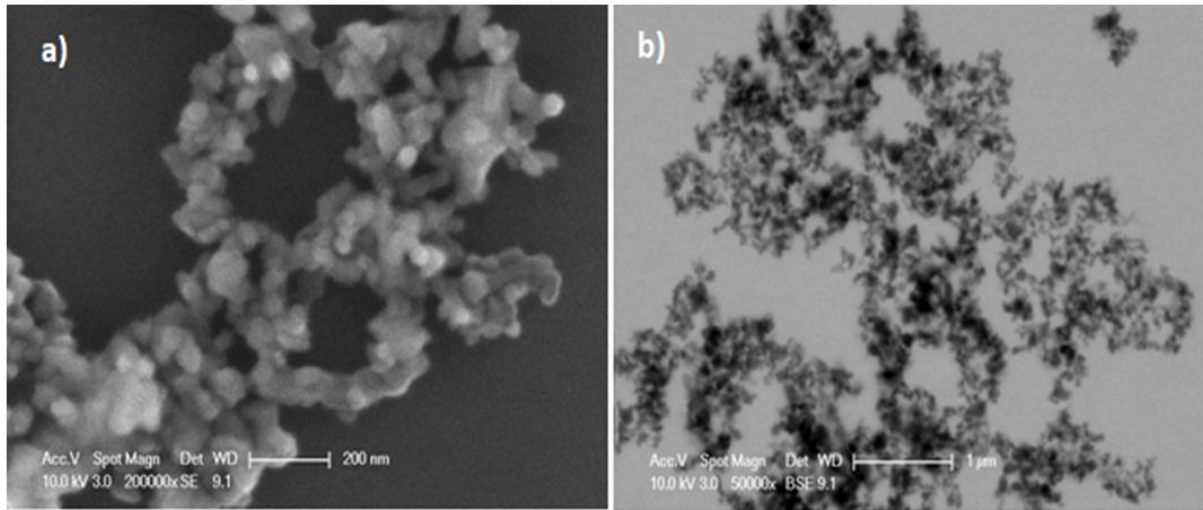


Şekil 3.12. MHAp-Br 50000x büyütmede a) SEM ve b) STEM görüntüleri.

MHAp-Br yüzeyine monomerlerin kontrollü polimerizasyonu ile hazırlanan rastgele-MHAp-P[PEGMA-DMAPMA-FMA] ve blok-MHAp-P[PEGMA-DMAPMA-FMA]'ın morfolojik yapılarında herhangi bir değişim olmadığı görülmüştür. Fakat çap boyutlarında bir artış gözlenmiştir. Bu sonuçlar DLS sonuçları ile desteklenmiştir. Şekil 3.13 ve 3.14 de SEM ve STEM görüntüleri yer almaktadır. Gözlenen bu artış polimerlerin HAp üzerinde gerçekleştirilen modifikasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.



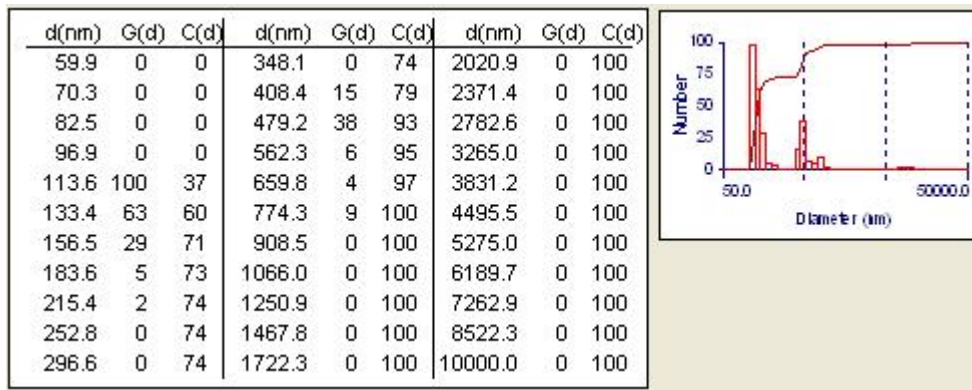
Şekil 3.13. Rastgele-MHAp-P[PEGMA-DMAPMA-FMA]'ın a) 200000x SEM, b) 200000x ve c) 200000x STEM görüntüleri.



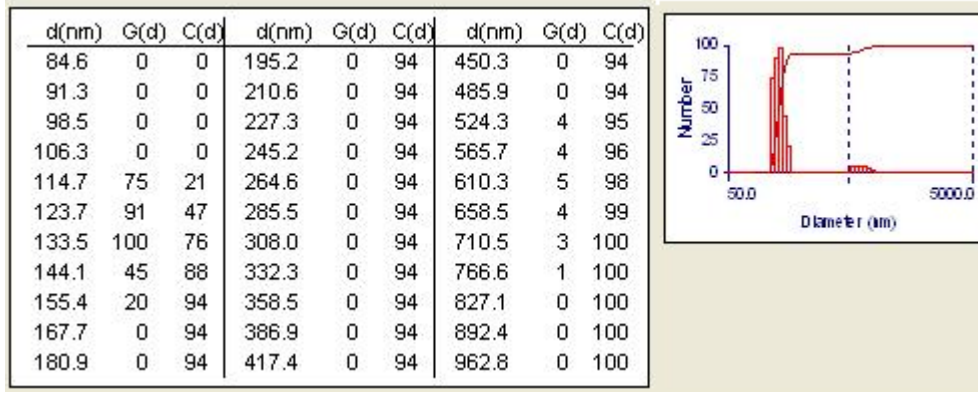
Şekil 3.14. Blok-MHAp-P[PEGMA-DMAPMA-FMA]'ın a) 100000x SEM b)50000x ve c) 200000x STEM görüntüleri.

3.5. DLS analizi

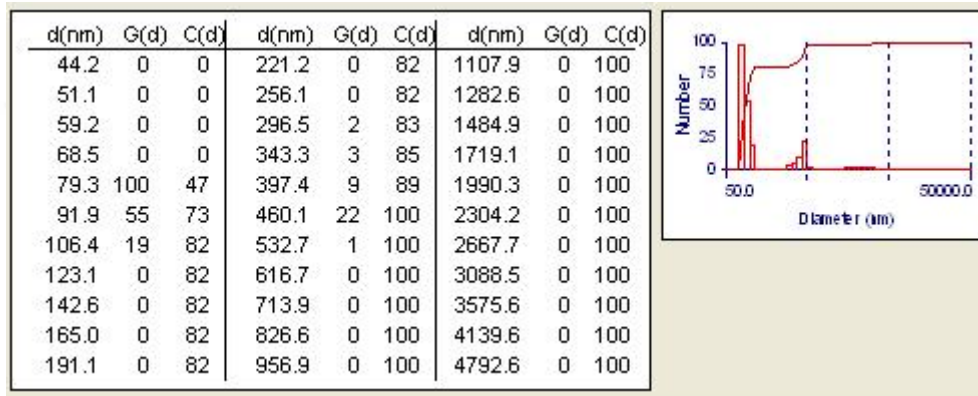
Modifikasyon öncesinde ve sonrasında MHAp parçacıklarının boyutlarındaki değişimler DLS sonuçları ile takip edildi. Sonuçlar Şekil 3.15, 3.16 ve 3.17 da verilmiştir. MHAp-Br, rastgele-MHAp-P[PEGMA-DMAPMA-FMA] ve blok-MHAp-P[PEGMA-DMAPMA-FMA] ortalama boyutları sırasıyla 120 nm, 158 nm ve 147 nm olduğunu görülmektedir. Modifikasyon ile beraber boyutların artması; MHAp yüzeyinin polimer ile kovalent olarak modifiye edildiğini göstermektedir.



Şekil 3.15. MHAp-Br DLS sonuçları.



Şekil 3.16. Rastgele- MHAp-P[PEGMA-DMAPMA-FMA] DLS sonuçları.



Şekil 3.17. Blok-MHAp-P[PEGMA-DMAPMA-FMA] DLS sonuçları.

3.6. Zeta Potansiyel Sonuçları

Zeta potansiyel ölçümleri, parçacıkların yüzey yükler hakkında bilgi veren bir yöntemdir. Zeta potansiyel sonuçları tablo 3.2 de verilmiştir. Saf MHAp yüzeyindeki ^-OH gruplarının varlığından dolayı eksi yüklüdür (-27.17 mV). Üzerine düzenli polimer zincirlerinin bağlanması ile MHA yüzey yükü artmıştır. Blok-MHAp-P[PEGMA-DMAPMA-FMA] ve rastgele-MHAp-P[PEGMA-DMAPMA-FMA] zeta potansiyel değerleri sırasıyla -14.83 mV ve -18.58 mV'dir. Yüzey yükünün değişmesi; MHAp yüzeyine fonksiyonel grupların başarılı bir şekilde bağlandığını göstermektedir. Kopolimer içeriğindeki protonlanabilir amino grupları MHA yüzey yük değerlerinin artmasına sebep olmuştur [76].

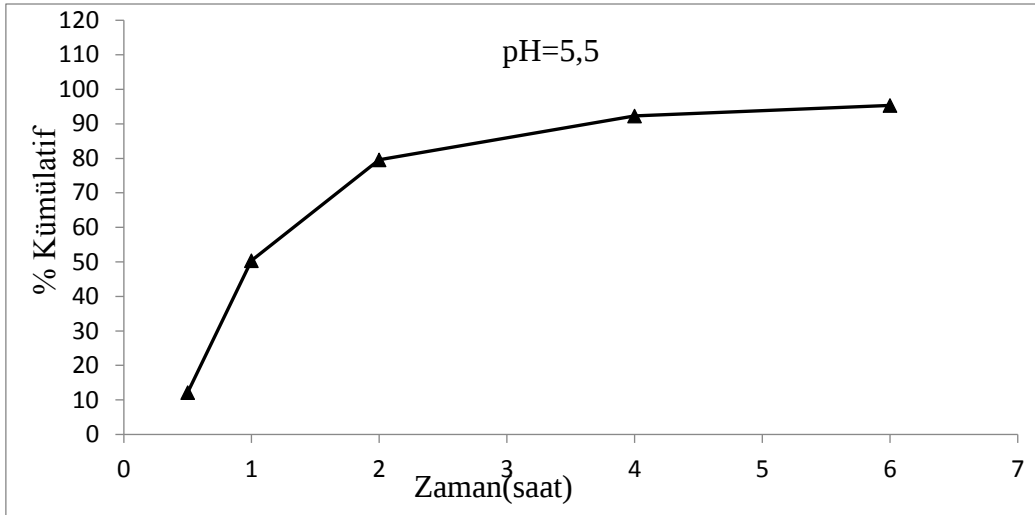
Tablo 3.2. Zeta potansiyel sonuçları.

	Zeta Potansiyeli (mV)
MHAp	-27,17
Rastgele-MHAp-P[PEGMA-DMAPMA-FMA]	-18.58
Blok-MHAp-P[PEGMA-DMAPMA-FMA]	-14,83

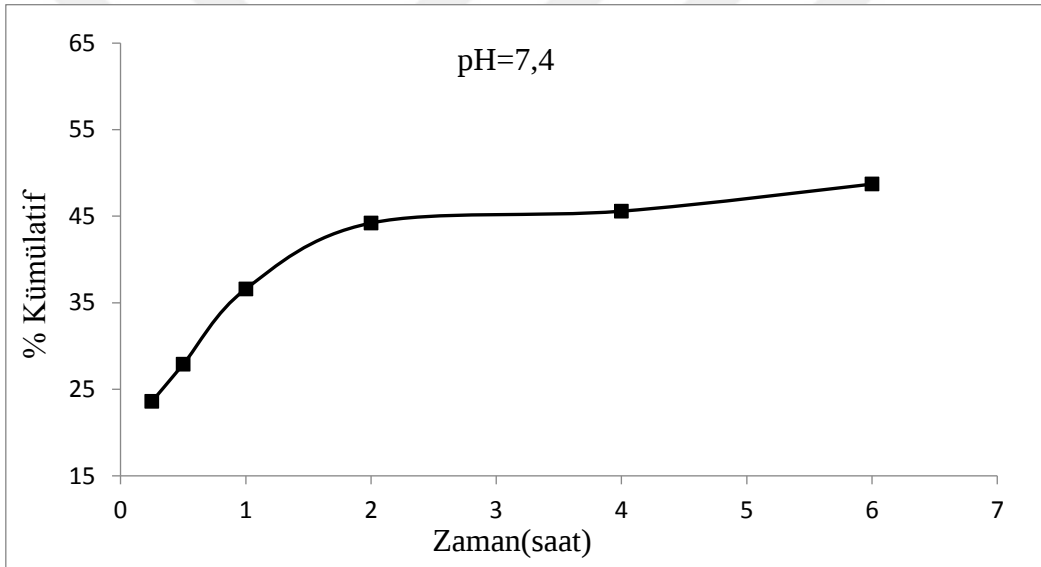
3.7. İlaç Salımı Sonuçları

İlaç salım çalışmaları iki farklı pH değerinde gerçekleştirildi. Kanseri dokularında ve kanser hücrelerinin etrafındaki pH değeri olan 5,5 ve normal hücrelerin pH değeri olan 7,4. Şekil 3.18 ve 3.19 de 37 °C'de pH 5,5 (asetat tamponu) ve pH 7,4 (fosfat tamponu) pH değerlerinde ilaç salım grafikleri yer almaktadır. Polimerlerin DOX salım hızı, FMA 480 nm de geniş absorpsiyon piki verdiği için UV spektroskopisi ile takip edilememiştir. Bundan dolayı floresans spektroskopisi kullanılarak takip edilmiştir.

Floresans sonuçlarına göre; rastgele-MHAp-P[PEGMA-DMAPMA-FMA]'ın salım profili incelendiğinde pH=5,5 te DOX'un %47 si ilk bir saatte salınmıştır. 6 saatin sonunda DOX'un %95 i salınmıştır. Buna karşılık pH=7,4 te salım daha yavaş gerçekleşmiştir. İlk bir saatte DOX'un %36 sı salınmıştır. 6 saatin sonunda ise DOX'un %48 nin salındığı tespit edilmiştir. Asidik pH değerinde protonlanabilen amin grupları polimerin daha fazla şişmesine sebep olur[77]. Kanseri dokularının pH'ı asidik olduğu için kemoterapi ilacı olan DOX'un pH=5,5 te 7.4e göre daha hızlı salım yapması istenilen bir durumdur [78].



Şekil 3.18. Rastgele- MHAp-P[PEGMA-DMAPMA-FMA]'ın pH= 5,5'te DOX salımı.



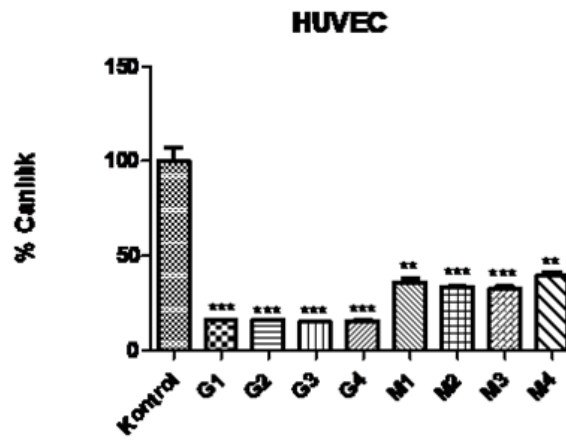
Şekil 3.19. Rastgele- MHAp-P[PEGMA-DMAPMA-FMA]'ın pH= 7,4'te DOX salımı.

Blok-MHAp-P[PEGMA-DMAPMA-FMA]'ın salım profili her iki pH değerinde de düzgün bir ölçüm gerçekleştirilemedi. Blok-FMA polimer zincirlerinin uzunluğu rastgele-FMA polimer zincirlerinin uzunluğunda daha fazladır. Blok uzunluğu floresans uyarılma dalga boyunu değiştirmektedir [79]. Uzun FMA polimer zincirleri floresan uyarılma dalga boyunu 590 nm'e kaydırmıştır. Bu dalga boyu DOX uyarılma dalga boyu ile aynı olduğu için salınan DOX miktarı tespit edilememiştir.

3.8. Sitotoksikite çalışmaları ve Hücre Kültürü

Hazırlanan hidroskiapapit esaslı doku iskelelerinin hücre çalışmaları Saos-2 hücreleri ile yapılmıştır. Sitotoksik davranışını değerlendirmek için 96 kuyucuklu plakalardaki Saos-2 hücreleri farklı konsantrasyonlara sahip hidroskiapapit esaslı doku iskelelerinde 72 saat boyunca hücre çoğalmaları izlenmiştir. 72 saatin sonunda MTT testi ile hücrelerin hazırlanan doku iskelelerinde %canlılık değerleri belirlenmiştir.

Öncelikle hazırlanan doku iskelesinde toksik veya non-toksik etkisinin belirlenmesi amacıyla sağlıklı hücre olan HUVEC hücre hattı kullanılmıştır. Başlangıçta 10 mg/mL polimer konsantrasyonunda yapılan HUVEC hücre çalışması yapıldı. Şekil 3.20 da HUVEC hücrelerinin doku iskelesinde % canlılık sonuçları yer almaktadır. MTT sonuçlarına göre bu konsantrasyondaki doku iskelesinin toksik olduğu sonucuna varıldı.

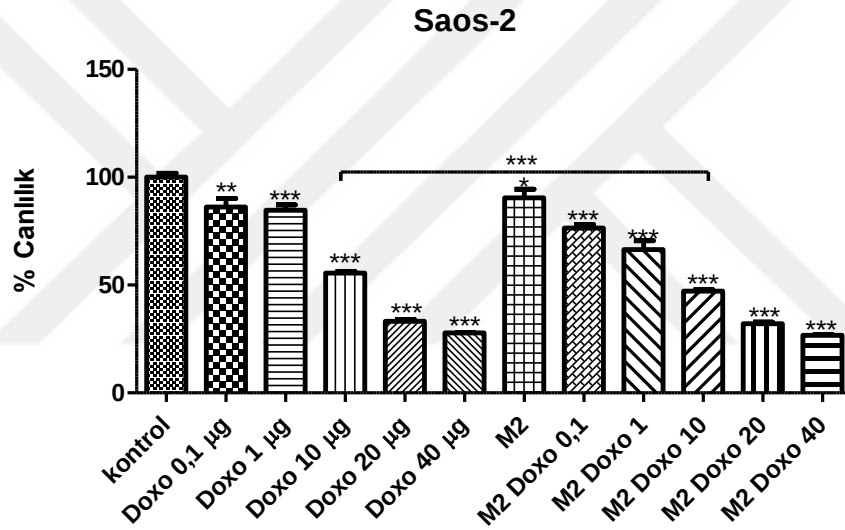


Şekil 3.20. HUVEC MTT %canlılık sonuçları

Daha düşük konsantrasyon (0.1mg/mL) için denemeler tekrarlandı ve toksik olmadığı MTT sonuçlarıyla doğrulandı (Şekil 3. 21).

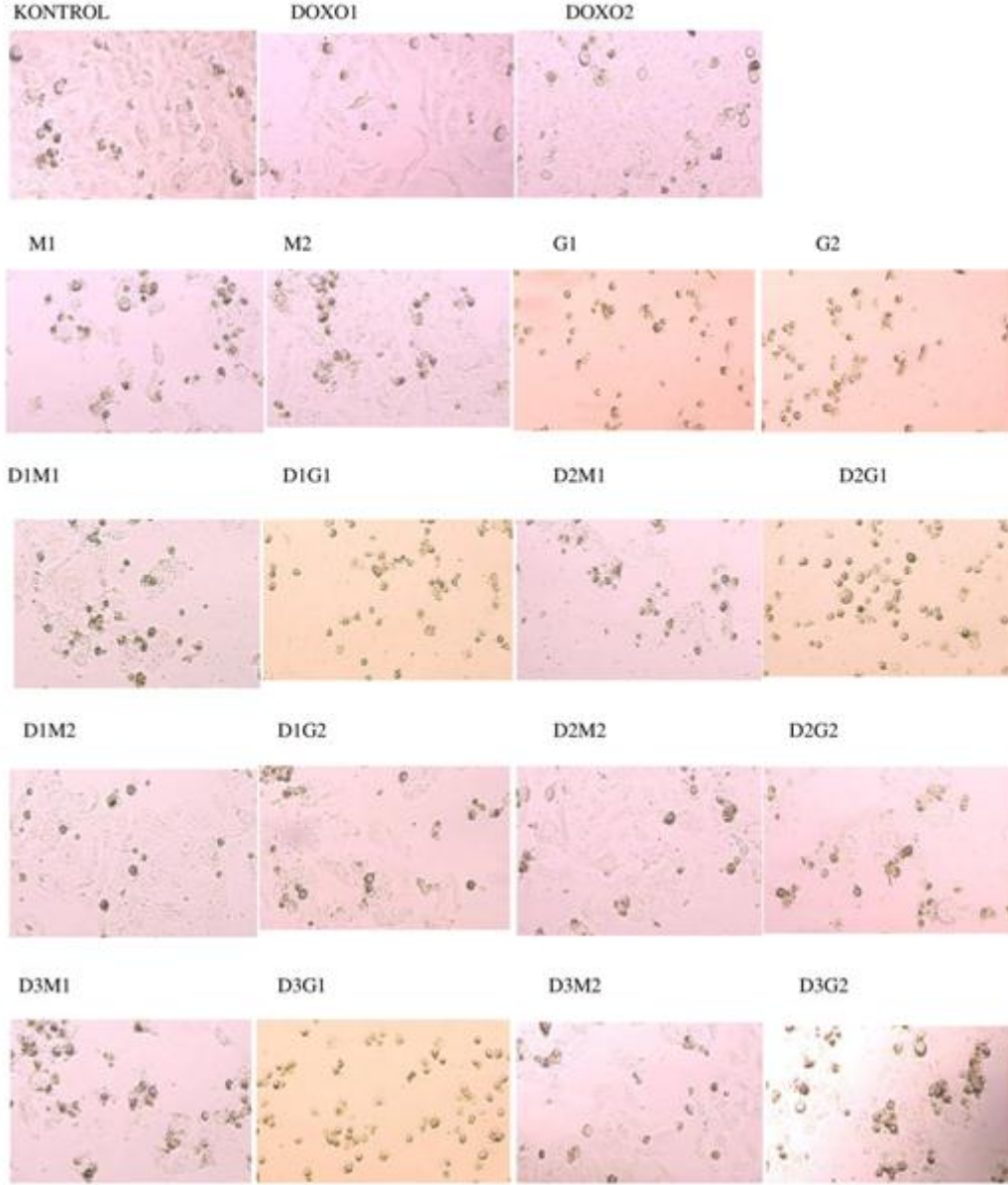
5 farklı DOX konsantrasyonlarında (40 µg, 20 µg, 10 µg, 1 µg ve 0.1 µg) Saos-2 hücrelerinin %canlılık değerleri incelendiğinde; artan DOX konsantrasyonu %canlılık değerinin azalmasına neden olmuştur. Doku iskelesi içerisine aynı konsantrasyonlarda DOX yüklenerek hazırlanan

ve DOX içermeyen (saf polimer) örneklerin 72 saat sonundaki %canlılık değerleri incelenmiştir. 0.1µg DOX konsantrasyonunda canlılık değeri %85, DOX yüklü MHAp doku iskelesinde %75 dir. 1 µg DOX konsantrasyonunda canlılık değeri %83, DOX yüklü MHAp doku iskelesinde %60 dir. 10 µg DOX konsantrasyonunda canlılık değeri %55, DOX yüklü MHAp doku iskelesinde %47 dir. 20 µg DOX konsantrasyonunda canlılık değeri %35, DOX yüklü MHAp doku iskelesinde %30 dur. 40 µg DOX konsantrasyonunda canlılık değeri %25, DOX yüklü MHAp doku iskelesinde %18 dir. DOX içermeyen saf doku iskelesinde canlılık değeri %90 dir.



Şekil 3.21. MTT % hücre canlılık sonuçları.

Şekil 3.22 de mikroskop görüntüleri yer almaktadır.



Şekil 3.22 Hücre Kültürü

Kanser kemoterapi tedavisinde kullanılan bir ilaç olan DOX'un tek başına kanserli hücreleri öldürmesi beklenen bir durumdur. DOX yüklenen doku iskelelerinin de artan DOX konsantrasyonu ile hücre çoğalmasını engellediği görülmektedir. Hazırlanan doku iskelelerinin DOX'un anti-kanser ilaç olma özelliğini bozmadığına aksine bu etkiyi güçlendirdiğini söyleyebiliriz. Hedeflendiği gibi polimer doku iskelelerinin daha yüksek Saos hücrelerinin öldürme kapasitesine sahip olduğu görülmüştür.

İlaç yüklü polimerlerin etkisi, in vivo analizlerde daha belirgin hale gelebilir, çünkü büyük makromoleküler nano taşıyıcılar, kanser dokularında, EPR (gelişmiş geçirgenlik ve tutma) etkisi ile normal olanlara kıyasla pasif seçici ilaç birikimine sahiptir.



SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında hidrotermal yöntem ile sentezlenen mezo gözenekli hidroksiapatitin ATRP yöntemi ile yüzeyinin fonksiyonellendirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmanın birinci bölümünde hidrotermal yöntem kullanılarak MHAp sentezlenmiştir. Sentezlenen MHAp'dan makro-ATRP başlatıcısı (MHAp-Br) hazırlanmıştır. MHAp-Br yapısal olarak aydınlatılması $^1\text{H-NMR}$ ve FT-IR spektroskopi yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 1730 cm^{-1} ve 1649 cm^{-1} de BiBB'ye ait karakteristik pikler görülmüştür. Aynı zamanda 1.90 ppm de görülen BiBB'nin komşu metilen protonları MHAp-Br'nin başarılı şekilde elde edildiğini göstermektedir.

MHAp-Br yüzeyde bağlatılan ATRP ile PEGMA, DMAPMA ve FMA monomerlerinin polimerizasyonu gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan MHA-kopolimerlerin yapısal karakterizasyonu $^1\text{H-NMR}$, FT-IR ve XPS spektroskopi teknikleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 1716 cm^{-1} de PEGMA'ya ait karbonil gerilmesi, 1651 cm^{-1} 'de DMAPMA'nın amid bandı ve 1426 cm^{-1} de gözlenen FMA'nın aromatik halka gerilmesi monomerlerin yapıya başarılı bir şekilde bağladığını göstermektedir. $^1\text{H-NMR}$ 'da gözlenen karakteristik pikler de modifikasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Ayrıca yüzeyi modifiye edilen MHAp'in yüzey özellikleri kimyasal olarak XPS tekniği kullanılarak analiz edilmiştir. MHAp-P[PEGMA-DMAPMA-FMA] C ve N element yüzdeleri artarken, P ve Ca yüzdelерinin polimer katmanının MHAp yüzeyinin kaplanmasından dolayı azaldığı görülmüştür.

ATRP ile modifiye edilen poliakrilat hidroksiapatitlerin morfolojik incelenmesi SEM ile gerçekleştirilmiştir. Monomerlerin kontrollü polimerizasyonu ile hazırlanan rastgele-MHAp-P[PEGMA-DMAPMA-FMA] ve blok-MHAp-P[PEGMA-DMAPMA-FMA]'in morfolojik yapılarında herhangi bir değişim olmadığı ancak çap boyutlarında bir artış olduğu gözlenmiştir. MHAp-Br, rastgele-MHAp-P[PEGMA-DMAPMA-FMA] ve blok-MHAp-P[PEGMA-

DMA-PMA-FMA] boyutlarının artması MHAp yüzeyinin polimer ile kovalent olarak modifiye edildiğini göstermiştir.

Poliakrilat hidroksiapatit ilaç taşıyıcı sistemin pH=7,4 ve pH=5,5 te ilaç salım çalışmaları floresans spektroskopisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Asidik pH değerinde protonlanabilen amin grupları polimerin daha fazla şişmesine sebep olarak, ilaç taşıyıcı sistemin pH=5,5 de pH=7,4'e göre daha hızlı salım yapmasına sebep olmuştur. Rastgele-MHAp-P[PEGMA-DMA-PMA-FMA]'nın ilaç salımı blok-MHAp-P[PEGMA-DMA-PMA-FMA]'ya göre daha iyi sonuçlar vermiştir. FMA polimer blok uzunluğunun uyarılma dalga boyunu etkilediği gözlenmiştir.

Hazırlanan hidroksiapatit esaslı doku iskelelerinin hücre çalışmaları Saos-2 hücreleri ile yapılmıştır. MTT testi ile hücrelerin hazırlanan doku iskelelerinde %canlılık değerleri belirlenmiştir. Başlangıçta 10 mg/mL polimer konsantrasyonunda yapılan HUVEC hücre çalışması ile bu konsantrasyondaki doku iskelesinin toksik olduğu sonucuna varılmıştır. Daha düşük konsantrasyon (0.1mg/mL) için denemeler tekrarlanmıştır ve toksik olmadığı MTT sonuçlarıyla doğrulanmıştır. DOX yüklenen MHAp doku iskelelerinin artan DOX konsantrasyonu ile hücre çoğalmasını engellemesi, hazırlanan doku iskelelerinin DOX'un anti-kanser ilaç olma özelliğini bozmadığı hatta bu etkiyi güçlendirdiği görülmüştür.

Tez çalışmasının bütün sonuçları değerlendirildiğinde, hidroksiapatit yüzeyi polimer ile kaplanarak ve kontrollü polimerizasyon tekniği (ATRP) ile iyi tanımlanmış polimer zincirleri tezin amacına göre modifiye edilmiştir. Yüzeyi modifiye edilmiş olan hidroksiapatit, hücre kültürü ve ilaç salımı çalışmalarının umut vaat eden sonuçları ile iyi bir ilaç taşıyıcı sistem olarak biyoteknolojik alanda kullanılabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Y. Gonzalez-Fernandez, E. Imbuluzqueta, A. Patino-Garcia, M.J. Blanco-Prieto (2015), Anti-tumoral lipid based nanoparticles: a platform for future application in osteosarcoma therapy, *Curr. Pharm. Des.* 21: 6104-6124
2. G. Soni, K.S. Yadav (2015), Applications of nanoparticles in treatment and diagnosis of leukemia, *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 47 :156–164.
3. K. Cho, X. Wang, S.Nie, Z.G. Chen, D.M. Shin (2008), Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer, *Clin. Cancer Res.* 14:1310–1316
4. Jiagen Li, Jin Zeng, Xu Jia, Lei Liu, Tingting Zhou, Peng Liu (2016). pH, temperature and reduction multi-responsive polymeric microspheres as drug delivery system for anti-tumor drug: Effect of middle hollow layer between pH and reduction dual-responsive cores and temperature sensitive shells, *Journal of the Taian Ins.of Chem. Engineers* 74:238-245
5. M. Vallet-Regí, F. Balas, D. Arcos (2007), *Angew. Chem. Int. Ed.* 46 7548–7558.
6. N. Zhang, T. Gao, Y. Wang, Z. Wang, P. Zhang, J. Liu(2015), Environmental pH-controlled loading and release of protein on mesoporous hydroxyapatite nanoparticles for bone tissue engineering, *Mater. Sci. Eng. C-Mater. Biol. App.* 46 :158-165
7. N.F. Mohammad, R. Othman, F.Y. Yeoh (2015), Controlling the pore characteristics of mesoporous apatite materials: Hydroxyapatite and carbonate apatite, *Ceram Int.* 41 :10624-10633.
8. J.D. Chen, Z.H. Wang, Z.L. Wen, S. Yang, J.H. Wang, Q.Q. Zhang (2015), Controllable self-assembly of mesoporous hydroxyapatite, *Colloid Surf. B-Biointerfaces* 127 : 47-53.
9. O.G. da Silva, M.M. Alves, I.M.G. dos Santos, M.G. Fonseca, M. Jaber (2017), Mesoporous calcium phosphate using casein as a template: application to bovine serum albumin sorption, *Colloid Surf. B-Biointerfaces* 158 :480 -487.

10. O. Jung Kwon, (2008), Recent Advances in Controlled/Living Radical Polymerization in Emulsion and Dispersion, *Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 1. 46, 6983–7001
11. M. Sadat-Shojai, M.T Khorasani, E. Dinpanah-Khoshdargi, A. Jamshidi (2013), Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta Biomater* ;9:7591–621.
12. S.V. Dorozhkin (2010), Nanosized and nanocrystalline calcium orthophosphates. *Acta Biomater*;6:715–34.
13. C. Vazquez, C. Barba, N. Munguia(2005), Stoichiometric hydroxyapatite obtained by precipitation and sol gel processes, *Revista mexicana de fisica* 51 :284–293.
14. J.H. Zhan, Y.H. Tseng, J.C.C. Chan, C.Y. Mou (2005), Biomimetic formation of hydroxyapatite nanorods by a single-crystal-to-single-crystal transformation, *Adv. Funct. Mater.* 15: 2005–2010.
15. D. Aquilano, M. Bruno, M. Rubbo, F.R. Massaro, L. Pastero (2014), Low symmetry polymorph of hydroxyapatite. Theoretical equilibrium morphology of the monoclinic $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$, *Cryst. Growth Des.* 14: 2846–2852.
16. Y. Hong, H. Fan, B. Li, B. Guo, M. Liu, X. Zhang(2010), Fabrication, biological effects and medical applications of calcium phosphate nanoceramics, *Mater. Sci. Eng. R* 70 :225–242.
17. S. Bose, S. Dasgupta, S. Tarafder, A. Bandyopadhyay (2010), Microwave processed nanocrystalline hydroxyapatite: simultaneous enhancement of mechanical and biological properties, *Acta Biomater.* 6 :3782–3790.
18. D.C. Manatunga, R.M. de Silva, K.M. Nalin de Silva, N. de Silva, E.V.A. (2018) Premalal, Metal and polymer-mediated synthesis of porous crystalline hydroxyapatite nano-composites for environmental remediation, *R. Soc. Open Sci.* 5 (1) 171557.
19. <http://www.chemtube3d.com/sshydroxyapatite/> ,
20. <https://www.chromospheres.com/nano-hydroxyapatite-powder/>

21. N.A.S. Mohd Pu'ad, P. Koshy, H.Z. Abdullah, M.I. Idris, T.C. Lee (2019), Syntheses of hydroxyapatite from natural sources, *Heliyon* e01588.
22. I.S. Neira, Y.V. Kolen'ko, O.I. Lebedev, G. Van Tendeloo, H.S. Gupta, F. Guitián, M. Yoshimura (2009), An effective morphology control of hydroxyapatite crystals via hydrothermal synthesis, *Cryst. Growth Des.* 9:466–474.
23. Byrappa K., Yoshimura M. (2013), History of Hydrothermal Technology. *Handbook of Hydrothermal Technology*, 51–73.
24. M.S. Bakshi (2016), How surfactants control crystal growth of nanomaterials, *Cryst. Growth Des.* 16 1104–1133.
25. S. López Ortiz, J. Hernández- Avila, M.P. Gutierrez, H. Gómez-Pozos, T.V.K. Karthik and V. Rodríguez Lugo (2017), Hydrothermal synthesis and characterization of hydroxyapatite microstructures.
26. M. Moradi, Y. Yamini (2012), Surfactant roles in modern sample preparation techniques: a review, *J. Sep. Sci.* 35: 2319-2340.
27. B. Jones, M.E. Barbour, R.P. Shellis, G.D. Rees (2014), Interactions between dodecyl phosphates and hydroxyapatite or tooth enamel: relevance to inhibition of dental erosion, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 117: 193–198.
28. M. Salarian, M. Solati-Hashjin, S.S. Shafiei, R. Salarian, Z.A. Nemati (2009), Template-directed hydrothermal synthesis of dandelion-like hydroxyapatite in the presence of cetyltrimethylammonium bromide and polyethyleneglycol, *Ceram. Int.* 35: 2563–2569 (accessed 9.11.14).
29. N.F. Mohammad, R. Othman, F.Y. Yeoh (2015), Controlling the pore characteristics of mesoporous apatite materials: Hydroxyapatite and carbonate apatite, *Ceram Int.* 41 : 10624-10633.

30. J.D. Chen, Z.H. Wang, Z.L. Wen, S. Yang, J.H. Wang, Q.Q. Zhang (2015), Controllable self-assembly of mesoporous hydroxyapatite, *Colloid Surf. B-Biointerfaces* 127 : 47-53.
31. H. Yang, Y. Wang (2016), Morphology control of hydroxyapatite microcrystals: synergistic effects of citrate and CTAB, *Mater. Sci. Eng. C* 62 160–165.
32. M. Khalid, M. Mujahid, S. Amin, R.S. Rawat, A. Nusair, G.R. Deen (2013), Effect of surfactant and heat treatment on morphology, surface area and crystallinity in hydroxyapatite nanocrystals, *Ceram. Int.* 39 :39–50.
33. Y.J. Wang, S.H. Zhang, K. Wei, N.R. Zhao, J.D. Chen, X.D. Wang (2006), Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanopowders using cationic surfactant as a template, *Mater. Lett.* 60:1484–1487.
34. R. Savu, R. Parra, E. Joanni, B. Jançar, S.A. Eliziário, R. de Camargo, P.R. Bueno, J.A. Varela, E. Longo, M.A. Zaghete (2009), The effect of cooling rate during hydrothermal synthesis on ZnO nanorods, *J. Cryst. Growth* 311: 4102–4108.
35. S. Wojciech, Y. Masahiro (2011), Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants, *Journal of materials research* 94-117.
36. F. Balas, J. Perez-Pariente, M. Vallet-Regi (2004), *J. Biomed. Mater. Res.* 1 133.
37. S. Aleksandra, H. Lucyna, C. Emil (2017), Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications Department of Physiscal Chemistry – Interfacial Phenomena, Faculty of Chemistry, Maria Curie-Sklodowska University, 20-031 Lublin, Poland.
38. E. Cukierman, D.R. Khan (2010), The benefits and challenges associated with the use of drug delivery systems in cancer therapy, *Biochem. Pharmacol.* 80: 762–770.
39. A. Hardenia, N. Maheshwari, S. S. Hardenia, S. K. Dwivedi, R. Maheshwari, R. K. Tekade (2019), Scientific Rationale for Designing Controlled Drug Delivery Systems. *Basic Fundamentals of Drug Delivery*, 1–28. doi:10.1016/b978-0-12-817909-3.00001
40. Y. Liu, H. Miyoshi, M. Nakamura (2007), *Int J Cancer.* 120: 2527-2537.

41. İsmail Bayraktar Adnan Menderes Üniversitesi, İnovatif kimya dergisi ismbyrktr@gmail.com
42. S.H. Xu, J. Shi, D.S. Feng, L. Yang, S.K. Cao (2014), J. Mater. Chem. B 2: 6500–6507.
43. D.S. Feng, J. Shi, X.J. Wang, L. Zhang, S.K. Cao (2013), RSC Adv. 3 : 24975–24982.
44. K.L. Lin, L. Chen, P.Y. Liu, Z.Y. Zou, M.L. Zhang, Y.H. Shen, Y.Q. Qiao, X.Y. Liu, J. Chang (2013), CrystEngComm 15 2999–3008.
45. Y.J. Guo, Y.Y. Wang, T. Chen, Y.T. Wei, L.F. Chu, Y.P. Guo (2013), Mater. Sci. Eng. C 33 :3166–3172.
46. H.W. Kim, J.C. Knowles, H.E. Kim (2005), Porous scaffolds of gelatin–hydroxyapatite nanocomposites obtained by biomimetic approach: characterization and antibiotic drug release, Journal Of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials. 74B:686-698.
47. L. Gómez, A. Gallastegui, M.B. Spesia, H.A. Montejano, R.J. Williams, C.M. Previtali (2017), Synthesis of poly (HEMA-co-AAm) hydrogels by visible-light photo polymerization of queous solutions containing as pirinor ibuprofen: analysis of the initiation mechanism and the drug release, Polym. Adv. Technol. 28 :435–442, <https://doi.org/10.1002/pat.3958>.
48. B. Singh, R. Bala (2017), Radiation formation of psyllium cross-linked poly(hydroxyethylmethacrylate)-copoly(acrylamide) based sterile hydrogels for drug delivery applications, Polym. Sci. 59 :363–375, <https://doi.org/10.1134/s0965545x17030166>
49. T.Demirtas, A.G. Karakeçili, M. Gumusderelioglu (2008), Hydroxyapatite containing superporous hydrogel composites: synthesis and in-vitro characterization, J. Mater.Sci.Mater.Med.19 :729–735, <https://doi.org/10.1007/s10856-007-3008-7>.
50. S. Sailaja, P. Ramesh, H.K. Varma (2010), Ultrastructural evaluation of in vitro miner-alized calcium phosphate phase on surface phosphorylated poly(hydroxy ethylmethacrylate-co-methyl methacrylate), J. Mater. Sci. Mater. Med. 21: 1183–1193, <https://doi.org/10.1007/s10856-010-3987-7>

51. Y. Zhanga, K.Donga, F. Wanga, H. Wanga, J. Wanga, Z. Jiangb, S. Diao (2018) Three dimensional macroporous hydroxyapatite/chitosan foam-supported polymer micelles for enhanced oral delivery of poorly soluble drugs Colloids Surf B Biointerfaces.;170:497-504. doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.06.053.
52. T. Wu, L. Tan, N. Cheng ,Q. Yan, Y. Zhang, C.J. Liu, B. Shi (2016), PNIPAAm modified mesoporous hydroxyapatite for sustained osteogenic drug release and promoting cell attachment, Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.62:888-96.
53. C. Jomarién García, C. Yaima, T. Susana, F. Gastón, P. Eduardo, A. Amisel, Á.D. José, C. José C.Rodríguez, R. Luis J.Cruz (2018), A novel information criterion to elucidate a drug delivery mechanism from poly (acrylamide-co-2-hydroxyethyl methacrylate) reinforced with hydroxyapatite composite, Polymer 158:279-288.
54. <https://www.lexisconferences.com/novel-drugdelivery>
55. <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/advanced-drug-delivery-systems-market>
56. www.kuam.com/story/40736839/controlled-release-drug-delivery-market-2019-will-grow-enormously-at-14-cagr-by-2023-growth-overview-mega-trends-key-companies-profiles-and-major
57. www.marketwatch.com/press-release/advanced-drug-delivery-systems-market-2019-global-industry-trends-statistics-competition-strategies-revenue-analysis-key-players-regional-analysis-by-forecast-to-2024-2019-04-22
58. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/controlled-release-drug-delivery-market>
59. JS. Wang, K. Matyjaszewski (1995), Controlled living radical polymerization atom transfer radical polymerization in the presence of transition-metal complexes. J Am Chem Soc;117:5614–5.

60. M. Kato, M. Kamigaito, M. Sawamoto, T. Higashimura (1995), Polymerization of methyl methacrylate with the carbon tetrachloride/dichlorotris-(triphenylphosphine)ruthenium(II)/methylaluminum bis(2,6-di-tert-butylphenoxide) initiating system: possibility of living radical polymerization. *Macromolecules*;28:1721–3.
61. V. Coessens, T. Pintauer, K. Matyjaszewski (2001), Functional polymers by atom transfer radical polymerization. *Prog Polym Sci*;26:337–77.
62. D. Aydan (2006) , Activator formation in atom transfer radical polymerization in reaction media .
63. O. Burcu (2015), Elektrospin tekniği ile hazırlanan biyopolimer nanoliflerin yüzey modifikasyonları ve uygulamaları
64. J. Xia, K. Matyjaszewski (2001). *Chem. Rev.* 101, 9.
65. K. Matyjaszewski, J. Xia (2001) Atom transfer radical polymerization 2924.
66. K. Matyjaszewski, N. Tsarevsky (2009), Nanostructured functional materials prepared by atom transfer radical polymerization *Nature Chemistry* 1(4):276-88.
67. J. Xia, X. Zhang, K. Matyjaszewski *ACS Symp. Ser.* 2000, 760, 207.
68. T.E. Patten, K. Matyjaszewski (1998), Atom Transfer Radical Polymerization and the Synthesis of Polymeric Materials.
69. E.P. Cortes, J.F. Holland, J.J. Wang, L.F. Sinks, J. Blom, H. Senn, A. Bank, O. Glidewell (1974), *N. Engl. J. Med.* 291 998–1000.
70. H.T. Ta, I. Larson, P.F. Choong, D.E. Dunstan (2009), *Biomaterials* 30 :4815–4823.
71. Angeloni L., Smulevich G., Marzocchi M. P. (1982), “Absorption, fluorescence and resonance Raman spectra of adriamycin and its complex with DNA,” *Spectrochim. Acta* 38A(2), 127–213.
72. Weber P., Wagner M., Schneckenburger H. (2013), Cholesterol dependent uptake and interaction of doxorubicin in mcf-7 breast cancer cells, *Int J Mol Sci.* Apr 16; 14(4):8358-66.

73. T. Mossman (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65: 55-63.
74. V. Anastasia, E. Cindy, C. S. Matthias, M. Ronald, S. Ulrich (2017), Early Stages of Biomineral Formation—A Solid-State NMR Investigation of the Mandibles of Minipigs,doi: 10.3390/magnetochemistry3040039
75. W. Amer, K. Abdelouahdi, R. RamanananarivoH, M. Zahouily, A. Fihri, Y. Coppel (2013)etal.MaterLett;107:189–93.
76. L. Dalong, H. Xin, W. Yadong, L. Jiwei, C. Weilu, H. Jinmei, T. Huayu, H. Yudong (2016), Preparation of pH-responsive mesoporous hydroxyapatite nanoparticles for intracellular controlled release of an anticancer drug *Biomater. Sci*, 4, 272-280.
77. L. Li, K. Raghupathi, C. Song, P. Prasad, S. Thayumanavan (2014), Self-assembly of random copolymers. *Chem. Commun.*, 50(88), 13417–13432. doi:10.1039/c4cc03688c
78. C. Wei, M. Fenghua, C. Ru, Z. Zhiyuan (2010), pH-Sensitive degradable polymersomes for triggered release of anticancer drugs: A comparative study with micelles, *Journal of Controlled Release* 142 40–46.
79. Y. Yang, A. Mori, A. Hashidzume (2019), Emission Properties of Diblock Copolymers Composed of Poly(ethylene glycol) and Dense 1,2,3-Triazole Blocks. *Polymers*, 11(7), 1086. doi:10.3390/polym11071086

ÖZGEÇMİŞ

Ad.Soyad : Gamze KOÇAL

Doğum tarihi : 06.02.1992

E-posta : gamzekocall@gmail.com

Eğitim Bilgileri:

Yüksek Lisans Marmara Üniversitesi – Organik Kimya programı (2017-2020)

Lisans Marmara Üniversitesi – Kimya Bölümü (2011-2016)

Lise Atatürk Lisesi

Poster Bildiri:

K.Gamze, O.Burcu, K.A.Nilhan, Preparation of Core-Shell Type Polyacrylate/Hydroxyapatite Drug Carriers by Controlled Polymerization , 6th Drug Chemistry Congress March 22-25 2018, Antalya (Poster) .