

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



SICAKLIK ve pH DUYARLI POLİMERZOMLARIN HAZIRLANMASI

Seyithan KANSIZ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2021

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



SICAKLIK ve pH DUYARLI POLİMERZOMLARIN HAZIRLANMASI

Seyithan KANSIZ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2021

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SICAKLIK ve pH DUYARLI POLİMERZOMLARIN HAZIRLANMASI

Seyithan KANSIZ
KİMYA
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez / / 2021 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Önder TOPEL (Danışman)

Prof. Dr. Osman DUMAN

Doç. Dr. Uğur CENGİZ

ÖZET

SICAKLIK ve pH DUYARLI POLİMERZOMLARIN HAZIRLANMASI

Seyithan KANSIZ

Yüksek Lisans Tezi, Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Önder TOPEL

Haziran 2021; 66 sayfa

Polimerzomlar ilaç taşıma sistemleri, nano reaktörler, nano motorlar gibi biyomedikal alanlarda kullanılabilen polimerik veziküllerdir. Son yıllarda özellikle uyarıcı duyarlı polimerzomlar araştırmacılar için oldukça ilgi çekici hale gelmiştir. Bunlar arasında sıcaklık ve pH duyarlı polimerzomlar ilaç taşıma sistemlerinde en yaygın olarak çalışılan polimerzom türüdür. Bu tez kapsamında ilk kez PEG-b-PDMAEMA blok kopolimeri kullanılarak hem sıcaklığa hem de pH'a duyarlı polimerzomlar oluşturulmuştur. Bu amaçla farklı molekül ağırlıklarında PEG-b-PDMAEMA blok kopolimerleri ATRP yöntemiyle sentezlenmiş ve yapıları FTIR ve ¹H NMR spektroskopisi ölçümleriyle karakterize edilmiştir. Sulu çözeltideki PEG-b-PDMAEMA blok kopolimerlerinin sıcaklık (LCST) ve pH duyarlılıkları UV-Vis spektrofotometresi ve dinamik ışık saçılımı (DLS) ölçümleriyle belirlenmiştir. Polimerzom oluşumu üzerine, polimer zincir uzunluğu, sıcaklık, pH ve derişimin etkisi araştırılmıştır. Polimer çözeltilerindeki polimerzom oluşumu DLS, optik mikroskopi ve transmission elektron mikroskopi (TEM) ölçümleriyle aydınlatılmıştır. Sentezlenen iki diblok kopolimerin (PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₇ ve PEG₄₈-b-PDMAEMA₁₂₅) %1(a/h) sulu çözeltilerinde iyi tanımlanmış polimerzomların oluştuğu belirlenmiştir. Oluşan polimerzomlar TEM ölçümleriyle karakterize edilmiş ve boyutları, sırasıyla, 362±69 ve 165±7 nm olarak belirlenmiştir. PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₇ kopolimerinin polimerzom oluşturma kabiliyetine pH'ın etkisi incelenmiş ve pH=9'da kararlı polimerzomların oluştuğu boyutlarının da 235±83 nm olduğu belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Polimerzom, PEG-b-PDMAEMA, pH duyarlı polimerler, sıcaklık duyarlı polimerler, polimer veziküller, kendiliğinden düzenlenme

JÜRİ: Doç. Dr. Önder TOPEL

Prof. Dr. Osman DUMAN

Doç. Dr. Uğur CENGİZ

ABSTRACT

PREPARATION OF TEMPERATURE AND pH RESPONSIVE POLYMERSOMES

Seyithan KANSIZ

MSc in Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Önder TOPEL

June 2021; 66 pages

Polymersomes are polymeric vesicles that can be used in biomedical fields such as drug delivery, nanoreactors, nanomotors etc. Recent years especially stimuli responsive polymersomes have been of great attention for the researchers. Among them, temperature and pH sensitive polymersomes are the most extensively studied drug delivery systems. In this thesis for the first time, temperature and pH sensitive polymersomes were developed by using PEG-b-PDMAEMA block copolymers. For this purpose, PEG-b-PDMAEMA block copolymers with different molecular weights were synthesized by ATRP method and their structures were characterized by FTIR and ^1H NMR spectroscopy measurements. Temperature and pH sensitivities of PEG-b-PDMAEMA block copolymers in aqueous solution were determined by UV-Vis spectrophotometer and dynamic light scattering (DLS) measurements. The effects of polymer chain length, temperature, pH and concentration on the polymersome formation were investigated. The formation of polymersomes in polymer solutions was elucidated by DLS, optical microscopy and transmission electron microscopy (TEM) measurements. It was determined that well-defined polymersomes were formed in 1% (w/v) aqueous solutions of the two synthesized diblock copolymers (PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₇ and PEG₄₈-b-PDMAEMA₁₂₅). The resulting polymersomes were characterized by TEM measurements and their sizes were determined as 362 ± 69 and 165 ± 7 nm, respectively. The effect of pH on the ability of the PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₇ copolymer to form polymersomes was investigated and it was determined that their sizes of stable polymersomes at pH=9 were 235 ± 83 nm.

KEYWORDS: PEG-b-PDMAEMA, pH responsive polymers, polymeric vesicles, polymersomes, self-assembly, temperature responsive polymers

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. Önder TOPEL

Prof. Dr. Osman DUMAN

Assoc. Prof. Dr. Uğur CENGİZ

ÖNSÖZ

Bu çalışmada PEG-b-PDMAEMA blok kopolimerlerini kullanarak biyomedikal uygulamalar için kullanılabilecek sıcaklığa ve pH'a duyarlı polimerzom sistemleri geliştirilmiştir. PEG-b-PDMAEMA blok kopolimerlerinin polimerzom oluşturma özellikleri polimer zincir uzunluğuna, sıcaklığa, pH'a ve derişime bağılı olarak ayrıntılı olarak araştırılmıştır. Çalışma sonucunda hem sıcaklığa hem de pH'a duyarlı olan polimerzomlar geliştirilmiştir.

Yüksek lisansa başladığım ilk günden itibaren maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, tez konumun belirlenmesinden yazımına kadar olan tüm süreçte daima yanımda olan, eğitimci yönünü her alanda gösteren, daima benim için en iyisini isteyen ve bu amaçla bana kılavuzluk eden, zor anlarda her zaman motive eden, emeklerinin karşılığını ödeyemeyeceğim danışmanım hocam Sayın Doç. Dr. Önder TOPEL'e,

Gerek bölüm imkânlarını gerek kendi laboratuvar imkânlarını her ihtiyaç duyduğumuzda kullanabilmemizi sağlayan hocam Sayın Prof. Dr. Ertuğrul ARPAÇ'a ve ekibine, Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Malzeme Bilim ve Mühendisliği Bölümü'nde bazı numune analizlerini yapmamı sağlayan hocam Prof. Dr. Meltem ASİLTÜRK'e (Akdeniz Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi) ve laboratuvar imkânlarından faydalanmamı sağlayan hocam Prof. Dr. Osman DUMAN'a,

Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde lisans ve yüksek lisans öğrenimim boyunca bana katkı sağlayan sayın öğretim üyelerine, Kimya Bölümü'ndeki arkadaşlarıma ve aynı laboratuvarı paylaştığım değerli arkadaşım Vahit GÖK'e, her zaman desteğini ve tecrübesini benimle paylaşan sevgili arkadaşım Eylül ODABAŞ'a, karakterizasyon çalışmalarında büyük emeği geçen değerli arkadaşlarım Gizem Büşra KELLER'e ve Merve TUNÇ'a tek tek teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak da bugünlere kadar gelmemde en büyük emeğe sahip olan, her zaman yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen anneme, babama, abime ve kız kardeşime yürekten teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
AKADEMİK BEYAN	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Polimer Veziküllerinin Kendiliğinden Yönlendirilmiş Oluşumu	2
1.2. Polimerzom Üretim Yöntemleri	4
1.1.1. Yukarıdan aşağıya yöntemler	5
1.1.1.1. Direkt hidrasyon yöntemi	5
1.1.1.2. Film rehidrasyon yöntemi	5
1.1.1.3. Elektroformasyon.....	6
1.1.2. Aşağıdan yukarıya yöntemler	6
1.1.2.1. Çözücü değiştirme yöntemi	6
1.1.2.2. Bir fiziksel uyarıya duyarlı yöntemler	7
1.1.2.3. Mikroakışkan yöntemi	9
1.1.2.4. Polimerizasyonla kendiliğinden düzenlenme (PISA)	9
1.3. Uyarıcıya Duyarlı Polimerzomalar	10
1.3.1. pH'a duyarlı polimerzomlar	10
1.3.2. Sıcaklığa duyarlı polimerzomlar.....	12
1.3.3. Redoks potansiyeline duyarlı polimerzomlar	13
1.3.4. Işığa duyarlı (fotoduyarlı) polimerzomlar	14
1.3.5. Gaza duyarlı polimerzomlar	15
1.3.6. Enzime duyarlı polimerzomlar	16
1.3.7. Manyetik alana duyarlı polimerzomlar.....	16
1.3. Kapsülasyon Yöntemleri	17
1.3.1. Polimerzom üretimi esnasında kapsülasyon.....	17
1.3.2. Polimerzom üretimi sonrası kapsülasyon	18
1.4. Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu	19

1.5. Tezin Amacı	21
2. KAYNAK TARAMASI.....	22
3. MATERYAL VE METOT.....	25
3.1. Materyal	25
3.2. Yöntem	25
3.2.1. Amfifilik blok kopolimerlerin sentezi ve karakterizasyonu	25
3.2.1.1. Makro başlatıcı (PEG–Br) sentezi	25
3.2.1.2. PEG–b–PDMAEMA blok kopolimerlerinin sentezi	26
3.2.1.3. PEG–b–PDMAEMA blok kopolimerlerinin sayıca molekül ağırlıklarının belirlenmesi	28
3.2.2. Sıcaklık ve pH Duyarlı Polimerzom Oluşumlarının İncelenmesi.....	29
3.2.2.1 Molekül ağırlığının polimerzom oluşumu üzerine etkisinin incelenmesi	29
3.2.2.2. Derişimin polimerzom oluşumu üzerine etkisinin incelenmesi.....	30
3.2.2.3 pH’ın polimerzom oluşumu üzerine etkisinin incelenmesi	30
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	31
4.1. Sıcaklık ve pH Duyarlı Amfifilik Blok Kopolimerlerin Sentezi.....	31
4.1.1. PEG–Br makro başlatıcı sentezi	31
4.1.2. PEG–b–PDMAEMA blok kopolimerlerin sentezi	33
4.2. Sıcaklık ve pH duyarlı polimerzomların oluşturulması ve incelenmesi.....	40
4.3. PEG–b–PDMAEMA blok kopolimerinden polimerzomların oluşması üzerine pH’ın etkisi	48
4.4. PEG–b–PDMAEMA blok kopolimerinden polimerzomların oluşması üzerine derişimin etkisi	50
5. SONUÇLAR	54
5. KAYNAKLAR	56
7. EKLER.....	64
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Sıcaklık ve pH Duyarlı Polimerzomların Hazırlanması” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

21/06/2021

Seyithan KANSIZ

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

k_{act}	: Aktivasyon hız sabiti
k_{deact}	: Deaktivasyon hız sabiti
k_p	: Polimerizasyon hız sabiti
$^{\circ}C$	: Celsius derecesi
T_g	: Camı geçiş sıcaklığı

Kısaltmalar

ABO	: 4-Amino benzil alkol
ATRP	: Atom transfer radikal polimerizasyonu
AzMB	: Azidometilbenzoat
CPT	: Kamptotesin
CSE	: Sistatyonin γ -liyaz
DLS	: Dinamik ışık saçılımı
DMF	: <i>N,N</i> -Dimetil formamit
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DOX.HCl	: Doksorubisin hidroklorür
FTIR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi
GPC	: Jel geçirgenlik kromatografisi
GSH	: Glutatyon
IL-12	: İnterlökin-12 reseptör
IL-16	: İnterlökin-16 reseptör
LCST	: Alt kritik çözelti sıcaklığı
MC	: Merosiyanin
NMP	: Nitroksit aracılı polimerizasyon
NMR	: Nükleer manyetik rezonans

P[EtIM][BF₄] : Poli [1–(2–viniloksietil)–3–etilimidazolyum tetrafloroborat]

PAA : Poliakrilik asit

PADS : Amidin grubu içeren polimer

PAGMA : Poli(*o*–azidometil benzoil gliserol metakrilat)

PAMPA : Poli[N–(3–aminopropil)metakrilamit hidroklorür]

PBC : Poli(benzilkarbamat),

PBD : Poli(bütadien)

PBO : Poli(bütilen oksit)

PCEMA : Poli(2–sinamoiletil metakrilat)

PCL : Poli(kaprolakton)

PDEGMA : Poli(dietilenglikol metakrilat)

PDMA : Poli(*N,N*–dimetil akrilamit)

PDMAEMA : Poli(*N,N*–dimetilaminoetil metakrilat)

PDMS : Poli(dimetilsiloksan)

PDPA : Poli[2–(diizopropilamino)etil metakrilat]

PEE : Poli(etil etilen)

PEG : Poli(etilen glikol)

PEGMA : Poli(etilenglikol metakrilat)

PEO : Poli(etilen oksit)

PGA : Poli(glutamik asit)

PHPMA : Poli[N–(2–hidroksipropil)metakrilamit]

PMDETA : *N,N,N',N',N''*–pentametildietilentriamin

PMOVE : Poli(2–metoksietil vinil eter)

PMPC : Poli[2–(metakriloil)etil fosforilkolin]

PNBOC : Poli(nitrobenziloksi karbonil aminoetil metakrilat)

PNIPAM : Poli(*N*–izopropil akrilamit)

PPO	: Poli(propilen oksit)
PPS	: Poli(propilen sülfid)
PS	: Polistiren
PSPA	: Poli(spiropiran metakrilamid)
RAFT	: Ekleme–parçalama zincir transferi
Rh–B	: Rodamin B
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SP	: Spiropiran
SS	: Disülfid bağı
TEM	: Transmission elektron mikroskobu
THF	: Tetrahidrofur
UCST	: Üst kritik çözelti sıcaklığı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Polimerzomun iki boyutlu (solda) ve üç boyutlu (sağda) temsili görünümleri, hidrofilik kısım (kırmızı), hidrofobik kısım (mavi) (Rideau vd. 2018)	2
Şekil 1.2. Farklı <i>p</i> değerlerinde agregat morfolojileri (Doncom vd. 2017)	4
Şekil 1.3. Film rehidrasyon yöntemi ile polimerzom oluşumu (Rideau vd. 2018).....	6
Şekil 1.4. Çözücü değiştirme yöntemi ile polimerzom oluşumu (Rideau vd. 2018)	7
Şekil 1.5. Uyarıcı olarak pH kullanılarak PMPC-b-PDPA blok kopolimerlerinden polimerzom oluşumu (Du vd. 2005)	8
Şekil 1.6. Mikro akışkan yöntemi ile polimerzom üretimi, IF (iç akışkan) su, MF (ara akışkan) organik çözücü ve polimer karışımı, OF (dış akışkan) su	9
Şekil 1.7. Farklı pH'larda PEO-b-PS-b-PDEA blok kopolimerinin zar yapısındaki değişimler (Du vd. 2005)	11
Şekil 1.8. Enzim taşıyan bir pH duyarlı polimerzom sisteminde enzim aktivasyonu (pH=6'da polimerzomlar substrata karşı geçirgen bir hal alır ve böylece enzimatik tepkime gerçekleşebilir) (Gräfe vd. 2014)	11
Şekil 1.9. İndirgenme duyarlı PEG-SS-PPS blok kopolimerinden oluşan polimerzom ile disülfid bağı içermeyen PEG-b-PPS blok kopolimerinden oluşan polimerzom sistemleri içerisine yüklenen florosein moleküllerinin endozom içerisindeki difüzyonları (Cerritelli vd. 2007)	13
Şekil 1.10. PEG-b-PSPA blok kopolimerinden elde edilen ışığa duyarlı polimerzom sisteminin şematik gösterimi (Wang vd. 2015)	15
Şekil 1.11. PEO-b-PAGMA blok kopolimeri ile elde edilen H ₂ S'e duyarlı polimerzom sisteminin şematik gösterimi (Yan vd. 2016)	16
Şekil 1.12. ATRP reaksiyonun genel gösterimi (Tang vd. 2006).....	19
Şekil 3.1. PEG-b-PDMAEMA blok kopolimerinin sentez akış şeması.....	26
Şekil 3.2. Frezee-Pump-Thaw yöntemiyle gaz uzaklaştırma işlemi. Sıvı N ₂ içerisinde dondurma (A), vakumlama (B) ve eritme (C) işlemleri.....	27
Şekil 3.3. PEG-b-PDMAEMA blok kopolimerinin sentezi. Kapalı sistem tepkime düzeneği (A), tepkime sonrası ürün (B), ürünün saflaştırma için nötral alümina kolondan geçirilişi (C).....	27
Şekil 3.4. Sentezlenen amfifilik blok kopolimerin yapısı ve NMR spektrumunda polimerizasyon derecesi belirlenmesi işlemlerinde kullanılan protonlar: (a) -CH ₂ CH ₂ -, (b) -CH ₃ ve (c) -CH ₂ - protonları	28

Şekil 4.1. Sentezlenen PEG–Br’nin ve PEG–OH ($M_n:2000$)’in FTIR spektrumları.....	31
Şekil 4.2. PEG–Br’nin 1H NMR spektrumu	32
Şekil 4.3. PEG–Br ve PEG ₄₈ –b–PDMAEMA ₁₉ ’un FTIR spektrumları.	33
Şekil 4.4. (A) PEG–Br’nin 1H NMR spektrumu, (B) PEG ₄₈ –b–PDMAEMA ₁₉ ’un 1H NMR spektrumu.....	34
Şekil 4.5. (A) PEG–Br’nin 1H NMR spektrumu, (B) PEG ₄₈ –b–PDMAEMA ₅₂ ’nin 1H NMR spektrumu.....	35
Şekil 4.6. (A) PEG–Br’nin 1H NMR spektrumu, (B) PEG ₄₈ –b–PDMAEMA ₅₆ ’nın 1H NMR spektrumu.....	36
Şekil 4.7. (A) PEG–Br’nin 1H NMR spektrumu, (B) PEG ₄₈ –b–PDMAEMA ₇₅ ’in 1H NMR spektrumu.....	37
Şekil 4.8. (A) PEG–Br’nin 1H NMR spektrumu, (B) PEG ₄₈ –b–PDMAEMA ₇₇ ’nin 1H NMR spektrumu.....	38
Şekil 4.9. (A) PEG–Br’nin 1H NMR spektrumu, (B) PEG ₄₈ –b–PDMAEMA ₁₂₅ ’in 1H NMR spektrumu.....	39
Şekil 4.10. Molekül ağırlığına karşılık LCST değerlerinin değişimi.....	41
Şekil 4.11. %1(a/h)’lik PEG ₄₈ –b–PDMAEMA ₇₇ ve PEG ₄₈ –b–PDMAEMA ₁₂₅ ’in (A) LCST değerinin altında (B) LCST değerinin üzerindeki TEM görüntüleri.....	43
Şekil 4.12. %1 (a/h)’lik PEG ₄₈ –b–PDMAEMA ₇₇ ile elde edilen polimerzomun zar yapısının odaklanmış görüntüsü.....	44
Şekil 4.13 PEG ₄₈ –b–PDMAEMA ₁₉ , PEG ₄₈ –b–PDMAEMA ₅₂ , PEG ₄₈ –b–PDMAEMA ₅₆ ve PEG ₄₈ –b–PDMAEMA ₇₅ için sırasıyla LCST değerinin altında (A, C, E, D) ve LCST değerinin üzerinde alınan (B, D, F, H) TEM görüntüleri	45
Şekil 4.14. Sulu %1(a/h) PEG ₄₈ –b–PDMAEMA ₇₇ kopolimer çözeltisinin sıcaklığa bağlı parçacık boyutu değişimi	46
Şekil 4.15. Sulu ortamda %1 (a/h) (A) ve %0,1 (a/h)’lik (B) PEG ₄₈ –b–PDMAEMA ₇₇ çözeltilerinin optik mikroskop görüntüsü	47
Şekil 4.16. %1(a/h) PEG ₄₈ –b–PDMAEMA ₇₇ ’in farklı pH’larda sıcaklığa bağlı olarak ölçülmüş yüzde geçirgenlik değerleri	48
Şekil 4.17. Farklı pH tamponlarında %1(a/h)’lik PEG ₄₈ –b–PDMAEMA ₇₇ ’nin sayıca boyut dağılımı grafiği.....	49

Şekil 4.18. PEG ₄₈ -b-PDMAEMA ₇₇ 'nin pH=9 tamponunda LCST değerinin üzerinde alınan TEM görüntüleri.....	50
Şekil 4.19. Farklı derişimlerdeki PEG ₄₈ -b-PDMAEMA ₇₇ çözeltilerinin yüzde geçirgenlik değerlerinin sıcaklığa bağı olarak değışimi	50
Şekil 4.20. PEG ₄₈ -b-PDMAEMA ₇₇ kopolimerinin LCST değerinin derişime bağı olarak değışimi.	51
Şekil 4.21. Farklı derişimlerde hazırlanan PEG ₄₈ -b-PDMAEMA ₇₇ kopolimer çözeltilerindeki parçacıkların sayıca boyut dağılımı.....	53
Şekil 7.1. PEG ₄₈ -b-PDMAEMA ₅₂ 'nin FTIR spektrumu	64
Şekil 7.2. PEG ₄₈ -b-PDMAEMA ₅₆ 'nın FTIR spektrumu	64
Şekil 7.3. PEG ₄₈ -b-PDMAEMA ₇₅ 'in FTIR spektrumu	65
Şekil 7.4. PEG ₄₈ -b-PDMAEMA ₇₇ 'nin FTIR spektrumu	65
Şekil 7.5. PEG ₄₈ -b-PDMAEMA ₁₂₅ 'in FTIR spektrumu.....	66

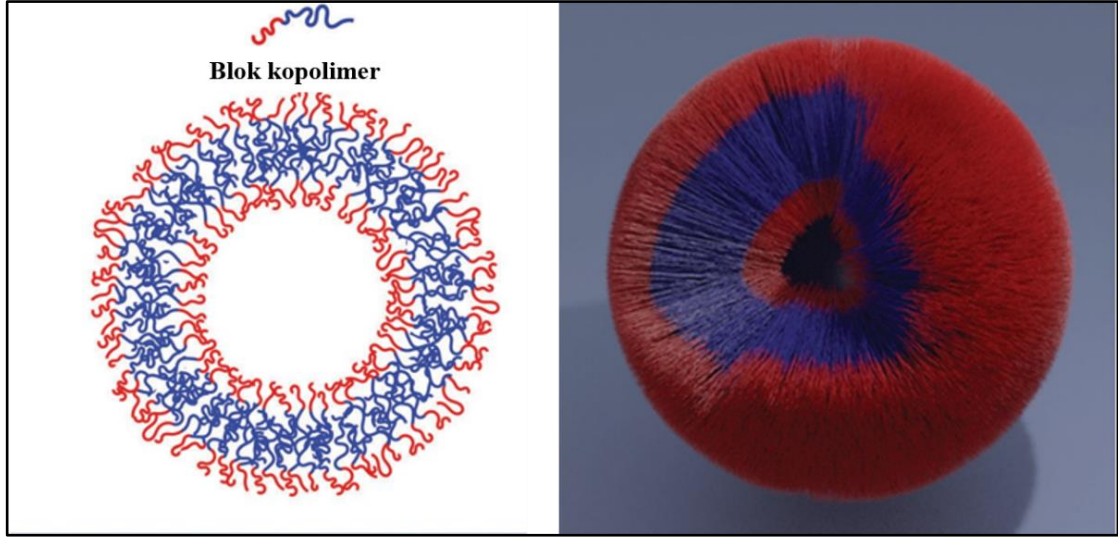
ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Sentezlenen blok kopolimerlerin molekül ağırlıkları (PD _{DMAEMA} =İOx48)	40
Çizelge 4.2. PEG ₄₈ -b-PDMAEMA ₁₉ , PEG ₄₈ -b-PDMAEMA ₅₂ , PEG ₄₈ -b- DMAEMA ₅₆ , PEG ₄₈ -b-PDMAEMA ₇₅ , PEG ₄₈ -b-PDMAEMA ₇₇ ve PEG ₄₈ -b- PDMAEMA ₁₂₅ kopolimerleri için belirlenen LCST değerleri.....	41
Çizelge 4.3. %1 (a/h) PEG ₄₈ -b-PDMAEMA ₇₇ 'in sulu çözeltileri için farklı pH'larda elde edilen LCST ve hidrodinamik çap değerleri	49
Çizelge 4.4. PEG ₄₈ -b-PDMAEMA ₇₇ kopolimerinin farklı derişimlerde ölçülen LCST ve hidrodinamik çap değerleri.....	52

1. GİRİŞ

Son yıllarda lipid bazlı doğal hücre zarının sentetik analoglarını oluşturmak için kapsamlı araştırmalar yapılmıştır. Canlı hücrelerin ve organellerin zar yapılarını taklit etmek için yapılan araştırmaların sayısı zamanla giderek artış göstermiştir. Örneğin, bazı yağ asitleri kendiliğinden büyüyeabilen ve bölünebilen dinamik çift tabaka zarlar meydana getirebilmektedirler. Bu özellikleri nedeniyle protocell çalışmaları için ideal aday moleküller olarak dikkate alınmaktadırlar (Mansy vd. 2008; Zhu vd. 2009; Budin vd. 2012). Diğer yandan, fosfolipitler de amfifilik özelliğe sahip olmalarından dolayı çeşitli yöntemlerle farklı veziküler yapılar oluşturabilmekte ve protocell araştırmaları için umut vaat etmektedirler (Subramaniam vd. 2011; Mashaghi vd. 2013; Brea vd. 2015). Yağ asitleri ve fosfolipitler kullanılarak başarılı bir şekilde veziküller oluşturulabilmesine rağmen, çift tabaka yapılarının ince olmasından dolayı oluşturdukları veziküller yeterli zar dayanıklılığına sahip değildir. Bu durum, yapının düşük mekanik kararlılığa sahip olmasına ve zar yapısından sızmalara neden olmakta dolayısıyla bazı biyomedikal uygulamalarda istenilen performansı gösterememelerine neden olmaktadır. Bu nedenle, araştırmacılar yapay hücre zarı yapısına sahip vezikülleri geliştirmek için kendiliğinden düzenlenebilen polimer temelli yapılara yönelmişlerdir (Discher vd. 2002). Amfifilik blok kopolimerler sulu ortamda lipitlere benzemektedirler; ancak, lipitlerden çok daha kararlı yapılar oluşturabilmektedir. Atom transfer radikal polimerizasyon (ATRP) ve tersinir ekleme-parçalama zincir transfer (RAFT) gibi kontrollü polimerizasyon yöntemlerindeki gelişmeler sayesinde belirli molekül ağırlığına ve düşük polidispersite indeksine (PDI'ya) sahip çok çeşitli amfifilik blok kopolimerlerin sentezlenmesi bu alandaki çalışmalarda sıçramaya neden olmuştur.

Amfifilik blok kopolimerler çözelti ortamında küresel miseller, solucan tipi miseller, veziküller ve hatta tübüler veziküller gibi yapılar oluşturabilmektedir (Li vd. 2004; Cui vd. 2007; Wang vd. 2007; Christian vd. 2009; van Oers vd. 2013). Bu polimerik agregatlar arasında en büyük gelişme *polimerzom* olarak da adlandırılan *polimerik veziküller* üzerine gerçekleştirilmiştir (Tanner vd. 2011). Tanım olarak polimerzomlar, amfifilik blok kopolimerlerden oluşan sentetik vezikülleridir. Tipik polimerzomlar, çift tabaka bir zar tarafından sarılan, sulu ve akışkan bir çekirdek (lümen) içeren boş küreciklerdir. Çift tabaka zar hidrofobik özellikte iken zarın iç yüzeyi ve dış yüzeyi hidrofilik özelliktedir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Polimerzomların iki boyutlu (solda) ve üç boyutlu (sağda) yapısı (kırmızı : hidrofilik blok, mavi : hidrofobik blok) (Rideau vd. 2018)

Polimerzomlar son yıllarda özellikle biyomedikal alanında giderek daha çok ilgi çekmeye başlamıştır. Bunun en büyük nedeni, misellerin aksine hem hidrofilik hem de hidrofobik özellikteki molekülleri sırasıyla lümen ve zar yapısına kapsülleyebilmeleridir (Palivan vd. 2016). Ayrıca, polimerzomların içerisine enzimler kapsülленerek yapay organeller dahi hazırlanabilmektedir (Tanner vd. 2011). Polimerzomların bütün uygulama alanları için zar geçirgenliğini en önemli parametredir. İlaç salımı veya substratın zar boyunca difüzyonu için, zar geçirgenliğinin uygun yöntemlerle kontrol edilmesi gerekmektedir. Bu yöntemler arasında en ilgi çekici olanlar pH, ışık, sıcaklık, enzim ve redoks ajanları gibi fiziksel ve kimyasal uyarıcılara duyarlı polimerzom sistemleri geliştirilerek bu uyarıcılar ile zar geçirgenliğini kontrol etmektir (de Las Heras Alarcon vd. 2005; Dai vd. 2008; Smith vd. 2010; Hu vd. 2012; Gohy vd. 2013; Huo vd. 2014; Yan vd. 2014). Son yıllarda, fiziksel veya kimyasal uyarıcılara duyarlı polimerzomları üretmek için büyük bir çaba sarf edilmiştir. Özellikle ilaç taşıma sistemleri, nanoreaktörler, teşhis, hücre taklidi çalışmaları en çok öne çıkan uygulama alanlarıdır. Akıllı polimerzomlar olarak da nitelendirilebilen bu polimerzomlar ile gerçekleştirilen ilaç taşıma işlemlerinin en büyük avantajı, sitotoksik özelliğe sahip ilaçları yalnızca hastalıklı doku bölgesinde uyarıcı aracılığı ile salmalarıdır. Ayrıca, biyolojik olarak aktif protein, polipeptid, nükleik asit gibi hassas molekülleri çeşitli enzimatik reaksiyonlardan koruyarak bu moleküllerin canlı dokulardaki stabilitesini arttırabilmektedir.

1.1. Polimer Veziküllerinin Kendiliğinden Yönlendirilmiş Oluşumu

Doğal amfifillerin kendi kendine düzenlenmesinin altında yatan ilkeler aslında oldukça genel ve basittir. Lipitler ve çoğu küçük amfifilik moleküller “baş grup” olarak da adlandırılan hidrofilik kısım açısından önemli ölçüde farklılık gösterirler. Ancak, bu moleküller çoğunlukla tekrarlayan etilen gruplarından $(-CH_2-CH_2-)_n$ ($n=5-18$) oluşan bir veya birden fazla hidrofobik kısım içerirler. Bu amfifil moleküllerin oluşturduğu agregatların termodinamik olarak kararlılığı kritik misel derişimi (CMC) ile belirlenir.

$$C_{CMC} = e^{-\frac{n\epsilon_h}{k_B T}} \quad (1.1)$$

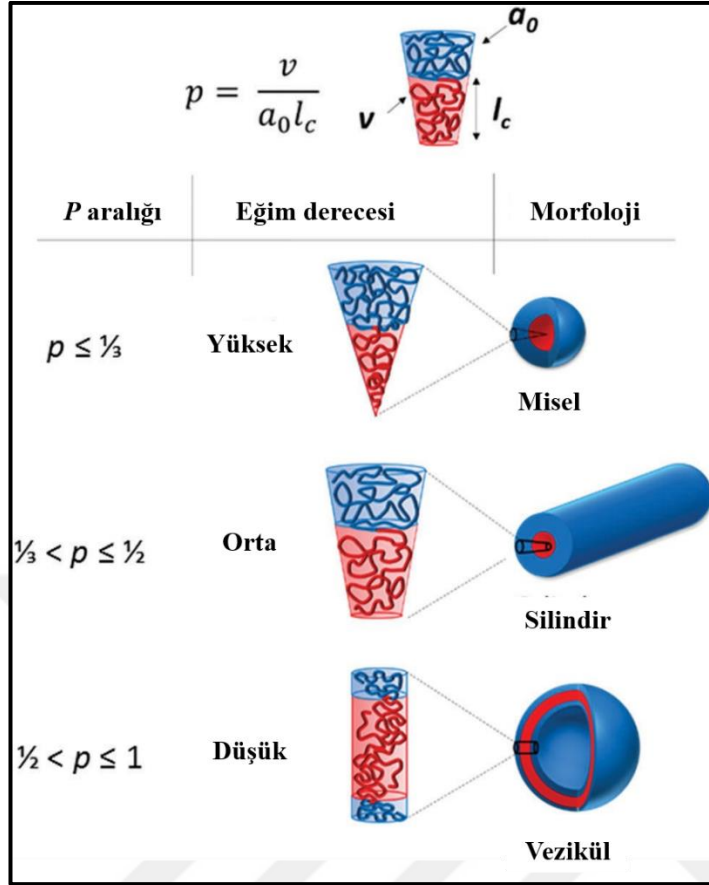
Bu denklemde, k_B Boltzman sabiti, T termodinamik sıcaklık, ϵ_h monomer ile çözelti arasındaki efektif etkileşim enerjisini, n ise hidrofobik kısımdaki tekrarlayan birim sayısını göstermektedir. Sadece kritik misel derişimi üzerindeki sürfektant derişimlerinde vezikül biçiminde agregatlar oluşabilir. Etilen grubu ve biyolojik sıcaklıklar için $\epsilon_h \sim 1-2 k_B T$ ($\sim 4-8$ pN nm) civarındadır. Bu aralıkta, doğal lipitler ve ilgili amfifiller için sulu çözeltideki kritik misel derişimi, mikromolarite ile pikomolarite aralığındadır. Eşitlik 1.1'deki n 'ye veya hidrofobik kısmın molekül ağırlığıyla olan üstel ilişkisi nedeniyle daha büyük hidrofobik molekül ağırlığına sahip olan polimer temelli amfifiller lipitlere kıyasla sulu çözeltide daha kararlı agregatlar oluştururlar.

Lipitlerle aynı amfifilik karaktere sahip olan blok kopolimerler iki veya daha fazla polimer bloğunun kovalent bağlar ile birbirine bağlanmasıyla meydana gelmiş makromoleküllerdir. Ortamda herhangi bir çözücü olmadığında blok kopolimerlerin lamelar fazlardan (kağıt düzlemiyle aynı simetride) oluşan düzenli yapılar sergilediği bilinmektedir. Sulu çözelti ortamındaki hidrasyon, kuru lamelar yapıları şişirir ve tabakaları akışkanlaştırır. Bu durum belli bir hacimde vezikül oluşumuyla sonuçlanır (Discher vd. 2006). Amfifilik bileşim, blok kopolimerlerin farklı yapılar oluşturmak üzere kendi kendine düzenlenmesine neden olan itici güçtür (Mai vd. 2012). Birbirine kovalent bağlarla bağlı hidrofilik ve hidrofobik kısımlar kimyasal olarak uyumsuz olmasına rağmen çözelti içinde hiçbir zaman mikrofaz ayrımına neden olmaz (Zhang vd. 2012). Bununla birlikte, sulu ortamda amfifilik moleküllerin hidrofobik kısımları polar çözücünden uzak duracak biçimde kendi kendine düzenlenerek istenmeyen etkileşimleri azaltır. Böylece, entropik olarak istemli vezikül yapıları oluşur. Bu yapılar sayesinde amfifilik moleküllerin mikrofaz ayrımı gerçekleşmiş olur (Kita-Tokarczyk vd. 2005). Kopolimerin doğası ve amfifildeki hidrofilik/hidrofobik oranı, çözelti ortamında polimerzomları (çift tabakalı), küresel miseller (tek tabakalı), silindirik miseller, çubuklar, lamelin (çift tabakalı) ve altıgen silindirik yapılar gibi yapıların oluşup oluşmadığını belirleyen ana değişkenlerdir (Che vd. 2016).

Bir amfifilik molekülde mikrofaz ayrımı 3 parametreye bağlıdır: *i*) blokların hacim fraksiyonları (f), *ii*) polimerizasyon derecesi (N) ve *iii*) Flory–Huggins parametresi χ (blok uyumsuzluk derecesi) (Mai vd. 2012). Ortalama alan teorisi kullanılarak f , N ve χ arasında oluşturulan teorik faz diyagramı hangi blok oranları ve parametrelerin istenen morfolojiyi vereceğini belirlemek için kullanılır. Bununla birlikte, kendiliğinden düzenlenen polimer agregatların oluşturacağı en olası morfolojiyi tahmin etmek için kritik paketleme parametresi, P_c , diye bilinen bir parametre tanımlanır ve,

$$P_c = v/(a l) \quad (1.2)$$

eşitliğiyle verilir. Burada; v , hidrofobik bloğun hacmi; a , hidrofilik bloğun alanı ve l ise blok kopolimerin uzunluğunu tanımlar. $P_c < 1/3$ için küresel miseller, $1/3 < P_c < 1/2$ için silindirik miseller, $1/2 < P_c < 1$ için veziküller, $P_c=1$ için düzlemsel çift tabakalar ve $P_c > 1$ için ise ters çevrilmiş yapılar oluşur (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Farklı p değerlerinde agregat morfolojileri (Doncom vd. 2017)

Sentezlenen blok kopolimerlerin mikrofaz ayrımını tahmin etmek için kullanılan ve daha az kesin sonuçlar veren bir diğer parametre hidrofilik kütle kesri (f_w)’dir ve,

$$f_w = M_{n(\text{hidrofilik blok})} / M_{n(\text{polimer})} \quad (1.3)$$

eşitliğiyle tanımlanır (Che vd. 2016). Çözelti ortamında hangi agregatların oluştuğu, büyük ölçüde blokların doğasına (hidrofiliklik veya hidrofobiklik, sterik etkiler, serbestlik dereceleri, polimer polidispersitesi, sertlik, vb. faktörlere) bağlıdır. Ancak, genellikle $0,25 > f_w > 0,40$ koşullarında vezikül yapıların oluşumu baskındır (Discher vd. 2006). Bununla birlikte, termodinamik ve kinetik özelliklerden dolayı kullanılan yöntemle bağlı olarak aynı polimer farklı morfolojiler oluşturabilir. Bu nedenle, polimerlerde kendi kendine düzenlenme sonucu oluşacak morfolojileri tahmin etmek oldukça karmaşıktır.

1.2. Polimerzom Üretim Yöntemleri

Polimerzom üretmek için pek çok farklı yöntemler mevcuttur. Bu yöntemler kabaca iki gruba ayrılabilir: “yukarıdan-aşağıya” ve “aşağıdan-yukarıya” yöntemler. *Yukarıdan-aşağıya yöntemlerde* polimerzomlar, sentezlenmiş amfifilik blok kopolimerin yığın halinden yola çıkarak tek bir bloğu seçici olarak çözebilen bir çözücü kullanılarak hazırlanırken; *aşağıdan-yukarıya yöntemlerde* ise unimerlerden yola çıkarak blok kopolimerin tek bir bloğu için seçici olan çözücü içerisinde polimerzomlar hazırlanır.

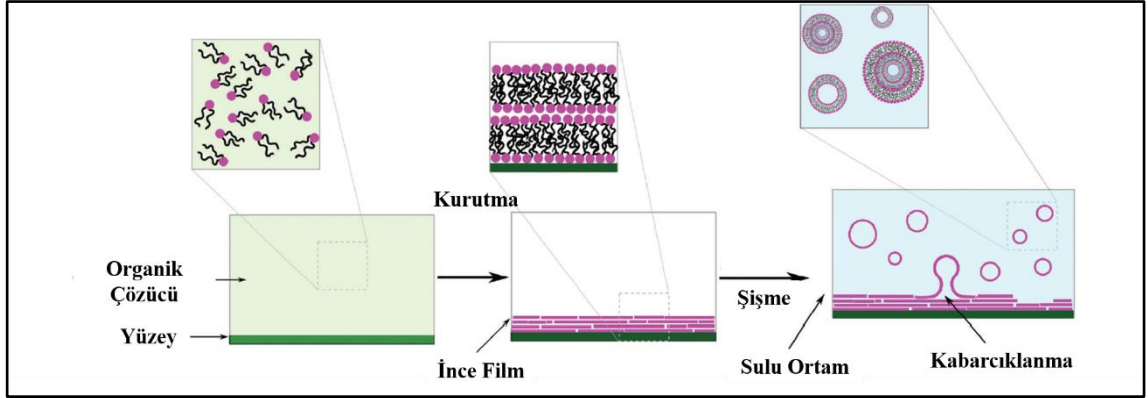
1.1.1. Yukarıdan aşağıya yöntemler

1.1.1.1. Direkt hidrasyon yöntemi

Direkt hidrasyon yöntemi, en basit polimerzom üretme yöntemidir. Blok kopolimerin direkt olarak sulu ortamda hidratlanmasıyla gerçekleştirilir (Balasubramanian vd. 2016). Bu yöntem, blok kopolimerin hidrofobik bloğunun düşük bir camsı geçiş sıcaklığına (T_g) sahip olması durumunda özellikle tercih edilir. Örnek olarak literatürde bu yöntem, sırasıyla, -45°C , -90°C , -60°C ve -73°C T_g sıcaklıklarına sahip poli(etil etilen) (PEE), poli(bütadien) (PBD), poli(bütilen oksit) (PBO) ve poli(propilen oksit) (PPO) blok kopolimerleri için kullanılmıştır (Discher vd. 1999; Jain vd. 2003; Bryskhe vd. 2004; Battaglia vd. 2005). Bu yöntem, ayrıca biyobozunur bir polimer olan poli(kaprolakton) (PCL) için de bildirilmiştir. Direkt hidrasyon yöntemi üretim esnasında herhangi bir çözücü gerektirmediği için özellikle enzim, protein, DNA ve RNA gibi biyoaktif moleküllerin yüklenmesi için çok uygun bir yöntemdir. Ancak, bu yöntem suda çözünmeyen maddelerin yüklenmesi için pek uygun değildir. Ayrıca, boyut kontrolü mümkün olmadığı için üretim sonrası ilave bir ekstrüzyon işlemi gerektirmektedir (Tanner vd. 2011).

1.1.1.2. Film rehidrasyon yöntemi

Film rehidrasyon yöntemi polimerzom üretmek için en sık kullanılan yöntemler arasındadır (Şekil 1.3). Bu yöntem blok kopolimerin 5–10 mg/mL derişim aralığında uygun bir çözücüde çözünmesini gerektirir. İdeal olarak seçilen çözücülerin kaynama noktasının mümkün olduğu kadar düşük olması beklenir. Çözücü uçurulduktan sonra cam balon yüzeyinde ince polimer filmi meydana gelir. Ardından bu polimer filmi, su veya tampon sistemi ile hidratlanır. Bu aşamada ultrasonikasyon ve karıştırma işlemi polimer filmi ile su fazı arasındaki etkileşimi arttırmak için kullanılabilir (Battaglia vd. 2006). Bu yöntemle polimerzomların üretim süresi polimerin türüne ve kullanılan koşullara bağlı olarak oldukça değişkenlik gösterir (birkaç saatten haftalara kadar). Ortalama olarak nanometre büyüklüğünde küresel kesecikler elde edilebileceği gibi yarı kararlı tübüler kesecikler de elde edilebilir (Battaglia vd. 2006). Kullanılan organik çözücülerden gelen herhangi bir kalıntı beklenmez. Ancak, gerçek çalışmalarda eser miktarda çözücü polimer filmi içerisine gömülebilir (Photos vd. 2003). Belirli bir polimerzom için gerekli koşullar oluşturulduktan sonra (kullanılan kabın şekli, karıştırma mekanizması ve hızı, film kalınlığı, derişim ve sıcaklık) belirlenen koşullar altında polimerzom yapıları etkili bir şekilde tekrar üretilebilir. Ayrıca, film rehidrasyon yönteminin tamamen steril koşullar altında da gerçekleştirilmesi mümkündür (Rizzello vd. 2017). Bununla birlikte, büyük miktarlarda üretim için uygun bir yöntem değildir (Parnell vd. 2009). Eser miktarda organik çözücü içermesi hem elde edilecek morfolojiyi olumsuz etkileyebilir hem de sitotoksik etkiye neden olup biyolojik uygulamalarda olumsuz yönde etkiye neden olabilir.



Şekil 1.3. Film rehidrasyon yöntemi ile polimerzom oluşumu (Rideau vd. 2018)

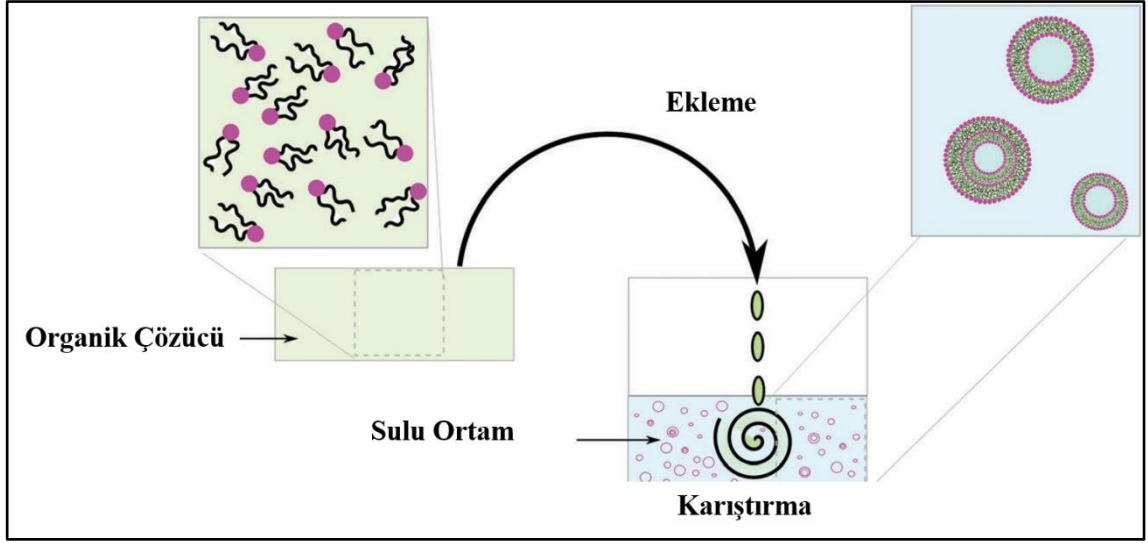
1.1.1.3. Elektroformasyon

Lipozomlara benzer bir şekilde, polimerzomları üretmek için bir diğer yöntem de elektroformasyondur. İletken (indiyum, kalay katkılı cam) yüzey üzerine bir polimer filmi dökülür ve dökülen bu film hidratlandıktan sonra bir elektrik akımı uygulanır. Bu akım sisteme enerji sağlayarak polimer filminin iletken yüzey üzerinden ayrılarak sulu faz içerisinde polimerzom oluşumunu tetikler. Bu yöntem, birçok nedenden dolayı oldukça ilgi çekicidir. En önemlisi, bu yöntem ile hücre ve organel benzeri mikro boyutlarda polimerzomlar elde edilebilir (Battaglia vd. 2006). Bu, vezikül oluşum kinetiğinin floresan/konfokal mikroskopi yoluyla gerçek zamanlı olarak değerlendirilmesine ve izlenmesine olanak tanır (Lomas vd. 2008). Elektroformasyon işlemindeki değişen akım, kullanılan polimere de bağlı olarak, polimerzom oluşum hızını ve vezikül boyutunu etkilemektedir (Battaglia vd. 2006). Ancak, bu yöntemle şimdiye kadar nano boyutta polimerzomların oluşturulabildiğine dair herhangi bir yayın bildirilmemiştir. Ayrıca, bu yöntemle polimerzom üretmek için gereken elektrot yüzeylerinin sınırlı olması dikkate alındığında yöntemin sadece polimerzomlarla ilgili analitik çalışmalar için daha uygun olduğu söylenebilir.

1.1.2. Aşağıdan yukarıya yöntemler

1.1.2.1. Çözücü değiştirme yöntemi

Çözücü değiştirme yöntemi *aşağıdan yukarıya yöntemler* arasında klasik olan ve halen en çok kullanılan yöntemdir. Bu yöntemi kullanarak polimerzomları üretmek için THF, DMSO, DMF, dioksan, aseton veya kısa zincirli alkoller gibi hem hidrofobik hem de hidrofilik bloğu çözebilen uygun organik çözücüler kullanılır (Balasubramanian vd. 2016). Çözünme işleminin ardından blok kopolimerin sadece tek bir bloğu için seçici olan çözücü damla damla yavaşça kopolimer çözeltisine ilave edilir. Bu seçici çözücü çoğunlukla su veya uygun bir tampon çözeltisidir. Dolayısıyla kullanılacak olan organik çözücü suyla karışabilir özellikte olmalıdır (Gaitzsch vd. 2016). Sistemin su içeriği arttıkça, kopolimerin hidrofobik kısmı desolvasyona uğramaya başlar ve bunun sonucunda polimerzom yapıları meydana gelir. İşlemin sonunda, kalan organik çözücü diyaliz veya evaporasyonla uzaklaştırılır.



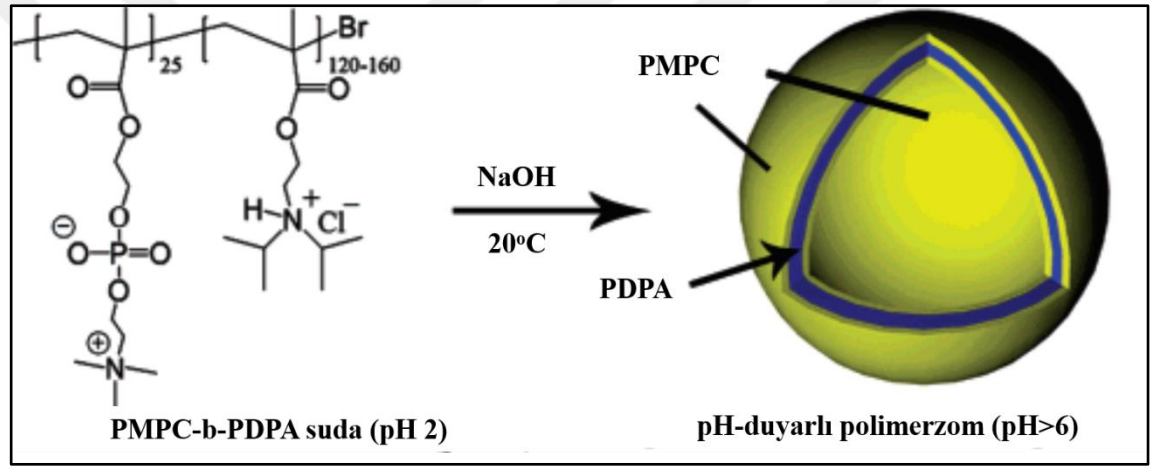
Şekil 1.4. Çözücü değiştirme yöntemi ile polimerzom oluşumu (Rideau vd. 2018)

Çözücü değiştirme yöntemi için üç parametre çok önemlidir. Bunlar, organik çözücünün seçimi, sistemdeki toplam su içeriği ve su ekleme hızıdır. Özellikle, organik çözücü elde edilecek yapı üzerinde çarpıcı etkilere sahiptir. Örneğin, yapılan bir çalışmada aynı kopolimer için (PS-*b*-PAA) organik çözücü olarak THF kullanıldığında polimerzom, DMF kullanıldığında ise küresel miseller oluştuğu bildirilmiştir (Yu vd. 1997). Sistemdeki su yüzdesi ise, kopolimerlerin miselleşmeye başladığı su miktarı olarak tanımlanan kritik su içeriğinin üzerinde olmalıdır. Bu değerin üzerinde, kopolimer unimerleri küresel miseller oluşturmaya başlar. Su içeriği daha da arttıkça küresel miseller silindirik misellere, çubuk yapılara ve en nihayetinde polimerzomlara dönüşür (Discher vd. 2002). Diğer yandan, kendiliğinden düzenlenebilen polimerik yapılar yavaş unimer değişim kinetiğine sahip olduklarından dolayı su ekleme hızı olabildiğince yavaş olmalıdır. Sistemi polimerzom oluşturacak koşullara getirmek için çözeltide oluşan polimerzomlara katılabilecek miktarda unimer bulunmalıdır. Bu sayede, yapı termodinamik olarak en kararlı hal olan polimerzom haline dönüşür. Eğer su ekleme hızı çok hızlı olursa o zaman bütün unimerler aniden desolvasyona uğrar, bunun sonucunda kinetik olarak donmuş (statik) yapılar elde edilir. Belirli bir kopolimer için gerekli parametreleri belirlemek deneme-yanılma gerektirdiğinden oldukça uzun zaman alsa da bu parametreler bir kere belirlendikten sonra polimerzomları tekrar tekrar üretmek oldukça kolaydır.

1.1.2.2. Bir fiziksel uyarıya duyarlı yöntemler

Son yıllarda pH, sıcaklık, ışık ve redoks potansiyeli gibi fiziksel uyarıcılara duyarlı pek çok polimerzom sistemi çalışılmıştır. Kullanılan fiziksel veya kimyasal uyarıcıya bağlı olarak gerçekleşen hidrofobik-hidrofilik geçiş hem polimerzomun oluşumunu hem de oluşan düzenli yapıların dağılmasını tetikleyebilir. Örneğin pH değişimine cevap veren, kolayca protonasyona ve/veya deprotonasyona uğrayabilen fonksiyonel gruplar taşıyan bir dizi blok kopolimerler sentezlenmiştir. Bunlar arasında, poli[2-(metakriloil)etil fosforilkolin)]-blok-poli[2-(diizopropilamino)etil metakrilat] (PMPC-*b*-PDPA) blok kopolimeri iyi karakterize edilmiş ve yoğun olarak çalışılmış bir polimerdir (Du vd. 2005). Zayıf bir polielektrolit olan PDPA bloğu ($pK_a=6,3$), pH değeri

pK_a 'nın altında olduğu ortamlarda protonasyona uğrar. Bu durumda, PDPA bloğu pozitif yükle yüklendiği için PMPC-b-PDPA blok kopolimeri amfifilik özelliğini kaybederek suda oldukça iyi çözünür. Diğer yandan, ortamın pH değeri pK_a değerinin üstüne çıktığı zaman, gerçekleşen deprotonasyon sonucu PDPA bloğunun hidrofobik karakteri artar. PDPA bloğunun polaritesinde ortamın pH'ına bağlı olarak meydana gelen bu değişim sayesinde amfifilik PMPC-b-PDPA blok kopolimeri fizyolojik pH'da kararlı ve dayanıklı polimerzomlar oluşturabilmesine karşın, düşük pH değerlerinde oluşan polimerzomlar unimerlerine ayrılır. Bu davranış biyomedikal uygulamalar için oldukça elverişli ve istenilen bir durumdur. Benzer davranışı farklı pK_a değerlerine sahip poli[2-(dietilamino)etil metakrikat] (PDEAMA, $pK_a \sim 7$) (Du vd. 2005), poli[2-(dimetilamino)etil metakrilat] (PDMAEMA, $pK_a \sim 7,5$) (Du vd. 2012) kopolimerler de sergilemektedir. Fizyolojik pH civarındaki değişimlere yanıt veren "akıllı" polimerzomlara diğer örnekler ise fonksiyonel grup olarak imidazol halkası içeren akrilik polimer bloğu içeren kopolimerler ve ayrıca polipeptid zincirinde histidin taşıyan sistemler de verilebilir (Gallon vd. 2015; Johnson vd. 2015).



Şekil 1.5. PMPC-b-PDPA blok kopolimerlerinin pH'a bağlı olarak polimerzom oluşumu (Du vd. 2005)

Polimerzom oluşumunu tetiklemek amacıyla kullanılabilen bir diğer uyarıcı da sıcaklıktır. Sıcaklığa duyarlı polimerzomlar, sıcaklık değişimine karşılık olarak kopolimeri oluşturan bloklardan birinde hacim faz geçişi sergilerler. Eğer sıcaklığa duyarlı olan bu blok, sulu ortamda belirli bir sıcaklığın üzerinde çözünürse, *üst kritik çözelti sıcaklığı* (UCST); buna karşın, belirli bir sıcaklığın altında suda çözünürse *alt kritik çözelti sıcaklığı* (LCST) davranışı sergiler. Bu etki polimerin hidrasyon durumundan kaynaklanmaktadır. Bilinen polimerlerin çoğu *alt kritik çözelti sıcaklığı* (LCST) sergilemektedir. Bunlar içinde en yoğun araştırılanlara örnek olarak poli(N-izopropil akrilamit) (PNIPAM) verilebilir (Wei vd. 2007). Son yıllarda, poli[N-(3-aminopropil) metakrilamit hidroklorür]-b-poli(N-izopropil akrilamit) (PAMPA-b-PNIPAM), poli(laktik asit)-b-poli(N-izopropil akrilamit) (PLA-b-PNIPAM), poli(2-sinanometil metakrilat)-b-poli(N-izopropil akrilamit) (PCEMA-b-PNIPAM) ve poli(etilen glikol)-b-poli(N-izopropil akrilamit) (PEG-b-PNIPAM) blok kopolimerleri ile sıcaklık kontrollü polimerzomlar geliştirilmiştir. Sıcaklık güdümlü geliştirilen bu sistemlerin içerisine hapsedilen aktif içerikleri kopolimerin bileşimine bağlı olarak 30–40 °C sıcaklık

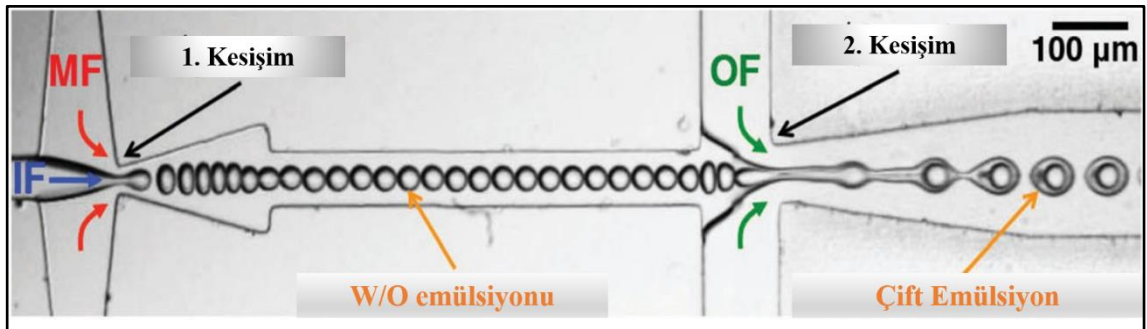
aralıklarında salabildikleri bildirilmiştir (Hales vd. 2004; Chen vd. 2006; Li vd. 2006; Qin vd. 2006).

Benzer biçimde, azobenzen ve spirobenzopiran türevi içeren foto duyarlı moleküller içeren blok kopolimerler ile bu moleküllerin tersinir foto izomerizasyon özellikleri sayesinde görünür ve/veya mor ötesi ışığa duyarlı olarak polimerzom oluşturabilen ve yine ışık etkisiyle açılabilen blok kopolimerler de hazırlanabilmektedir. Bu tip ışığa duyarlı sistemlere örnek olarak, poli(spirobenzopiran)-b-poli[(N-(2-hidroksipropil) metakrilamit)] ve poli(azobenzen metakrilat)-b-poli(*ter*-bürl akrilat) blok kopolimerleri verilebilir (Koňák vd. 1997; Wang vd. 2004).

Bir fiziksel veya kimyasal uyarıcıya duyarlı olarak oluşan ve/veya bozulan(açılan) polimerzom sistemleri, hassas ve önemli moleküllerin kapsüllemesi için önemli bir alternatif yol önermektedir. Fiziksel veya kimyasal uyarıcıyla polimerzom oluşturulması temelde iki önemli avantaj sunar; i) polimerzomlar daha kolay üretilir ve ii) polimerzom üretim aşamasında herhangi bir organik çözücü kullanılmaz.

1.1.2.3. Mikroakışkan yöntemi

Polimerzom oluşturma teknikleri içerisinde mikroakışkan teknolojisi ile üretim nispeten yeni bir yöntemdir. Bu yöntemde blok kopolimer bir organik çözücü içerisinde çözülür. Blok kopolimer çözeltisi mikroakışkan cihazı yardımıyla çift emülsiyona (W/O/W) dönüştürülür ve organik çözücü buharlaştırılarak uzaklaştırılır (Shum vd. 2008). Bu yöntemle polimerzom oluşturmak için, çözücünün buharlaşma hızına ve emülsiyon adımı sırasında su fazının ozmolaritesine dikkat etmek gerekir. Eğer çözücü çok hızlı buharlaşırsa, emülsiyon kararsızlaşır ve damlacık birleşmesi gerçekleşebilir (Perro vd. 2011). Diğer yandan, ozmolarite farklılığı söz konusu olduğu zaman yapıya/yapıdan su difüzyonunu kontrol etmek mümkün olmaz ve bunun sonucunda polimerzom oluşumu esnasında boyut kontrolü güçleşir ve yapısal bozukluklar meydana gelir. Bu yöntem kopolimer zincirlerinin kendiliğinden düzenlenmesine dayalı olmadığından oldukça yüksek kapsülasyon verimi elde edilebilir. Ancak, bu yöntem ile yalnızca mikro boyutlu veziküller üretilmektedir (Thiele vd. 2010).



Şekil 1.6. Mikro akışkan yöntemi ile polimerzom üretimi, IF (iç akışkan) su, MF (ara akışkan) organik çözücü ve polimer karışımı, OF (dış akışkan) su

1.1.2.4. Polimerizasyonla kendiliğinden düzenlenme (PISA)

Son dönemlerde popüler olan bir diğer yöntem ise “polimerizasyonla kendiliğinden düzenlenme” (PISA: polymerization-induced self assembly)’dir. Bu

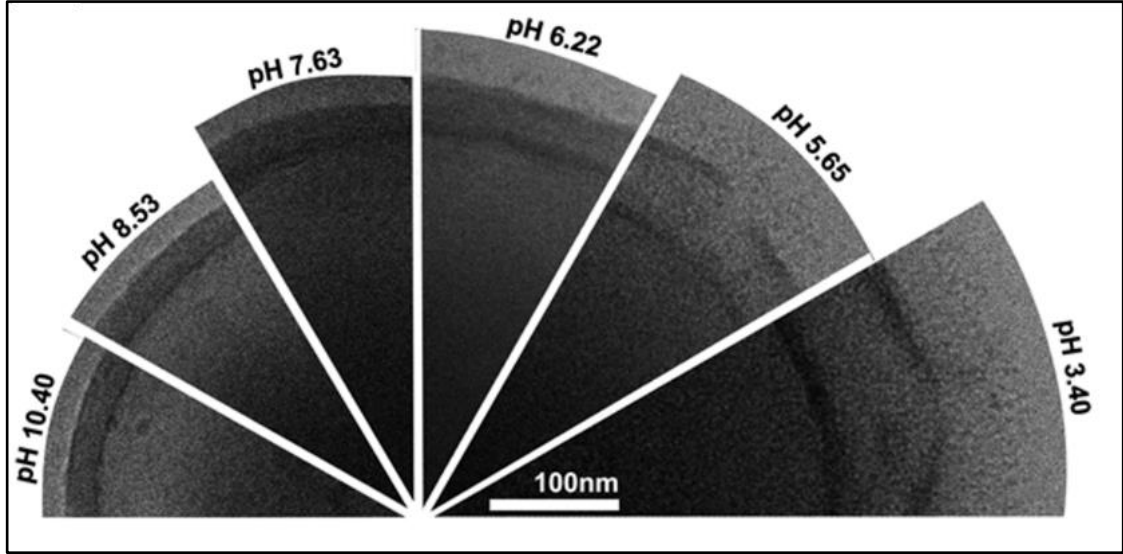
yöntem, su içerisindeki monomer ile uzayan polimer zinciri arasındaki çözünürlük farkına dayanır (Warren vd. 2014). Hidrofilik monomer, hidrofilik makro başlatıcı üzerinde polimerleştikçe polimer artan bir şekilde hidrofobik karakter kazanmaya başlar ve entropik olarak kendiliğinden düzenlenme meydana gelir. Başlangıç kritik polimerizasyon derecesine ulaşıldıktan sonra miseler çekirdeklenme oluşur. Polimerizasyon derecesi arttıkça, sırasıyla, küresel, çubuk, ara yapılar ve son olarak da veziküller gözlenir. Hedeflenen yapı polimerizasyon derecesi veya amfifil derişimi ayarlanarak kontrol edilebilir (Rideau vd. 2018). Ancak, PISA yönteminin uygulama alanı kısıtlıdır, sadece sınırlı monomerler için kullanılabilmektedir.

1.3. Uyarıcıya Duyarlı Polimerzomalar

1.3.1. pH'a duyarlı polimerzomlar

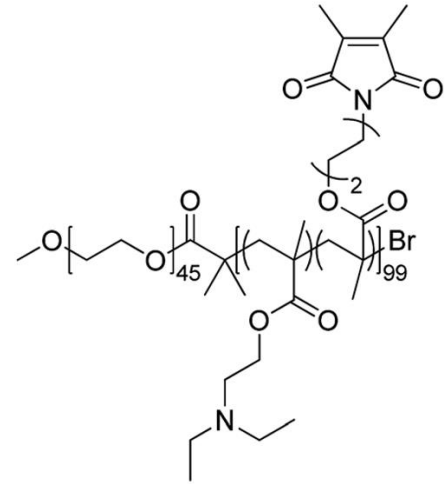
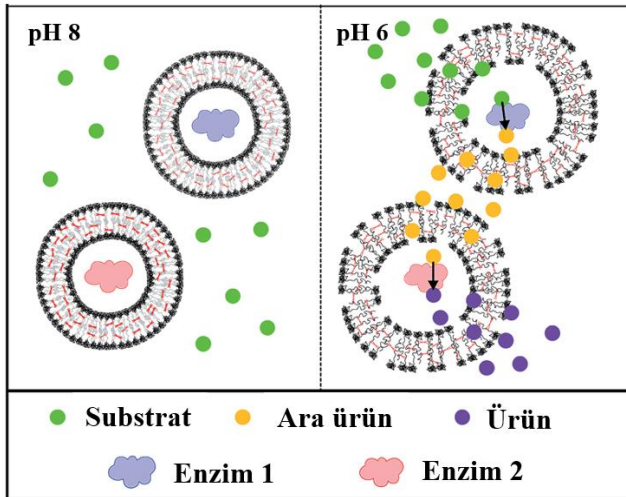
pH'a duyarlı polimerzomlar, vücutta fizyolojik pH gradyanlarının varlığı nedeniyle en çok çalışılan sistemler arasındadır. Örneğin, tümör ve inflamatuvar dokuların hücre dışı pH'ı (pH~6,5-7,2) normal dokulardan ve kandan (pH~7,4) daha düşüktür. İlâveten lizozomlarla endozomlardaki pH ise normal doku ve kana göre daha düşüktür (pH 5,5-5,0) (Meng vd. 2009). Canlılarda var olan bu fizyolojik pH gradyanı hedeflenen bölgelere ilacı taşımak ve yerinde tedavi etmek için pH'a duyarlı ilâç taşıma sistemlerinin önemini ortaya koymaktadır. Bu açıdan pH'a duyarlı polimerzomlar bu tip sistemler için ideal adaylar haline gelmektedir. Genellikle, pH'a duyarlı polimerzomlar asitle hidroliz olabilen ve/veya iyonlaşabilen bir bloğa sahip blok kopolimerler kullanılarak elde edilir. Özellikle, asitle iyonlaşabilen gruplara sahip blok kopolimerler pH duyarlı polimerzom sistemleri için en yaygın olarak çalışılan polimer çeşitleridir. Bu tip kopolimerlerin hidrofobik kısımları farklı pH değerlerinde iyonlaşarak suda daha iyi çözünür hale gelir ve böylece polimerzom yapısı dağılır (Hu vd. 2017).

Polimerzomların pH'a duyarlılığı poli(etilenoksit)-b-poli(stiren)-b-poli(dietilaminoetil metakrilat) (PEO-b-PS-b-PDEA) triblok kopolimeri incelenerek ortaya konulmuştur (Du vd. 2005). pH'a duyarlı olan PDEA bloğu sayesinde, pH düştükçe vezikül boyutunun (250 nm'den 480 nm'ye) ve zar kalınlığının (25 nm'den 80 nm'ye) arttığı bu sayede yapının daha geçirgen bir hal aldığı gözlenmiştir (Şekil 1.7). Bu tip yapılar "*nefes alan veziküller*" olarak tanımlanmıştır.



Şekil 1.7. Farklı pH'larda PEO-b-PS-b-PDEA blok kopolimerinin zar yapısındaki değişimler (Du vd. 2005)

Blok kopolimerlere çapraz bağlayıcılar eklenerek şişme sonrası polimerzom yapısının dağılması engellenebilmektedir. Böylece yapı unimerlerine dağılmadan kontrollü geçirgenlik sağlanır. Örneğin, PEG-b-PDMAEMA blok kopolimerinden oluşan polimerzom sistemine UV ışık altında çapraz bağlanabilen 3,4-dimetil maleikimidobutil metakrilat monomerlerinin eklenmesiyle asidik pH'ta (pH<6) dağılmayan ve morfolojisini koruyan yapılar elde edilmiştir (Şekil 1.8) (Gräfe vd. 2014). Üretilen bu polimerzom sistemin içerisine glikoz oksidaz ve myoglobin enzimleri kapsüllenerek farklı pH'larda sistemin zar yapısında meydana gelen şişme-büzülme davranışları sayesinde substrat geçişi kontrol edilerek enzim aktivitesi takip edilmiştir.



Şekil 1.8. Enzim taşıyan bir pH duyarlı polimerzom sisteminde enzim aktivasyonu (pH=6'da polimerzomlar substrata karşı geçirgen bir hal alır ve böylece enzimatik tepkime gerçekleşebilir) (Gräfe vd. 2014)

Polipeptidlerden oluşan blok kopolimerler de pH'a duyarlı polimerzom oluşturmak için yaygın şekilde kullanılmıştır. Genel anlamda iki farklı tipte polipeptid

içeren blok kopolimerler pH'a duyarlı polimerzomlar oluşturmak için kullanılmaktadır. Birinci tip polipeptid içeren kopolimerlerde hidrofobik kısım polipeptidlerden hidrofilik kısım ise sentetik polimerlerden oluşmaktadır. İkinci tip kopolimerlerde her iki blokta da polipeptid zincirleri bulunur (Che vd. 2016). Li vd. (2006), poli(L-glutamik asit)-b-poli(L-lizin) (PGlu-b-PLys) blok kopolimeri kullanarak pH'a duyarlı polimerzomlar oluşturmuşlardır. PGlu-b-PLys kopolimerinde asidik pH'ta poli(L-glutamik asit) bloğu nötürleşir ve böylece polimerin ikincil yapısı yüklü zincir yapısından nötür ve daha kompakt olan R-heliks yapısına dönüşerek hidrofobik karakter kazanır. Diğer yandan, bazik koşullar altında ise protonlanmış olan poli(L-lizin) bloğu protonunu kaybederek nötral duruma geçer ve dolayısıyla bu blok da bazik pH'ta hidrofobik karakter kazanmış olur. Bu iki bloğun da farklı pH değerlerinde hidrofilik-hidrofobik karakterlerinin değişmesi aynı blok kopolimerin hem asidik hem de bazik ortamda polimerzom oluşturmaya olanak sağlamıştır.

1.3.2. Sıcaklığa duyarlı polimerzomlar

Sıcaklık, polimerzom oluşturmak için kullanılabilecek başka bir fiziksel uyarıcıdır. Bu amaçla en çok kullanılan polimer PNIPAM'dır. PNIPAM, düşük *kritik çözelti sıcaklığı* (LCST) olarak adlandırılan sıcaklığın (PNIPAM için LCST=32°C) altında hidrofilik karakterdeyken bu sıcaklığın üzerinde hidrofobik karakter kazanmaktadır. PNIPAM içeren amfifilik blok kopolimerlerin LCST değeri genellikle fizyolojik sıcaklığın (36,5°C) altında olduğu için fizyolojik koşullarda polimerzom sistemleri oluşturulabilir. Sıcaklık, 32°C veya altına düşürüldüğünde ise yapı dağılır. PEO-b-PNIPAM blok kopolimeri kullanılarak oluşturulan polimerzom sistemi hidrofilik molekülleri lümeni içerisine hidrofobik molekülleri ise zarı içerisine kapsülleyerek akıllı nano taşıyıcı olarak kullanılmıştır (Li vd. 2006).

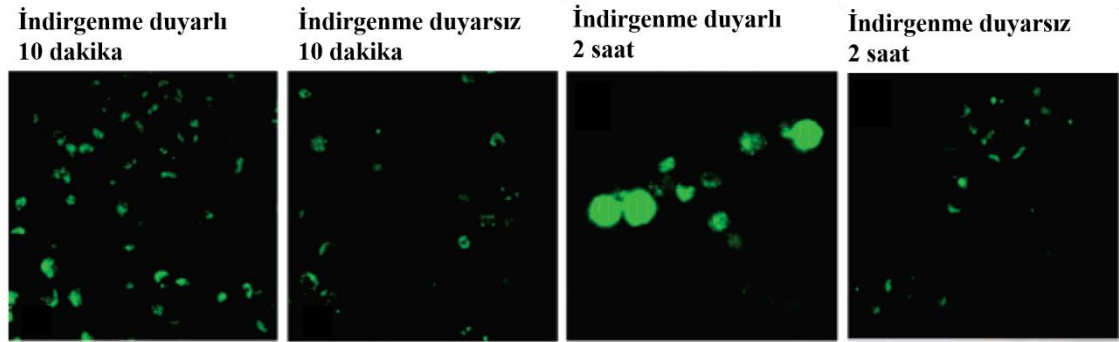
Bir diğer çalışmada ise poli[N-(3-aminopropil metakrilamit) hidroklorür]-b-poli(N-izopropil akrilamit) (PAMPA-b-PNIPAM) ve poli[2-(dimetilaminoetil) metakrilat]-b-poli(N-izopropil akrilamit) (PDMAEMA-b-PNIPAM) blok kopolimerleri ile sıcaklığa duyarlı polimerzom sistemleri oluşturulmuştur (Li vd. 2007). PDMAEMA-b-PNIPAM polimerzom sisteminin zarında NaAuCl₄ indirgenerek Au nanopartiküllerine dönüştürülmüş ve zarın daha da kararlı hale gelmesi sağlanmıştır. Hazırlanan polimerzom sistemlerinin özellikle pDNA, siRNA, protein ve farmositik peptidleri taşımak için oldukça umut vaat ettiği rapor edilmiştir.

Yakın bir dönemde poli(N-vinil kaprolaktam)-b-polidimetilsiloksan-b-poli(N-vinil kaprolaktam) triblok kopolimerden oluşan polimerzom sistemi bildirilmiştir (Liu vd. 2015). Bu sistemde, sıcaklık arttıkça polimerzom yapısına zarar vermeden zar yapısında geçici gözenekler oluşmakta ve kapsüllenmiş doksorubisinin bu gözeneklerden kolayca geçişi sağlanmaktadır. Bu sistem, fizyolojik sıcaklıklarda (37-42°C) sıcaklık kontrollü membran geçirgenliği vasıtasıyla anti-kanser ilaçların taşınmasına iyi bir örnektir.

Çok nadir olsa da *yüksek kritik çözelti sıcaklığına* (UCST) sahip olan polimerler kullanılarak oluşturulan polimerzomlar da mevcuttur. Bu polimerler UCST sıcaklığının üzerine ısıtıldığında hidrofobik karakterden hidrofilik karaktere geçiş yaparlar. UCST tipi poli(2-metoksietil vinil eter)-b-poli[1-(2-viniloksietil)-3-etilimidazonyum tetrafloroborat] (PMOVE-b-P[(EtIM)][BF₄]) blok kopolimerinin UCST değerinin altında polimerzom oluşturduğu bildirilmiştir (Yoshimitsu vd. 2016).

1.3.3. Redoks potansiyeline duyarlı polimerzomlar

Redoks potansiyeli, bir hücrenin içi ile dışı arasında ve tümörlü dokularla sağlıklı dokular arasında büyük oranda değişiklik gösterir. Önemli bir indirgeyici ajan olan glutatyon (GSH) miktarı, sitozolde ve çekirdekte 10 mM civarındayken hücre dışı ortamda bu derişim 2–20 μ M aralığındadır (Cheng vd. 2011). Dolayısıyla, bölgesel redoks potansiyeli farklılıklarından faydalanarak redoks potansiyeline duyarlı polimerler ile polimerzomlar oluşturulabilir. Literatürde bildirilen pek çok çalışmada disülfid bağı indirgenmeye duyarlı polimerzom sistemlerin geliştirilmesi için kullanılmıştır (Yan vd. 2011; Aleksanian vd. 2012; Yu vd. 2012). Böyle sistemlere örnek olarak bir çalışmada polietilenglikol–SS–poli(fenil sülfid) (PEG–SS–PPS) kopolimeri endozomlar içerisindeki redoks potansiyeline duyarlı nano taşıyıcılar olarak tasarlanmıştır. Gerçekleştirilen *in vivo* gözlemler PEG–SS–PPS blok kopolimerinden oluşan redoks duyarlı (indirgenme duyarlı) polimerzom ile disülfid bağı içermeyen PEG–b–PPS blok kopolimerinden oluşan polimerzom içerisine yüklenen florosein aracılığıyla endozom içerisindeki difüzyon kıyaslanmıştır (Şekil 1.9). İndirgenme duyarlı PEG–SS–PPS blok kopolimerlerinden oluşan polimerzomların kapsüllenen florosein moleküllerini indirgenme duyarlılığı olmayan PEG–b–PPS’den elde edilen polimerzomlarla kıyaslandığında 2 saat içerisinde saldığı gözlenmiştir (Cerritelli vd. 2007). Bir diğerk çalışmada ise, amfifilik triblok kopolimer temelli poli(etilen glikol) metakrilat–b–polikaprolacton–SS–polikaprolakton (PEGMA–b–PCL–SS–PCL) nanotaşıyıcı polimerzom sistemi tasarlamıştır (Kumar vd. 2015). Hücre içi bir tripeptid olan glutatyon (GSH), polimer omurgasındaki PCL blokları arasında bulunan disülfid bağı kırarak polimerzom yapısının dağılmasına sebep olur. Redoks duyarlı ve biyouyumlu polimerzomlar gelişmiş anti–tümör etkinliğı sergilemekte olup, kanser tedavisi için umut vadeden sistemlerdendir.



Şekil 1.9. İndirgenmeye duyarlı PEG–SS–PPS blok kopolimerinden elde edilen polimerzom sistemlerine yüklenmiş florosein moleküllerinin endozom içerisindeki difüzyonlarının indirgenmeye duyarlı olmayan PEG–b–PPS blok kopolimerinden elde edilen polimerzom sistemleriyle karşılaştırılması (Cerritelli vd. 2007)

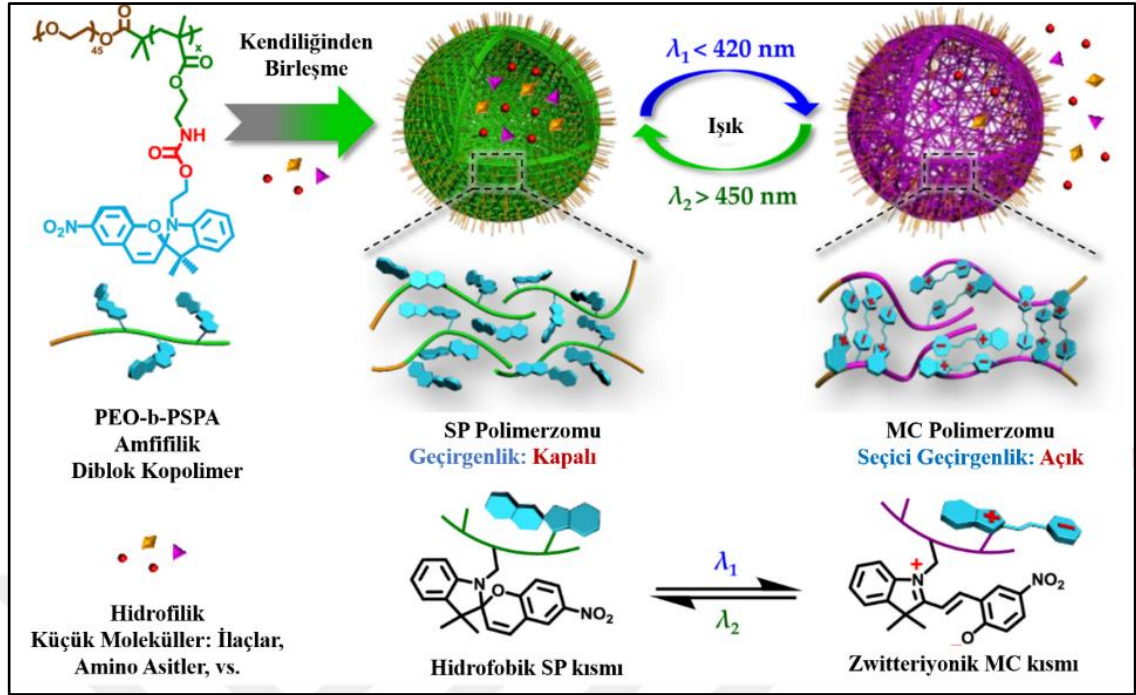
İndergenme duyarlı polimerzomlara kıyasla yükseltgenme duyarlı polimerzomlarla ilgili çalışmalar daha azdır ve bunlarda çoğunlukla hidrojen peroksit gibi (H_2O_2) reaktif oksijen türlerine (ROS) duyarlıdırlar. Oksidasyon duyarlı polimerzomlarda hidrofobik blok olarak kullanılan ilk polimer poli(propilen sülfid)’tir (Napoli vd. 2004). H_2O_2 ’nin eklenmesiyle hidrofobik karakterdeki poli(propilen sülfid) hidrofilik karakterdeki poli(propilen sülfoksit) haline dönüşür. Bu dönüşüm blok kopolimer için mevcut hidrofilik karakteri artırarak daha önce var olan hidrofobik–hidrofilik dengiyi

bozar ve yapının vezikül halinden misel haline dönüşmesine neden olur. Bu çalışma esas alınarak dendritik hücre endozomlarına antijen ve adjuvan iletimi gerçekleştirilmiştir (Scott vd. 2012). Toll benzeri reseptör agonisti olan gardiquimod ve R848, polimerzom içerisine kapsüllendiği zaman, IL-12 ve IL-16 sitokin ekspresyonunu 10 kat kadar arttırdığı bildirilmiştir. Dolayısıyla, oksidasyon duyarlı polimerzomların immunoterapi ajanları için kullanışlı bir taşıyıcı olduğu gösterilmiştir.

1.3.4. Işığa duyarlı (fotoduyarlı) polimerzomlar

Fotoduyarlı polimerzomlar, istenilen zamanda, istenilen bölgede hızlı bir şekilde belirli dalga boyundaki ışınlarla kontrol edilebildikleri için oldukça ilgi çekmektedirler. Bu tarz sistemler çoğunlukla polimer omurgasına kovalent bağ ile bağlanmış fotoduyarlı moleküllerin ışık etkisi ile polimer omurgasından ayrılması veya bu moleküllerin konformasyonlarının değişmesini temel alır.

PEO-b-PNBOC (PNBOC: poli(nitrobenziloksi karbonil aminoetil metakrilat) blok kopolimeri UV ışığa duyarlı çapraz bağlı polimerzom sistemi olarak geliştirilmiştir (Wang vd. 2014). UV ışığa maruz kaldığında 2-nitrobenzaldehit ve CO₂ yapıdan ayrılır ve serbest kalan primer amin grubu sayesinde daha önce hidrofobik karakterde olan zar hidrofilik karakter kazanır. İlaveten serbest kalan primer amin grupları, ester grupları ile amitleşme reaksiyonuna girerek çapraz bağlanma sağlar ve yapının unimerlerine ayrılarak dağılmasını engeller. Bir diğer ışığa duyarlı polimerzom sistemi ise PBC-b-PDMA (PBC: poli(benzilkarbamat), PDMA: poli(N,N-dimetil akrilamit) blok kopolimeri kullanılarak, görünür veya UV ışığa duyarlı bir şekilde polimer zincirinin kuyruk kısmından kafa kısmına doğru aşamalı olarak depolimerizasyona uğramasına dayanmaktadır. Bu polimerzom sistemi, suda çözünen 4-amino benzilalkol (ABO), CO₂ ve PDMA moleküllerine dağılarak içerisine kapsüllenmiş olan biyoaktif moleküllerin iletilmesini sağlar. Işığa duyarlı polimerzom sistemleri arasında özellikle spiropiran içeren blok kopolimerlerden oluşan polimerzom sistemleri oldukça ilgi çekici bir diğer gruptur. Spiropiran (SP) molekülü UV ışığa maruz kaldığında zwitter iyonik formu olan merosiyanin (MC) izomer yapısına dönüşerek hidrofobik karakterden hidrofilik karaktere dönüşür ve bu dönüşüm tersinir bir şekilde (görünür ışık altında veya karanlıkta) gerçekleşir. Bir çalışmada, poli(etilen oksit)-blok-poli(spiropiran) (PEO-b-PSPA) kopolimeri kullanarak polimerzomlar hazırlanmış ve içerisine bir anti-kanser ilaç olan 2-deoksi-5-florouridin yüklenmiştir. PSPA bloğundaki ışığa bağlı olarak gerçekleşen SP-MC izomerizasyonu sonucu hazırlanan polimerzomların $\lambda < 420$ nm'de açılıp, $\lambda > 450$ nm'de kapanarak bir açma-kapama döngüsü gerçekleştirebildiği ve böylece polimerzom zarının geçirgenliğinin kontrol edilebildiği belirlenmiştir (Şekil 1.10) (Wang vd. 2015). Çalışma sonucunda sistemin 5 etkili açma-kapama döngüsü gerçekleştirebildiği gözlemlenmiştir. Bu çalışma polimerzomların tersinir bir şekilde geçirgenliklerinin kontrolü için iyi bir örnektir.

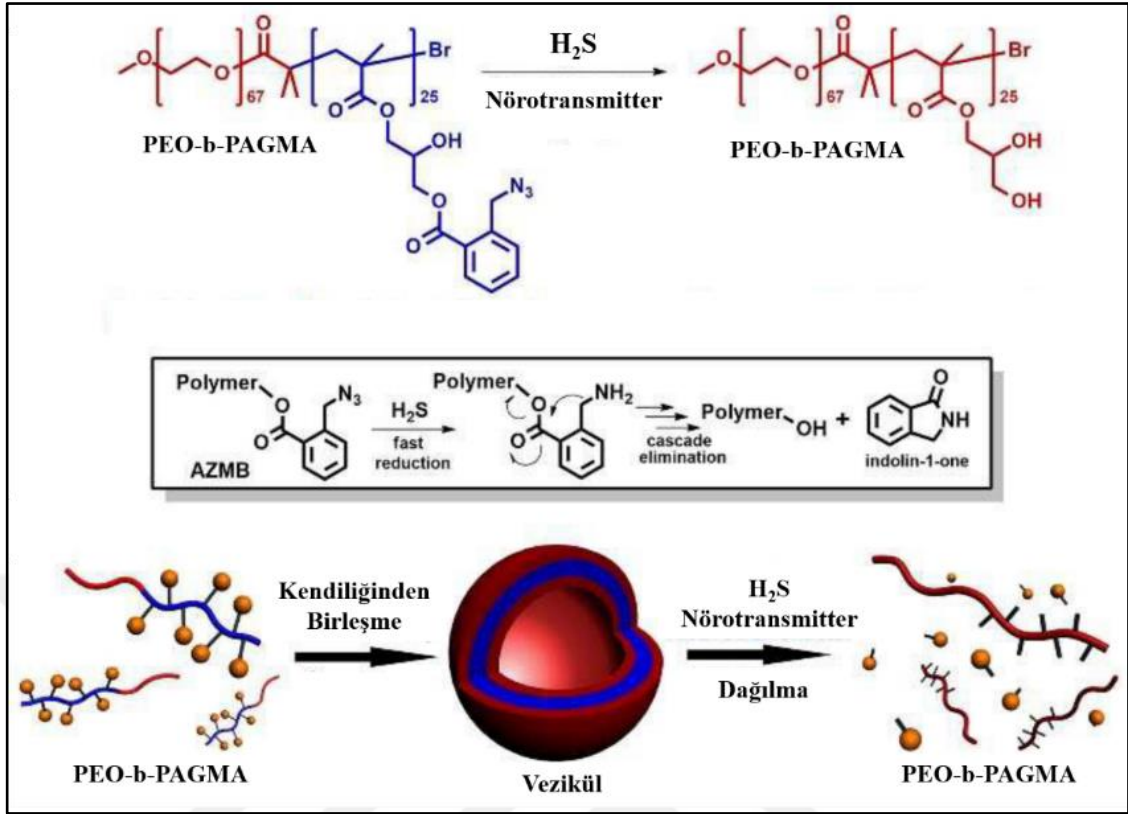


Şekil 1.10. PEG–b–PSPA blok kopolimerinden elde edilen ışığa duyarlı polimerzom sisteminin şematik gösterimi (Wang vd. 2015)

1.3.5. Gaza duyarlı polimerzomlar

Son dönemlerde, biyoaktif moleküllere veya hücre içi sinyal moleküllerine duyarlı polimerzomlar ilgi odağı olmuştur. NO, CO₂, H₂S ve O₂ gibi hücre içi biyosinyal moleküllerinden uyarıcı olarak biyogörüntüleme, tanı ve ilaç/gen taşıma amaçları için faydalanılmıştır (Che vd. 2016). CO₂'e duyarlı amidino grubu içeren PEO–b–PAD (PAD: poli[(N–amidino) dodesil akrilamit]) polimerzom sistemi başarılı bir şekilde elde edilmiştir. Oluşturulan polimerzomun boyutu ve hacmi, CO₂ ve Ar gaz miktarlarının değişimiyle gerçekleşen protonasyon ve deprotonasyon aracılığıyla ayarlanmıştır (Yan vd. 2011). Bu sistemin gaza duyarlılığı tersinir bir şekilde şişme ve büzülme şeklinde olup ilaç taşıma uygulamaları için umut vadetmektedir. PDMAEMA ve PDEAEMA diğer CO₂ duyarlı polimerlerdir. PDMAEMA ve PDEAEMA polimerlerindeki tersiyer amin grubu su içerisinde CO₂ ile reaksiyona girerek hidrofilik karakter kazanır ve sonrasında N₂ ile muamele edildiklerinde ise tekrar eski hidrofobik karakterlerini kazanırlar. Dolayısıyla, tersinir bir şekilde şişme ve büzülme davranışı sergilerler (Han vd. 2012; Han vd. 2012; Yan vd. 2013; Liu vd. 2014).

Sistatinyonin γ -liyaz (CSE) enzimi ile gerçekleşen L–sisteinin H₂S'e bozulması hücre sinyalleşmesinde çok önemli bir nöromodulatördür (Che vd. 2016). H₂S'e duyarlı olan azidometilbenzoat (AzMB) içeren blok kopolimeri kullanarak H₂S'e duyarlı polimerzom sistemi başarıyla oluşturulmuştur (Yan vd. 2016). AzMB içeren PEO–b–PAGMA (PAGMA: poli(o–azidometil benzoil gliserol metakrilat) polimeri ile oluşturulan polimerzom sistemi artan H₂S derişimiyle kontrollü bir şekilde dağılmaktadır. İlaven, polimerzomun zar yapısına CSE enziminin kapsüllenmesiyle dolaylı bir şekilde sistemin L–sisteine de duyarlı olması sağlanmıştır (Şekil 1.11).



Şekil 1.11. PEO-b-PAGMA blok kopolimeri ile elde edilen H₂S'e duyarlı polimerzom sisteminin şematik gösterimi (Yan vd. 2016)

1.3.6. Enzime duyarlı polimerzomlar

Enzime duyarlı polimerler, enzimatik dönüşümlerin eşlik ettiği yüksek düzeyde seçicilik ve verimliliğe sahip benzersiz sistemlerdir (Zelzer vd. 2013). Buradaki akıllı supramoleküler sistemleri geliştirmek için spesifik enzimatik reaksiyonlardan faydalanılmıştır. Çalışmaların çoğu misel sistemleri üzerine yoğunlaşırken, polimerzomlar hakkındaki çalışmalar nispeten sınırlı kalmıştır. Enzime duyarlı polimerzomlar, özellikle tümörlü ve enfeksiyonlu bölgelerde bazı enzimlerin olması gerekenden daha fazla bulunmalarını temel alarak geliştirilen sistemlerdir. Dekstran temelli polimerzomlar kullanılarak suda çözenen Rodamin B (Rh-B) ve poliaromatik antikanser ilaç olan kamptotesin (CPT), polimerzomun sırasıyla lümen ve zar yapısı içerisine kapsüllenmiştir (Pramod vd. 2012). Esteraz enzimi vasıtasıyla dekstan ve alifatik grup arasındaki ester bağı kırılır ve yapı dağılır. Bu mekanizmaya göre CPT yüklü polimerzomlardan salınan ilaçların serbest CPT'ye kıyasla çok daha iyi hücresel alım gösterdiği gözlenmiştir.

1.3.7. Manyetik alana duyarlı polimerzomlar

Manyetik alana duyarlı sistemler; noninvazif yapıları, yüksek penetrasyonları ve kontrol kolaylığı gibi benzersiz özelliklerinden dolayı tedavi, görüntüleme ve teşhis gibi alanlarda geniş uygulamalara sahiptir. Paramanyetik veya süperparamanyetik malzemelerin kendiliğinden birleşen yapılara dahil edilmesi özellikle ilaç taşıma sistemlerine yeni bir yaklaşım sağlamaktadır.

Poli(trimetilen karbonat)-b-poli(L-glutamik asit) (PTMC-b-PGA) blok kopolimeri kullanarak, anti-kanser ilaç olan DOX.HCl ve süper paramanyetik demir oksit nanopartikülleri (γ -Fe₂O₃) sırasıyla polimerzomun lümen ve zar yapısına başarıyla yüklenmiştir (Oliveira vd. 2013). Polimerzom zarı değişen manyetik alanla birlikte artan ısıdan dolayı geçirgen özellik kazanıp yüklenmiş olan anti-kanser ilacı saldıgı gözlenmiştir.

1.3. Kapsülasyon Yöntemleri

Polimerzomların en büyük avantajı hem hidrofilik hem de hidrofobik özellikteki teröpatik molekülleri kapsülleyebilmesidir. Başarılı bir kapsülasyon için, kapsüllenecek molekülün kimyasal yapısı, stabilitesi ve çözünürlüğü oldukça önemlidir. Polimerzom elde etmek için kullanılan yöntemlere göre kapsülasyon teknikleri farklılık göstermektedir. Kapsülasyon yöntemleri genellikle polimerzom üretimi esnasında ve sonrasında olmak üzere iki gruba ayrılabilir.

1.3.1. Polimerzom üretimi esnasında kapsülasyon

Burada kapsülasyon işlemi, blok kopolimerlerin kendiliğinden düzenlenerek polimerzomları oluşturduğu aşamada gerçekleşmektedir. *Yukarıdan aşağıya polimerzom üretim yöntemleri* kullanıldığında kapsüllenecek molekül, çözünürlüğüne de bağlı olarak, polimerzom üretimi esnasında ya sulu faz içerisinde çözülerek ya da organik çözücü içerisinde kopolimer ile çözülerek gerçekleştirilir.

Suda çözünür anti-kanser ilaç olan doksorubisin hidroklorürün (DOX-HCl), PMPC-b-PDPA polimerzom sistemine, su fazı içerisinde film rehidrasyon yöntemi ile oldukça yüksek bir kapsülasyon verimi ile (~ %50) kapsüllendiği bildirilmiştir (Colley vd. 2014). Benzer bir prensiple, enzim ve proteinler herhangi bir aktivite kaybı olmadan yaklaşık %40'lık bir verimlilikle kapsüllenmiştir (O'Neil vd. 2009; Liu vd. 2010). Burada, ilaç veya biyoaktif moleküller için uzun sürelerde karıştırma veya ultrasonikasyon işlemi tavsiye edilmemektedir. Bu nedenle, eğer hızlı rehidrasyon adımı (direkt rehidrasyon, ince film rehidrasyonu) polimer formülasyonu ile uyumlu değilse polimerzom üretimi sonrası kapsülasyon yöntemleri tercih edilir. Ayrıca, daha önce de bahsedildiği gibi film rehidrasyon yönteminde eser miktarda filmde kalan organik çözücüler proteinlerin istenmeyen denatürasyonuna neden olabilir.

Diğer yandan, hidrofobik ilaçlar kopolimer ile birlikte organik çözücü içerisinde çözülüp ince film içerisine gömülebilir. Ardından rehidrasyon işlemi ile kapsülasyon gerçekleştirilir. Bu yöntemle, hidrofilik ve hidrofobik moleküllerin başarılı bir şekilde birlikte kapsülasyonu mümkündür (Colley vd. 2014). Hidrofobik ilaçlar organik çözücülere suda çözünen biyoaktif moleküllere kıyasla daha dayanıklıdır. Buna rağmen, enzim ve diğer biyomoleküller için tavsiye edildiği bu tarz moleküller için de uzun süre su fazı ile etkileşim halinde olmaları tavsiye edilmemektedir. Bu nedenle uygulanacak kapsülasyon işlemine göre molekülün kararlılığını göz önünde bulundurmak gerekmektedir.

Eğer çözücü değiştirme gibi *aşağıdan yukarıya yöntemler* kullanılırsa, biyoaktif molekül su fazında veya alternatif olarak kopolimer ile organik faz içerisinde çözülebilir (Meng vd. 2005; van Dongen vd. 2009; Du vd. 2012). Küçük interferans RNA (siRNA)

ve antisens oligonükleotidlerin PEG–b–PLA polimerzom sistemi içerisine kapsülasyonu bu yöntemle başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir (Kim vd. 2009).

Mikro akışkan yöntemlerin kullanılması polimerzomların heterojen boyut dağılımı problemini ortadan kaldırdığı gibi, kapsülasyon verimini de arttırmaktadır. Çeşitli moleküller ve hatta bazı küçük veziküler yapılar dahi bu yöntem kullanılarak kapsüllenebilmektedir (Thiele vd. 2010; Thiele vd. 2010; Kim vd. 2011). Ancak, daha önce de bahsedildiği gibi organik fazın varlığı uygulama alanlarını kısıtlamaktadır.

Eğer polimerzom üretimi için pH ve sıcaklık gibi uyarı duyarlı yöntemlerden faydalanılıyorsa, herhangi bir organik çözücü sistemde olmadığı için biyomoleküllerin kapsülasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilebilir. Literatürdeki çoğu biyoaktif molekül bu yöntem kullanılarak kapsüllenmiştir (Lomas vd. 2007; Lomas vd. 2010; Matini vd. 2014). Örnek olarak plasmid DNA'sı pH duyarlı PMPC–b–PDPA polimerzom sistemi içerisine, ilk olarak blok kopolimeri ve plasmid DNA'sını asidik bir tampon içerisinde çözüp daha sonra pH'ı yavaşça PDPA'nın pKa değerinin üzerine çıkarılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sırasında asidik bölgede protonlanmış olan tersiyer amin grubu pK_a değerinin üzerine çıktıktan sonra deprotasyona uğrayarak hidrofobik karakter kazanır ve plasmid DNA'sı oluşan polimerzom içerisine kapsülendir (Lomas vd. 2007; Lomas vd. 2010).

1.3.2. Polimerzom üretimi sonrası kapsülasyon

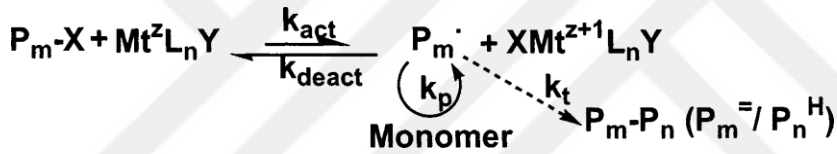
Biyoaktif maddeleri kapsüllemenin bir diğer yolu da polimerzom üretimi sonrası kapsülasyon işlemi gerçekleştirmektir. Bu strateji, kapsüllenecek molekülün çözeltisinin direkt olarak polimerzom süspansiyonuna enjekte edilerek ilacın polimerzom içerisine difüzyonu aracılığıyla gerçekleştirilir (Ahmed vd. 2004; Ahmed vd. 2006; Ahmed vd. 2006). Bu yöntem oldukça başarılıdır ve yaklaşık %60'lık bir kapsülasyon verimi elde edilmiştir. Ancak, yöntem oldukça yavaştır ve ayrıca difüzyonu kolaylaştırmak amacıyla ekstra katkılar gerektirebildiği için işlem sonrası ekstra saflaştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır (Choucair vd. 2005). Ayrıca, eklenen katkıların derişiminin yüksek oluşu vezikülün içinde ve dışında ozmotik basınç farklılığına neden olarak polimerzom yapısını bozabilir.

Daha ılımlı ve çok daha yönlü bir yöntem ise elektroporasyon yöntemidir. Bu yöntem polimerzomun yapısını ve boyutunu bozmadan çeşitli biyomakromoleküllerin (protein, DNA, RNA ve ilaç gibi) kapsüllemesine olanak sağlar (Choucair vd. 2005). Yöntem, bir polimerzom sistemine kapsüllenecek molekülün uygun tampon içerisinde dışarıdan bir elektrik alan uygulanarak gerçekleşmektedir. Uygulanan elektrik alan sistemin iletkenliğini artırır ve bu durum zar yapısında artan geçirgenlikle sonuçlanır. Oluşan gözenekler vasıtasıyla kargo molekülünün lümen içerisine kapsülasyonu gerçekleşir. Belirli bir sürenin sonunda gözenekler kendiliğinden kapanır ve membran eski bütünlüğüne tekrar kavuşur. Çok yönlü ve pek çok biyomolekül kapsülasyonu için uygun olan bu yöntem oldukça yeni olduğu için halen bilimsel olarak geliştirilmesi ve farklı sistemler için optimize edilmesi gerekmektedir.

1.4. Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu

Binlerce farklı bileşimde, yılda yaklaşık 100 milyon ton polimer üretmek için geleneksel radikalik polimerizasyon (RP) kullanılmaktadır. Ancak, bu teknikle polimer mimarisini kontrol etmek çok zordur. Bununla birlikte, dinamik denge kavramı RP tekniklerine dahil edildiği zaman zincir topolojisi bakımından istenilen mimaride (yıldız tipi, tarak tipi, fırça tipi), bileşimde (blok, aş, ardışık), özellikte ve nispeten düşük molekül ağırlığı dağılımında polimerlerin sentezlenmesine olanak sağlamıştır. Bu teknikler, reaksiyon ortamında az miktarda bulunan ve büyümekte olan serbest radikaller ile büyük miktarlarda pasif halde bulunan türler arasında kurulan hızlı bir dengeye dayanmaktadır. Atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP), tersinir ekleme-parçalama zincir transferi (RAFT) ve nitroksit aracılı polimerizasyon (NMP) bu tekniklerden bazılarıdır.

ATRP, atom transfer radikal katılma (ATRA) olarak adlandırılan, alkil halojenürlerle alkenlerin geçiş metal katalizi ile gerçekleşen katılma reaksiyonuna dayanmaktadır (Matyjaszewski 2012). Çok bileşenli bir polimerizasyon tepkimesi olan ATRP; monomer, başlatıcı olarak alkil halojenür ve kataliz olarak uygun ligand ile birlikte geçiş metallerinden oluşmaktadır. Aşağıda bir ATRP tepkimesindeki mekanizmalar özetlenmiştir (Şekil 1.12):



Şekil 1.12. Bir ATRP tepkimesini genel görünümü (Eşitlikte polimerizasyon dengesine tüm katkılar gösterilmiştir) (Tang vd. 2006)

Başarılı bir ATRP reaksiyonu, bir geçiş metal kompleksi katalizörlüğünde, pasif halde bulunan alkil halojenürün, halojenür grubunun tersinir bir şekilde çıkarılmasıyla aktifleşmesini temel alır. Denge durumunda, aktivasyon basamağında (k_{act} hız sabitiyle) düşük oksidasyon halindeki geçiş metal katalizörü (Cu^+) ile alkil halojenür bağının (P_m-X) homolitik kırılması sonucu bir alkil radikali ($P_m\cdot$) oluşturulur. Eş zamanlı olarak, oluşturulan alkil radikali ($P_m\cdot$), yüksek oksidasyon halindeki geçiş metal iyonu (Cu^{2+}) tarafından deaktive (k_{deact} hız sabiti ile) edilmeden önce k_p hız sabiti ile monomere eklenir. Bu tersinir ve tekrarlanan döngüler ile artan molekül ağırlığıyla birlikte düşük polidispersif indekse sahip polimerler oluşturulur. Kalıcı radikal etkiden dolayı da sonlanma hızı önemsiz kalır. Bir ATRP reaksiyonu için hız denklemi Eşitlik (1.4)'te verilmiştir (Tang vd. 2006).

$$\ln\left(\frac{[M]_0}{[M]_t}\right) = \left(\frac{k_p k_{act} [P_m X] [Cu^+]}{k_{deact} [(CuX)^+]}\right) t \quad (1.4)$$

ATRP tekniğiyle gerçekleştirilen polimerizasyonda elde edilen polimerin yapısı ve molekül ağırlığı üzerine etki eden faktörler, sırasıyla, *monomerin cinsi*, *başlatıcının türü*, *katalizörün cinsi*, *kullanılan çözücü sistemi*, *sıcaklık* ve *tepkime süresi* olarak sıralanabilir. Aşağıda, bu faktörlerin etkisi kısaca açıklanmıştır.

a) Monomerin etkisi: ATRP ile çeşitli monomerler kullanılarak polimerizasyon reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Tipik monomerler, (met)akrilatlar, (met)akrilamitler, stirenler ve akrilonitrillerdir. Aynı koşullar altında dahi her monomerin, aktif ve uyku durumundaki türleri için kendi atom transfer denge sabiti mevcuttur. Sonlanma basamağı haricinde herhangi bir yan reaksiyon olmadığı durumda denge sabitinin büyüklüğü ($K_d = k_{act}/k_{deact}$) polimerizasyon hızını belirler. Denge sabiti eğer çok küçük olursa ya tepkime gerçekleşmez ya da çok yavaş gerçekleşir. Bunların birlikte, denge sabiti çok büyük ise, yüksek radikal derişiminden dolayı polimerizasyonun henüz başlangıcında sonlanma tepkimesinin gerçekleşmesine neden olur. Bu durum, deaktivatör görevi gören yüksek oksidasyon haline sahip geçiş metal iyonu miktarını arttırarak tepkime dengesinin uyku durumundaki türler yönüne kaymasına neden olur. Bu durumda tepkime hızını yine düşürür. İlaveten her monomerin bir radikal uzama hızı mevcuttur. Dolayısıyla, her bir spesifik monomer için uzayan radikallerin derişimi ve radikal deaktivasyon hızı polimerizasyon kontrolünü sağlamak için ayarlanmalıdır. Ancak, ATRP katalitik bir proses olduğu için tüm denge sadece radikale (monomere) ve uyku halindeki türe değil aynı zamanda eklenen geçiş metaline de bağlıdır (Matyjaszewski vd. 2001).

b) Başlatıcıların etkisi: Bir ATRP reaksiyonunda başlatıcının ana görevi büyüyen polimer zinciri sayısını belirlemektir. Eğer başlama basamağı hızlı, transfer ve sonlanma basamakları ihmal edilebilir bir düzeyde ise büyüyen zincir sayısı sabittir ve başlangıçtaki başlatıcı derişimine eşittir. Teorik molekül ağırlığı ya da polimerizasyon derecesi (PD) başlatıcının başlangıçtaki derişimiyle birlikte artar. ATRP’de alkil halojenürler (RX’ler) başlatıcı olarak kullanılırlar. Polimerizasyon hızı RX derişimine göre birinci mertebededir. Dar bir molekül ağırlığı dağılımına sahip bir polimerizasyon için halojenür grubu hızlı ve seçici biçimde geçiş metal iyonu ile büyüyen zincir arasında sürekli olarak değişmelidir. Özellikle, halojenür grubu olarak bromürler ya da klorürler kullanıldığında çok iyi bir molekül ağırlığı dağılımı elde edilir. Genellikle α -karbonu üzerinde aril, karbonil, allil gibi aktive edici gruplar bulunduran alkil halojenürler ATRP başlatıcısı olarak kullanılabilir. Polihalojenlenmiş bileşikler (CCl_4 , $CHCl_3$ v.b.) ve zayıf R-X bağına sahip bileşikler de (N-X, S-X, O-X gibi) ATRP başlatıcısı olarak kullanılabilir. Başlatıcı bileşik makromoleküler bir türe bağlandığı zaman makro başlatıcılar elde edilmiş olur ve blok/aşı kopolimerlerin sentezi için kullanılabilir. Bununla birlikte, R-X bağının sadece homolitik olarak değil heterolitik olarak da kırılacağı dikkate alınmalıdır. Bu durum çoğunlukla seçilen başlatıcıya ve geçiş metal kompleksine bağlıdır. Örneğin, bakır katalizli stiren polimerizasyonunda C-X bağının heterolitik kırılmasından veya radikalın karşılık gelen karbokatyona yükseltgenmesinden dolayı p-metoksistiren yan reaksiyonu meydana gelir (Matyjaszewski vd. 2001).

c) Katalizörler: Katalizör, aktif türler ile pasif türler arasındaki dinamik değişimi ve atom transfer dengesinin seviyesini belirlediği için ATRP’deki en önemli bileşendir. Etkili bir geçiş metal katalizörü için bazı gereksinimler vardır. İlk olarak metalik merkez iki farklı oksidasyon durumuna kolayca geçiş yapabilmelidir. İkinci olarak, metal merkezin halojenlere karşı belirli bir afinitesi olması gerekmektedir. Üçüncü gereksinim, metal etrafındaki koordinasyon küresi oksidasyon ile genişleyerek seçici olarak halojeni koordinasyon küresine alabilmelidir. Son olarak, ligand metal iyonu kuvvetli bir

kompleks oluşturabilmelidir. Pek çok geçiş metali ATRP yöntemi için denenmiştir. Ancak, bunlar arasında en yaygın şekilde kullanılan bakır iyonlarıdır.

d) Çözücü türü: ATRP, çözelti fazında veya heterojen (emülsiyon, süspansiyon) ortamlarda gerçekleştirilebilmektedir. ATRP yönteminde benzen, toluen, anisol, difenil eter, etil asetat, aseton, dimetil formamit, etilen karbonat, karbon dioksit, su ve daha pek çok farklı çözücü kullanılmaktadır. Özellikle, sentezlenen polimer kendi monomeri içerisinde çözünmediği durumlarda mutlaka bir çözücü kullanılmaktadır. Bu aşamada çözücü seçimini etkileyen çok çeşitli faktörler vardır. Bunlardan en önemlisi çözücünün zincire transferinin minimum seviyede olmasıdır. Ayrıca, katalizör ve çözücü arasındaki etkileşimler, çözücü tarafından katalizör zehirlenmesi ve çözücünün neden olduğu yan reaksiyonlar da ihtimal dahilinde tutulmalıdır. Örneğin, n-bütül akrilatın $\text{CuBr}(\text{bpy})_3$ (bpy:2-2' bipyridin) katalizörü ile çözücü olarak etilen karbonat kullanıldığında, bulk haline göre ATRP reaksiyonunun daha hızlı ilerlediği bulunmuştur. Bulk sistemde katalizör yapısı halojen köprülü dimerik Cu(I) yapıda bulunurken, etilen karbonat içerisinde monomerik Cu(I) halinde bulunması bu hız farklılığının nedeni olarak belirtilmiştir (Matyjaszewski vd. 2001).

e) Sıcaklık ve tepkime süresi: Sıcaklık artışıyla birlikte atom transfer denge sabiti ve zincir uzama hız sabiti arttığı için ATRP tepkimesinin hızı da artmaktadır. Radikalik uzamanın radikalik sonlanmaya göre daha yüksek aktivasyon enerjisine sahip olmasının sonucu olarak yüksek sıcaklıklarda daha yüksek k_p/k_t oranı ve daha iyi kontrol sağlanır. Bununla birlikte zincir transferlerinin ve yan reaksiyonların da yüksek sıcaklıklarda gerçekleşme olasılığı artar. Bu yüzden monomere ve istenilen molekül ağırlığına da bağlı olarak optimum sıcaklıklarda çalışılması gerekmektedir. Yüksek monomer dönüşümlerinde, zincirin büyüme hızı dikkat çekici bir şekilde düşer; bununla birlikte yan tepkimelerin hızı monomer derişimine bağlı olmadığı için dikkate değer herhangi bir değişim gözlenmez. Tam bir monomer dönüşümüne neden olan uzun tepkime süreleri sentezlenen polimerin polidispersitesini arttırmaz; bunun yerine fonksiyonel uç grubun (R-X) kaybedilmesine neden olur. Özellikle, blok kopolimer sentezi için uç grup fonksiyoneliyesinin yüksek olduğu polimerler elde edebilmek için monomer dönüşümü %95'i aşmamalıdır (Matyjaszewski vd. 2001).

1.5. Tezin Amacı

Bu tezde, atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP) ile farklı molekül ağırlıklarında polietileglikol-blok-poli(N,N-dimetilaminoetil metakrilat) (PEG-b-PDMAEMA) diblok kopolimerini sentezlemek ve bu kopolimerlerin sulu çözeltide sıcaklık ve pH değişimine bağlı olarak polimerzom oluşturma davranışlarını araştırmak amaçlanmıştır.

2. KAYNAK TARAMASI

Çevresel sıcaklığa bağlı olarak çözünürlüğü değişen polimerler sıcaklık duyarlı polimerler olarak adlandırılmaktadır. Bu çözünürlük değişimi polimerin yapısındaki konformasyonel değişimlerden kaynaklanmaktadır. Polimerin çözünürlüğünün ya da konformasyonunun değiştiği sıcaklığa *kritik çözelti sıcaklığı* (CST) denilmektedir. Isı duyarlı polimerler iki kategoriye ayrılırlar: i) yüksek kritik çözelti sıcaklığına (UCST) sahip olan polimerler ve ii) *düşük kritik çözelti sıcaklığına* (LCST) sahip olan polimerler. UCST'ye sahip olan polimerler belirli bir sıcaklığın altında suda çözünmezken, aynı sıcaklığın üzerinde suda çözünmeye başlarlar. Ancak, UCST özelliğine sahip polimerler oldukça kısıtlıdır ve literatürdeki çalışmalar da dolayısıyla azınlıktadır. Diğer taraftan, LCST'ye sahip polimerler geçiş sıcaklığının altında suda çözünürken, bu sıcaklığın üzerinde ise suda çözünmezler. Geçiş sıcaklığının üzerine çıkıldığında konformasyonları suda çözünür zincir konformasyonundan suda çözünmeyen küresel konformasyona dönüşür. LCST değerinin altında polimer zinciri kendi içinde veya başka bir polimer zinciri ile hidrojen bağı yapmaktan ziyade, su molekülleri ile hidrojen bağı yapmayı tercih eder. Bununla birlikte, bir polimerin LCST geçişi gözlemlenebilir bir durumdur. LCST değerinin altındaki bir polimerik çözelti şeffaf ve homojenken, LCST'nin üzerinde bulanık hale gelir. Bu nedenle, LCST, bulutlanma noktası (CP) olarak da adlandırılır. Sıcaklığa duyarlı polimerlerin LCST'si, polimer zincirindeki substitüye grupların doğasından, zincir uzunluğundan ve molekül ağırlığından etkilenir. Ayrıca, LCST'nin, polimerde hidrojen bağı oluşumunu etkileyen tuz derişimi, sürfektant ve yardımcı çözücü gibi katkılarla da etkilendiği gösterilmiştir (Doberenz vd. 2020).

Literatürde mevcut olan ısıya duyarlı polimerler incelendiğinde en yaygın olarak kullanılan polimer PNIPAM'dır. 32°C'de faz geçişi gözlenen PNIPAM ile ilgili literatürde pek çok uygulama ve araştırma mevcuttur. Özellikle sıcaklığa duyarlı polimerzom sistemlerinde PNIPAM düşük LCST değeri nedeniyle sıcaklığa duyarlı hidrofobik blok olarak en çok göze çarpan polimerdir. Chen vd. (2006), PCMA-b-PNIPAM blok kopolimerleri ile 32°C'de faz geçişi gösteren polimerzom üretmişlerdir. PCMA bloğunun UV ışık altında çapraz bağlanmasıyla yapının kararlılığını arttırmışlardır. Oluşturulan polimerzom sisteminde, LCST değerinin altında PNIPAM bloğu zincir morfolojisinde olup madde geçişine izin verirken, LCST değerinin üzerinde küresel morfolojiye geçerek PCMA zar yapısı üzerinde toplanır ve madde geçişine izin vermez.

Quin vd. (2006), PEO-b-PNIPAM blok kopolimerini kullanarak farklı bir sıcaklığa duyarlı polimerzom sistemi geliştirmiştir. Geliştirdikleri sistemde fizyolojik sıcaklık olan 37°C'de blok kopolimerlerin polimerzom yapılarını meydana getirdiğini göstermişlerdir. Polimerzom içerisine kapsüledikleri DOX.HCl'nin salım davranışlarını 27°C (LCST değerinin altında) ve 37°C'de incelemişlerdir. Huang vd. (2013), PNIPAM bloğunu sığır serum albümin, myoglobin ve hemoglobin gibi proteinlere bağlayarak elde ettikleri hibrit yapılar ile "proteinzom" olarak da adlandırılan mikron boyutlarında vezikül yapılarını oluşturmuşlardır. Bu yapıların sıcaklık değişimiyle geçirgenliklerini kontrol ederek protocell özelliklerini araştırmışlardır. Li vd. (2006), PAMPA-b-PNIPAM blok kopolimerlerinin oda sıcaklığında unimerleri halinde bulunduğunu ve sıcaklık artışıyla birlikte polimerzomların oluştuğunu göstermiştir. Yapılan çalışmada blok kopolimerin derişiminin ve ısıtma hızının polimerzomların boyutunu ve boyut

dağılımını etkilediği belirlenmiştir. Ayrıca, hazırlanan polimerzomun zıt yüklü bir polielektrolit ile çapraz bağlarla bağlanabildiği de gösterilmiştir.

Bazı pH'a duyarlı olan tersiyer amin gruplarını içeren polimerlerin sıcaklığa bağlı olarak asitlik sabitleri (pK_a) değişmektedir. Bu polimerler arasında poli(N,N-dimetilaminoetil metakrilat) (PDMAEMA) en çok göze çarpan polimerdir. Oda sıcaklığında PDMAEMA, bütün pH değerlerinde suda çözünmektedir. Bununla birlikte nötr ve bazik pH'larda molekül ağırlığına da bağlı olarak sıcaklığa duyarlı hale gelmektedir. Agut vd. (2010), PDMAEMA-b-PGA blok kopolimerleri ile hem sıcaklığa hem de pH'a duyarlı polimerzomlar üretmiştir. Blok kopolimerin izoelektrik noktasına yakın pH değerlerinde vezikül yapıları oluşturduğunu, 40°C LCST değerine sahip olduğunu ve blok kopolimerin kompozisyonuna bağlı olarak oluşturulan agregatların yapılarının değiştiğini göstermişlerdir. Pietsch vd. (2012), PDEGMA-b-PDMAEMA blok kopolimerinde PDEGMA bloğunu hidrofilik blok olarak sabit tutarak farklı molekül ağırlıklarında PDEGMA-b-PDMAEMA blok kopolimeri sentezlemiştir. Yapılan ölçümler sonucunda molekül ağırlığı arttıkça LCST değerinin de arttığı bulunmuştur. Bununla birlikte, sıcaklık artışıyla birlikte polimerzomların multi-lamelar yapıdan unilamelar yapıya geçişi gözlenmiştir. Li vd. (2007), PDMAEMA-b-PNIPAM blok kopolimeri ile sıcaklığa duyarlı polimerzom üretmiştir. Blok kopolimerler 25°C'de unimerleri halinde bulunurken 50°C'de polimerzom yapıları gözlenmiştir. NaAuCl₄ tuzunun polimerzom zarı içerisinde nanoaltın'a indirgenmesiyle zar bütünlüğü sağlanmış ve bu sayede 25°C'de dahi polimerzom yapılarının kararlılığını koruduğu gözlenmiştir. Zou vd. (2015), PADS-b-PDMAEMA blok kopolimerlerini kullanarak hem sıcaklığa hem de CO₂'e duyarlı polimerzomlar oluşturmuşlardır. Amidin ve DMAEMA birimlerinin her ikisi de CO₂'e duyarlı iken yalnızca PDMAEMA bloğu sıcaklığa duyarlıdır. Yapılan çalışmada geliştirilen polimerzomun LCST değeri 42,8°C olarak ölçülmüş ve bu sıcaklıkta misel/vezikül geçişinin gerçekleştiği gösterilmiştir. Model ilaç olarak da DOX.HCl sistem içerisine kapsüllenmiştir.

Biyouyumlu oluşu nedeniyle PEG polimerzom üretmek için amfifilik blok kopolimerlerde hidrofilik blok olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Yapılan kaynak taramaları sonucunda PEO-b-PDMAEMA blok kopolimerinin sıcaklığa ve pH'a duyarlı davranışıyla ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Qiao vd. (2010), sentezledikleri PEG₁₁₃-b-PDMAEMA₉₄ blok kopolimerini DNA taşıyıcı vektör olarak kullanmıştır. Yapılan çalışmada PEG₁₁₃-b-PDMAEMA₉₄ blok kopolimerinin PDMAEMA₉₄ homopolimerine göre sitotoksitesinin azaldığını ve daha yüksek adjuvant etkinliği gösterdiğini bildirmişlerdir. Ancak, sentezlenen blok kopolimer ile misel sistemleri oluşturulmuştur. Housni vd. (2010), PEO-b-PDMAEMA blok kopolimerini kullanarak nanoaltın parçacıklarının su içindeki dispersiyonu esnasındaki agregasyonlarını önlemişlerdir. Sentezlenen blok kopolimerin LCST değeri piren molekülü kullanılarak floresans spektrofotometresi ve türbidimetre ölçümleriyle belirlenmiştir. Wei (2015), kemosenör çalışmalarında CO₂ tayini için PEO-b-PDMAEMA blok kopolimerlerini ve Na₉DyW₁₀O₃₆ (polioksimetalat) lüminesans bileşiğini kullanmışlardır. Yapılan çalışmada PDMAEMA bloğunun CO₂'e duyarlılığından faydalanılarak, Na₉DyW₁₀O₃₆ lüminesans malzemesindeki floresans şiddeti takip edilerek CO₂ tayini gerçekleştirilmiştir.

Yapılan literatür taraması göstermektedir ki PEG-b-PDMAEMA blok kopolimerinin sıcaklığa ve pH'a duyarlılığından çeşitli uygulamalarda faydalanılmasına

rağmen bu blok kopolimerin sıcaklığa, pH'a ve PDMAEMA bloğunun uzunluğuna bağlı olarak polimerzom oluşumuyla ilgili herhangi bir çalışma mevcut değildir.



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu çalışmada, sıcaklık ve pH duyarlı blok kopolimerleri sentezlemek amacıyla polietilen glikol monometil eter (PEG-2000, TCI Chemicals), α -bromo izobütiril bromür (Aldrich), trietilamin (Et_3N , Merck), toluen (Merck), sodyum klorür (NaCl , Riedel), sodyum bikarbonat (NaHCO_3 , Merck), magnezyum sülfat (MgSO_4 , Merck), diklorometan (DCM, Merck), bakır (I) bromür (CuBr , Sigma-Aldrich), N,N,N',N'',N'' -pentametildietilentriamin (PMDETA, Aldrich), 2-dimetilaminoetil metakrilat (DMAEMA, ABCR), tetrahidrofuran (THF, Merck), 2-bütanon (Merck), aseton (Tekkim) ve nötral alümina (Al_2O_3 , Merck) kullanılmıştır.

Polimerlerin sentezi esnasındaki ısıtma ve karıştırma işlemlerinde ICA RTC Classic marka manyetik karıştırıcı ve 2 Mag Magnetic Motion marka çoklu karıştırıcı, pH ölçümlerinde Mettler Toledo T50 model pH metre kullanılmıştır. Kurutma işlemlerinde etüvler, tartımlar için $\pm 0,0001$ g hassasiyete sahip Chyco Balance marka JL-200 model hassas terazi kullanılmıştır.

Sentezlenen polimerlerin yapısındaki fonksiyonel gruplar Fourier transform infrared (FTIR) spektrometresi ile yapılan ölçümlerle belirlenmiştir. FTIR analizleri, Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Bölümü'nde bulunan Perkin Elmer TWO model FTIR spektrometresiyle $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında ATR tekniğiyle gerçekleştirilmiştir. Polimerzomların hidrodinamik çapları, Malvern Zetasizer ZS cihazı ile dinamik ışık saçılımı (DLS) tekniğine göre ölçülmüştür. Oluşturulan polimerzomların boyutları transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ölçümleri ile belirlenmiştir. TEM ölçümleri için Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Bölümü'nde bulunan Zeiss Leo 906E marka TEM cihazı kullanılmıştır. Ölçümler, karbon kaplı bakır gridler üzerine kaplanmış örnekler kullanılarak 80 kV 'da gerçekleştirilmiştir. Elde edilen TEM görüntüleri ImageJ programı ile değerlendirilerek polimerzomların ortalama boyutları belirlenmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Amfifilik blok kopolimerlerin sentezi ve karakterizasyonu

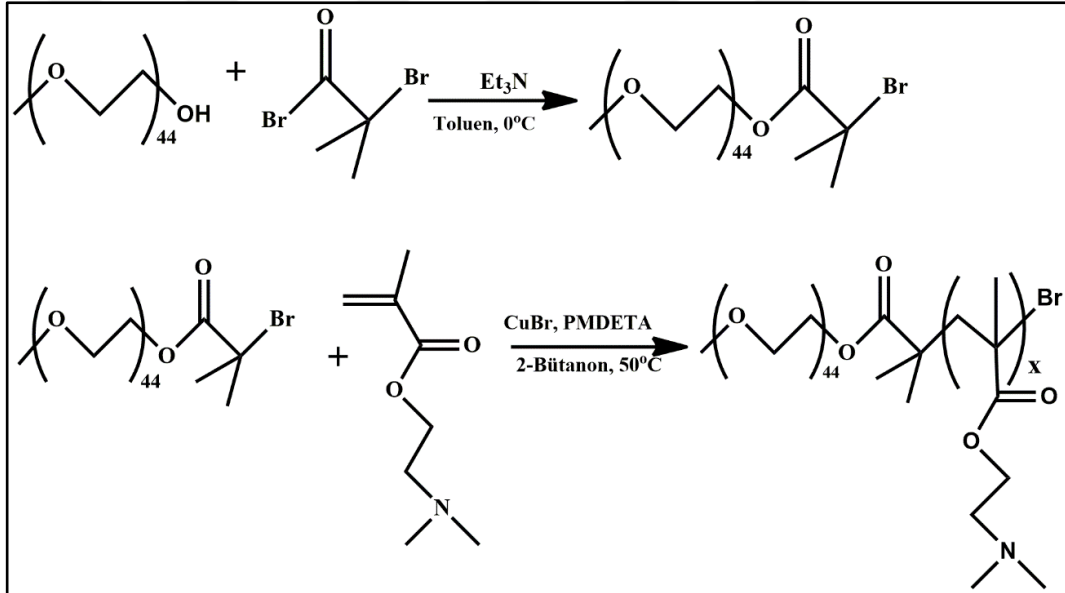
3.2.1.1. Makro başlatıcı (PEG-Br) sentezi

Polietilenglikol metil eter ($M_n:2000$) ve 2-bromo-izobütiril bromür moleküllerinin Et_3N katalizörlüğünde esterleşme reaksiyonuyla gerçekleştirilmiştir (Yu vd. 2009). 100 mL 'lik 3 boyunlu tepkime balonuna 5 g polietilen glikol monometil eter (PEG-OH) tartılmış ve sistem kapatılarak vakum altında 60°C 'de 1 saat boyunca ısıtılmıştır. Böylece PEG-OH içerisinde mevcut olabilecek nemin uzaklaşması sağlanmıştır. Ardından sistem içerisine N_2 akışı sağlanarak inert bir atmosfer elde edilmiştir ve içine bir damlatma hunisi yardımıyla 60 mL kuru toluen ilave edilmiştir. Karışım oda sıcaklığına geldikten sonra, sisteme $1,4\text{ mL}$ Et_3N ilave edilmiş ve 1 saat oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Bu sürenin sonunda buz banyosuna alınan karışım 0°C 'ye soğutulmuştur. Bu sıcaklıktaki çözeltiye, 5 mL kuru toluen içerisinde çözünmüş $1,25\text{ mL}$ 2-bromoizobütiril bromür çözeltisi sıcaklık devamlı kontrol

edilerek yavaş yavaş 1 saatte ilave edilmiştir. Daha sonra, karışım 2 saat boyunca inert atmosfer altında buz banyosunda karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığına alınmış ve burada 24 saat boyunca N_2 gaz akışı altında karışmaya bırakılmıştır. Tepkime sonucunda sarı renkli bulanık bir karışım elde edilmiştir. Ele geçen sarımsı bulanık karışım süzgeç kağıdından süzöldükten sonra içindeki çözücü bir evaporatör yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Evaporasyondan sonra elde edilen tepkime ürünü 50 mL CH_2Cl_2 içerisinde çözülmüş ve sırasıyla, ikişer kez 15 mL doymuş $NaHCO_3$ ve $NaCl$ sulu çözeltileri ile yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından polimer çözeltisi $MgSO_4$ ile kurutulmuştur. Elde edilen PEG-Br, sıcak izopropil alkol içerisinde çözülüp 3 gün boyunca kristallenmeye bırakılarak saflaştırılmıştır. Kristallenen beyaz PEG-Br süzülerek ayrılmış ve vakum altında 1 gün boyunca kurutulmuştur. Sentezlenen PEG-Br'nin yapısı FTIR ve 1H NMR ölçümleriyle aydınlatılmıştır.

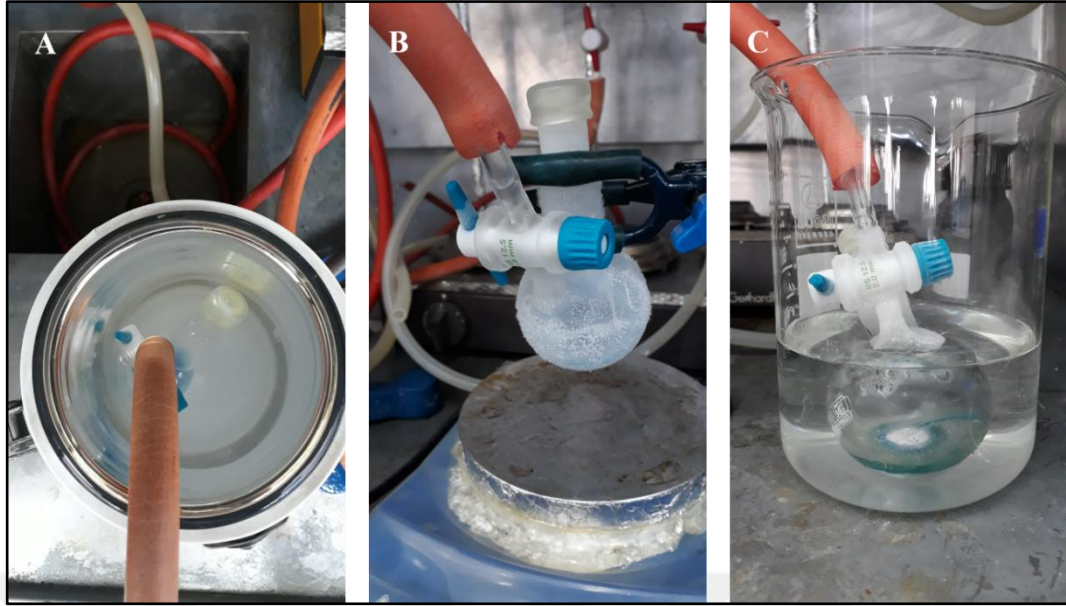
3.2.1.2. PEG-b-PDMAEMA blok kopolimerlerinin sentezi

PEG-b-PDMAEMA blok kopolimeri ATRP yöntemiyle sentezlenmiştir. Sentez akış şeması Şekil 3.1'de verilmiştir.

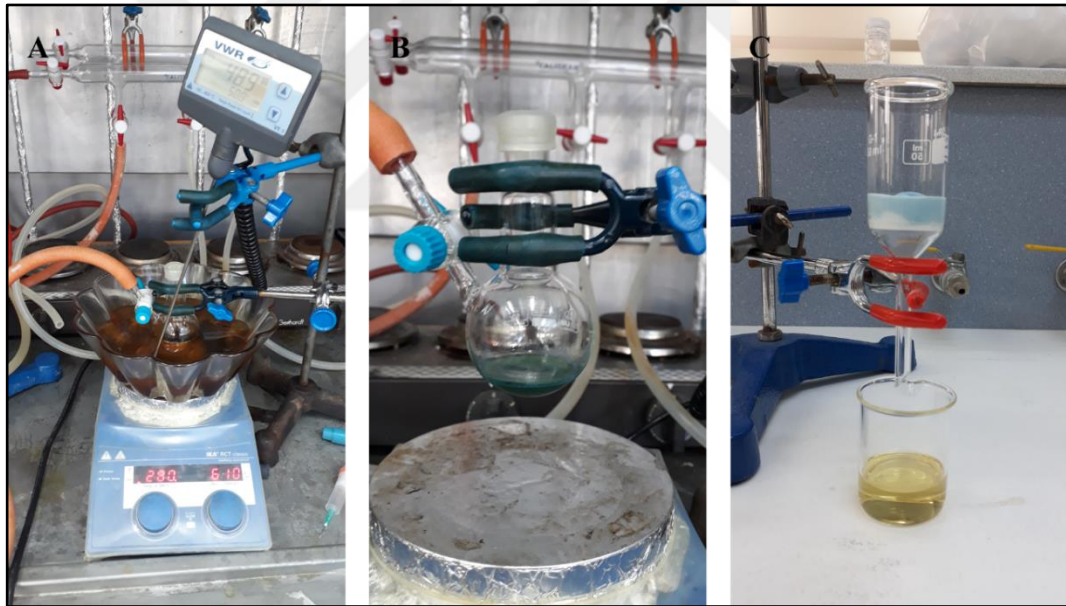


Şekil 3.1. PEG-b-PDMAEMA blok kopolimerinin sentez akış şeması

220 mg (0,1 mmol) PEG-Br, 17 mg CuBr (0,1 mmol), $n_{DMAEMA:n_{PEG-Br}}$ oranı sırasıyla 70, 95 ve 150 olacak biçimde DMAEMA, 0,0210 mL PMDETA (0,1 mmol) ve 3 mL 2-bütanon 50 mL'lik bir Schlenk balonuna ilave edilmiştir. Tepkime balonunun ağzı septum ile kapatılarak hızlı bir şekilde sıvı azot içerisinde 3 dakika boyunca tutularak dondurulmuştur. Dondurma işlemini takiben 3 dakika boyunca vakumlama ve sonrasında 3 dakika boyunca su banyosunda oda sıcaklığında eritme işlemi gerçekleştirilerek tepkime karışımındaki çözünmüş gazlar uzaklaştırılmıştır. *Freeze-Pump-Thaw* tekniği olarak adlandırılan bu işleme (Şekil 3.2), tepkime balonunda eritme basamağı sırasında gaz kabarcığı çıkmayınca kadar devam edilmiştir.



Şekil 3.2. Freeze–Pump–Thaw yöntemiyle gaz uzaklaştırma işlemi. Sıvı N₂ içerisinde dondurma (A), vakumlama (B) ve eritme (C) işlemleri



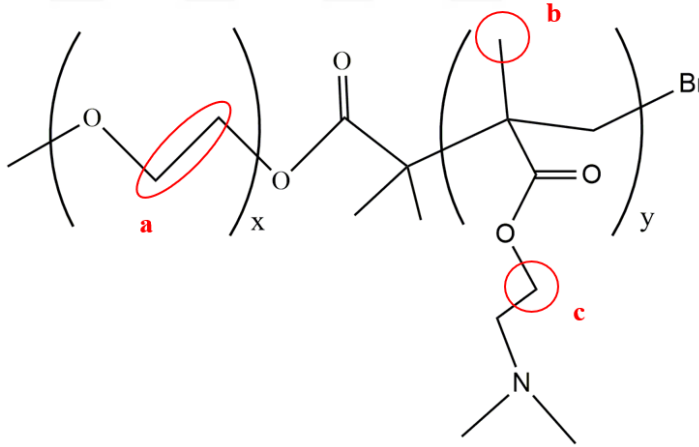
Şekil 3.3. PEG–b–PDMAEMA blok kopolimerinin sentezi. Kapalı sistem tepkime düzeneği (A), tepkime sonrası ürün (B), ürünün saflaştırma için nötral alümina kolondan geçirilişi (C)

PEG–b–PDMAEMA blok kopolimerinin sentez adımları Şekil 3.2 ve 3.3'teki resimlerde görülmektedir. Gaz uzaklaştırma işlemi tamamlandıktan sonra tepkime balonu N₂ gazı ile doldurulmuş ve geri soğutucu altında (veya kapalı sistemde) 19 saat boyunca yağ banyosunda karışmaya bırakılmıştır. Tepkimeyi sonlandırmak için N₂ gaz akışı kesilerek tepkime balonuna 3 mL THF eklenmiştir. Polimer karışımındaki bakır türevlerini ayırmak için çözelti nötral alümina kolondan geçirilmiştir. Saflaştırma işlemi

sırasında hareketli faza (THF) karışan kolon dolgu maddesi 0,2 mikron filtre ile filtrelenmiştir. Elde edilen polimer çözeltisi, evaporatörde deriştirilerek soğuk n-hekzan ile çöktürülmüştür. Çöken polimer süzgeç kağıdı ile ayrılıp vakum etüvünde 35°C’de vakum altında 18 saat boyunca kurutulmuştur. Sentezlenen blok kopolimerler FTIR, ^1H NMR ve GPC analizleriyle karakterize edilmiştir.

3.2.1.3. PEG–b–PDMAEMA blok kopolimerlerinin sayıca molekül ağırlıklarının belirlenmesi

Sentezlenen PEG–b–PDMAEMA blok kopolimerlerinin polimerizasyon dereceleri ve sayıca molekül ağırlıkları ^1H NMR spektrumundaki pik integrallerinden belirlenmiştir. İlk olarak makro başlatıcıda (PEG-Br) bulunan etilen gruplarının polimerizasyon derecesi ve molekül ağırlığı, uç grup analizi olarak bilinen bir yöntemle hesaplanmıştır (Dong vd. 2010; Stubbs vd. 2017). Bunun için, PEG-Br zincirindeki metil ($-\text{CH}_3$) protonları ($\delta=3,37$ ppm) ile etilen ($-\text{CH}_2\text{CH}_2-$) (**a**) protonlarına ($\delta=3,65$ ppm) ait NMR piklerinin integralleri oranlanmıştır. PEG bloğunun polimerizasyon derecesi belirlendikten sonra PEG–b–PDMAEMA blok kopolimerinin polimerizasyon derecesi PDMAEMA bloğuna ait 0,89 ve 4,05 ppm kimyasal kayma değerlerinde ortaya çıkan, sırasıyla, metil ($-\text{CH}_3$) (**b**) ve metilen ($-\text{CH}_2-$) (**c**) protonlarına ait piklerin integrallerinin PEG bloğundaki etilen ($-\text{CH}_2\text{CH}_2-$) protonlarına (**a**) ($\delta=3,65$ ppm) karşılık gelen pik integraline oranlanması ile belirlenmiştir. Burada, öncelikle bir integral oranı ($\bar{I}\text{O}$) belirlenmiş, daha sonra bu oran PEG bloğunun polimerizasyon derecesi ile çarpılarak ($\text{PD}_{\text{DMAEMA}}=\bar{I}\text{O}\times\text{D}_{\text{DMAEMA}}$) PDMAEMA bloğunun polimerizasyon derecesi hesaplanmıştır. (Dong vd. 2010; Stubbs vd. 2017).



Şekil 3.4. Sentezlenen amfifilik blok kopolimerin yapısı ve NMR spektrumunda polimerizasyon derecesi belirlenmesi işlemlerinde kullanılan protonlar: (**a**) $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, (**b**) $-\text{CH}_3$ ve (**c**) $-\text{CH}_2-$ protonları

Sentezlenen kopolimerlerin molekül ağırlıkları ayrıca Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC) ile de belirlenmiştir. THF’da çözülen örnekler Agilent Marka 1260 Infinity model GPC ile ölçülmüştür.

3.2.2. Sıcaklık ve pH Duyarlı Polimerzom Oluşumlarının İncelenmesi

Sıcaklık ve pH duyarlı polimerzomlar, aşağıdan yukarıya yöntemler başlığı altında bulunan bir fiziksel uyarıcıya duyarlı yöntemlerden biri olan sıcaklık aracılığıyla elde edilmiştir. Daha önce de bahsedildiği gibi sıcaklığa duyarlı olan polimerzomlar, sıcaklığa duyarlı amfifilik blok kopolimerlerin, LCST değerlerinin üzerine ısıtılmasıyla oluşmaktadır. Bu amaçla, polimerzom oluşumu üzerine derişimin, pH'ın ve blok kopolimerinin molekül ağırlığının etkisini çalışmak için ilk olarak polimer çözeltilerinin LCST değerleri belirlenmiştir. LCST değerlerini belirlemek için hazırlanan polimer çözeltilerinin UV-Vis spektrofotometresi kullanılarak 500 nm'de, 20–70°C aralığında, 0,5°C/dk ısıtma hızıyla, 1°C'lik sıcaklık aralıklarıyla yüzde geçirgenlik değerleri ölçülmüştür. Yüzde geçirgenliğin sıcaklığa karşı çizilen grafiğinde geçirgenliğin %50'ye düştüğü sıcaklık LCST değeri kabul edilmiştir (Sidoli vd. 2019). Sıcaklık değişiminin polimerzom oluşumu üzerine etkisi ayrıca sıcaklığa bağlı olarak gerçekleştirilen dinamik ışık saçılımı (DLS) ölçümleriyle de incelenmiştir. Ölçümler, Malvern Zetasizer ZS cihazıyla gerçekleştirilmiştir. Belirli derişimde hazırlanan polimer çözeltileri uygun miktarda bir quartz küvete konulmuş polimer çözeltisinde varolan parçacıkların boyut değişimi 20–70°C aralığında iki derecelik artışlarla gerçekleştirilen hidrodinamik çap (R_H) ölçümleriyle takip edilmiştir.

Her bir kopolimerin LCST değeri belirlendikten sonra bu sıcaklığın üzerine çıkılarak hazırlanan polimerzom dispersiyonları optik mikroskop ve transmission elektron mikroskopu (TEM) ile incelenmiştir. Optik mikroskop ölçümleri Leica marka DMI8 model mikroskopa takılı Basler Aca 1920-155µ kamera ile gerçekleştirilmiş ve hazırlanan hücre ile sıvı formda görüntüler alınmıştır. Polimerzomların TEM görüntülerini almak için kopolimer çözeltileri LCST değerlerinin 10°C üzerine ısıtılmıştır. Bulanık halde hidrodinamik boyutu ölçülmüş bu karışımlardan 10 µL alınarak hızlıca karbon kaplı gridlere damlatılarak kaplanmıştır. Ölçümler, 80 kV'da gerçekleştirilmiş ve alınan görüntüler ImageJ programı ile değerlendirilerek parçacıkların boyut dağılımları belirlenmiştir.

3.2.2.1 Molekül ağırlığının polimerzom oluşumu üzerine etkisinin incelenmesi

Molekül ağırlığının polimerzom oluşumu üzerine etkisini belirlemek için sentezlenen farklı molekül ağırlıklarındaki PEG-b-PDMAEMA blok kopolimerlerinin ultrasaf su içerisinde %1 (a/h)'lik karışımları hazırlanmış ve oda sıcaklığında 1000 rpm'de 2 saat boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırmaya bırakılmıştır. Hazırlanan bu kopolimer çözeltilerinin LCST değerleri, UV-Vis spektrofotometresi kullanılarak 500 nm'de, 20–70°C aralığında, 0,5°C/dk ısıtma hızıyla, 1°C aralıklarla, absorbans (A) ölçümleri gerçekleştirilerek belirlenmiştir. Ölçülen absorbans değerleri denklem 3.1 kullanılarak yüzde geçirgenlik (%T) değerlerine dönüştürülmüş ve ardından %T'in sıcaklığa (°C) göre grafiği çizilerek farklı molekül ağırlığına sahip PEG-b-PDMAEMA blok kopolimerlerinin LCST değerleri belirlenmiştir. Sulu PEG-b-PDMAEMA çözeltilerindeki parçacıklarının molekül ağırlığına bağlı olarak boyut ve morfolojisi DLS ve TEM ölçümleriyle belirlenmiştir.

3.2.2.2. Derişimin polimerzom oluşumu üzerine etkisinin incelenmesi

Derişimin polimerzom oluşumu üzerine etkisini incelemek için, sentezlenen PEG–b–PDMAEMA blok kopolimerinin ultrasaf su içerisinde farklı derişimlerde [%0,1 (a/h), %0,2 (a/h), %0,4 (a/h), %0,6 (a/h), %0,8 (a/h) ve %1,0 (a/h)] karışımları hazırlanmıştır. Hazırlanan kopolimer karışımlarındaki polimer parçacıklarının polimerzom oluşturma davranışları sıcaklığa bağlı olarak gerçekleştirilen boyut dağılımlarının ölçülmesiyle incelenmiştir. Ayrıca, kopolimerlerin farklı derişimlerdeki LCST değerlerindeki değişim UV–Vis spektrofotometresi kullanılarak 500 nm’de, 20–70°C sıcaklık aralığında ve 0,5°C/dk ısıtma hızı ve 1°C’lik sıcaklık aralıklarıyla gerçekleştirilen yüzde geçirgenlik ölçümleriyle belirlenmiştir. Elde edilen yüzde geçirgenlik değerinin sıcaklığa bağlı değişimi farklı derişimlerdeki kopolimer çözeltileri için karşılaştırılarak derişimin LCST değeri üzerine etkisi belirlenmiştir.

3.2.2.3 pH’ın polimerzom oluşumu üzerine etkisinin incelenmesi

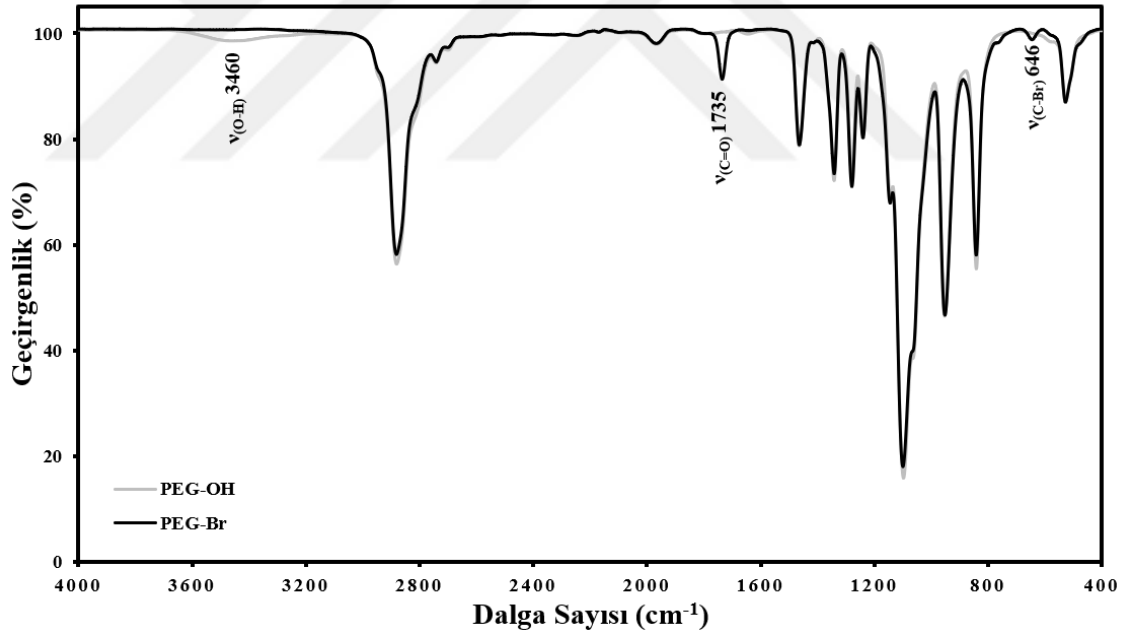
pH’ın polimerzom oluşumu üzerine etkisini incelemek için, belirlenen farklı molekül ağırlıklarındaki PEG–b–PDMAEMA blok kopolimerinin ultra saf su, pH 4, pH 7,4 ve pH 9 tamponları içerisinde %1 (a/h)’lik çözeltileri hazırlanmış ve oda sıcaklığında 1000 rpm’de 2 saat karıştırılmaya bırakılmıştır. Hazırlanan kopolimer çözeltilerindeki polimerzom oluşumları sıcaklığa bağlı olarak gerçekleştirilen DLS ve UV–Vis spektrofotometresi ölçümleriyle incelenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Sıcaklık ve pH Duyarlı Amfifilik Blok Kopolimerlerin Sentezi

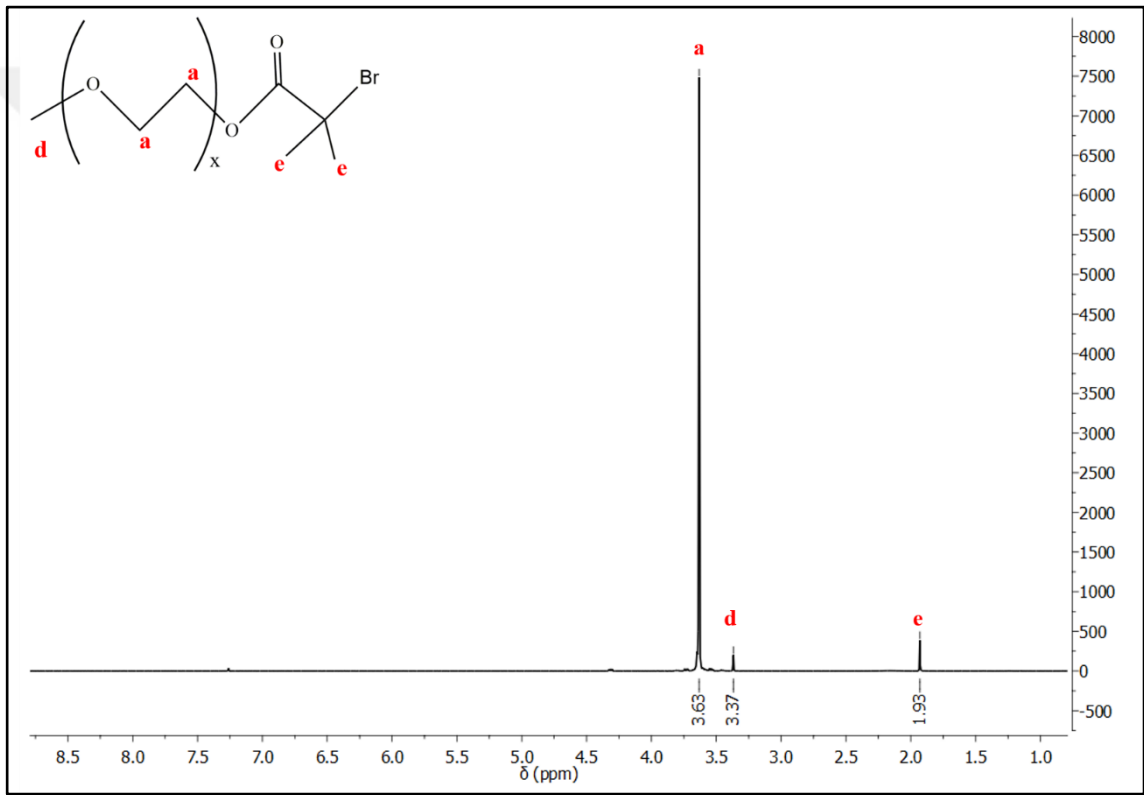
4.1.1. PEG–Br makro başlatıcı sentezi

Sentezlenecek kopolimerler PEG ($M_n=2000$) bloğunun üzerine ikinci bloğun ATRP yöntemine göre uzatılması biçiminde planlanmıştır. Bu nedenle öncelikle PEG ($M_n=2000$) polimerinin uç grubu Et_3N katalizörlüğünde α -bromo izobütil bromür ile bir esterleştirme tepkimesine göre bromlanmış ve böylece ATRP yönteminde gerekli olan makro başlatıcı, PEG–Br, sentezlenmiştir (Yu vd. 2009). Gerçekleştirilen bromlama tepkimesi sonucunda %55 verimle beyaz renkli, katı PEG–Br sentezlenmiştir. Sentezlenen PEG–Br FTIR ve NMR ölçümleriyle karakterize edilmiştir. Sentezlenen PEG–Br ve çıkış maddesi olan PEG ($M_n=2000$) FTIR spektrumları Şekil 4.1’de görülmektedir. Şekil 4.1’deki spektrumlar incelendiğinde PEG ($M_n=2000$)’e ait 3460 cm^{-1} ’deki –OH pikinin kaybolduğu görülmektedir. Bu durum, PEG’deki –OH grubu ile α -bromo izobütil bromürün HBr kondenzasyonu eşliğinde ester bağı oluşturduğunu göstermektedir. Ayrıca, α -bromo izobütil grubundan kaynaklanan 1735 cm^{-1} ’deki ester grubuna ait karbonil piki ile 646 cm^{-1} ’deki tersiyer C–Br piki makro başlatıcı PEG–Br’nin başarılı bir şekilde sentezlendiğini göstermektedir.



Şekil 4.1. Sentezlenen PEG–Br’nin ve PEG–OH ($M_n:2000$)’in FTIR spektrumları

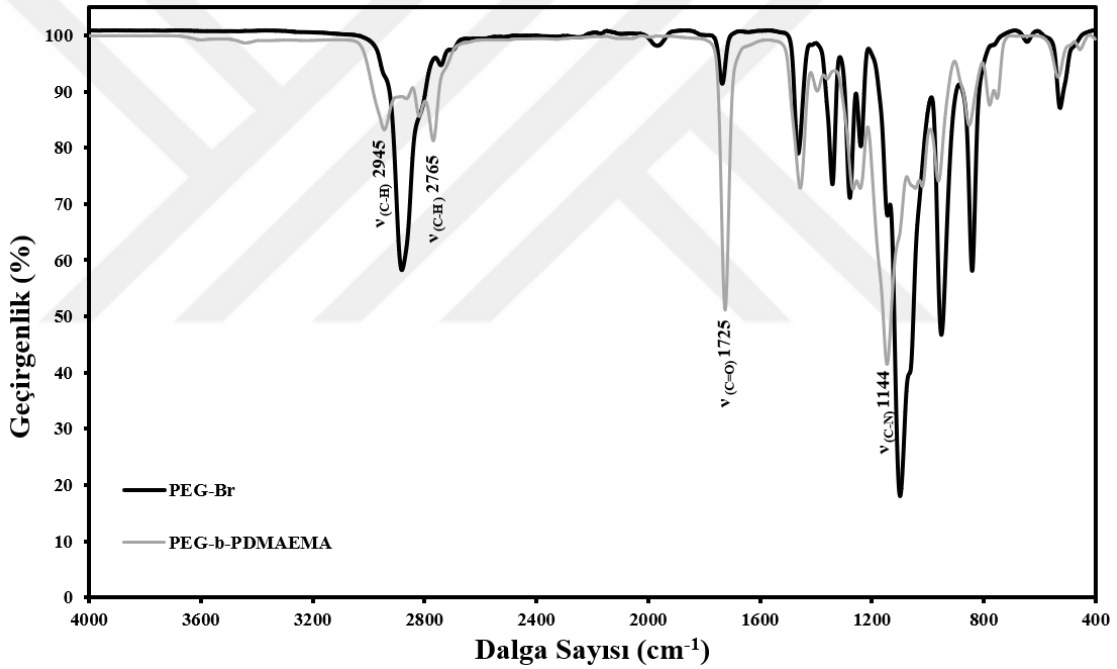
FTIR analizinin ardından gerçekleştirilen ^1H NMR analiziyle PEG-Br'nin ayrıntılı yapısı kesinleştirilmiştir. Yapılan ^1H NMR analizi sonucunda PEG ($M_n=2000$) zincirindeki ($\text{CH}_3\text{O}-$) grubundaki metil protonlarına ait $\delta=3,37$ ppm'deki kimyasal kayma değerleri ve ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$) grubundaki etilen protonlarına ait $\delta=3,63$ ppm'de gelen piklere ilaveten ($-\text{C}(\text{CH}_3)_2$) grubuna ait metil protonları için $\delta=1,93$ ppm'deki pik polimere α -bromo izobütil'in bağlandığını göstermektedir (Şekil 4.2). Ayrıca, NMR verileri uç grup analiz yöntemiyle değerlendirilerek polimerin molekül ağırlığı hesaplanmıştır. Burada, $\delta=3,37$ ppm'deki $\text{CH}_3\text{O}-$ protonlarına ait pik integrali $\delta=3,63$ ppm'deki ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$) grubuna ait protonlara karşılık gelen pik integrallerinin oranlanmasıyla PEG-Br'nin polimerizasyon derecesi 48 ve sayıca molekül ağırlığı, M_n , 2293 g/mol olarak hesaplanmıştır. Hesaplanan polimerizasyon derecesi ATRP yöntemi ile sentezlenecek olan PEG-b-PDMAEMA bloğunun polimerizasyon derecesinin hesaplanmasında kullanılmıştır.



Şekil 4.2. PEG-Br'nin ^1H NMR spektrumu

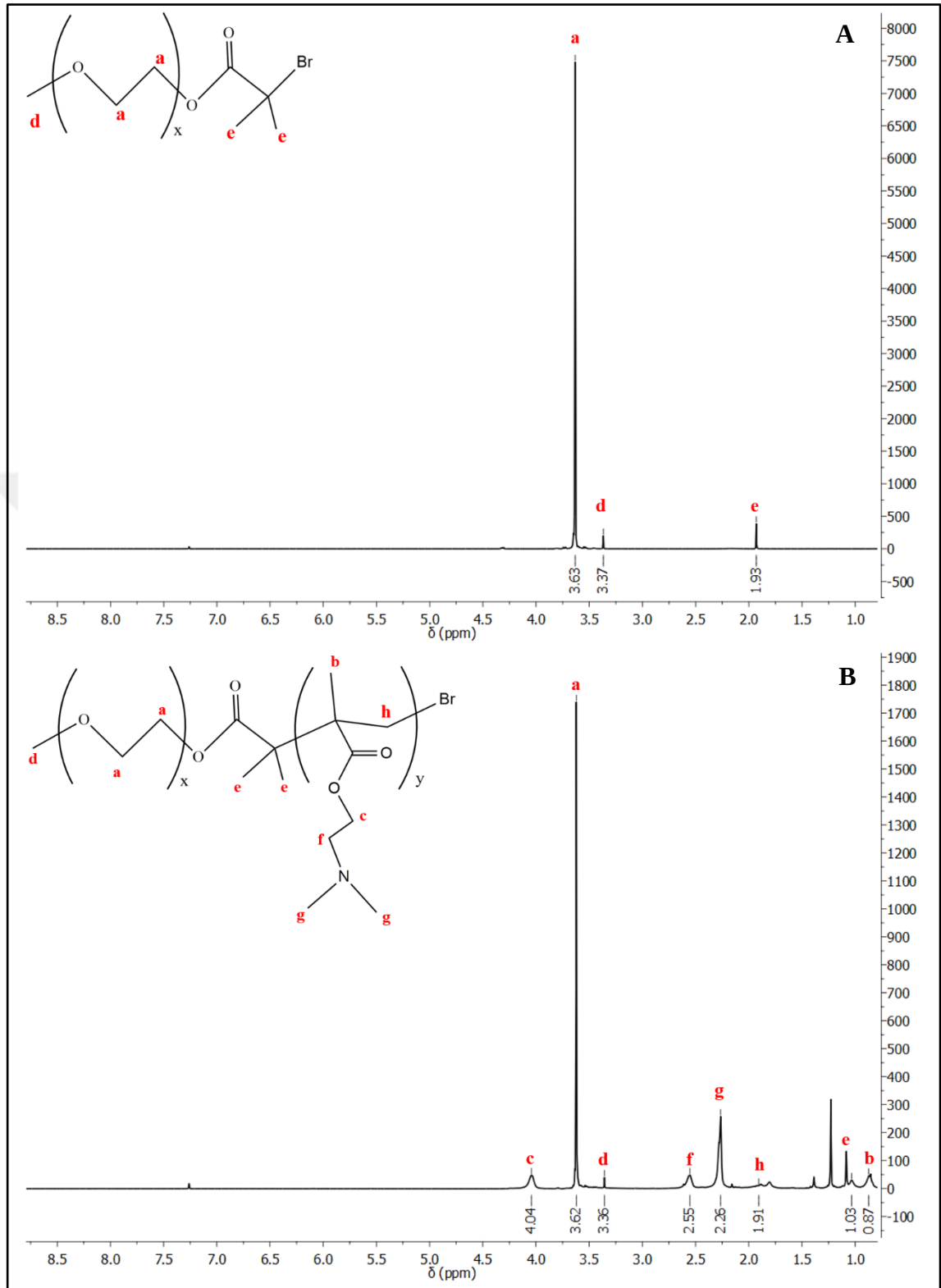
4.1.2. PEG–b–PDMAEMA blok kopolimerlerin sentezi

Sentezlenen makro başlatıcı PEG–Br kullanılarak PEG–b–PDMAEMA blok kopolimerleri ATRP yöntemiyle sentezlenmiştir (Gräfe vd. 2014). Sentez sonucunda %50-60 verimle renksiz, yapışkan halde olan kopolimerler elde edilmiştir. Sentez işleminin ardından sentezlenen her bir blok kopolimer için FTIR analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.3'te örnek olarak sentezlenen PEG₄₈–b–PDMAEMA₁₉ kopolimerinin FTIR spektrumu makro başlatıcı PEG–Br'nin FTIR spektrumu ile birlikte verilmiştir. Sentezlenen tüm diğer kopolimerlere ait FTIR spektrumları EK'te verilmiştir. Şekil 4.3'teki spektrumlar karşılaştırıldığında PEG zincirine PDMAEMA bloğunun eklenmesi sonucunda spektrumda ortaya çıkan yeni pikler, PDMAEMA bloğundaki N(CH₃)₂ grubuna ait 1144 cm⁻¹'de C–N gerimesine ve 2945 cm⁻¹, 2765 cm⁻¹'de, C–H gerilmelerine karşılık gelmektedir. Ayrıca 1725 cm⁻¹'deki C=O pikinin şiddetinin DMAEMA monomerinden gelen esterik C=O grubu nedeniyle arttığı açıkça görülmektedir. Dolayısıyla, bu veriler polimerizasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini göstermektedir.

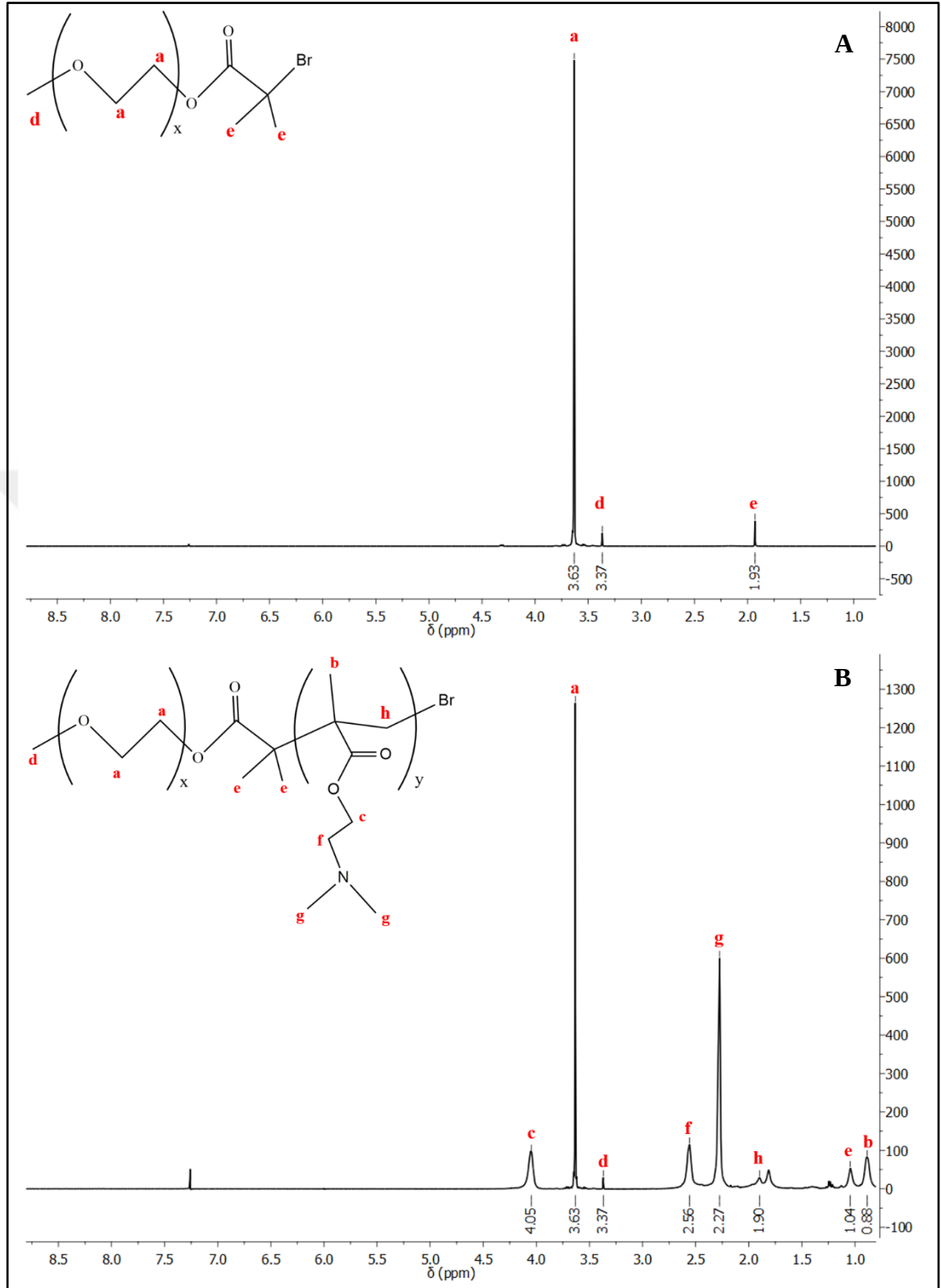


Şekil 4.3. PEG–Br ve PEG₄₈–b–PDMAEMA₁₉'un FTIR spektrumları

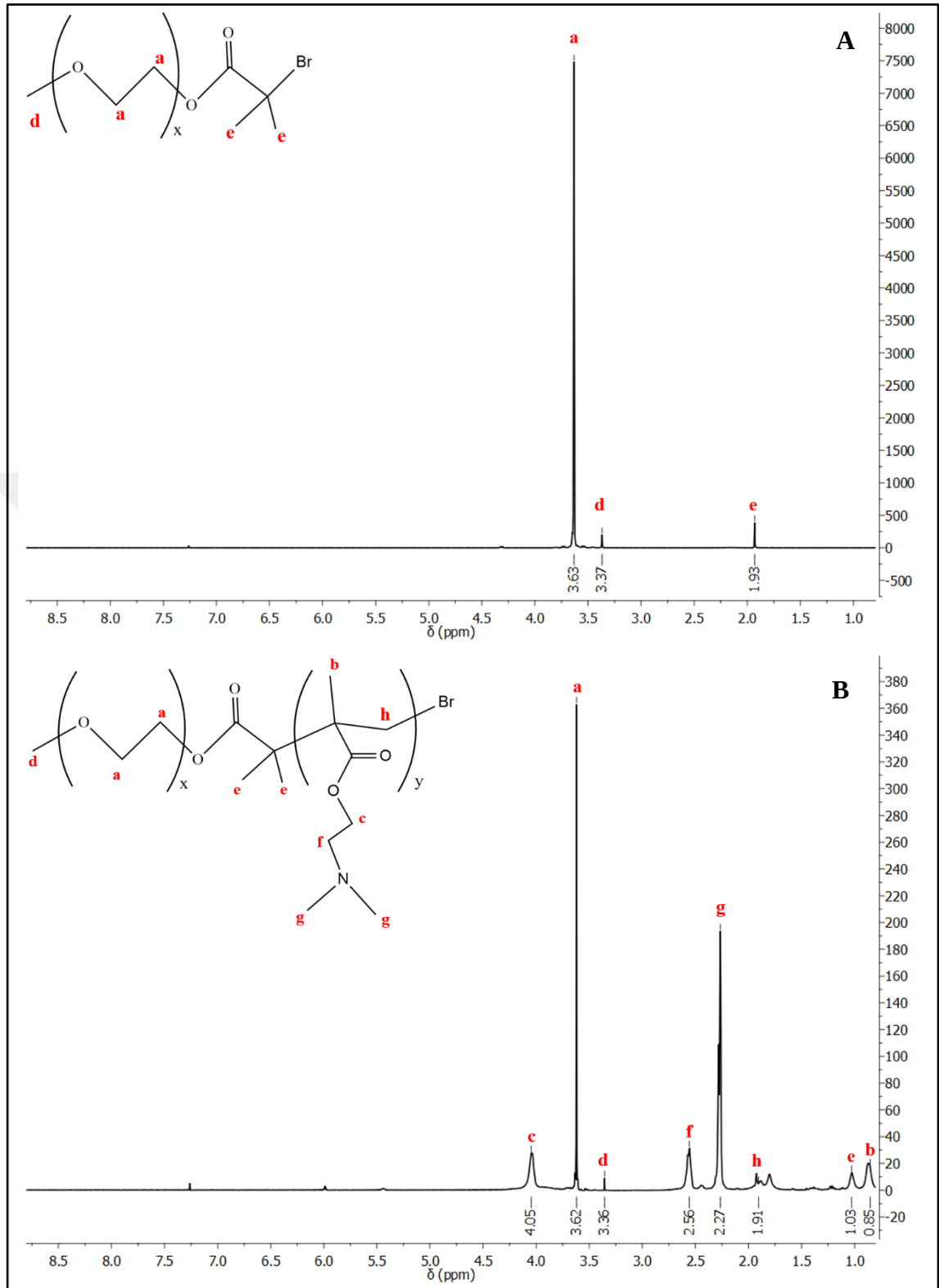
Sentezlenen PEG–b–PDMAEMA blok kopolimerlerinin ayrıntılı yapısı ve sayıca molekül ağırlığı (M_n) ¹H NMR analiziyle de kanıtlanmıştır. Sentezlenen tüm kopolimerlerin ¹H NMR ölçümlerinden elde edilen NMR spektrumları Şekil 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8 ve 4.9'da verilmiştir. Makro başlatıcı PEG–Br'nin NMR spektrumlarıyla kıyaslandığında $\delta=3,63-3,62$ ppm (–CH₂CH₂O–), $\delta=3,37-3,36$ ppm (CH₃O–), $\delta=1,91-1,90$ ppm (–CCH₂–), $\delta=0,89-0,85$ ppm (–C(CH₃)), $\delta=1,04-1,03$ ppm (–C(CH₃)₂), $\delta=4,05-4,04$ ppm (–COOCH₂–), $\delta=2,56-2,55$ ppm (–CH₂N–) ve $\delta=2,28-2,26$ ppm (–N(CH₃)₂) kimyasal kayma değerlerindeki pikler blok kopolimerin başarıyla sentezlendiğini göstermektedir.



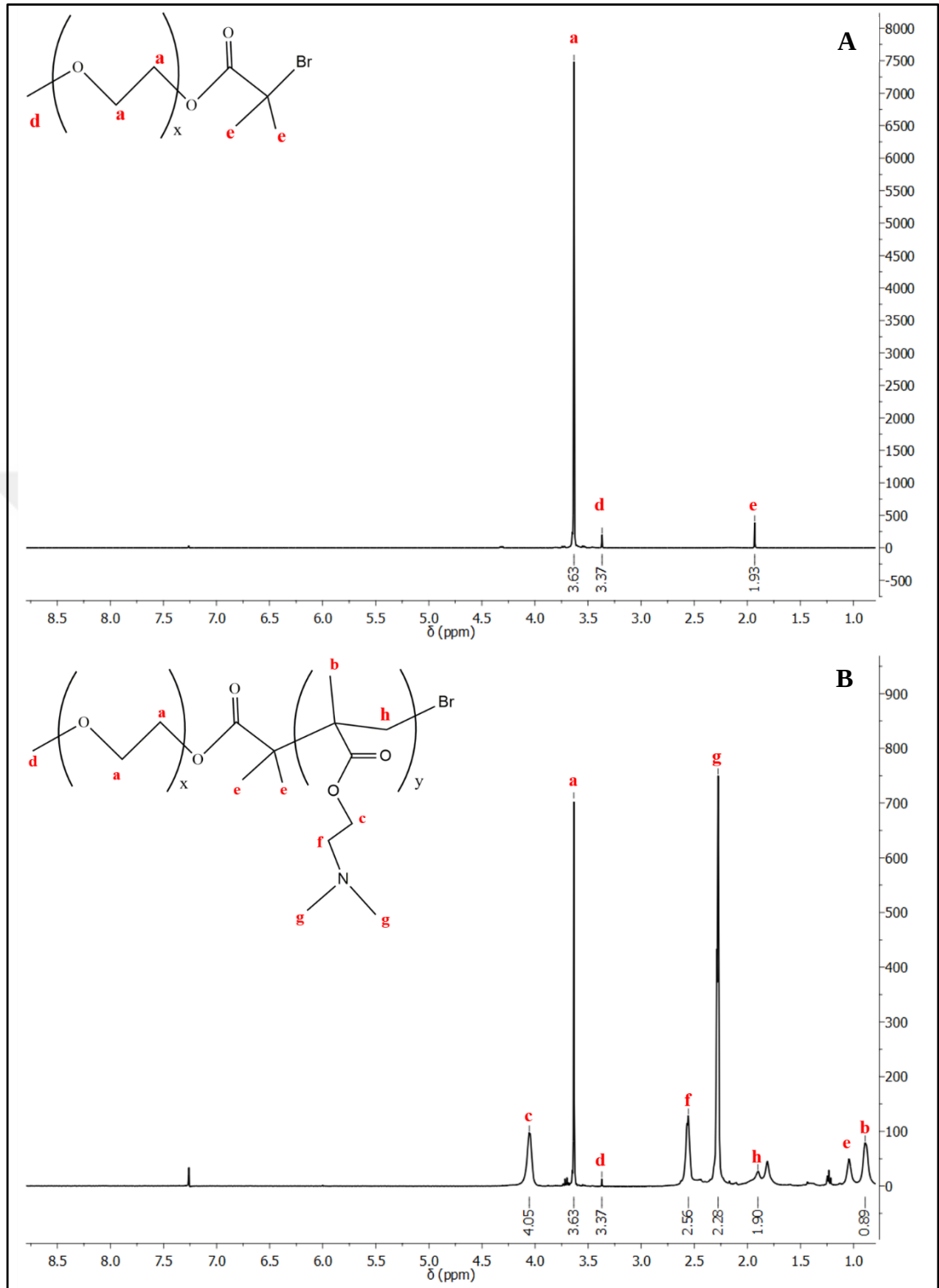
Şekil 4.4. (A) PEG-Br'nin ^1H NMR spektrumu, (B) PEG₄₈-b-PDMAEMA₁₉'un ^1H NMR spektrumu



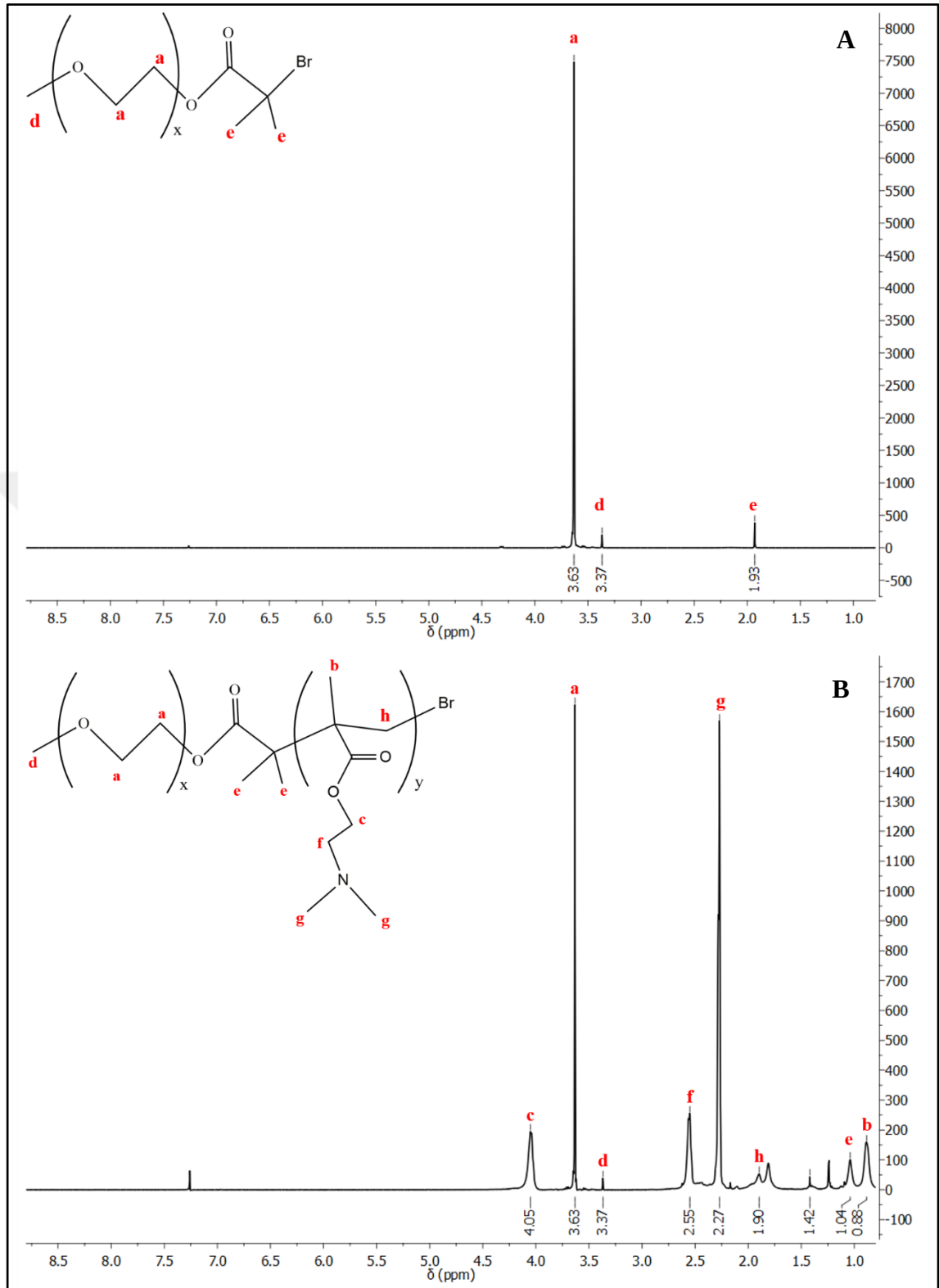
Şekil 4.5. (A) PEG-Br'nin ^1H NMR spektrumu, (B) PEG₄₈-b-PDMAEMA₅₂'nin ^1H NMR spektrumu



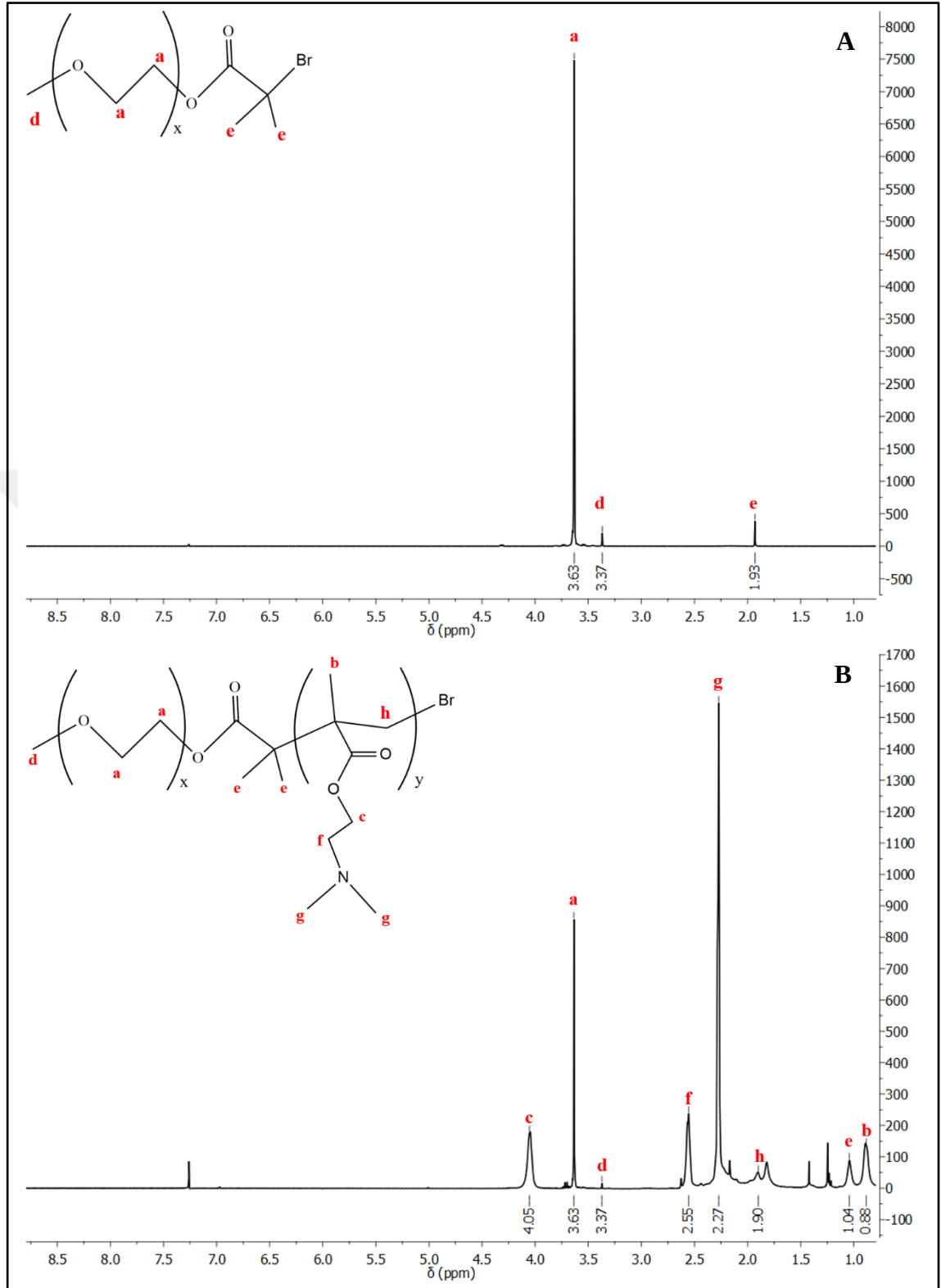
Şekil 4.6. (A) PEG-Br'nin ^1H NMR spektrumu, (B) PEG₄₈-b-PDMAEMA₅₆'nin ^1H NMR spektrumu



Şekil 4.7. (A) PEG-Br'nin ¹H NMR spektrumu, (B) PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₅'in ¹H NMR spektrumu



Şekil 4.8. (A) PEG-Br'nin ^1H NMR spektrumu, (B) PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₇'nin ^1H NMR spektrumu



Şekil 4.9. (A) PEG-Br'nin ^1H NMR spektrumu, (B) PEG₄₈-b-PDMAEMA₁₂₅'in ^1H NMR spektrumu

Sentezlenen tüm PEG–b–PDMAEMA blok kopolimerleri için Şekil 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8 ve 4.9'daki ^1H NMR spektrumlarına dayanarak sayıca molekül ağırlıkları (M_n), belirlenmiştir. Bunun için, PDMAEMA bloğundaki metil ($-\text{C}(\text{CH}_3)$) grubunun 3 protonuna (**b**) ait $\delta=0,89$ ppm'deki tekli pikin ve metilen ($-\text{COOCH}_2-$) grubunun 2 protonuna (**c**) ait $\delta=4,05$ ppm'deki tekli pikin integralleri belirlenmiş ve referans alınan $\delta=3,65$ ppm'deki PEG'in etilen ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$) grubuna ait (**a**) tekli pikin integraline oranlanmıştır. Bölüm 3.2.1.3'de ayrıntılı olarak açıklanan yöntemle göre yapılan hesaplama sonucu elde edilen veriler Çizelge 4.1'de sunulmuştur.

Sentezlenen blok kopolimerlerin sayıca molekül ağırlıklarının yanında ağırlıkça molekül ağırlıkları ve PDI değerleri GPC ölçümleriyle ile belirlenmiştir. Ancak, GPC analizinden elde edilen sonuçların güvenilirliğinin standart olarak polistiren kullanılması sebebiyle düşük olduğundan blok kopolimerlerin polimerizasyon derecesi ve sayıca molekül ağırlıkları ^1H NMR ölçümleri dikkate alınarak verilmiştir. GPC sonuçları yalnızca PDI değerleri için kullanılmıştır.

Çizelge 4.1. Sentezlenen blok kopolimerlerin molekül ağırlıkları ($\text{PD}_{\text{DMAEMA}}=\text{IOx48}$)^a

Polimer	İntegral oranı (İO)	DMAEMA bloğunun polimerizasyon derecesi ^a	Sayıca molekül ağırlığı (M_n) (g/mol)
PEG ₄₈ –b–PDMAEMA ₁₉	0,40	19	5362
PEG ₄₈ –b–PDMAEMA ₅₂	1,08	52	10550
PEG ₄₈ –b–PDMAEMA ₅₆	1,16	56	11179
PEG ₄₈ –b–PDMAEMA ₇₅	1,56	75	14165
PEG ₄₈ –b–PDMAEMA ₇₇	1,60	77	14480
PEG ₄₈ –b–PDMAEMA ₁₂₅	2,60	125	22026

4.2. Sıcaklık ve pH duyarlı polimerzomların oluşturulması ve incelenmesi

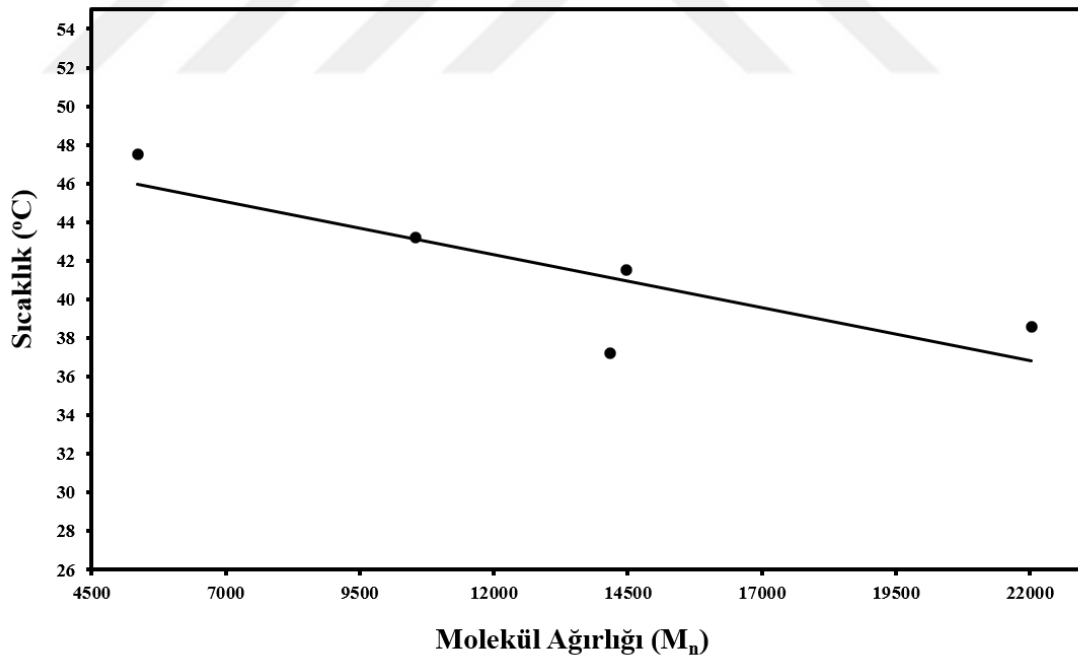
Sıcaklık duyarlı polimerzomlar LCST değerlerinin üzerinde oluşturulabildiği için ilk olarak sentezlenen blok kopolimerlerin LCST değerleri belirlenmiştir. Bunun için blok kopolimerlerin %1 (a/h)'lik ultra saf su içerisinde hazırlanan çözeltileri ile UV–Vis spektrofotometresi yardımıyla yüzde geçirgenliğinin %50'ye düştüğü sıcaklıklar LCST değeri olarak alınmıştır. Yüzde geçirgenliğin sıcaklığa bağlı olarak çizilen grafiği yardımıyla elde edilen sonuçlara göre, PEG₄₈–b–PDMAEMA₁₉, PEG₄₈–b–PDMAEMA₅₂, PEG₄₈–b–PDMAEMA₅₆, PEG₄₈–b–PDMAEMA₇₅, PEG₄₈–b–PDMAEMA₇₇ ve PEG₄₈–b–PDMAEMA₁₂₅ için LCST değerleri, sırasıyla, 47,5°C, 43,2°C, 52,4°C, 37,2°C, 41,5°C ve 38,6°C olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.2. PEG₄₈-b-PDMAEMA₁₉, PEG₄₈-b-PDMAEMA₅₂, PEG₄₈-b-PDMAEMA₅₆, PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₅, PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₇ ve PEG₄₈-b-PDMAEMA₁₂₅ kopolimerleri için belirlenen LCST değerleri

Polimer	Sayıca Molekül Ağırlığı (M _n) (g/mol)	LCST (°C)	Agregat Morfolojisi
PEG ₄₈ -b-PDMAEMA ₁₉	5362	47,5	Misel
PEG ₄₈ -b-PDMAEMA ₅₂	10550	43,2	Misel
PEG ₄₈ -b-PDMAEMA ₅₆	11179	(52,4)	Misel
PEG ₄₈ -b-PDMAEMA ₇₅	14165	37,2	Misel
PEG ₄₈ -b-PDMAEMA ₇₇ *	14480	41,5	Vezikül
PEG ₄₈ -b-PDMAEMA ₁₂₅	22026	38,6	Vezikül

*En iyi sonucu veren blok kopolimer

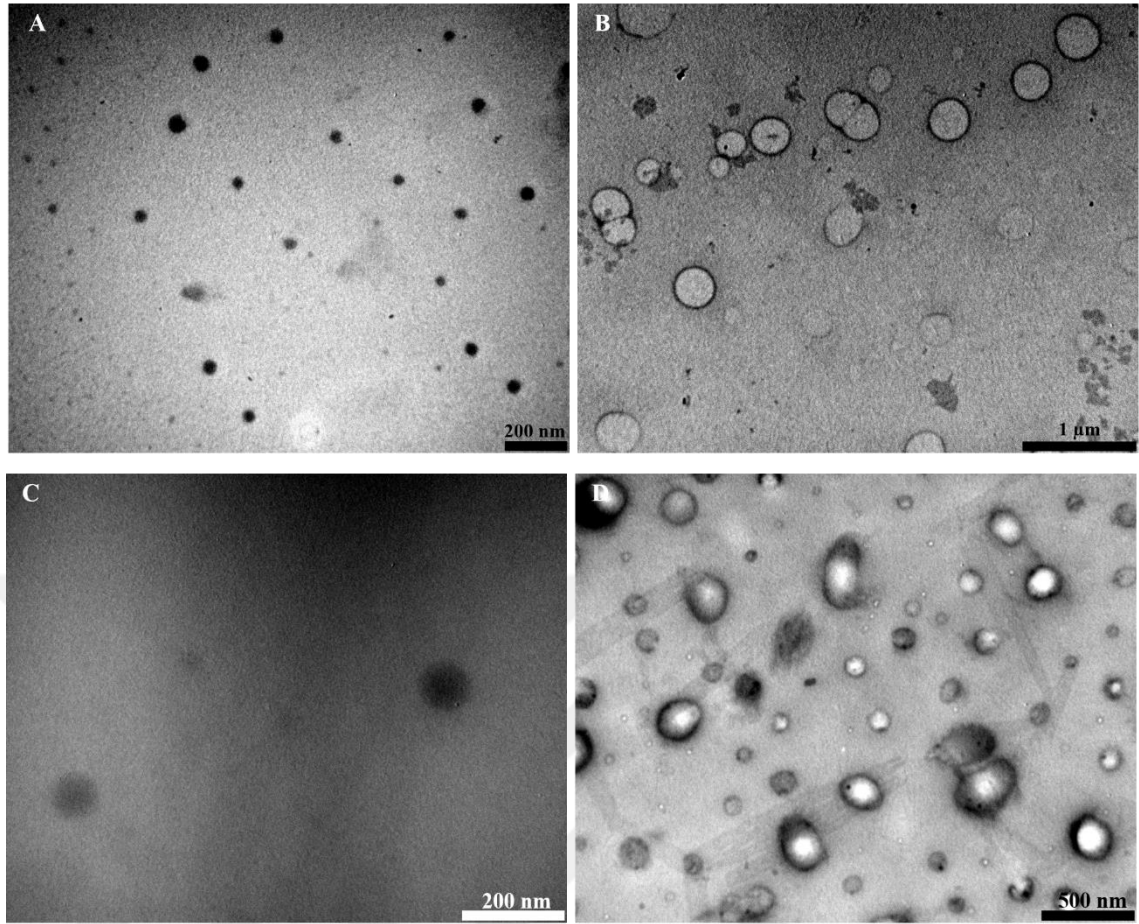
Şekil 4.10'da LCST değerlerinin kopolimer molekül ağırlığına göre değişimi görülmektedir. Molekül ağırlığı arttıkça blok kopolimerlerin LCST değerlerinin doğrusal olarak düştüğü görülmektedir. Bu sonuçlar, literatürdeki veriler ile uyum içerisindedir (Dong vd. 2010).



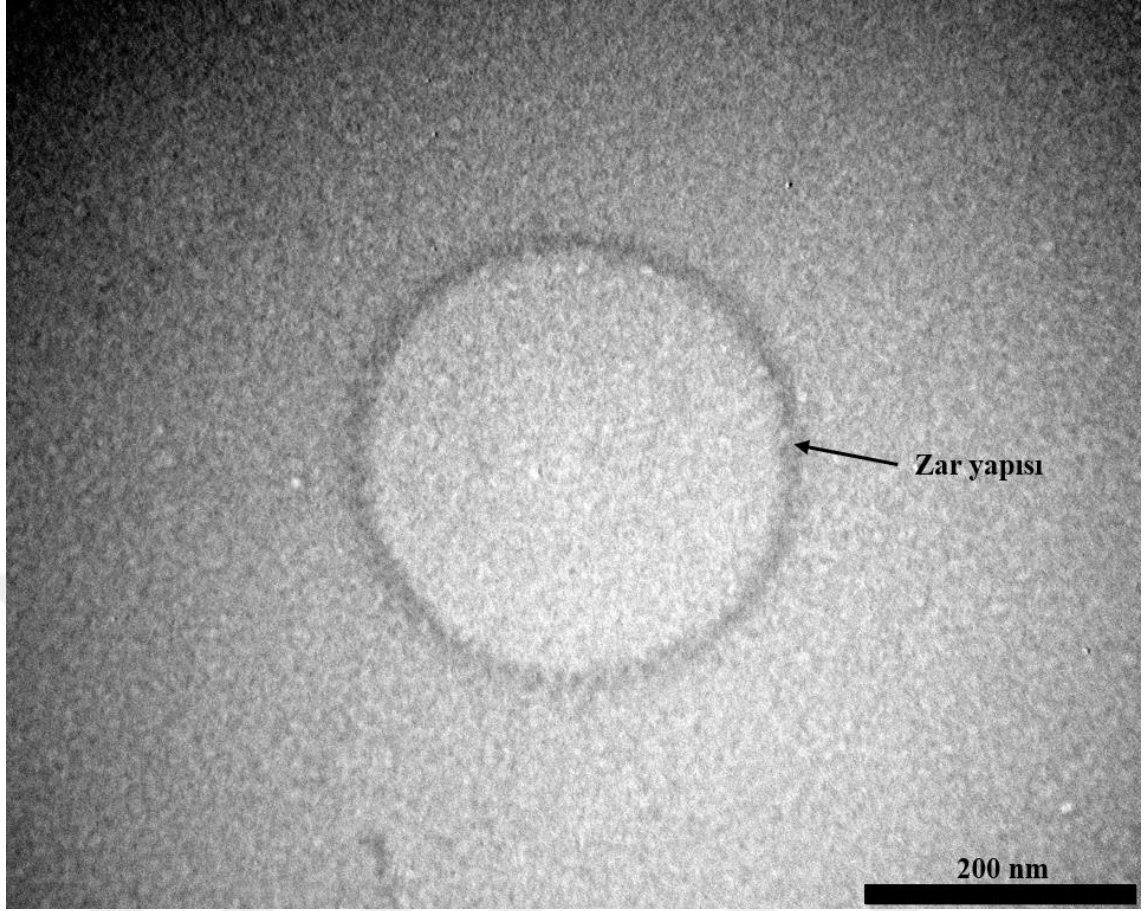
Şekil 4.10. Molekül ağırlığına karşılık LCST değerlerinin değişimi

LCST değerleri belirlendikten sonra blok kopolimerlerin DLS tekniğiyle hidrodinamik çapları ölçülmüştür. Bunun için hazırlanan %1 (a/h)'lik sulu çözeltilerinin 20°C'de (LCST değerlerinin altında) ve tespit edilen LCST değerlerinin 10°C üzerinde ölçümler gerçekleştirilmiştir. Yapılan ölçümler neticesinde PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₇, PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₅, PEG₄₈-b-PDMAEMA₁₂₅ ve PEG₄₈-b-PDMAEMA₅₆ blok kopolimerleri için 20°C'de gerçekleştirilen DLS analizinde yorumlanabilir sonuçlar elde edilememiştir. Bunun nedeni, LCST değerinin altında polimer zincirlerinin serbest halde bulunmasına bağlanmıştır. Buna karşın, PEG₄₈-b-PDMAEMA₁₉ ve PEG₄₈-b-PDMAEMA₅₂ numuneleri için sırasıyla 78 nm ve 122 nm hidrodinamik çap ölçülmüştür. PEG₄₈-b-PDMAEMA₁₉ ve PEG₄₈-b-PDMAEMA₅₂ numuneleri için gözlenen bu durumun polimerlerin yeterince saflaştırılamamasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ancak, LCST değerlerinin üzerinde gerçekleştirilen ölçümlerde kopolimerlerin agregasyonu sonucu polimerik parçacıkların oluştuğu belirlenmiştir. Sulu PEG₄₈-b-PDMAEMA₁₉, PEG₄₈-b-PDMAEMA₅₂, PEG₄₈-b-PDMAEMA₅₆, PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₅, PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₇ ve PEG₄₈-b-PDMAEMA₁₂₅ çözeltilerindeki parçacıklar için hidrodinamik çap değerleri, sırasıyla, 142 nm, 164 nm, 98 nm, 100 nm, 334,2 nm ve 190 nm olarak ölçülmüştür.

Kopolimerlerin LCST üzerindeki hidrodinamik çapları ölçüldükten sonra aynı örneklerdeki parçacıkların boyut ve morfolojisi TEM ölçümleriyle de incelenmiştir. Elde edilen TEM görüntüleri Şekil 4.11, 4.12 ve 4.13'de verilmiştir. Şekil 4.11'deki görüntüler incelendiğinde PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₇ ve PEG₄₈-b-PDMAEMA₁₂₅ ile başarılı bir şekilde polimerzomların oluşturulduğu görülmektedir. LCST değerinin altında PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₇ için 40±9 nm, PEG₄₈-b-PDMAEMA₁₂₅ için 95±7 nm boyutunda misel yapıları gözlenmiştir. Bununla birlikte, LCST değerinin üzerinde hazırlanan TEM numuneleri incelendiğinde PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₇ için 362±69 nm ve PEG₄₈-b-PDMAEMA₁₂₅ için 165±7 nm boyutunda polimerzom yapıları dikkat çekmektedir. LCST değerinin üzerinde gözlenen misel yapılarının homojen molekül ağırlığına sahip olmayan polimer zincirlerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₇ ile elde edilen polimerzomun zar yapısı Şekil 4.12'deki TEM görüntüsünde ayrıntılı olarak görülmektedir. Burada, polimerzomun zar kalınlığı 17 nm olarak ölçülmüştür.

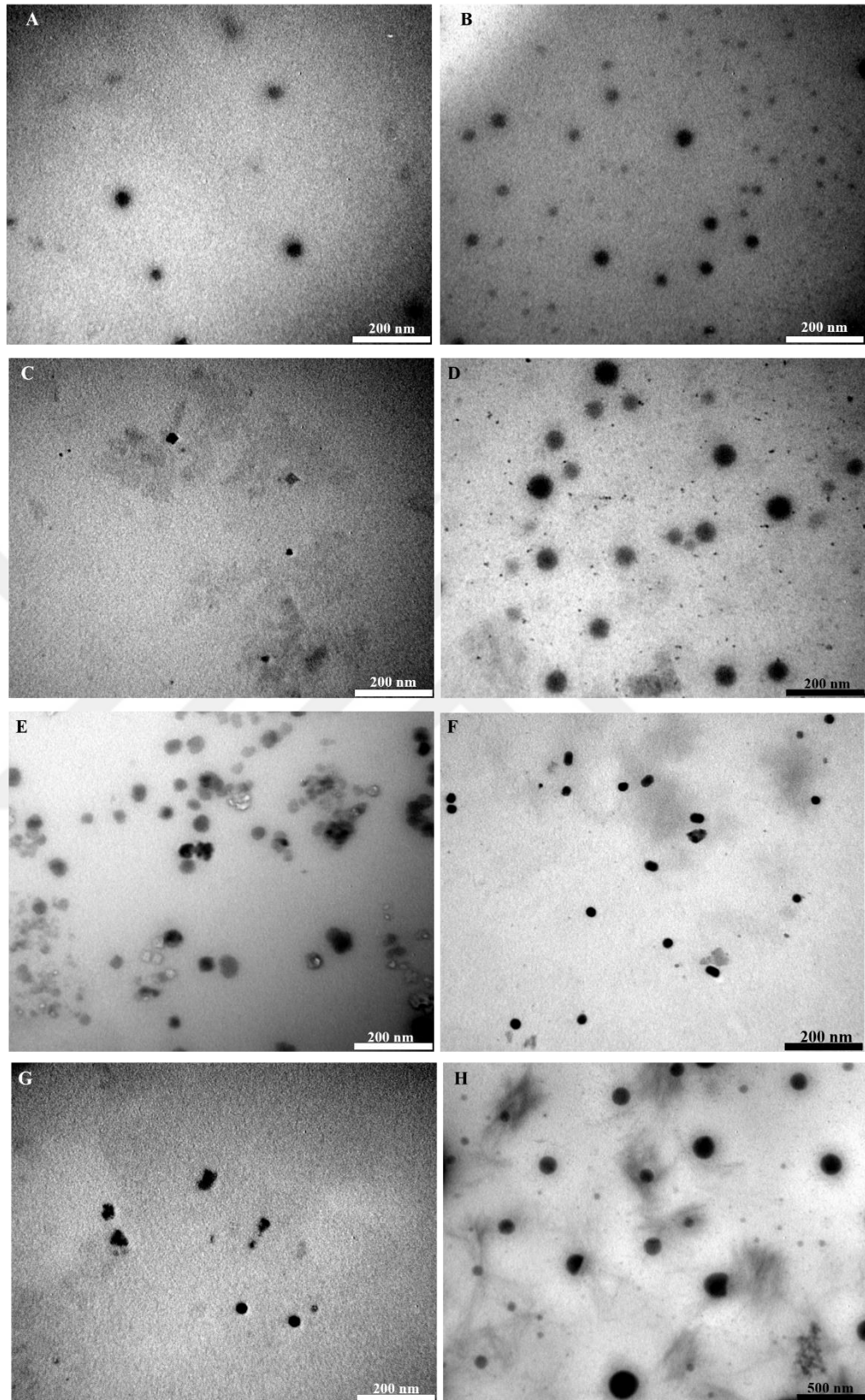


şekil 4.11. %1 (a/h)'lik PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₇ ve PEG₄₈-b-PDMAEMA₁₂₅'in (A) LCST değerinin altında (B) LCST değerinin üzerindeki TEM görüntüleri



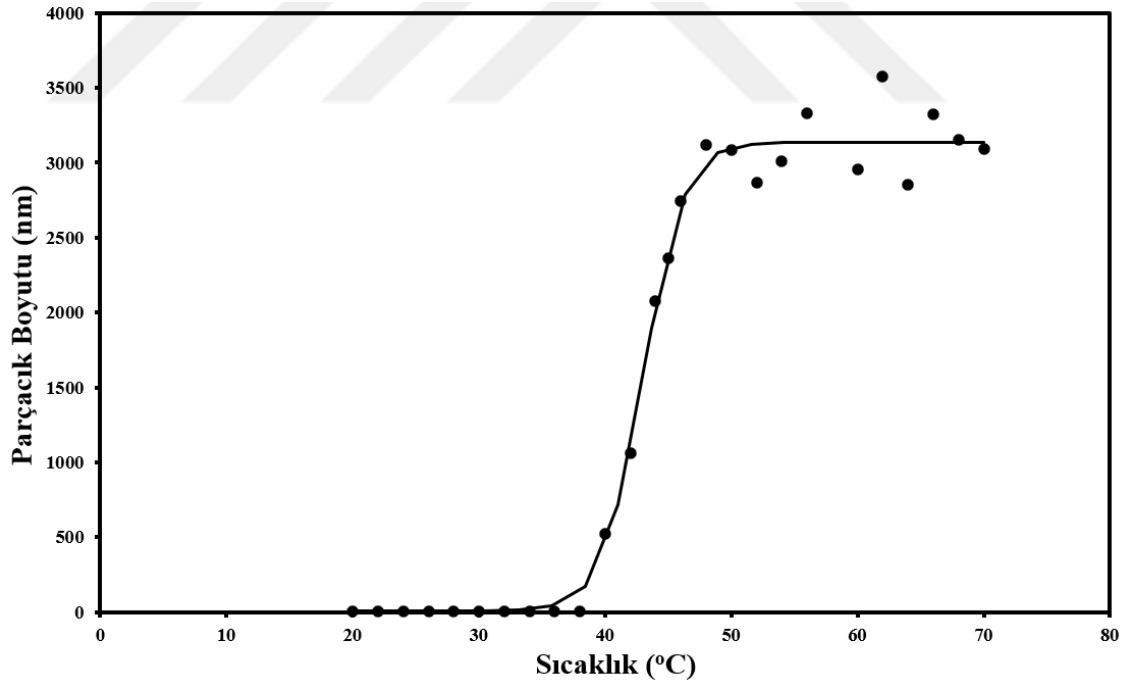
şekil 4.12. %1 (a/h)'lik PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₇ ile elde edilen polimerzomun zar yapısının odaklanmış görüntüsü

PEG₄₈-b-PDMAEMA₁₉, PEG₄₈-b-PDMAEMA₅₂, PEG₄₈-b-PDMAEMA₅₆ ve PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₅ için elde edilen TEM görüntüleri şekil 4.13'te verilmiştir. şekil 4.13'teki görüntüler hem LCST değeriinin altında hem de üstünde yalnızca misel yapıları gözlenmiştir. PEG₄₈-b-PDMAEMA₅₂ ve PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₅ kopolimerleri için LCST değeriinin altında daha küçük misel yapıları gözlenirken LCST değeriinin üzerinde misel yapılarının büyüdüğü açıkça görülmektedir. Buna karşın, PEG₄₈-b-PDMAEMA₅₆ ve PEG₄₈-b-PDMAEMA₁₉ kopolimerlerinde LCST değeriinin altında veya üstünde dikkat çekici herhangi bir değışim gözlenmemiştir

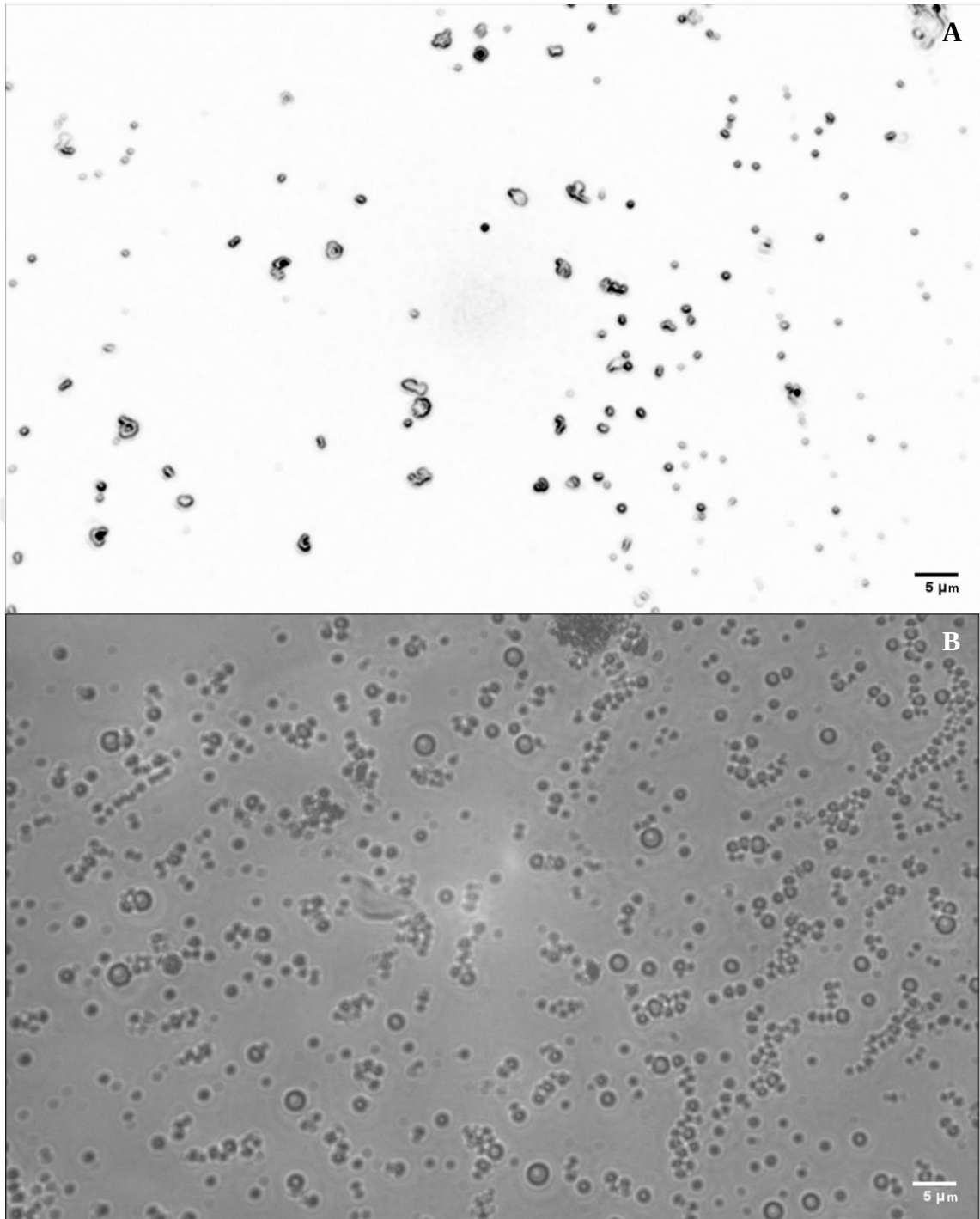


şekil 4.13 PEG₄₈-b-PDMAEMA₁₉, PEG₄₈-b-PDMAEMA₅₂, PEG₄₈-b-PDMAEMA₅₆ ve PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₅ için sırasıyla LCST değerinin altında (A, C, E, D) ve LCST değerinin üzerinde alınan (B, D, F, H) TEM görüntüleri

Gerçekleştirilen TEM analizi sonucunda polimerzom oluşumunu daha ayrıntılı çalışmak için PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₇ kopolimeri seçilmiştir. Bu seçim yapıldıktan sonra, ilgili kopolimerin %1 (a/h) derişimdeki sulu çözeltisi üzerine DLS tekniği ile 20–70°C aralığında sıcaklığa bağlı parçacık boyutu ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Ölçümler sonucu PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₇ sulu çözeltisi için elde edilen sıcaklığa bağlı parçacık boyutu değişimi Şekil 4.14'te verilmiştir. Burada daha önce yüzde geçirgenlik sonuçlarında da verildiği gibi PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₇ kopolimeri LCST değerinin altında beklendiği gibi serbest zincirler olarak davranmaktadır. Ancak, sıcaklığın 40°C'ye ulaşmasıyla polimer zincirlerinde kendi kendine düzenlenerek agregasyona başladığı açıkça görülmektedir. Bununla birlikte, DLS sonuçları ile TEM sonuçları kıyaslandığında DLS'ten elde edilen parçacık boyutlarının TEM sonuçlarına kıyasla oldukça büyük (2845±845 nm) olduğu görülmektedir. Bu durum, çözelti fazında daha kararlı ve iyi tanımlanmış polimerzom yapılarının TEM ölçümü için kurutulması esnasında dehidrasyondan dolayı küçülmesi, büzülmesi ve/veya dağılması sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, DLS ölçümleri ile belirlenen çözelti fazındaki veziküller yapı ve varlığını kanıtlamak için polimer çözeltilerinin görüntüleri sıvı fazda hazırlanan hücreler üzerine optik mikroskopi ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Sulu ortamda %1 (a/h)'lik PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₇ için elde edilen optik mikroskop görüntüsü Şekil 4.15'de görülmektedir. Şekil 4.15 incelendiğinde sulu ortamda 841±360 nm boyutunda küresel yapılar görülmektedir. Ayrıca, bu parçacıklarla birlikte 1855±442 nm boyutlarında küresel olmayan daha büyük agregatlar da görülmektedir. Bu durum DLS ölçümlerinde belirlenen hidrodinamik çapın neden daha büyük olduğunu açıklamaktadır.



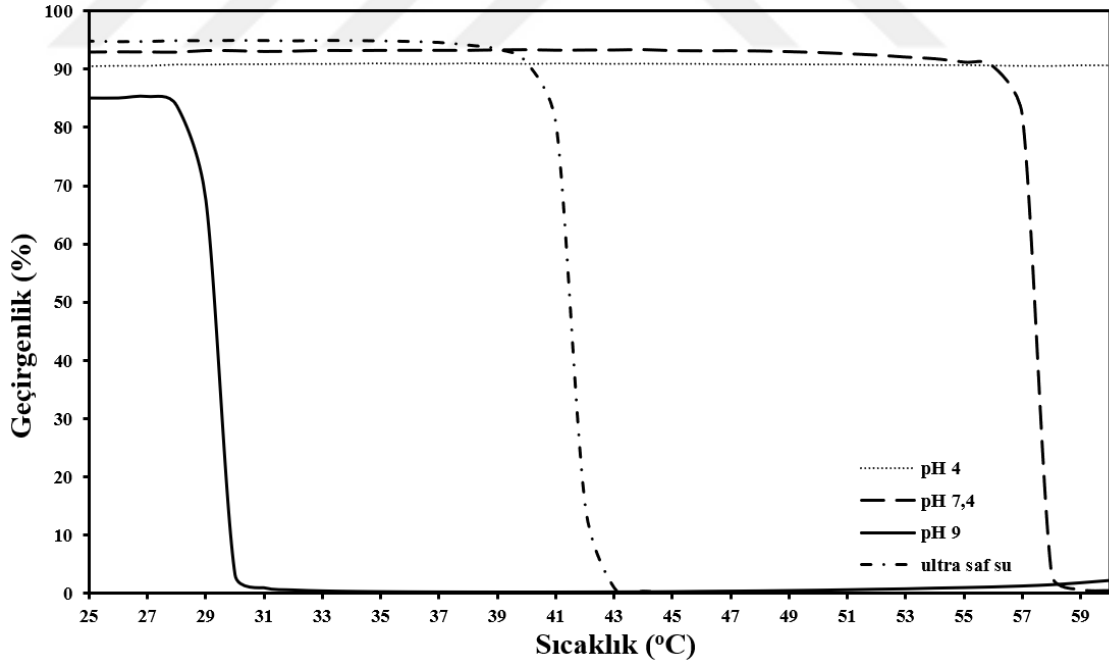
Şekil 4.14. Sulu %1(a/h) PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₇ kopolimer çözeltisinin sıcaklığa bağlı parçacık boyutu değişimi



şekil 4.15. Sulu ortamda %1 (a/h) (A) ve %0,1 (a/h)'lik (B) PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₇ çözeltilerinin optik mikroskop görüntüsü

4.3. PEG–b–PDMAEMA blok kopolimerinden polimerzomların oluşması üzerine pH’ın etkisi

PEG₄₈–b–PDMAEMA₇₇ blok kopolimerinin sulu çözelti polimerzom oluşumu üzerine pH’ın etkisini incelemek için pH’ı 4,0, 7,4 ve 9 tampon çözeltileri ile %1 (a/h)’lik çözeltiler hazırlanmıştır. Daha sonra farklı pH’larda hazırlanan çözeltilerin yüzde geçirgenliklerinin sıcaklığa bağlı değişimleri UV–Vis spektrofotometresi ile ölçülmüştür. Yapılan deneyler sonucunda elde edilen yüzde geçirgenliğin pH ve sıcaklığa bağlı grafiği Şekil 4.16’da görülmektedir. Bu ölçümler analiz edildiğinde her bir pH değerindeki LCST değeri belirlenmiştir. Sonuçlar, Çizelge 4.4’de özetlenmiştir. pH=9’da LCST değeri 29,3 °C olarak bulunmuştur. Bu değer pH=7,4 için 57,4°C olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte, pH=4 tamponu içerisinde çalışılan sıcaklık aralığında herhangi bir LCST değeri belirlenememiştir. Bu aslında beklenen bir durumdur. Çünkü, pH=4 değeri PDMAEMA bloğunun pK_a değerinin altında olduğu için bloktaki tersiyer amin grupları protonlanmış halde bulunur. Dolayısıyla, bu durumda diblok kopolimerin amfifilik karakteri ortadan kaybolmaktadır. LCST değerlerinin 10°C üzerine çıkılarak gerçekleştirilen DLS ölçümleri sonucunda pH=7,4 ve pH=9’da ölçülen polimer parçacıklarının hidrodinamik çapları, sırasıyla, 2669 ve 4145 nm olarak belirlenmiştir. pH=4 tamponu ile hazırlanan numunede beklendiği üzere herhangi bir sonuç elde edilememiştir. %1 (a/h) PEG₄₈–b–PDMAEMA₇₇’in sulu çözeltileri için farklı pH’larda elde edilen LCST ve hidrodinamik çap değerleri Çizelge 4.3 ve Şekil 4.17’de verilmiştir.

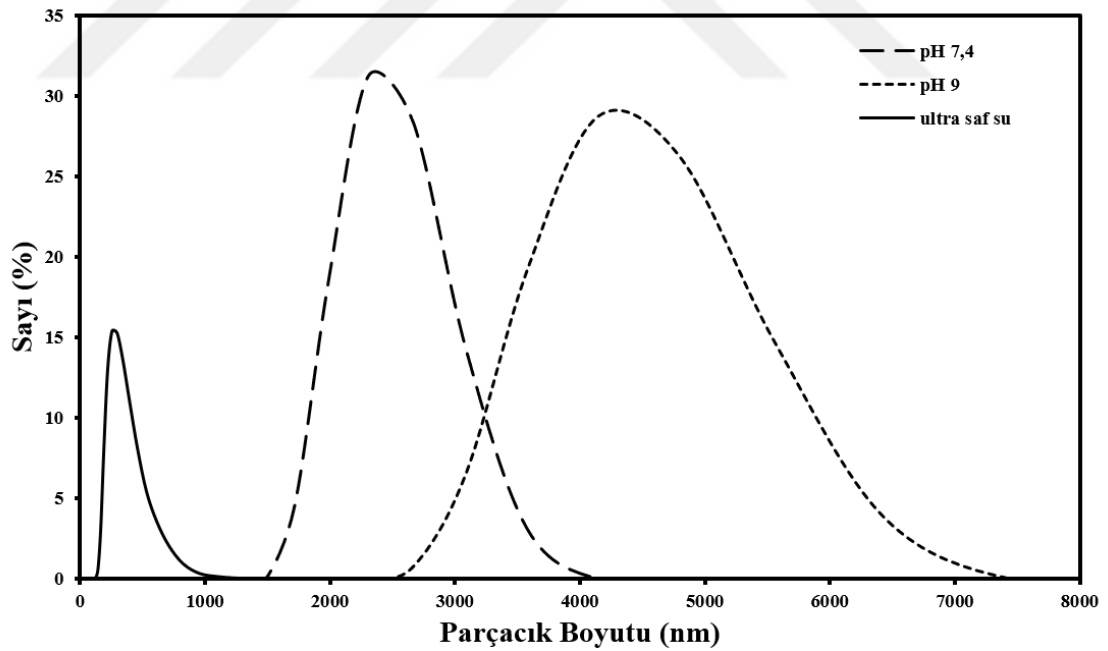


Şekil 4.16. %1 (a/h) PEG₄₈–b–PDMAEMA₇₇’in farklı pH’larda sıcaklığa bağlı olarak ölçülmüş yüzde geçirgenlik değerleri

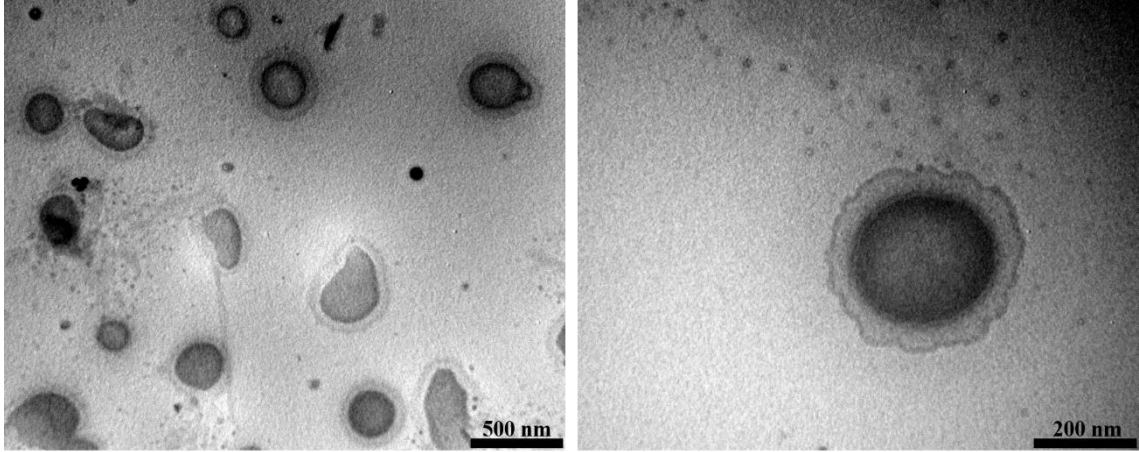
Çizelge 4.3. %1 (a/h) PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₇'in sulu çözeltileri için farklı pH'larda elde edilen LCST ve hidrodinamik çap değerleri

Polimer	pH	LCST (°C)	Hidrodinamik Çap (nm)
PEG ₄₈ -b-PDMAEMA ₇₇	4,0	—	—
PEG ₄₈ -b-PDMAEMA ₇₇	7,4	57,4	2669
PEG ₄₈ -b-PDMAEMA ₇₇	9,0	29,3	4145

%1 (a/h)'lik PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₇ sulu çözeltisinin pH=9,0'daki polimerzom davranışı LCST değerinin üzerinde hazırlanan örnekler üzerinde TEM ölçümü gerçekleştirilerek belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.18'de görülmektedir. TEM görüntüleri incelendiğinde pH arttığı zaman oluşan polimerzom yapılarının daha kararlı olduğu, polimerzomun zar yapısının daha da kalınlaştığı açıkça görülmektedir. Ayrıca, parçacık morfolojisi açısından incelendiğinde her ne kadar küresel veziküller daha baskın olsa da bunların yanında silindirik veziküllerin de oluştuğu açıkça gözükmemektedir. TEM görüntüleri ImageJ programı ile değerlendirildiğinde polimerzomların boyutlarının 235 ± 83 nm, zar kalınlığının ise 19 nm olduğu belirlenmiştir.



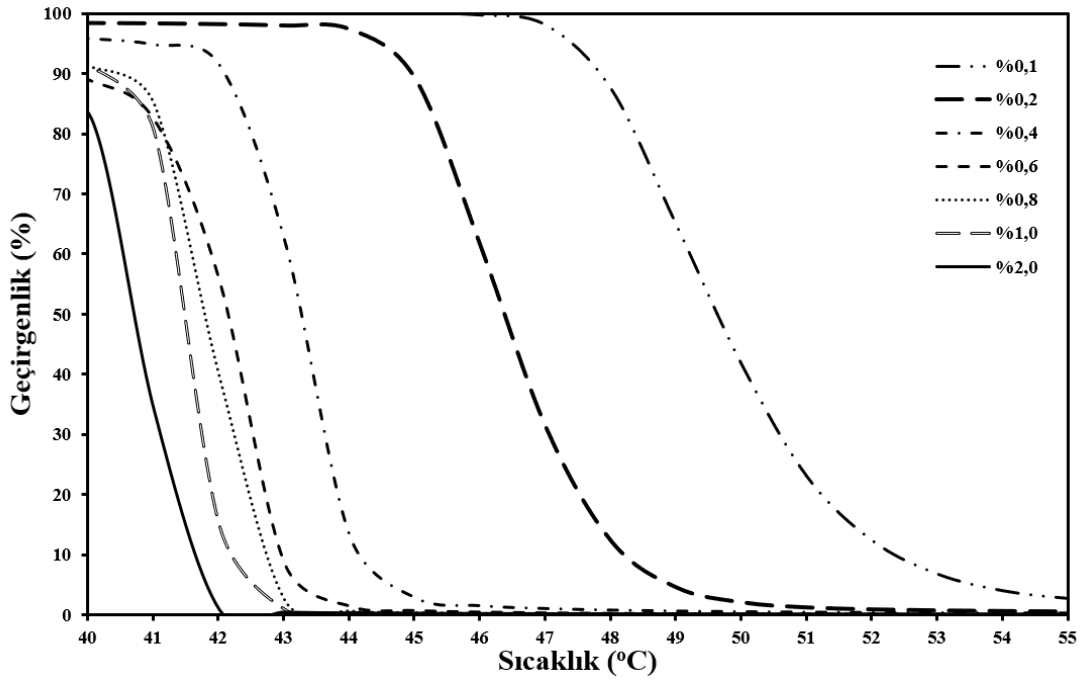
Şekil 4.17. Farklı pH tamponlarında %1(a/h)'lik PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₇'nin sayıca boyut dağılımı grafiği



Şekil 4.18. PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₇'nin pH=9 tamponunda LCST değerinin üzerinde alınan TEM görüntüleri

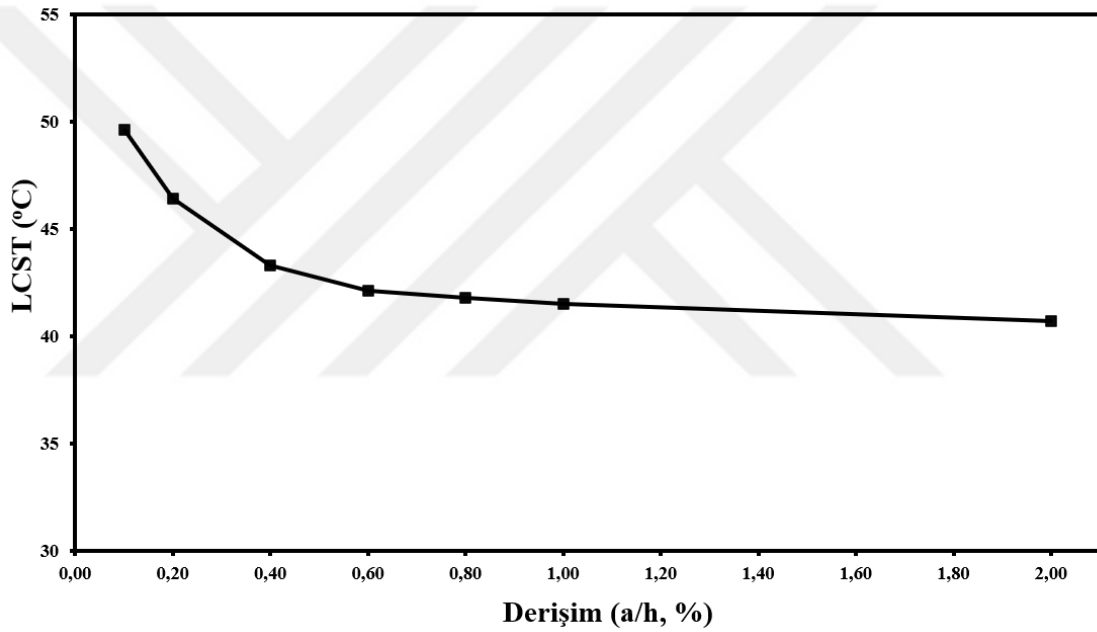
4.4. PEG-b-PDMAEMA blok kopolimerinden polimerzomların oluşması üzerine derişimin etkisi

Derişimin polimerzom oluşumu üzerine etkisini incelemek için PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₇ kopolimerinin sulu ortamda farklı derişimlerde [%0,1 (a/h), %0,2 (a/h), %0,4 (a/h), %0,6 (a/h), %0,8 (a/h), %1 (a/h) ve %2 (a/h)] PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₇ çözeltileri hazırlanmış ve hazırlanan polimer çözeltilerinin bir UV-Vis spektrofotometresi yardımıyla 500 nm dalga boyunda sıcaklığa bağlı yüzde geçirgenlik değerleri ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.19'de karşılaştırmalı olarak verilmiştir.



Şekil 4.19. Farklı derişimlerdeki PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₇ çözeltilerinin yüzde geçirgenlik değerlerinin sıcaklığa bağlı olarak değişimi

Sonuçlar değerlendirildiğinde PEG₄₈–b–PDMAEMA₇₇ kopolimerinin %0,1 (a/h), %0,2 (a/h), %0,4 (a/h), %0,6 (a/h), %0,8 (a/h), %1 (a/h) ve %2 (a/h) derişimlerdeki LCST değerleri, sırasıyla, 49,6, 46,4, 43,3, 42,1, 41,8, 41,5 ve 40,5 °C olarak hesaplanmıştır. Farklı derişimlerde elde edilen LCST değerleri ve LCST değerlerinin derişime bağlı grafiği sırasıyla izelge 4.4 ve şekil 4.20’de verilmiştir. şekil 4.20 incelendiğinde PEG₄₈–b–PDMAEMA₇₇ kopolimerinin sulu çözeltide derişiminin artışı ile birlikte LCST değerlerinin düştüğü açıkça görölmektedir. LCST değerindeki bu azalış paraboliktir ve LCST değerinde gözlenen bu azalış düşük derişimlerde oldukça hızlı olmasına rağmen, yüksek derişimlerde yavaşlamaktadır. Muhtemelen belirli bir derişim değerinden sonra LCST derişimden bağımsız hale gelecektir. şekil 4.20’de bu değer özellikle derişim %1 (a/h) civarına gelince çok az değişmeye neredeyse sabitlenmeye başlamıştır. Bu nedenle, çalışma boyunca diğer parametreler çalışırken derişim %1 (a/h) olarak seçilmiştir. Belirlenen bu davranış literatürdeki verilerle de uyumludur (Dong vd. 2010).

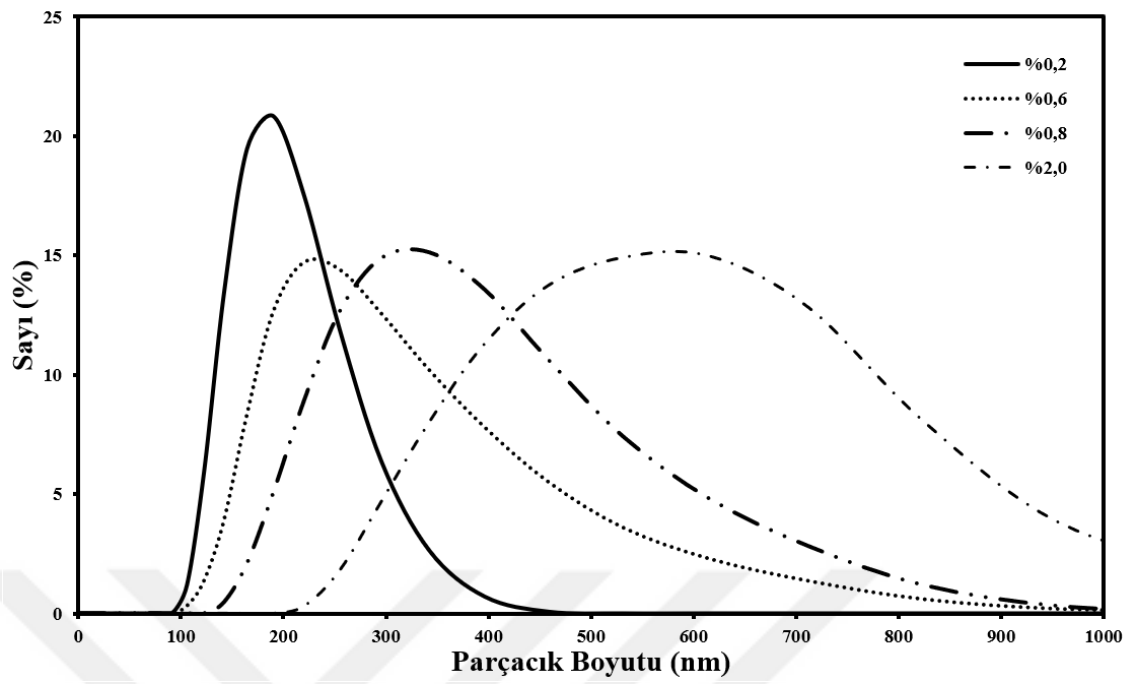


şekil 4.20. PEG₄₈–b–PDMAEMA₇₇ kopolimerinin LCST değerinin derişime bağlı olarak değişimi

Çizelge 4.4. PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₇ kopolimerinin farklı derişimlerde ölçülen LCST (°C) ve hidrodinamik çap değerleri

Polimer	%Derişim (a/h)	LCST (°C)	Hidrodinamik Çap (nm)
PEG ₄₈ -b-PDMAEMA ₇₇	0,1	49,6	120
PEG ₄₈ -b-PDMAEMA ₇₇	0,2	46,4	190
PEG ₄₈ -b-PDMAEMA ₇₇	0,4	43,3	281
PEG ₄₈ -b-PDMAEMA ₇₇	0,6	42,1	294
PEG ₄₈ -b-PDMAEMA ₇₇	0,8	41,8	366
PEG ₄₈ -b-PDMAEMA ₇₇	1,0	41,5	334
PEG ₄₈ -b-PDMAEMA ₇₇	2,0	40,5	615

Farklı derişimlerde hazırlanan PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₇ kopolimeri için LCST değerleri belirlendikten sonra, her bir derişimde çözeltide bulunan polimer parçacıklarının hidrodinamik çapları DLS ölçümleriyle belirlenmiştir. Ölçümler her derişim için belirlenen LCST değerinin 10°C üzerinde alınmıştır. PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₇ kopolimerinin %0,1 (a/h), %0,2 (a/h), %0,4 (a/h), %0,6 (a/h), %0,8 (a/h), %1 (a/h) ve %2 (a/h) derişimlerdeki sulu çözeltilerinde bulunan polimer parçacıklarının hidrodinamik çapları, sırasıyla, 120 nm, 198,73 nm, 280,9 nm, 293,73 nm, 366,4 nm, 334,2 nm ve 615,1 nm olarak ölçülmüştür. Derişim artışıyla birlikte çözeltideki polimer parçacıklarının hidrodinamik çapının da arttığı açıkça görülmektedir. Özellikle %1 (a/h)'lik numune için 51,8 °C'de gözlenen 334,2 nm'lik hidrodinamik çap ve aynı numunede sıcaklık taraması yapılarak ölçülen 52°C'de ölçülen hidrodinamik çap arasındaki fark dikkat çekmektedir. Bu farklılığın, numunenin direkt olarak LCST sıcaklığının 10°C üzerine ısıtılmasının, sıcaklık taraması ile gerçekleştirilen DLS analizine nazaran çok daha hızlı olması nedeniyle olabileceği düşünülmüştür.



Şekil 4.21. Farklı derişimlerde hazırlanan PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₇ kopolimer çözeltilerindeki parçacıkların sayıca boyut dağılımı

5. SONUÇLAR

Bu tez kapsamında bir makro başlatıcı PEG-Br kullanarak ATRP yöntemiyle farklı molekül ağırlıklarında ve polimerizasyon derecelerinde PEG-b-PDMAEMA blok kopolimerleri sentezlenmiştir. ¹H NMR ölçümlerine dayanarak yapılan uç grup analizleri sonucunda sentezlenen blok kopolimerlerdeki PDMAEMA bloğunun 19, 52, 56, 75, 77 ve 125 polimerizasyon derecesine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu polimerizasyon derecelerine göre sentezlenen kopolimerlerin sayıca molekül ağırlıkları (M_n), sırasıyla, 5362 g/mol, 10550 g/mol, 11179 g/mol, 14165 g/mol, 14480 g/mol ve 22026 g/mol olarak hesaplanmıştır.

Sentezlenen her bir polimerin LCST değerleri, %1 (a/h)'lik sulu çözeltileri üzerine sıcaklığa bağlı olarak gerçekleştirilen UV-Vis spektrofotometresi ve dinamik ışık saçılımı (DLS) ölçümleri ile belirlenmiştir. PEG₄₈-b-PDMAEMA₁₉, PEG₄₈-b-PDMAEMA₅₂, PEG₄₈-b-PDMAEMA₅₆, PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₅, PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₇ ve PEG₄₈-b-PDMAEMA₁₂₅ için elde edilen LCST değerleri, sırasıyla, 47,5°C, 43,2°C, 52,4°C, 37,2°C, 41,5°C ve 38,6°C olarak bulunmuştur. Kopolimerlerin artan molekül ağırlığıyla LCST değerlerinin nispeten doğru orantılı olarak azaldığı görülmüştür.

Sentezlenen kopolimerlerin bu LCST değerleri üzerinde kendiliğinden düzenlenerek agregatlar oluşturduğu DLS ölçümleriyle belirlenmiştir. LCST sıcaklıklarının üzerinde PEG₄₈-b-PDMAEMA₁₉, PEG₄₈-b-PDMAEMA₅₂, PEG₄₈-b-PDMAEMA₅₆, PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₅, PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₇ ve PEG₄₈-b-PDMAEMA₁₂₅ kopolimer çözeltileri için gerçekleştirilen DLS ölçümlerinde elde edilen hidrodinamik çapları, sırasıyla, 142 nm, 164 nm, 98 nm, 100 nm, 334,2 nm ve 190 nm olarak bulunmuştur.

PEG-b-PDMAEMA kopolimer agregatlarının boyut ve morfolojisi TEM ölçümleriyle de incelenmiştir. LCST değerinin altında tüm kopolimerler misel biçiminde düzenlenmektedir. Diğer yandan, LCST değerinin üzerinde sadece PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₇ ve PEG₄₈-b-PDMAEMA₁₂₅ blok kopolimerleri iyi tanımlanmış vezikül tipi (polimerzom) agregatlar oluşturmaktadırlar. PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₇ ve PEG₄₈-b-PDMAEMA₁₂₅ kopolimerlerinden oluşturulan polimerzomların ortalama boyutları sırasıyla, 362±69 nm ve 165±7 nm olarak hesaplanmıştır.

Polimerzom oluşumu üzerine pH'ın etkisini 4,0, 7,4 ve 9,0 tamponlarında hazırlanan %1 (a/h)'lik PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₇ çözeltileri üzerine yapılan UV-Vis spektrofotometresi, dinamik ışık saçılımı ve transmission elektron mikroskobu ölçümleriyle incelenmiştir. Veziküler yapıların (polimerzom) oluşmaya başladığı sıcaklıkların (LCST) pH artışı ile düştüğü belirlenmiştir. PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₇ için 7,4 ve 9,0 pH değerlerinde belirlenen LCST değerleri, sırasıyla, 57,4 ve 29,3 °C'dir. pH=4 için çalışılan sıcaklık aralığında herhangi bir LCST değeri belirlenememiştir. Farklı pH'larda LCST değerlerinin üzerinde kopolimer çözeltisinde bulunan parçacıkların boyutları incelenmiş ve parçacıkların hidrodinamik çaplarının pH 7,4 ve 9,0 için, sırasıyla, 2669 ve 4145 nm olduğu belirlenmiştir. pH 9 için gerçekleştirilen TEM ölçümleri sonucunda LCST değerinin üzerinde ortalama polimerzom boyutları 235±83 nm olarak hesaplanmıştır.

Ölçülen LCST değerleri üzerine derişimin etkisi değişen derişimlerde PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₇ kopolimer çözeltileri üzerine sıcaklığa bağlı olarak gerçekleştirilen UV-Vis spektrofotometresi ve dinamik ışık saçılımı (DLS) ölçümleri ile belirlenmiştir. Ölçümler sonucunda, derişimin artışıyla birlikte LCST değerlerinin düştüğü bulunmuştur. Farklı derişimlerde [%0,1 (a/h), %0,2 (a/h), %0,4 (a/h), %0,6 (a/h), %0,8 (a/h), %1 (a/h) ve %2 (a/h)] ölçülen LCST değerleri, sırasıyla, 49,6, 46,4, 43,3, 42,1, 41,8, 41,5 ve 40,5 °C'dir. LCST değerlerinin üzerinde farklı derişimlerde kopolimer çözeltileri içindeki parçacık büyüklüklerinin derişime bağlı olarak değişimi DLS ölçümleriyle belirlenmiştir. Ölçümler sonucunda, polimer parçacıklarının hidrodinamik çapları, sırasıyla, 120 nm, 198,73 nm, 280,9 nm, 293,73 nm, 366,4 nm, 334,2 nm ve 615,1 nm olarak belirlenmiştir. Derişim artışıyla polimer agregatlarının boyutunun arttığı bulunmuştur.

5. KAYNAKLAR

- Agut, W., Brûlet, A., Schatz, C., Taton, D. ve Lecommandoux, S. 2010. pH and temperature responsive polymeric micelles and polymersomes by self-assembly of poly [2-(dimethylamino) ethyl methacrylate]-b-poly (glutamic acid) double hydrophilic block copolymers. *Langmuir*, 26(13), 10546–10554.
- Ahmed, F. and Discher, D.E. 2004. Self-porating polymersomes of PEG–PLA and PEG–PCL: hydrolysis-triggered controlled release vesicles. *Journal of Controlled Release*, 96(1), 37-53.
- Ahmed, F., Pakunlu, R.I., Brannan, A., Bates, F., Minko, T. and Discher, D.E. 2006. Biodegradable polymersomes loaded with both paclitaxel and doxorubicin permeate and shrink tumors, inducing apoptosis in proportion to accumulated drug. *Journal of Controlled Release*, 116(2), 150-158.
- Ahmed, F., Pakunlu, Srinivas, G., Brannan, A., Bates, F., Klein, M.L., Minko, T. and Discher, D.E. 2006. Shrinkage of a Rapidly Growing Tumor by Drug-Loaded Polymersomes: pH-Triggered Release through Copolymer Degradation. *Molecular Pharmaceutics*, 3(3), 340-350.
- Alarcon, C.H, Pennadam, S. and Alexander, C. 2005. Stimuli responsive polymers for biomedical applications. *Chemical Society Reviews*, 34(3), 276-285.
- Aleksanian, S., Khorsand, B., Schmidt R. and Oh, J.K. 2012. Rapidly thiol-responsive degradable block copolymer nanocarriers with facile bioconjugation. *Polymer Chemistry*, 3(8), 2138-2147.
- Balasubramanian, V., Herranz-Blanco, B., Almeida, P.V., Hirvonen, J. and Santos, H.A. 2016. Multifaceted polymersome platforms: Spanning from self-assembly to drug delivery and protocells. *Progress in Polymer Science*, 60, 51-85.
- Battaglia, G. and Ryan, A.J. 2005. The evolution of vesicles from bulk lamellar gels. *Nature Materials*, 4(11), 869-876.
- Battaglia, G. and Ryan, A.J. 2006. Neuron-like tubular membranes made of diblock copolymer amphiphiles. *Angewandte Chemie-International Edition*, 45(13), 2052-2056.
- Battaglia, G. and Ryan, A.J. 2006. Pathways of polymeric vesicle formation. *Journal of Physical Chemistry B*, 110(21), 10272-10279.
- Brea, R. J., Hardy, M.D. and Devaraj, N.K. 2015. Towards self-assembled hybrid artificial cells: novel bottom-up approaches to functional synthetic membranes. *Chemistry*, 21(36), 12564-12570.
- Bryskhe, K., Jansson, J., Topgaard, D., Schillen, K. and Olsson, U. 2004. Spontaneous vesicle formation in a block copolymer system. *Journal of Physical Chemistry B*, 108(28), 9710-9719.
- Budin, I., Debnath, A. and Szostak, J.W. 2012. Concentration-driven growth of model protocell membranes. *Journal of the American Chemical Society*, 134(51), 20812-20819.

- Cerritelli, S., Velluto D. and Hubbell, J.A. 2007. PEG-SS-PPS: Reduction-Sensitive Disulfide Block Copolymer Vesicles for Intracellular Drug Delivery. *Biomacromolecules*, 8(6), 1966-1972.
- Che, H. ve Van Hest J.C.M. 2016. Stimuli-responsive polymersomes and nanoreactors. *Journal of Materials Chemistry B*, 4(27), 4632-4647.
- Chen, X., Ding, X., Zheng, Z. and Peng, Y. 2006. Thermosensitive cross-linked polymer vesicles for controlled release system. *New Journal of Chemistry*, 30(4), 577-582.
- Cheng, R., Feng, F., Meng, F., Deng, C., Feijen, J. and Zhong, Z. 2011. Glutathione-responsive nano-vehicles as a promising platform for targeted intracellular drug and gene delivery. *Journal of Controlled Release*, 152(1), 2-12.
- Choucair, A., Soo P. L. and Eisenberg, A. 2005. Active Loading and Tunable Release of Doxorubicin from Block Copolymer Vesicles. *Langmuir*, 21(20), 9308-9313.
- Christian, D.A., Tian, A., Ellenbroek, W.G., Levental, I., Rajagopal, K., Janmey, P.A., Liu, A.J., Baumgart, T. and Discher, D.E. 2009. Spotted vesicles, striped micelles and Janus assemblies induced by ligand binding. *Nature Materials*, 8(10), 843-849.
- Colley, H.E., Hearnden, V., Avila-Olias, M., Cecchin, D., Canton, I., Madsen, J., MacNeil, S., Warren, N., Hu, K., McKeating, J.A., Armes, S.P., Murdoch, C., Thornhill, M.H. and Battaglia, G. 2014. Polymersome-mediated delivery of combination anticancer therapy to head and neck cancer cells: 2D and 3D in vitro evaluation. *Molecular pharmaceuticals*, 11(4), 1176-1188.
- Cui, H., Chen, Z., Zhong, S., Wooley, K.L. and Pochan, D.J. 2007. Block copolymer assembly via kinetic control. *Science*, 317(5838), 647-650.
- Dai, S., Ravi, P. and Tam, K.C. 2008. pH-Responsive polymers: synthesis, properties and applications. *Soft Matter*, 4(3), 435-449.
- Discher, B.M., Won, Y.Y., Ege, D.S., Lee, J.C.M., Bates, F.S., Discher, D.E. and Hammer, D.A. 1999. Polymersomes: Tough vesicles made from diblock copolymers. *Science*, 284(5417), 1143-1146.
- Discher, D.E. and Ahmed, F. 2006. Polymersomes. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 8, 323-341.
- Discher, D.E. and Eisenberg, A. 2002. Polymer vesicles. *Science*, 297(5583), 967-973.
- Doberenz, F., Zeng, K., Willems, C., Zhang, K. and Groth, T. 2020. Thermoresponsive polymers and their biomedical application in tissue engineering - a review. *Journal of Materials Chemistry B*, 8(4), 607-628.
- Doncom, K.E.B., Blackman, L.D., Wright, D.B., Gibson M.I. and O'Reilly R.K. 2017. Dispersity effects in polymer self-assemblies: a matter of hierarchical control. *Chemical Society Reviews*, 46(14), 4119-4134.
- Dong, A., Zhai, Y., Xiao, L., Qi, H., Tian, Q., Deng, L. and Guo, R. 2010. Thermosensitive behavior of poly(ethylene glycol)/poly(2-(N,N-dimethylamino)ethyl methacrylate) double hydrophilic block copolymers. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 48(5), 503-508.

- Du, J. and Armes, S.P. 2005. pH-responsive vesicles based on a hydrolytically self-cross-linkable copolymer. *Journal of the American Chemical Society*, 127(37), 12800-12801.
- Du, J., Fan, L. and Liu, Q. 2012. pH-Sensitive Block Copolymer Vesicles with Variable Trigger Points for Drug Delivery. *Macromolecules*, 45(20), 8275-8283.
- Du, J., Tang, Y. Lewis A.L. and Armes, S.P. 2005. pH-sensitive vesicles based on a biocompatible zwitterionic diblock copolymer. *Journal of the American Chemical Society*, 127(51), 17982-17983.
- Du, Y., Chen, W., Zheng, M., Meng, F. and Zhong, Z. 2012. pH-sensitive degradable chimaeric polymersomes for the intracellular release of doxorubicin hydrochloride. *Biomaterials*, 33(29), 7291-7299.
- Gaitzsch, J., Huang, X. and Voit, B. 2016. Engineering Functional Polymer Capsules toward Smart Nanoreactors. *Chemical Reviews*, 116(3), 1053-1093.
- Gallon, E., Matini, T., Sasso, L., Mantovani, G., De Benito, A.A., Sanchis, J., Caliceti, P., Alexander, C., Vicent, M.J. and Salmaso, S. 2015. Triblock Copolymer Nanovesicles for pH-Responsive Targeted Delivery and Controlled Release of siRNA to Cancer Cells. *Biomacromolecules*, 16(7), 1924-1937.
- Gohy, J. F. and Zhao, Y. 2013. Photo-responsive block copolymer micelles: design and behavior. *Chemical Society Reviews*, 42(17), 7117-7129.
- Gräfe, D., Gaitzsch, J., Appelhans, D. and Voit, B. 2014. Cross-linked polymersomes as nanoreactors for controlled and stabilized single and cascade enzymatic reactions. *Nanoscale*, 6(18), 10752-10761.
- Hales, M., Kowollik, C.B., Davis, T.P. and Stenzel, M.H. 2004. Shell-Cross-Linked Vesicles Synthesized from Block Copolymers of Poly(d,l-lactide) and Poly(N-isopropyl acrylamide) as Thermoresponsive Nanocontainers. *Langmuir*, 20(25), 10809-10817.
- Han, D., Boissiere, O., Kumar, S., Tong, X., Tremblay, L. and Zhao, Y. 2012. Two-Way CO₂-Switchable Triblock Copolymer Hydrogels. *Macromolecules*, 45(18), 7440-7445.
- Han, D., Tong, X., Boissière, O. and Zhao, Y. 2012. General Strategy for Making CO₂-Switchable Polymers. *ACS Macro Letters*, 1(1), 57-61.
- Housni, A. and Zhao, Y. 2010. Gold Nanoparticles Functionalized with Block Copolymers Displaying Either LCST or UCST Thermosensitivity in Aqueous Solution. *Langmuir*, 26(15), 12933-12939.
- Hu, X., Zhang, Y., Xie, Z., Jing, X., Bellotti A. and Gu, Z. 2017. Stimuli-Responsive Polymersomes for Biomedical Applications. *Biomacromolecules*, 18(3), 649-673.
- Huo, M., Yuan, J., Tao, L. and Wei, Y. 2014. Redox-responsive polymers for drug delivery: from molecular design to applications. *Polymer Chemistry*, 5(5), 1519-1528.
- Jain, S. and Bates, F.S. 2003. On the origins of morphological complexity in block copolymer surfactants. *Science*, 300(5618), 460-464.

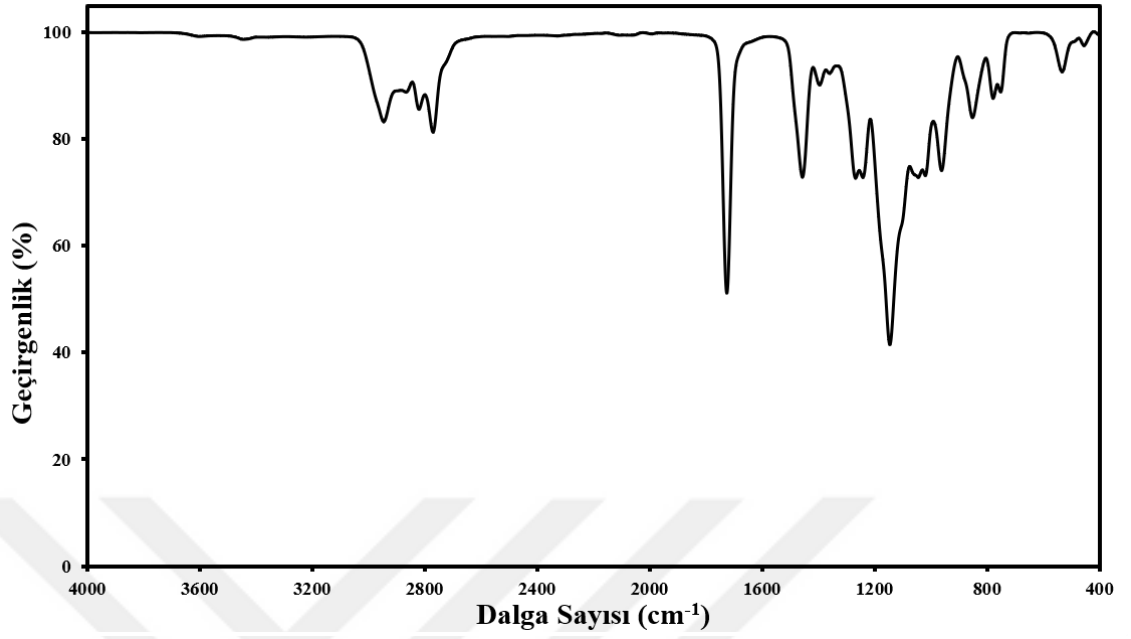
- Johnson, R.P., Uthaman, S., John, J.V., Lee, H.R., Lee, S.J., Park, H., Park, I.K., Suh, H. and Kim, I. 2015. Poly(PEGA)-b-poly(L-lysine)-b-poly(L-histidine) Hybrid vesicles for tumoral pH-triggered intracellular delivery of doxorubicin hydrochloride. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 7(39), 21770-21779.
- Kim, S.H., Shum, H.C., Kim, J.W., J. Cho, C. and Weitz, D.A. 2011. Multiple polymersomes for programmed release of multiple components. *Journal of the American Chemical Society*, 133(38), 15165-15171.
- Kim, Y., M. Tewari, Pajerowski, J.D., Cai, S., Sen, S., Williams, J., Sirsi, S., Lutz, G. and Discher, D.E. 2009. Polymersome delivery of siRNA and antisense oligonucleotides. *Journal of Controlled Release*, 134(2), 132-140.
- Kita-Tokarczyk, K., Grumelard, J., Haefele, T. and Meier, W. 2005. Block copolymer vesicles - using concepts from polymer chemistry to mimic biomembranes. *Polymer*, 46(11), 3540-3563.
- Koňák, Č., Rathi R.C., Kopečková, P. and Kopeček, J. 1997. Photoregulated Association of Water-Soluble Copolymers with Spirobenzopyran-Containing Side Chains. *Macromolecules*, 30(18), 5553-5556.
- Kumar, A., Lale, S.V., Mahajan, S., Choudhary, V. and Koul, V. 2015. ROP and ATRP Fabricated Dual Targeted Redox Sensitive Polymersomes Based on pPEGMA-PCL-ss-PCL-pPEGMA Triblock Copolymers for Breast Cancer Therapeutics. *ACS Applied Materials ve Interfaces*, 7(17), 9211-9227.
- Li, Y., Lokitz, B.S. ve McCormick, C. L. 2006. Thermally Responsive Vesicles and Their Structural “Locking” through Polyelectrolyte Complex Formation. *Angewandte Chemie International Edition*, 45(35), 5792-5795.
- Li, Y., Smith, A.E., Lokitz, B.S. and McCormick, C.L. 2007. In Situ Formation of Gold-“Decorated” Vesicles from a RAFT-Synthesized, Thermally Responsive Block Copolymer. *Macromolecules*, 40(24), 8524-8526.
- Li, Z., Kesselman, E., Talmon, Y., Hillmyer, M.A. and Lodge, T.P. 2004. Multicompartment micelles from ABC miktoarm stars in water. *Science*, 306(5693), 98-101.
- Liu, B.W., Zhou, H., Zhou, S.T., Zhang, H.J., Feng, A.C., Jian, C.M., Hu, J., Gao, W.P. and Yuan, J.Y. 2014. Synthesis and Self-Assembly of CO₂-Temperature Dual Stimuli-Responsive Triblock Copolymers. *Macromolecules*, 47(9), 2938-2946.
- Liu, F., Kozlovskaya, V., Medipelli, S., Xue, B., Ahmad, F., Saeed, M., Cropek, D. and Kharlampieva, E. 2015. Temperature-Sensitive Polymersomes for Controlled Delivery of Anticancer Drugs. *Chemistry of Materials*, 27(23), 7945-7956.
- Liu, G., Ma, S., Li, S., Cheng, R., Meng, F., Liu, H. and Zhong, Z. 2010. The highly efficient delivery of exogenous proteins into cells mediated by biodegradable chimaeric polymersomes. *Biomaterials*, 31(29), 7575-7585.
- Lomas, H., Canton, I., MacNeil, S., Du, J., Armes, S.P., Ryan, A.J., Lewis, A.L. and Battaglia, G. 2007. Biomimetic pH Sensitive Polymersomes for Efficient DNA Encapsulation and Delivery. *Advanced Materials*, 19(23), 4238-4243.
- Lomas, H., Massignani, M., Abdullah, K.A., Canton, I., Lo Presti, C., MacNeil, S., Du, J.Z., Blanazs, A., Madsen, J., Armes, S.P., Lewis, A.L. and Battaglia, G. 2008.

- Non-cytotoxic polymer vesicles for rapid and efficient intracellular delivery. *Faraday Discussions*, 139, 143-159.
- Mai, Y. and Eisenberg, A. 2012. Self-assembly of block copolymers. *Chemical Society Reviews*, 41(18), 5969-5985.
- Mansy, S.S., Schrum, J.P., Krishnamurthy, M., Tobe, S., Treco, D.A. and Szostak, J.W. 2008. Template-directed synthesis of a genetic polymer in a model protocell. *Nature*, 454(7200), 122-125.
- Mashaghi, S., Jadidi, T., Koenderink, G. and Mashaghi, A. 2013. Lipid nanotechnology. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(2), 4242-4282.
- Matini, T., Francini, N., Battocchio, A., Spain, S.G., Mantovani, G., Vicent, M.J., Sanchis, J., Gallon, E., Mastrotto, F., Salmaso, S., Caliceti, P. and Alexander, C. 2014. Synthesis and characterization of variable conformation pH responsive block co-polymers for nucleic acid delivery and targeted cell entry. *Polymer Chemistry*, 5(5), 1626-1636.
- Matyjaszewski, K. 2012. Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP): Current Status and Future Perspectives. *Macromolecules*, 45(10), 4015-4039.
- Matyjaszewski, K. and Xia, J. 2001. Atom Transfer Radical Polymerization. *Chemical Reviews*, 101(9), 2921-2990.
- Meng, F., Engbers, G.H.M. and Feijen, J. 2005. Biodegradable polymersomes as a basis for artificial cells: encapsulation, release and targeting. *Journal of Controlled Release*, 101(1), 187-198.
- Meng, F., Zhong, Z. and Feijen, J. 2009. Stimuli-responsive polymersomes for programmed drug delivery. *Biomacromolecules*, 10(2), 197-209.
- Napoli, A., Valentini, M., Tirelli, N., Muller, M. and Hubbell, J.A. 2004. Oxidation-responsive polymeric vesicles. *Nature Materials*, 3(3), 183-189.
- O'Neil, C. P., Suzuki, T., Demurtas, D., Finka, A. and Hubbell, J.A. 2009. A Novel Method for the Encapsulation of Biomolecules into Polymersomes via Direct Hydration. *Langmuir*, 25(16), 9025-9029.
- Oliveira, H., Perez-Andres, E., Thevenot, J., Sandre, O., Berra, E. and Lecommandoux, S. 2013. Magnetic field triggered drug release from polymersomes for cancer therapeutics. *Journal of Controlled Release*, 169(3), 165-170.
- Palivan, C. G., Goers, R., Najer, A., Zhang, X., Car, A. and Meier, W. 2016. Bioinspired polymer vesicles and membranes for biological and medical applications. *Chemical Society Reviews*, 45(2), 377-411.
- Parnell, A. J., Tzokova, N., Topham, P.D., Adams, D.J., Adams, S., Fernyhough, C.M., Ryan, A.J. and Jones, R.A.L. 2009. The efficiency of encapsulation within surface rehydrated polymersomes. *Faraday Discussions*, 143, 29-46.
- Perro, A., Nicolet, C., Angly, J., Lecommandoux, S., Le Meins J.F. and Colin, A. 2011. Mastering a Double Emulsion in a Simple Co-Flow Microfluidic to Generate Complex Polymersomes. *Langmuir*, 27(14), 9034-9042.
- Pietsch, C., Mansfeld, U., Guerrero-Sanchez, C., Hoeppener, S., Vollrath, A., Wagner, M., Hoogenboom, R., Saubern, S., Thang, S.H., Becer, C.R., Chiefari, J. and

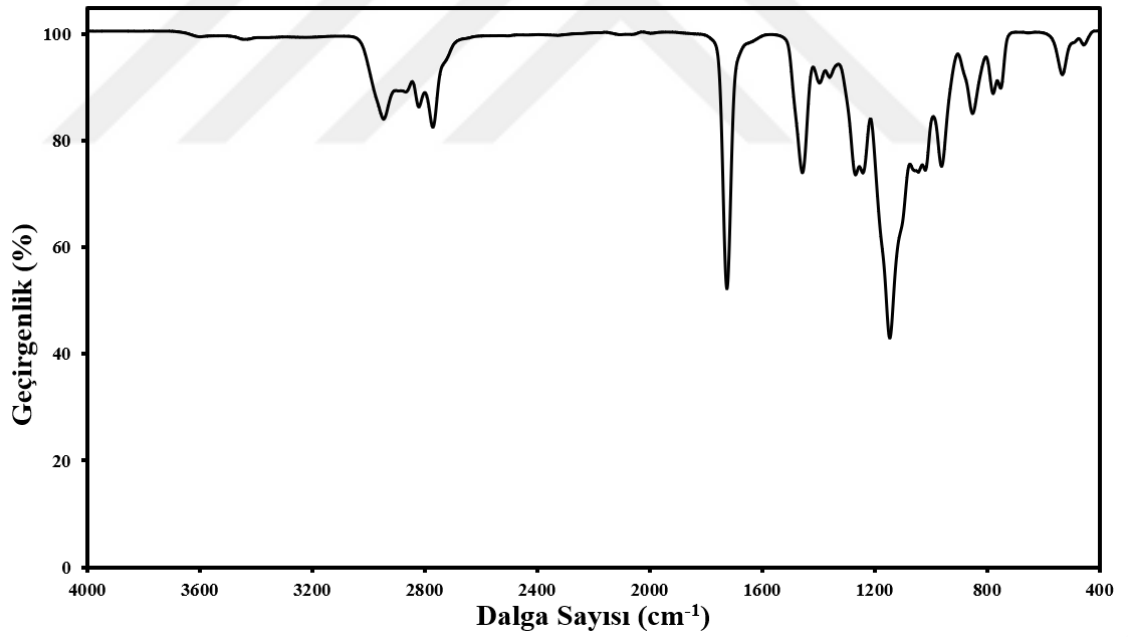
- Schubert, U.S. 2012. Thermo-Induced Self-Assembly of Responsive Poly(DMAEMA-b-DEGMA) Block Copolymers into Multi- and Unilamellar Vesicles. *Macromolecules*, 45(23), 9292-9302.
- Photos, P. J., Bacakova, L., Discher, B., Bates, F.S. and Discher, D.E. 2003. Polymer vesicles in vivo: correlations with PEG molecular weight. *Journal of Controlled Release*, 90(3), 323-334.
- Pramod, P. S., Takamura, K., Chaphekar, S., Balasubramanian, N. and Jayakannan, M. 2012. Dextran Vesicular Carriers for Dual Encapsulation of Hydrophilic and Hydrophobic Molecules and Delivery into Cells. *Biomacromolecules*, 13(11), 3627-3640.
- Qiao, Y., Huang, Y., Qiu, C., Yue, X.Y., Deng, L.D., Wan, Y.M., Xing, J.F., Zhang, C.Y., Yuan, S.H., Dong, A.J. and Xu, J.Q. 2010. The use of PEGylated poly [2-(N,N-dimethylamino) ethyl methacrylate] as a mucosal DNA delivery vector and the activation of innate immunity and improvement of HIV-1-specific immune responses. *Biomaterials*, 31(1), 115-123.
- Qin, S., Geng, Y., Discher, D.E. and Yang, S. 2006. Temperature-Controlled Assembly and Release from Polymer Vesicles of Poly(ethylene oxide)-block- poly(N-isopropylacrylamide). *Advanced Materials*, 18(21), 2905-2909.
- Rideau, E., Dimova, R., Schwille, P., Wurm, F.R. and Landfester, K. 2018. Liposomes and polymersomes: a comparative review towards cell mimicking. *Chemical Society Reviews*, 47(23), 8572-8610.
- Rizzello, L., Robertson, J.D., Elks, P.M., Poma, A., Daneshpour, N., Prajsnar, T.K., Evangelopoulos, D., Canseco, J.O., Yona, S., Marriott, H.M., Dockrell, D.H., Foster, S.J., De Geest, B., De Koker, S., McHugh, T., A. Renshaw, S. and Battaglia, G. 2017. Targeting mononuclear phagocytes for eradicating intracellular parasites. *bioRxiv*, 119297.
- Scott, E.A., Stano, A., Gillard, M., Maio-Liu, A.C., Swartz, M.A. ve Hubbell, J.A. 2012. Dendritic cell activation and T cell priming with adjuvant- and antigen- loaded oxidation-sensitive polymersomes. *Biomaterials*, 33(26), 6211-6219.
- Shum, H.C., Kim J.W. and Weitz, D.A. 2008. Microfluidic fabrication of monodisperse biocompatible and biodegradable polymersomes with controlled permeability. *Journal of the American Chemical Society*, 130(29), 9543-9549.
- Sidoli, U., Tee, H.T., Raguzin, I. Muhldorfer, J., Wurm, F.R. and Synytska, A. 2019. Thermo-Responsive Polymer Brushes with Side Graft Chains: Relationship Between Molecular Architecture and Underwater Adherence. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24).
- Smith, A.E., Xu, X. and McCormick, C.L. 2010. Stimuli-responsive amphiphilic (co)polymers via RAFT polymerization. *Progress in Polymer Science*, 35(1), 45-93.
- Stubbs, E., E. Laskowski, E., Conor, P., Heinze, D.A. Karis, D. and E. M. Glogowski E.M. 2017. Control of pH-and temperature-responsive behavior of mPEG-b-PDMAEMA copolymers through polymer composition. *Journal of Macromolecular Science Part a-Pure and Applied Chemistry*, 54(4), 228-235.

- Subramaniam, S., Fahy, E.S. Gupta, M., Sud, R., Byrnes, W.D. Cotter, A.R. Dinasarapu and M. R. Maurya 2011. Bioinformatics and systems biology of the lipidome. *Chemical Society Reviews*, 111(10), 6452-6490.
- Tang, W. and Matyjaszewski, K. 2006. Effect of ligand structure on activation rate constants in ATRP. *Macromolecules*, 39(15), 4953-4959.
- Tanner, P., Baumann, P. Enea, R., Onaca, O., Palivan, C. and Meier, W. 2011. Polymeric vesicles: from drug carriers to nanoreactors and artificial organelles. *Accounts of Chemical Research*, 44(10), 1039-1049.
- Tanner, P., Onaca, O., Balasubramanian, V., Meier, W. and Palivan, C.G. 2011. Enzymatic Cascade Reactions inside Polymeric Nanocontainers: A Means to Combat Oxidative Stress. *Chemistry-a European Journal*, 17(16), 4552-4560.
- Thiele, J., Abate, A.R.H., Shum, C., Bachtler, S., Förster, S. and Weitz, D.A. 2010. Fabrication of Polymersomes using Double-Emulsion Templates in Glass-Coated Stamped Microfluidic Devices. *Small*, 6(16), 1723-1727.
- Thiele, J., Steinhauser, D.T. and Förster, S. 2010. Preparation of Monodisperse Block Copolymer Vesicles via Flow Focusing in Microfluidics. *Langmuir*, 26(9), 6860-6863.
- van Oers, M. C., Rutjes, F.P. and van Hest, J.C. 2013. Tubular polymersomes: a cross-linker-induced shape transformation. *Journal of the American Chemical Society*, 135(44), 16308-16311.
- van Dongen, S.F.M., Nallani, M., Cornelissen, J.J.L.M., Nolte, R.J.M. and van Hest, J.C.M. 2009. A Three-Enzyme Cascade Reaction through Positional Assembly of Enzymes in a Polymersome Nanoreactor. *Chemistry – A European Journal*, 15(5), 1107-1114.
- Wang, G., Tong, X. and Zhao, Y. 2004. Preparation of Azobenzene-Containing Amphiphilic Diblock Copolymers for Light-Responsive Micellar Aggregates. *Macromolecules*, 37(24), 8911-8917.
- Wang, X., Guerin, G.H., Wang, Y., Wang, M.I. and Winnik, M.A. 2007. Cylindrical block copolymer micelles and co-micelles of controlled length and architecture. *Science*, 317(5838), 644-647.
- Wang, X., Hu, J., Liu, G., Tian, J.H., Wang, G.M. and Liu, S. 2015. Reversibly Switching Bilayer Permeability and Release Modules of Photochromic Polymersomes Stabilized by Cooperative Noncovalent Interactions. *Journal of the American Chemical Society*, 137(48), 15262-15275.
- Wang, X., Liu, G., Hu, J., Zhang, G. and Liu, S. 2014. Concurrent Block Copolymer Polymersome Stabilization and Bilayer Permeabilization by Stimuli-Regulated "Traceless" Crosslinking. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(12), 3138-3142.
- Warren, N.J. and Armes, S.P. 2014. Polymerization-induced self-assembly of block copolymer nano-objects via RAFT aqueous dispersion polymerization. *Journal of the American Chemical Society*, 136(29), 10174-10185.

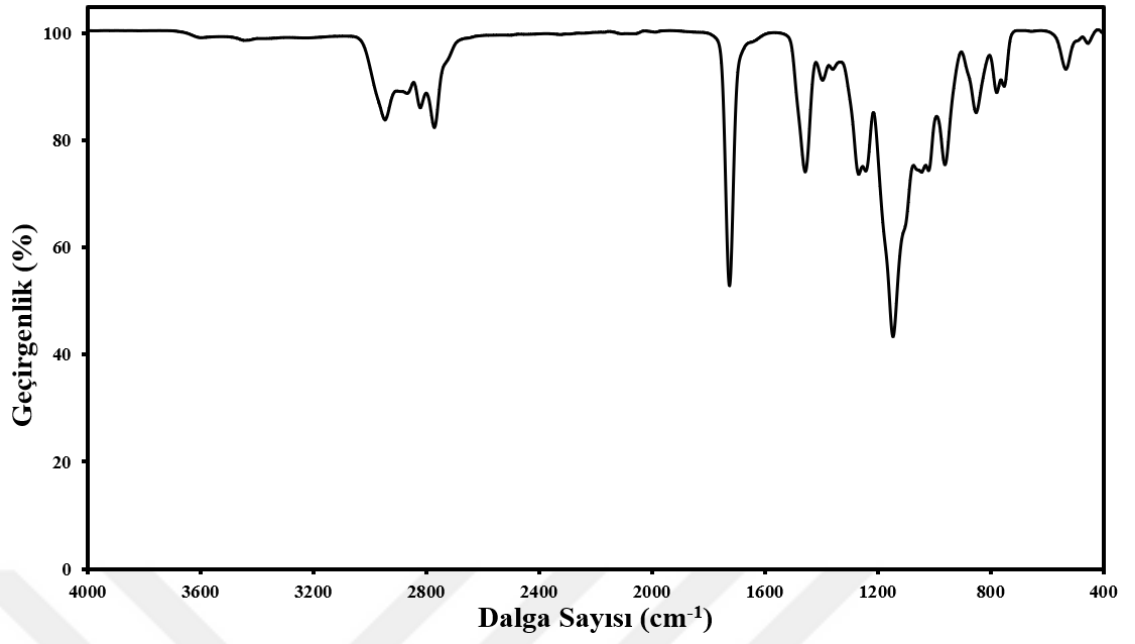
- Wei, H.B., Zhang, J.L., Shi, N., Liu, Y., Zhang, B., Zhang, J. and Wan, X.H. 2015. A recyclable polyoxometalate-based supramolecular chemosensor for efficient detection of carbon dioxide.
- Wei, H., Zhang, X. Z., Chen, W.Q., Cheng, S.X. and Zhuo, R.X. 2007. Self-assembled thermosensitive micelles based on poly(L-lactide-star block-N-isopropylacrylamide) for drug delivery. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 83(4), 980-989.
- Yan, B., Han, D., Boissière, O., Ayotte, P. and Zhao, Y. 2013. Manipulation of block copolymer vesicles using CO₂: dissociation or “breathing”. *Soft Matter*, 9(6), 2011-2016.
- Yan, Q. and Sang, W. 2016. H₂S gasotransmitter-responsive polymer vesicles. *Chemical Science*, 7(3), 2100-2105.
- Yan, Q., Zhou, R., Fu, C., Zhang, H., Yin, Y. and Yuan, J. 2011. CO₂-Responsive Polymeric Vesicles that Breathe. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(21), 4923-4927.
- Yan, Y., Wang, Y., Heath, J.K., Nice, E.C. and Caruso, F. 2011. Cellular Association and Cargo Release of Redox-Responsive Polymer Capsules Mediated by Exofacial Thiols. *Advanced Materials*, 23(34), 3916-3921.
- Yoshimitsu, H., Korchagina, E., Kanazawa, A., Kanaoka, S., Winnik, F.M. and Aoshima, S. 2016. Shape-switching self-assembly of new diblock copolymers with UCST-type and LCST-type segments in water. *Polymer Chemistry*, 7(11), 2062-2068.
- Yu, S., Azzam, T., Rouiller, I. and Eisenberg, A. 2009. “Breathing” Vesicles. *Journal of the American Chemical Society*, 131(30), 10557-10566.
- Yu, Y. and Eisenberg, A. 1997. Control of Morphology through Polymer–Solvent Interactions in Crew-Cut Aggregates of Amphiphilic Block Copolymers. *Journal of the American Chemical Society*, 119(35), 8383-8384.
- Yu, Z.-Q., Sun, J.T., Pan, C.Y. and Hong, C.Y. 2012. Bioreducible nanogels/microgels easily prepared via temperature induced self-assembly and self-crosslinking. *Chemical Communications*, 48(45), 5623-5625.
- Zelzer, M., Todd S.J., Hirst, A.R., McDonald, T.O. and Ulijn, R.V. 2013. Enzyme responsive materials: design strategies and future developments. *Biomaterials Science*, 1(1), 11-39.
- Zhang, X.Y., Tanner, P., Graff, A., Palivan C.G. and Meier W. 2012. Mimicking the cell membrane with block copolymer membranes. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry*, 50(12), 2293-2318.
- Zhu, T.F. and Szostak, J.W. 2009. Coupled growth and division of model protocell membranes. *Journal of the American Chemical Society*, 131(15), 5705-5713.
- Zou, H. and Yuan, W. 2015. CO₂- and thermo-responsive vesicles: from expansion–contraction transformation to vesicles-micelles transition. *Polymer Chemistry*, 6(13), 2457-2465.

7. EKLER

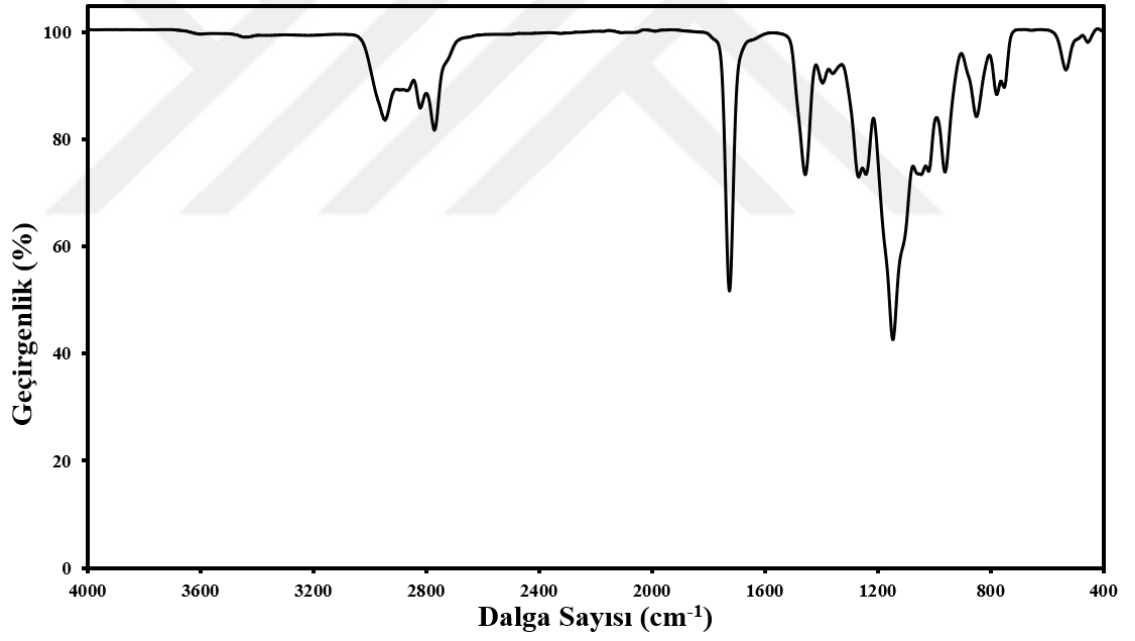
Şekil 7.1. PEG₄₈-b-PDMAEMA₅₂'nin FTIR spektrumu



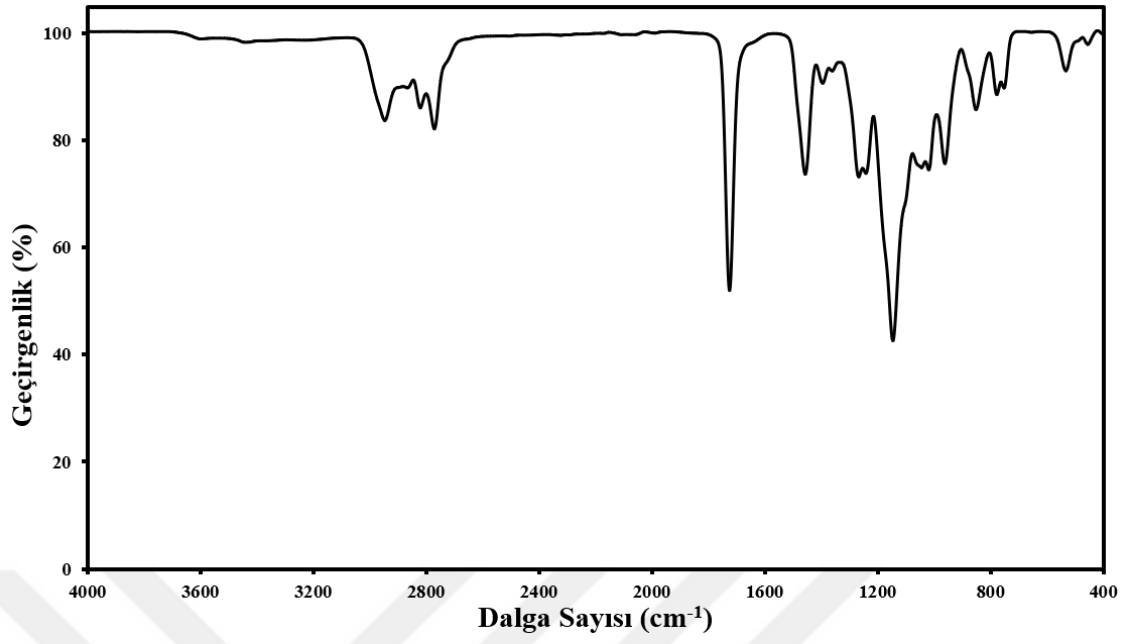
Şekil 7.2. PEG₄₈-b-PDMAEMA₅₆'nin FTIR spektrumu



Şekil 7.3. PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₅'in FTIR spektrumu



Şekil 7.4. PEG₄₈-b-PDMAEMA₇₇'nin FTIR spektrumu



Şekil 7.5. PEG₄₈-b-PDMAEMA₁₂₅'in FTIR spektrumu

ÖZGEÇMİŞ

SEYİTHAN KANSIZ

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2018–2021	Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Bölümü, Antalya
Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2011–2017	Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Bölümü, Antalya

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Araştırma Görevlisi	Ankara Üniversitesi
2021–Devam Ediyor	Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Ankara

ESERLER

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

- 1– Demir E., Topel, Ö, **Kansız, S.**, Akkoyunlu G., Dogan M., Kandur M.Y. (2021). A systematic *in vivo* study of copper hydroxide nanopesticides using *Drosophila Melanogaster*: Cellular uptake and biological impacts. Virtual 11th Congress of Toxicology in Developing Countries (CTDC11), 13-16 Haziran 2021, Kuala Lumpur, Malezya (sözlü sunum)
- 2– Demir E., **Kansız, S.**, Dogan M., Topel, Ö., Akkoyunlu G., Kandur M.Y. (2021). A comprehensive *in vivo* study using *drosophila melanogaster*: new insights into mechanisms and biological effects of permethrin nanopesticides. Nanotech France 2021 International Conference. 23-25 Haziran 2021, Paris, Fransa (poster sunum)