

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İLAC TAŞIYICI SİSTEMLER OLARAK TEK-ZİNCİR POLİMER
NANOPARTİKÜLLER**

DOKTORA TEZİ

Hatice Kübra BATU

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Doktora Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Binnur TEMEL

MAYIS 2025

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İLAC TAŞIYICI SİSTEMLER OLARAK TEK-ZİNCİR POLİMER
NANOPARTİKÜLLER**

DOKTORA TEZİ

**Hatice Kübra BATU
195314001**

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Doktora Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Binnur TEMEL

MAYIS 2025

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 195314001 numaralı Doktora Öğrencisi Hatice Kübra BATU, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "İLAC TAŞIYICI SİSTEMLER OLARAK TEK-ZİNCİR POLİMER NANOPARTİKÜLLER" başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Binnur TEMEL**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Deniz CEYLAN**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Prof. Dr. Aydan DAĞ
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Prof. Dr. Demet KARACA BALTA
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Muhammet Ü. KAHVECİ
İstanbul Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Belma ZENGİN KURT
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Teslim Tarihi : 13 Haziran 2025
Savunma Tarihi : 15 Mayıs 2025

ÖNSÖZ

Tez çalışmam boyunca hiç bıkmadan bana yol gösterdiği, tez dahilinde veya haricinde her türlü sıkıntıda bana destek olan, bu süreçte bilgi, deneyim, ilgi ve alakadarlığımı eksik etmeyen ve üzerimde emeği ödenmeyecek kadar çok olan sevgili danışman hocam sayın Prof. Dr. Binnur TEMEL'e çok teşekkür ederim.

Laboratuvarında, her daim halimden haberdar olup maddi manevi desteklerini esirgemeyen ve benimle bilgi birikimlerini paylaşan, tez süresince yardımlarını esirgemeyen, bu yolculukta beraber ilerlediğimiz laboratuvar arkadaşlarım Gizem İĞDELİ, Esmâ SAMUK ve Zehra DEMİR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca desteklerini benden esirgemeyen bu süreçte yanımda olan sevgili aileme ve eşime çok teşekkür ederim.

Tezim için çalıştığım yıllarda destek ve rehberliklerinden dolayı Tez İzleme Komitesi Üyesi Prof. Dr. Deniz CEYLAN ve Prof. Dr. Muhammet Ü. KAHVECİ hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 20210604 numaralı proje ile ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 123Z112 numaralı proje ile desteklenmiştir. Projeye verdiği destekten ötürü TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, BİDEB 2211-C Bilim ve Teknolojide Öncelikli Alanlarda Ulusal Doktora Burs Programı kapsamında sağladığı finansal destek için TÜBİTAK'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Bezmialem Vakıf Üniversitesi İlaç Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne (İLMER) sunduğu altyapı ve teknik destek için teşekkür ederim.

Mayıs 2025

Hatice Kübra Batu
(Eczacı)

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Hatice Kübra Batu

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	iii
BEYAN	iv
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMALAR	viii
SEMBOLLER	ix
TABLO LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xi
ÖZET	xvi
SUMMARY	xviii
1. GİRİŞ	1
2. TEORİK BİLGİ	2
2.1 Polimerler	2
2.1.1 Polimerlerin sınıflandırılması	2
2.1.1.1 Poli(amino asit)	4
2.1.2 Polimerizasyon yöntemleri	5
2.1.2.1 Kontrollü/yaşayan radikal polimerizasyonu	7
2.1.2.2 Tersinir katılma-ayırışma zincir transfer (RAFT) polimerizasyonu	8
2.1.2.3 Halka açılma polimerizasyonu (ROP)	10
2.2 İlaç Taşıyıcı Sistemler	12
2.2.1 Polimerik miseller	13
2.3 Tek-Zincir Polimer Nanopartiküller (SCNP'ler)	15
2.3.1 SCNP'lerin sentezi	17
2.3.1.1 SCNP'lerin katlanma (çökme) mekanizmaları	18
2.3.1.2 SCNP'lerin kimyasal bağlanma mekanizmaları	20
2.3.2 SCNP'lerin karakterizasyonu	21
2.3.3 SCNP'lerin uygulama alanları	22
2.4 Kurkumin	25
2.4.1 Biyolojik etkileri	27
2.4.2 Farmakokinetik özellikleri ve biyoyararlanımı	29
2.5 Sisplatin	29
2.6 Doksorubisin (DOKS)	30
3. MATERYAL VE METOD	33
3.1 Malzemeler	33
3.2 Kullanılan Cihazlar	34
3.3 Deneysel Kısım	35
3.3.1 Çapraz bağlayıcı olarak sisplatin kullanılarak SCNP'lerin oluşturulması	35
3.3.1.1 RAFT polimerizasyonu ile poli[poli(etilen glikol) metil eter metakrilat- <i>r</i> -metakrilik asit] (P(PEGMA- <i>r</i> -MAA)) sentezi	35
3.3.1.2 PEG-CTPA'nın sentezi	35

3.3.1.3 RAFT polimerizasyonu ile poli(etilen glikol)- <i>b</i> -poli(<i>N</i> -izopropilakrilamit- <i>r</i> -metakrilik asit) (PEG- <i>b</i> -P(NIPAM- <i>r</i> -MAA)) sentezi	35
3.3.1.4 Sisplatin ile P(PEGMA- <i>r</i> -MAA) kopolimerinden SCNP'lerin oluşturulması	36
3.3.1.5 Sisplatin ile PEG- <i>b</i> -P(NIPAM- <i>r</i> -MAA) kopolimerinden iribaş yapılı TSCNP'lerin oluşturulması	36
3.3.1.6 γ -Benzil-L-glutamat <i>N</i> -karboksianhidrit (Glu-NCA) sentezi	37
3.3.1.7 N ϵ -Benzilkarbonil-L-lizin <i>N</i> -karboksianhidrit (Liz-NCA) sentezi	37
3.3.1.8 L-alanin <i>N</i> -karboksianhidrit (Ala-NCA) sentezi.....	37
3.3.1.9 Poli[(γ -benzil-L-glutamat <i>N</i> -karboksianhidrit)- <i>r</i> -(N ϵ -benzilkarbonil-L-lizin <i>N</i> -karboksianhidrit)] [P(Glu-NCA- <i>r</i> -Liz-NCA)] sentezi	38
3.3.1.10 Poli[(γ -benzil-L-glutamat)- <i>r</i> -(N ϵ -benzilkarbonil-L-lizin)] [P(Glu- <i>r</i> -Liz)] sentezi	38
3.3.1.11 Sisplatin ile P(Glu- <i>r</i> -Liz) kopolimerinden SCNP'lerin oluşturulması	38
3.3.1.12 Poli(etilen glikol)- <i>b</i> -poli[(γ -benzil-L-glutamat <i>N</i> -karboksianhidrit)- <i>r</i> -(L-alanin <i>N</i> -karboksianhidrit)] [PEG- <i>b</i> -P(Glu-NCA- <i>r</i> -Ala-NCA)] sentezi	38
3.3.1.13 Poli(etilen glikol)- <i>b</i> -poli[(γ -Benzil-L-glutamat)- <i>r</i> -(L-alanin)] [PEG- <i>b</i> -P(Glu- <i>r</i> -Ala)] sentezi	39
3.3.2 Çapraz bağlayıcı olarak Cur kullanılarak SCNP'lerin oluşturulması	39
3.3.2.1 2-Bromoetil metakrilat (BrMA) sentezi.....	39
3.3.2.2 RAFT polimerizasyonu ile poli[poli(etilen glikol metil eter metakrilat)- <i>r</i> -(2-bromoetil metakrilat)] (P(PEGMA- <i>r</i> -BrMA)) sentezi	39
3.3.2.3 Cur ile P(PEGMA- <i>r</i> -BrMA) polimerlerinden SCNP'lerin oluşturulması	40
3.3.2.4 SCNP-2'nin ilaç salım çalışması.....	40
3.3.2.5 Antioksidan aktivite tayini	40
3.3.2.6 Antiinflamatuvar aktivite tayini	41
3.3.2.7 Hücre kültürü	41
3.3.2.8 SCNP-2'nin <i>in vitro</i> hücre sel alımı.....	41
3.3.2.9 SCNP-2'nin <i>in vitro</i> sitotoksitesi.....	42
3.3.3 Çapraz bağlayıcı olarak Cur kullanılarak TSCNP'lerin oluşturulması.....	42
3.3.3.1 RAFT polimerizasyonu ile poli(etilen glikol)- <i>b</i> -poli[(metil metakrilat)- <i>r</i> -(metakrilik asit)] (PEG- <i>b</i> -P(MMA- <i>r</i> -MAA)) sentezi ..	42
3.3.3.2 Cur ile PEG- <i>b</i> -P(MMA- <i>r</i> -MAA) kopolimelerinden TSCNP'lerin oluşturulması	43
3.3.3.3 TSCNP'lerden misel oluşturulması.....	43
3.3.3.4 TSCNP'lerden DOKS yüklü misel oluşturulması	43
3.3.3.5 Kritik misel konsantrasyonunun (KMK) belirlenmesi.....	43
3.3.3.6 İlaç yükleme kapasitesi (İYK) ve ilaç yükleme veriminin (İYV) belirlenmesi	44
3.3.3.7 M _{TSCNP} DOKS'in ilaç salım çalışması.....	44
3.3.3.8 Antioksidan aktivite tayini	45
3.3.3.9 Hücre kültürü	45
3.3.3.10 M _{TSCNP} DOKS'un <i>in vitro</i> hücre sel alımı	45
3.3.3.11 M _{TSCNP} DOKS'un <i>in vitro</i> sitotoksitesi.....	45
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	47

4.1 Çapraz Bağlayıcı Olarak Sisplatin Kullanılarak SCNP'lerin Oluşturulmasına Dair Bulgular	47
4.1.1 RAFT polimerizasyonu ile P(PEGMA- <i>r</i> -MAA) sentezi ve karakterizasyonu	48
4.1.2 PEG-CTPA'nın sentezi ve karakterizasyonu	52
4.1.3 RAFT polimerizasyonu ile PEG- <i>b</i> -P(NIPAM- <i>r</i> -MAA) sentezi ve karakterizasyonu	54
4.1.4 Sisplatin ile P(PEGMA- <i>r</i> -MAA)-2 kopolimerinden SCNP'lerin oluşturulması ve karakterizasyonu	57
4.1.5 Sisplatin ile PEG- <i>b</i> -P(NIPAM- <i>r</i> -MAA)-3 kopolimerinden TSCNP'lerin oluşturulması ve karakterizasyonu	61
4.1.6 γ -Benzil-L-glutamat <i>N</i> -karboksianhidrit (Glu-NCA) sentezi ve karakterizasyonu	63
4.1.7 N ϵ -benzilkarbonil-L-lizin <i>N</i> -karboksianhidrit (Liz-NCA) sentezi ve karakterizasyonu	65
4.1.8 L-alanin <i>N</i> -karboksianhidrit (Ala-NCA) sentezi ve karakterizasyonu.....	66
4.1.9 P(Glu-NCA- <i>r</i> -Liz-NCA) sentezi ve karakterizasyonu.....	68
4.1.10 P(Glu- <i>r</i> -Liz) sentezi ve karakterizasyonu	70
4.1.11 Sisplatin ile P(Glu- <i>r</i> -Liz) kopolimerinden SCNP'lerin oluşturulması ve karakterizasyonu	71
4.1.12 PEG- <i>b</i> -P(Glu-NCA- <i>r</i> -Ala-NCA) sentezi ve karakterizasyonu	73
4.1.13 PEG- <i>b</i> -P(Glu- <i>r</i> -Ala) sentezi ve karakterizasyonu	75
4.1.14 Sisplatin ile PEG- <i>b</i> -(Glu- <i>r</i> -Ala) kopolimerinden TSCNP'lerin oluşturulması ve karakterizasyonu	76
4.2 Çapraz bağlayıcı olarak Cur kullanılarak SCNP'lerin oluşturulmasına dair bulgular	77
4.2.1 BrMA sentezi ve karakterizasyonu	77
4.2.2 RAFT polimerizasyonu ile P(PEGMA- <i>r</i> -BrMA) sentezi ve karakterizasyonu	79
4.2.3 Cur ile P(PEGMA- <i>r</i> -BrMA) polimerlerinden SCNP'lerin oluşturulması ve karakterizasyonu	85
4.2.4 Antioksidan aktivite tayini	91
4.2.5 Antiinflamatuvar aktivite tayini	92
4.2.6 SCNP-2'nin ilaç salım çalışması.....	93
4.2.7 SCNP-2'nin <i>in vitro</i> hücresel alımı ve sitotoksitesi	94
4.3 Çapraz Bağlayıcı Olarak Cur Kullanılarak TSCNP'lerin Oluşturulmasına Dair Bulgular	96
4.3.1 RAFT Polimerizasyonu ile PEG- <i>b</i> -P(MMA- <i>r</i> -MAA) sentezi ve karakterizasyonu	96
4.3.2 Cur ile PEG- <i>b</i> -P(MMA- <i>r</i> -MAA) kopolimelerinden TSCNP'lerin oluşturulması ve karakterizasyonu	102
4.3.3 TSCNP'ler ile boş ve DOKS yüklü misellerin oluşturulması ve karakterizasyonu	107
4.3.4 KMK'nın belirlenmesi	108
4.3.5 M _{TSCNP} DOKS'un ilaç salım çalışması	109
4.3.6 Antioksidan aktivite tayini	110
4.3.7 M _{TSCNP} DOKS'un <i>in vitro</i> hücresel alımı ve sitotoksitesi.....	111
5. SONUÇ	115
KAYNAKLAR	117
ÖZGEÇMİŞ.....	130

KISALTMALAR

¹H-NMR	: Proton nükleer manyetik rezonans
AIBN	: 2,2'-azobis(2-metilpropiyonitril)
Ala	: Alanin
BrMA	: 2-Bromoetil metakrilat
BSA	: Bovin serum albumin
CDTP	: 4-Siyano-4[(dodesilsülfaniltiyokarbonil)sülfanil]pentanoik asit
Cur	: Kurkumin
DCC	: <i>N,N'</i> -Disiklohekzilkarbodiimit
DCM	: Diklorometan
DLS	: Dinamik ışık saçılması
DMAP	: Dimetilamino piridin
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DOKS	: Doksorubisin
DSC	: Diferansiyel taramalı kalorimetri
EtOAc	: Etil asetat
FDA	: Gıda ve ilaç idaresi
FT-IR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi
HBr	: Hidrojen bromür
K₂CO₃	: Potasyum karbonat
KMK	: Kritik misel konsantrasyonu
MAA	: Metakrilik asit
MMA	: Metil metakrilat
Na₂SO₄	: Sodyum sülfat
NCA	: <i>N</i> -Karboksianhidritlerin
NIPAM	: <i>N</i> -İzopropilakrilamid
NP	: Nanopartikül
PDI	: Polidispersite
PEG	: Poli(etilen glikol)
PEGMA	: Poli(etilen glikol) meti eter metakrilat
RAFT	: Tersinir katılma-ayrışma zincir transferi
ROP	: Halka açılma polimerizasyonu
SCNP	: Tek zincir polimer nanopartikül
<i>T_c</i>	: Kristallenme sıcaklığı
TEA	: Trietilamin
TEM	: Geçirimli elektron mikroskopisi
TFA	: Trifloroasitik asit
<i>T_g</i>	: Camı geçiş sıcaklığı
<i>T_m</i>	: Erime sıcaklığı
UV-Vis	: Ultraviyole-görünür ışık absorpsiyon spektroskopisi

SEMBOLLER

°C	: Derece santigrat
cm	: Santimetre
Da	: Dalton
g	: Gram
g/mol	: Gram bölü mol
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mL/dk	: Mililitre bölü dakika
nm	: Nanometre
v/v	: Hacimce yüzde
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 4.1 : RAFT polimerizasyonu ile elde edilen hidrofilik P(PEGMA- <i>r</i> -MAA) kopolimerlerinin oluşma koşulları ve sonuçları.....	49
Tablo 4.2 : RAFT polimerizasyonu ile elde edilen amfifilik PEG- <i>b</i> -P(NIPAM- <i>r</i> -MAA) kopolimerlerinin oluşma koşulları ve sonuçları.....	55
Tablo 4.3 : Sisplatin ile P(PEGMA- <i>r</i> -MAA)-2 kopolimerinden SCNP'lerin oluşturulma koşulları ve DLS sonuçları.	59
Tablo 4.4 : Sisplatin ile PEG- <i>b</i> -(NIPAM- <i>r</i> -MAA)-3 kopolimerinden TSCNP'lerin oluşturulma koşulları ve DLS sonuçları.	63
Tablo 4.5 : RAFT polimerizasyonu ile elde edilen hidrofilik kopolimerlerin oluşma koşulları ve sonuçları.	80
Tablo 4.6 : P(PEGMA- <i>r</i> -BrMA)-1 ve P(PEGMA- <i>r</i> -BrMA)-2 polimerleri ile Cur kullanılarak sentezlenen SCNP'lerin oluşma koşulları ve sonuçları. ...	86
Tablo 4.7 : RAFT polimerizasyonu ile elde edilen amfifilik kopolimerlerin (PEG- <i>b</i> -P(MMA- <i>r</i> -MAA)) oluşma koşulları ve sonuçları.....	98
Tablo 4.8 : PEG- <i>b</i> -P(MMA- <i>r</i> -MAA)-1 ve PEG- <i>b</i> -P(MMA- <i>r</i> -MAA)-2 kopolimerleri ile Cur kullanılarak sentezlenen TSCNP'lerin oluşma koşulları ve sonuçları.	103

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1	: Polimerlerin genel şekli..... 2
Şekil 2.2	: Genel polimerizasyon yöntemleri şeması..... 6
Şekil 2.3	: RAFT ajanının genel yapısı..... 9
Şekil 2.4	: RAFT polimerizasyon mekanizması..... 10
Şekil 2.5	: Halka açılma polimerizasyonunun mekanizmaları..... 11
Şekil 2.6	: İlaç taşıyıcı sistemler 13
Şekil 2.7	: Amfifilik kopolimer ve oluşturduğu misel yapısı..... 14
Şekil 2.8	: Tek zincir polimer nanopartiküllerin kavramsal yapısı..... 16
Şekil 2.9	: İribaş (tadpole) SCNP'lerin yapısı..... 17
Şekil 2.10	: SCNP'lerin sentez şeması..... 18
Şekil 2.11	: SCNP'lerin sentezi için kullanılan stratejinin şematik gösterimi: A) homo-fonksiyonel zincir çökmesi, B) hetero-fonksiyonel zincir çökmesi ve C) çapraz bağlayıcı kullanılarak zincir çökmesi..... 19
Şekil 2.12	: SCNP'lerin kimyasal bağlanma mekanizmaları..... 20
Şekil 2.13	: Tek zincir nanopartiküllerin uygulama alanlarının şematik gösterimi..... 23
Şekil 2.14	: SCNP'lerin sentezi ve korumalarının kaldırılması ardından Gd^{3+} yüklenmesi..... 23
Şekil 2.15	: Floresan etkili tek-zincir nanopartikül (SCNP) oluşumunun şematik gösterimi..... 24
Şekil 2.16	: Katalitik tek-zincir nanopartikül (SCNP) oluşumunun şematik gösterimi..... 25
Şekil 2.17	: Kurkuminoidlerin yapısı. A) Kurkuminoidlerin kimyasal formülü ve B) Kurkuminin iki tautomerik formu..... 26
Şekil 2.18	: Cur'in aktif bölgeleri..... 27
Şekil 2.19	: Cur'in kanserler üzerindeki etkileri ve mekanizmaları. (1) Wnt/ β -katenin yolağını inhibe ederek, p21 p27 ve p53 seviyelerini artırır; bunun yanında Siklin D1 ve CDK4 seviyelerinin inhibisyonunu sağlayarak hücre döngüsünü zayıflatır böylece hücre çoğalmasını baskılayabilir. (2) TGF- β /Smad2/3 yolağını baskılayarak E-kadherin seviyelerinde artış sebep olabilir ve N-kadherin, vimentin ve fibronektin seviyelerinde azalmayı tetikleyebilir böylece göçü ve invazyonun inhibisyonunu edebilir. (3) JNK, p38 MAPK ve ERK yolağının aktivasyonunu sağlayarak ROS üretimini tetikleyebilir. (4) Ferroptozu uyararak TFRC, FTL ve FTH1 seviyelerinde artışa sebep olabilir (5) Apoptotik proteinlerin (Bax, Cleaved-PARP, Cleaved-caspase-3 ve Cleaved-caspase-9) ekspresyonunu artışa sebep olup; antiapoptotik proteinlerin (Bcl-2) ekspresyonunu inhibe edip apoptozu destekleyebilir. (6) Beclin1, Atg5, Atg3 ve LC3B-II/I ekspresyonunda artışa sebep olarak; PI3K/Akt/mTOR yolağıyla otofajiyi destekleyebilir. (7) JAK/STAT3 yolağında inhibisyona sebep olarak

kök hücrelerini baskılamak adına Oct4, Sox2 ve Nanog seviyelerini azaltabilir. (8) İnflamasyonu hafifletmek için TLR4/NF- κ B sinyal yolağını baskılayabilir (TNF- α , IL-6 ve IL-1 β). (9) VEGF, CD31, α SMC, iNOS ve COX-2 ekspresyonlarının inhibisyonunu sağlayarak anjiyogenezisi azaltabilir. (10) Firmicutes/Bacteroidetes oranında azalmayı tetikleyerek bağırsak mikrobiyotasını düzenleyebilir. 28

Şekil 2.20	: DOKS'un kimyasal yapısı.....	31
Şekil 4.1	: RAFT polimerizasyonu ile P(PEGMA- <i>r</i> -MAA) sentezi.....	48
Şekil 4.2	: A) P(PEGMA- <i>r</i> -MAA)-2 ve B) P(PEGMA- <i>r</i> -MAA)-3'ün CDCl ₃ içerisinde çekilmiş ¹ H NMR spektrumları.	51
Şekil 4.3	: P(PEGMA- <i>r</i> -MAA)-2 (sol) ve P(PEGMA- <i>r</i> -MAA)-3 (sağ) kopolimerlerinin DSC grafikleri.....	51
Şekil 4.4	: PEG-CTPA'nın sentezi	52
Şekil 4.5	: PEG-CTPA'nın FT-IR spektrumu.....	52
Şekil 4.6	: PEG-CTPA'nın CDCl ₃ içerisinde çekilmiş ¹ H NMR spektrumu.....	53
Şekil 4.7	: PEG-CTPA'nın DSC grafiği.	53
Şekil 4.8	: RAFT polimerizasyonu ile PEG- <i>b</i> -P(NIPAM- <i>r</i> -MAA) sentezi.....	54
Şekil 4.9	: PEG- <i>b</i> -(NIPAM- <i>r</i> -MAA)-3'ün DMSO içerisinde çekilmiş ¹ H NMR spektrumu.	56
Şekil 4.10	: PEG- <i>b</i> -(NIPAM- <i>r</i> -MAA)-3'ün DSC grafiği.....	57
Şekil 4.11	: Sisplatin ile P(PEGMA- <i>r</i> -MAA) kopolimerinden SCNP oluşturulması.	58
Şekil 4.12	: P(PEGMA- <i>r</i> -MAA)-2 ve SCNP-7'nin DLS ölçümü sonucunda elde edilen partikül boyutu dağılım eğrileri.	60
Şekil 4.13	: P(PEGMA- <i>r</i> -MAA)-2'nin ve SCNP-7'nin DSC grafikleri.....	60
Şekil 4.14	: SCNP'in TEM görüntüsü.	61
Şekil 4.15	: Sisplatin ile PEG- <i>b</i> -P(NIPAM- <i>r</i> -MAA) kopolimerinden iribaş yapı TSCNP oluşturulması.....	62
Şekil 4.16	: γ -Benzil-L-glutamat <i>N</i> -karboksianhidrit (Glu-NCA) sentezi.....	64
Şekil 4.17	: a) L-Glutamik asit γ -benzil ester ve b) Glu-NCA'nın FT-IR spektrumları.....	64
Şekil 4.18	: Glu-NCA'nın CDCl ₃ içerisinde çekilen ¹ H NMR spektrumu.....	65
Şekil 4.19	: N ϵ -Benzilkarbonil-L-lizin <i>N</i> -karboksianhidrit (Liz-NCA) sentezi. ...	65
Şekil 4.20	: a) N ϵ -Benzilkarbonil-L-lizin ve b) Liz-NCA'nın FT-IR spektrumları.	66
Şekil 4.21	: Liz-NCA'nın CDCl ₃ içerisinde çekilen ¹ H NMR spektrumu.....	66
Şekil 4.22	: L-alanin <i>N</i> -karboksianhidrit (Ala-NCA) sentezi.....	67
Şekil 4.23	: a) L-alanin ve b) Ala-NCA'nın FT-IR spektrumları.	67
Şekil 4.24	: Ala-NCA'nın DMSO içerisinde çekilmiş olan ¹ H NMR spektrumu.	68
Şekil 4.25	: P(Glu-NCA- <i>r</i> -Liz-NCA) sentezi.....	68
Şekil 4.26	: a) Glu-NCA, b) Liz-NCA ve c) P(Glu-NCA- <i>r</i> -Liz-NCA)'nın FT-IR spektrumları.....	69
Şekil 4.27	: P(Glu-NCA- <i>r</i> -Liz-NCA)'nin DMSO içerisinde çekilmiş olan ¹ H NMR spektrumu.	69
Şekil 4.28	: P(Glu-NCA- <i>r</i> -Liz-NCA) DMF içerisinde alınan GPC kromatogramı.	70
Şekil 4.29	: P(Glu- <i>r</i> -Liz) sentezi.....	70
Şekil 4.30	: P(Glu-NCA- <i>r</i> -Liz-NCA) ve P(Glu- <i>r</i> -Liz) polimerlerinin D ₂ O içinde çekilmiş ¹ H NMR spektrumları.....	71
Şekil 4.31	: Sisplatin ile P(Glu- <i>r</i> -Liz) kopolimerinden SCNP'lerin oluşturulması.....	72

Şekil 4.32	: P(Glu- <i>r</i> -Liz) polimeri ile oluşturulan SCNP'nin için DLS grafiği. ...	72
Şekil 4.33	: SCNP-1'in TEM görüntüleri.	73
Şekil 4.34	: PEG- <i>b</i> -P(Glu-NCA- <i>r</i> -Ala-NCA) sentezi.	73
Şekil 4.35	: a) Ala-NCA, b) Glu-NCA ve c) PEG- <i>b</i> -P(Glu-NCA- <i>r</i> -Ala-NCA)'nın FT-IR spektrumları.	74
Şekil 4.36	: PEG- <i>b</i> -P(Glu-NCA- <i>r</i> -Ala-NCA) polimerinin DMSO içerisinde çekilmiş ¹ H NMR spektrumu.	74
Şekil 4.37	: PEG- <i>b</i> -P(Glu-NCA- <i>r</i> -Ala-NCA) polimerinin DMF içerisinde alınmış GPC kromatogramı.	75
Şekil 4.38	: PEG- <i>b</i> -P(Glu- <i>r</i> -Ala) sentezi.	75
Şekil 4.39	: PEG- <i>b</i> -P(Glu- <i>r</i> -Ala) ve PEG- <i>b</i> -(Glu- <i>r</i> -Ala) polimerlerinin DMSO içinde çekilmiş ¹ H NMR spektrumları.	76
Şekil 4.40	: Sisplatin ile PEG- <i>b</i> -(Glu- <i>r</i> -Ala) kopolimerinden TSCNP'lerin oluşturulması	77
Şekil 4.41	: 2-Bromoetil metakrilat (BrMA) sentezi.	77
Şekil 4.42	: a) 2-Bromoetanol ve b) BrMA'nın FT-IR spektrumları.	78
Şekil 4.43	: BrMA'nın CDCl ₃ içerisinde çekilmiş ¹ H NMR spektrumu.	78
Şekil 4.44	: RAFT polimerizasyonu ile P(PEGMA- <i>r</i> -BrMA) sentezi.	79
Şekil 4.45	: P(PEGMA- <i>r</i> -BrMA)-1 kopolimerinin THF GPC kromatogramı.	81
Şekil 4.46	: P(PEGMA- <i>r</i> -BrMA)-1'in CDCl ₃ içerisinde çekilmiş ¹ H NMR spektrumu.	82
Şekil 4.47	: P(PEGMA- <i>r</i> -BrMA)-1 polimerinin DSC grafiği.	82
Şekil 4.48	: P(PEGMA- <i>r</i> -BrMA)-2 ve 3 kopolimerlerinin THF GPC kromatogramları.	83
Şekil 4.49	: P(PEGMA- <i>r</i> -BrMA)-2'nin CDCl ₃ içerisinde çekilmiş ¹ H NMR spektrumu.	84
Şekil 4.50	: P(PEGMA- <i>r</i> -BrMA)-2 polimerinin DSC grafiği.	84
Şekil 4.51	: Cur ile P(PEGMA- <i>r</i> -BrMA) polimerlerinden SCNP oluşturulması. .	85
Şekil 4.52	: P(PEGMA- <i>r</i> -BrMA)-1 kopolimeri ve SCNP'lerin THF GPC kromatogramları.	86
Şekil 4.53	: P(PEGMA- <i>r</i> -BrMA)-2 kopolimeri ve SCNP'lerin THF GPC kromatogramları.	87
Şekil 4.54	: SCNP-2'nin TEM görüntüsü (ölçek= 200 nm).	88
Şekil 4.55	: SCNP-4'ün TEM görüntüsü (ölçek= 500 nm).	88
Şekil 4.56	: P(PEGMA- <i>r</i> -BrMA)-1'in (siyah) ve SCNP-2'nin (kırmızı) DSC grafikleri.	89
Şekil 4.57	: P(PEGMA- <i>r</i> -BrMA)-2'nin (siyah) ve SCNP-5'in (kırmızı) DSC grafikleri.	89
Şekil 4.58	: a) Cur (0.008 mg/mL), b) P(PEGMA- <i>b</i> -BrMA)-1 (5.76 mg/mL) ve c) SCNP-2'nin (5.76 mg/mL) DCM içerisinde çekilmiş UV spektrumları.	90
Şekil 4.59	: a) Cur (0.002 mg/mL), b) P(PEGMA- <i>b</i> -BrMA)-2 (3.13 mg/mL) ve c) SCNP-4'ün (3.13 mg/mL) DCM içerisinde çekilmiş UV spektrumları.	90
Şekil 4.60	: A) P(PEGMA- <i>r</i> -BrMA)-1 ve B) SCNP-2'nin CDCl ₃ içerisinde çekilmiş ¹ H NMR spektrumları.	91
Şekil 4.61	: SCNP-2, SCNP-5 ve Cur'in DPPH radikal temizleme metodu ile belirlenen antioksidan aktivite grafikleri.	92
Şekil 4.62	: SCNP-2 ve Cur'in sıgır serum albümini denatürasyon yöntemi ile elde edilen anti-inflamatuar aktivite grafiği.	93

Şekil 4.63	: SCNP-2'nin 37°C'de PBS tampon çözeltisi (pH= 7.4) ve asetat tampon çözeltisi (pH= 5.0) içindeki <i>in vitro</i> salım grafiği.	94
Şekil 4.64	: SCNP-2'nin MDA-MB-231 hücreleri tarafından hücreSEL alımı. MDA-MB-231 hücreleri 10 µM SCNP-2 ile muamele edildi ve 3 ve 6 saat inkübe edildi.	94
Şekil 4.65	: P(PEGMA- <i>r</i> -BrMA)-1, SCNP-2 ve Cur ile 24 saat inkübe edilen MDA-MB-231 ve CCD-987Sk hücrelerinin canlılık sonuçları (* p<0.05). .	95
Şekil 4.66	: RAFT polimerizasyonu ile PEG- <i>b</i> -P(MMA- <i>r</i> -MAA) sentezi.	96
Şekil 4.67	: PEG- <i>b</i> -P(MMA- <i>r</i> -MAA)-1 kopolimerinin THF GPC kromatogramı.	99
Şekil 4.68	: PEG- <i>b</i> -P(MMA- <i>r</i> -MAA)-2 kopolimerinin THF GPC kromatogramı.	99
Şekil 4.69	: PEG- <i>b</i> -P(MMA- <i>r</i> -MAA)-1'in DMSO içerisinde çekilmiş ¹ H NMR spektrumu.	100
Şekil 4.70	: PEG- <i>b</i> -P(MMA- <i>r</i> -MAA)-2'nin DMSO içerisinde çekilmiş ¹ H NMR spektrumu.	100
Şekil 4.71	: PEG- <i>b</i> -P(MMA- <i>r</i> -MAA)-1 polimerinin DSC grafiği.	101
Şekil 4.72	: PEG- <i>b</i> -P(MMA- <i>r</i> -MAA)-2 polimerinin DSC grafiği.	101
Şekil 4.73	: Cur ile PEG- <i>b</i> -P(MMA- <i>r</i> -MAA) kopolimelerinden iribaş yapılı TSCNP'lerin oluşturulması.	102
Şekil 4.74	: PEG- <i>b</i> -P(MMA- <i>r</i> -MAA)-1 kopolimeri ve TSCNP'lerin THF GPC kromatogramları.	104
Şekil 4.75	: PEG- <i>b</i> -P(MMA- <i>r</i> -MAA)-2 kopolimeri ve TSCNP'lerin THF GPC kromatogramları.	104
Şekil 4.76	: a) Cur (0.002 mg/mL), b) PEG- <i>b</i> -P(MMA- <i>r</i> -MAA)-1 (7 mg/mL) ve c) TSCNP-2'nin (7 mg/mL) DCM içerisinde çekilmiş UV spektrumları.	105
Şekil 4.77	: a) Cur (0.002 mg/mL), b) PEG- <i>b</i> -P(MMA- <i>r</i> -MAA)-2 (10 mg/mL) ve c) TSCNP-5'in (10 mg/mL) DCM içerisinde çekilmiş UV spektrumları.	105
Şekil 4.78	: PEG- <i>b</i> -P(MMA- <i>r</i> -MAA)-1'in (siyah) ve TSCNP-2'nin (kırmızı) DSC grafikleri.	106
Şekil 4.79	: PEG- <i>b</i> -P(MMA- <i>r</i> -MAA)-2'nin (siyah) ve TSCNP-5'in (kırmızı) DSC grafiği.	106
Şekil 4.80	: TSCNP-5'in STEM görüntüleri (ölçek= 100 nm).....	107
Şekil 4.81	: M _{TSCNP-2} (sol) ve M _{TSCNP-5} (sağ) miselinin TEM görüntüleri (ölçek= 100 nm).....	107
Şekil 4.82	: DOKS yüklü M _{TSCNP-5} miselinin STEM görüntüleri (ölçek= 200 nm).	108
Şekil 4.83	: M _{TSCNP-2} 'nin sulu çözelti konsantrasyonunun (mg/mL) logaritmasına karşı floresans yoğunluk oranının I ₃ /I ₁ grafiği.	109
Şekil 4.84	: M _{TSCNP-5} 'in sulu çözelti konsantrasyonunun (mg/mL) logaritmasına karşı floresans yoğunluk oranının I ₃ /I ₁ grafiği.	109
Şekil 4.85	: M _{TSCNP} DOKS'un 37°C'de PBS tampon çözeltisinde (pH= 7.4 ve pH= 5.0) içindeki <i>in vitro</i> salım grafiği.	110
Şekil 4.86	: TSCNP-2, TSCNP-5 ve Cur'in DPPH radikal giderme metodu ile belirlenen antioksidan aktivite grafikleri.....	111
Şekil 4.87	: M _{TSCNP} DOKS'un MDA-MB-231 hücreleri tarafından hücreSEL alımı. MDA-MB-231 hücreleri 10 µM M _{TSCNP} DOKS ile muamele edilerek 3, 6 ve 24 saat inkübe edildi.	112

- Şekil 4.88** : $M_{TSCNP-5}$, M_{POL} , Cur, $M_{TSCNPDOKS}$, DOKS ve DOKS-Cur ile 100 μM ile 3.125 μM arasında değişen konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saat inkübe edilen MDA-MB-231 hücrelerinin canlılığı. Hücre canlılığı MTT testi kullanılarak değerlendirildi ve 570 nm'de emilim ölçüldü..... 113
- Şekil 4.89** : $M_{TSCNP-5}$, M_{POL} , Cur, $M_{TSCNPDOKS}$, DOKS ve DOKS-Cur ile 100 μM ile 3.125 μM arasında değişen konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saat inkübe edilen CCD-986Sk hücrelerinin canlılığı. Hücre canlılığı MTT testi kullanılarak değerlendirildi ve 570 nm'de emilim ölçüldü..... 114



İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLER OLARAK TEK-ZİNCİR POLİMER NANOPARTİKÜLLER

ÖZET

Nanoteknolojinin artan cazibesi ile hassas boyut kontrolü ve özel olarak işlevselleştirmeye izin veren nano boyutta nesnelere üretimi için sentetik teknikler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bu amaçla, polimer zincirlerinin mimari olarak tanımlanan nanoyapılara çökmesi veya katlanması ile oluşturulan tek-zincir polimer nanopartiküller (SCNP) polimer biliminde son yirmi yılda gelişmekte olan ve günümüzde hızla büyüyen bir araştırma konusudur. Ultra küçük çapraz-bağlı nanopartiküller olan SCNP'ler, yüksek seyreltme koşullarında zincir içi çapraz bağlanma yoluyla lineer polimer zincirlerinin ayrı ayrı katlanması veya çökmesi ile elde edilir. SCNP'ler geleneksel polimer nanopartiküllerden çok daha küçük 1-20 nm boyutunda polimer nanopartiküllerinin oluşumuna olanak sağlar. Son yıllarda bu alana olan ilgi kataliz, sensörler, nanoreaktörler ve biyotıp alanı da dahil olmak üzere SCNP'nin çeşitli potansiyel uygulamaları nedeniyle artmaya devam etmektedir. Özellikle ortaya koydukları çok çeşitli uygulamaların bir sonucu olarak, biyotıp alanında herhangi bir araştırma konusu için umut verici nanotaşıyıcılardandır. SCNP'nin oluşumu için bir dizi sentetik metodoloji kullanılmıştır. Örneklerin çoğu seyreltik polimer çözeltilerinde (tipik olarak $<1 \text{ mg mL}^{-1}$) postpolimerizasyon modifikasyon reaksiyonlarını içermektedir. Postpolimerizasyon çapraz bağlama reaksiyonları tipik olarak verimliliklerine göre seçilir; düşük verimli veya yan reaksiyonlar içeren reaksiyonlar istenmez. Zincir içi çapraz bağlama, kovalent, dinamik kovalent ve kovalent olmayan etkileşimler ile oluşur.

Bu tez çalışmasında, ilaç taşıyıcı sistemler olarak tek-zincir polimer nanopartiküller ile 3 farklı çalışma gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalarda ilaç molekülleri SCNP oluşumunda zincir içi çapraz bağlanmayı gerçekleştirecek şekilde seçilmiş olup SCNP'lerde herhangi bir ilaç yüklemesine ihtiyaç duyulmayacaktır.

İlk olarak sisplatin molekülü çapraz bağlayıcı olarak kullanılarak SCNP'ler oluşturulmuştur. Bunun için tersinir katılma-ayırma zincir transfer (RAFT) polimerizasyonu ile poli[poli(etilen glikol) metil eter metakrilat-*r*-metakrilik asit] (P(PEGMA-*r*-MAA)) hidrofilik kopolimeri ve poli(etilen glikol)-*b*-poli(*N*-izopropilakrilamid-*r*-metakrilik asit) (PEG-*b*-P(NIPAM-*r*-MAA)) amfifilik kopolimeri sentezlenmiştir. Aynı zamanda halka açılma polimerizasyonu kullanılarak poli[(γ -benzil-L-glutamat)-*r*-(N_{ϵ} -benzilkarbonil-L-lizin)] [P(Glu-*r*-Liz)] hidrofilik kopolimeri ve poli(etilen glikol amin)-*b*-poli[(γ -benzil-L-glutamat)-*r*-(L-alanin)] [PEG-*b*-P(Glu-*r*-Ala)] amfifilik kopolimeri sentezlenmiştir. Bu öncü polimerlerin sisplatin molekülü ile ultra seyreltik koşullarda reaksiyonu sonucunda SCNP'ler oluşturulması hedeflenmiştir.

Yapılan ikinci çalışmada kurkumin molekülünün çapraz bağlayıcı olarak kullanılmasıyla SCNP'ler oluşturulmuştur. Öncelikle RAFT polimerizasyonu ile poli[poli(etilen glikol metil eter metakrilat)-*r*-(bromometakrilat)] (P(PEGMA-*r*-

BrMA)) hidrofilik kopolimeri sentezlenmiştir. Ardından kurkumin molekülü ile ultra seyreltik koşullarda reaksiyonu sonucunda SCNP'ler oluşturulmuştur.

Son çalışmada ise kurkumin molekülünün çapraz bağlayıcı olarak kullanılmasıyla iribaş yapılı tek zincir polimer nanopartiküler (TSCNP) sentezlenerek miselleri oluşturulmuştur. Öncelikle RAFT polimerizasyonu ile poli(etilen glikol)-*b*-poli[(metil metakrilat)-*r*-(metakrilik asit)] (PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA)) amfifilik kopolimeri sentezlenmiştir. Ardından kurkumin molekülü ile ultra seyreltik koşullarda reaksiyonu sonucunda TSCNP'ler oluşturulmuştur. Oluşturulan TSCNP'ler kullanılarak diyaliz yöntemi ile doksorubisin yüklü miseller oluşturulmuştur

Tez kapsamında elde edilen tüm polimerler, jel geçirgenlik kromatografisi (GPC), nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (¹H NMR), diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) teknikleri ile karakterize edilmiştir. Elde edilen SCNP ve TSCNP'ler ise GPC, DSC, dinamik ışık saçılması (DLS), geçirimli elektron mikroskopisi (TEM) analizleri ile çapraz bağlanmaya bağlı değişen molekül ağırlığı, boyut, camsı geçiş sıcaklığı ve morfolojisi açısından karakterize edilmiştir. İlaç yükleme verimliliği ve salım davranışı ultraviyole-görünür ışık absorpsiyon spektroskopisi ve mikropilaka okuyucu ile izlenmiştir. SCNP, TSCNP ve misellerin sitotoksitesi ve hücrel alımları incelenmiştir. Yapılan çalışmalar tek zincir nanopartiküllerin ilaç taşıyıcı sistemler açısından önemli bir potansiyele sahip olduğunu ve bu doğrultuda umut vadeden araştırmaların gerçekleştirilebileceğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Tek zincir polimer nanopartikül (SCNP), amfifilik kopolimer, tersinir katılma-ayırışma zincir transfer (RAFT) polimerizasyonu, kurkumin

SINGLE-CHAIN POLYMER NANOPARTICLES AS DRUG DELIVERY SYSTEMS

SUMMARY

Nanotechnology is focused on the development of synthetic techniques for producing nanoscale objects that enable precise size control and specific functionalization. For that purpose, single-chain polymer nanoparticles (SCNPs), created by the collapse or folding of polymer chains into structurally defined nanoparticles, are a dramatically growing research topic in polymer science that has been developing over the last twenty-five years. SCNPs, which are ultra-small cross-linked nanoparticles, are obtained by individual folding or collapse of linear polymer chains by intra-chain cross-linking under high dilution conditions. SCNPs allow the formation of 1-20 nm sized polymer nanoparticles which are more smaller than traditional polymer nanoparticles. Finally, interest in this field continues to increase due to the various potential applications of SCNP, including catalysis, sensors, nanoreactors and biomedicine. As a result of the wide variety of applications, they are one of the promising nano carriers for any research topic in the field of biomedicine. A variety of synthetic methodologies have been applied to the formation of SCNPs. Most of the examples include postpolymerization functionalization reactions in dilute polymer solutions (typically $<1 \text{ mg mL}^{-1}$). Postpolymerization cross-linking reactions are typically selected based on their efficiency; reactions with low yields or side reactions are undesirable. Intrachain crosslinking consists of covalent, dynamic covalent and non-covalent interactions.

In this thesis, 3 different studies were carried out with single-chain polymer nanoparticles as drug carrier systems. In the studies, drug molecules were selected to ensure intra-chain cross linking in SCNP formation, so that no drug loading would be required in SCNPs.

First, SCNPs were formed using the cisplatin molecule as a cross-linker. For this purpose, poly[poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate-*r*-methacrylic acid] (P(PEGMA-*r*-MAA)) hydrophilic copolymer and poly(ethylene glycol)-*b*-poly(*N*-isopropylacrylamide-*r*-methacrylic acid) (PEG-*b*-P(NIPAM-*r*-MAA)) amphiphilic copolymer were synthesized by reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization. At the same time, poly[(γ -benzyl-L-glutamate)-*r*-($N\epsilon$ -benzylcarbonyl-L-lysine)] [P(Glu-*r*-Lyz)] hydrophilic copolymer and poly(ethylene glycol amine)-*b*-poly[(γ -benzyl-L-glutamate)-*r*-(L-alanine)] [PEG-*b*-P(Glu-*r*-Ala)] amphiphilic copolymer were synthesized using ring-opening polymerization. It was aimed to form SCNPs as a result of the reaction of these precursor polymers with cisplatin molecule under ultra-dilute conditions.

In the second study, SCNPs were formed by using curcumin molecule as a cross linker. Firstly, poly[poly(ethylene glycol methyl ether methacrylate)-*r*-(bromomethacrylate)] (P(PEGMA-*r*-BrMA)) hydrophilic copolymer was synthesized by RAFT

polymerization. Then, SCNPs were formed as a result of the reaction with the curcumin molecule under ultra-dilute conditions.

In the last study, tadpole like single chain polymer nanoparticles (TSCNP) were formed by using the curcumin molecule as a crosslinker and micelles were formed from these TSCNPs. First, poly(ethylene glycol)-*b*-poly[(methyl methacrylate)-*r*-(methacrylic acid)] (PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA)) amphiphilic copolymers were synthesized by RAFT polymerization. Then, TSCNPs were formed as a result of the reaction with the curcumin molecule under ultra-dilute conditions. Doxorubicin-loaded micelles were formed by dialysis using the formed TSCNPs.

All polymers obtained during thesis work were characterized by gel permeation chromatography (GPC), nuclear magnetic resonance spectroscopy (¹H NMR), and differential scanning calorimetry (DSC) techniques. The obtained SCNPs and TSCNPs were characterized by GPC, DSC, dynamic light scattering (DLS), transmission electron microscopy (TEM) analyses and molecular weight, size, glass transition temperature and morphology that changed due to cross linking. Drug loading efficiency and release behavior were monitored by ultraviolet-visible light absorption spectroscopy and microplate reader. Cytotoxicity and cellular uptake of SCNPs, TSCNPs and micelles were investigated. Studies show that single-chain nanoparticles provide potential for drug delivery systems and promising studies can be presented.

Keywords: Single-chain polymeric nanoparticle (SCNP), amphiphilic copolymers, reversible addition-fragmentation chain-transfer (RAFT) polymerization, curcumin.

1. GİRİŞ

Nanoteknoloji, Ulusal Nanoteknoloji Girişimindeki (NNI) genel tanımıyla, 1–100 nm boyut aralığındaki yapıları ifade eder. Nanoteknolojinin alt dallarından biri olan nanotıp alanı, hastalığın altında yatan patofizyolojinin daha iyi anlaşılması için hastalığın teşhis, tedavi ve önlenmesi için nano boyutlu yapılar kullanılarak, yaşam kalitesinin artırılmasıdır [1]. Nanoteknoloji alanında kullanılan ilaç taşıyıcı sistemler arasında lipozomlar, nanopartiküller, nanokapsüller, polimer-ilaç konjugatları, polipeptitler, albümin-ilaç konjugatları, antikor-ilaç konjugatlar, DNA-ilaç kompleksleri ve polimerik nanopartiküller sayılabilir [2]. Günümüzde, polimer bazlı ilaç taşıyıcılar ile ilgili yaygın bir şekilde çalışma yapılmaktadır ve ilaç taşıyıcı sistemlerde polimer seçimi ve tasarımı büyük önem taşımaktadır [3]. Taşıyıcının boyutunun kolay ve hassas kontrolü, polimerik misellerin avantajlarından biridir. Partikül büyüklüğünün hazırlama yönteminden ziyade polimerlerin kimyasal yapısına bağlı olması ilaç taşıyıcı sistem olarak hazırlanan misellerin boyutlarının kolay ve daha hassas bir şekilde kontrolünü sağlamaktadır [4].

Polimerik ilaç taşıyıcı sistemler ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda hassas boyut kontrolü ve özel olarak işlevselleştirmeye izin veren nano-boyutta nesnelere üretimi için sentetik teknikler geliştirilmeye ve araştırılmaya başlanmıştır. Son yirmi yılda, polimer biliminde gelişmekte olan ve günümüzde hızla büyüyen bir araştırma konusu olan tek-zincir polimer nanopartiküller (SCNP) 2001 yılında Mecerreyes, Miller ve arkadaşları tarafından ortaya atılan bir kavramdır [5]. SCNP'ler, polimer zincirlerinin ayrı ayrı zincir içi çapraz bağlanma yoluyla nanoyapılara çökmesi veya katlanması ile oluşmaktadır. Lineer polimer zincirlerinin ayrı ayrı katlanması veya çökmesinden dolayı SCNP'ler geleneksel polimer nanopartiküllere kıyasla çok daha küçük yaklaşık olarak 3-30 nm boyutunda yani protein ve virüs boyutunda yapılardır. Yapıları nedeniyle ilgi görmekte ve son yıllarda oldukça fazla araştırılmaktadırlar [6].

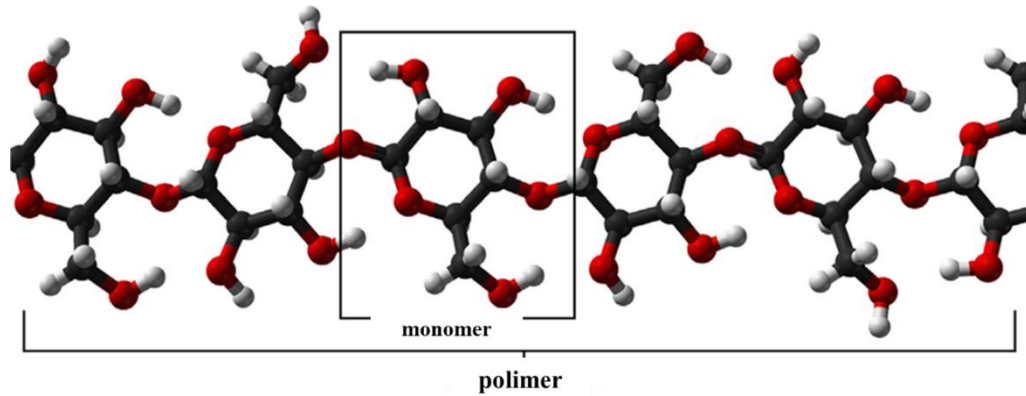
Bu çalışması kapsamında, SCNP'lerin ilaç taşıyıcı olarak kullanılma potansiyellerinin araştırılması hedeflenmiştir. Tasarlanan polimerlerin seyreltik çözeltilerinde ilaç molekülleri ile zincir içi çapraz bağlanması sağlanmış ve SCNP'ler oluşturulmuştur. SCNP'ler polimer zincirlerinin doğrudan ilaç molekülleri ile reaksiyonu sonucunda oluşturulduğundan bu yöntem ile elde edilen SCNP'lere herhangi bir ilaç yüklemesine ihtiyaç duyulmamaktadır.



2. TEORİK BİLGİ

2.1 Polimerler

Polimer” kelimesi, Yunanca kökenli olup “çok parça” anlamına gelir (poly: çok, mer: parça). Polimerler, “monomer” adı verilen tekrar eden birimlerin kovalent bağlarla birbirine bağlanmasıyla oluşan, mol kütleleri binler ile milyonlar arasında değişebilen büyük moleküllerdir (Şekil 2.1). Bir polimerde bulunan tekrarlanan ünite sayısı düşük ise yani zincir kısa ise bu tür yapılar oligomer olarak adlandırılır. Tekrarlanan ünite sayısı (monomer sayısı) çok fazla olduğunda ise ortaya çıkan büyük yapıli bileşiklere makromolekül adı verilir. Günümüzde organik kimya sanayisinin yaklaşık %80’i plastikler, sentetik tekstil lifleri ve kauçuklar gibi sentetik polimerlerin üretimine ayrılmıştır [7, 8].



Şekil 2.1 : Polimerlerin genel şekli.

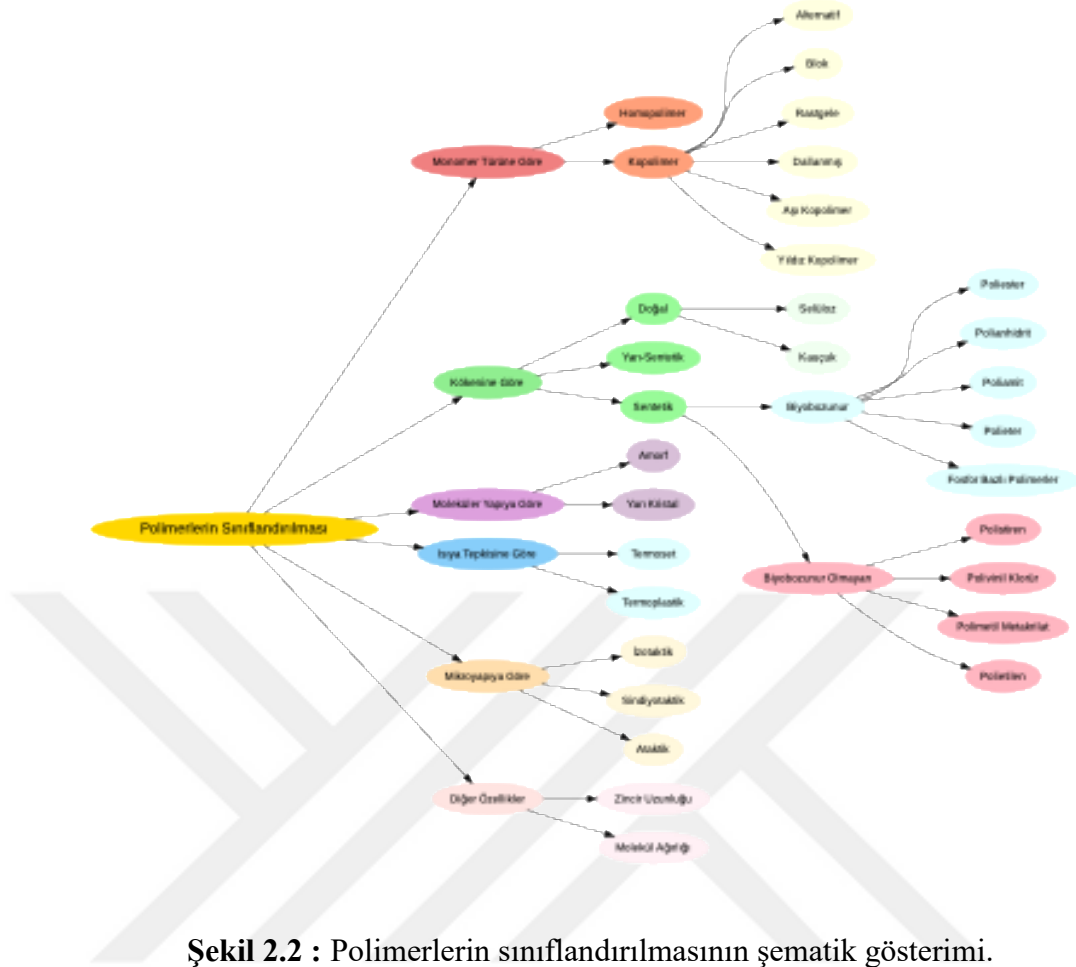
2.1.1 Polimerlerin sınıflandırılması

Polimerler; kimyasal yapıları, kökenleri, zincir morfolojileri, termal tepkileri, üretim yöntemleri ve kullanım alanlarına göre çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir (Şekil 2.2). En temel sınıflandırmalardan biri, polimeri oluşturan monomer türlerine göre yapılıdır.

Eğer polimer zinciri sadece tek bir monomer türünden oluşuyorsa bu yapıya homopolimer denir (örneğin polietilen). Buna karşılık, birden fazla farklı monomer birimi içeren polimerler ise kopolimer olarak adlandırılır. Kopolimerler de kendi içinde alternatif, blok, rastgele ve dallanmış kopolimerler gibi alt gruplara ayrılır [9]. Polimerler ayrıca kökenlerine göre doğal (selüloz, kauçuk vb.) ve sentetik (PVC, polistiren vb.) olarak sınıflandırılır. Moleküler yapılarının düzenine göre amorf ve yarı kristal, ısıya karşı verdikleri tepkilere göre ise termoset (ısıtıldığında şekli sabit kalan) ve termoplastik (ısıtıldığında yeniden şekil alabilen) polimerler olarak iki ana gruba ayrılır [10].

Bir diğer önemli sınıflandırma ölçütü ise polimerin mikroyapısıdır. Bu bağlamda, tekrarlayan birimlerin uzaydaki düzeni olan taktisite, polimerin fiziksel özelliklerini doğrudan etkiler. İzotaktik, sindiyotaktik ve ataktik polimerler bu yapı farklılıklarına örnektir [8]. Ayrıca, polimerlerin zincir uzunlukları ve molekül ağırlıkları da mekanik ve termal özellikleri üzerinde belirleyicidir.

Bu çok boyutlu sınıflandırma sistemi, polimerlerin hem akademik araştırmalarda hem de endüstriyel uygulamalarda daha iyi anlaşılmasını ve uygun kullanım alanlarının belirlenmesini sağlar [11].



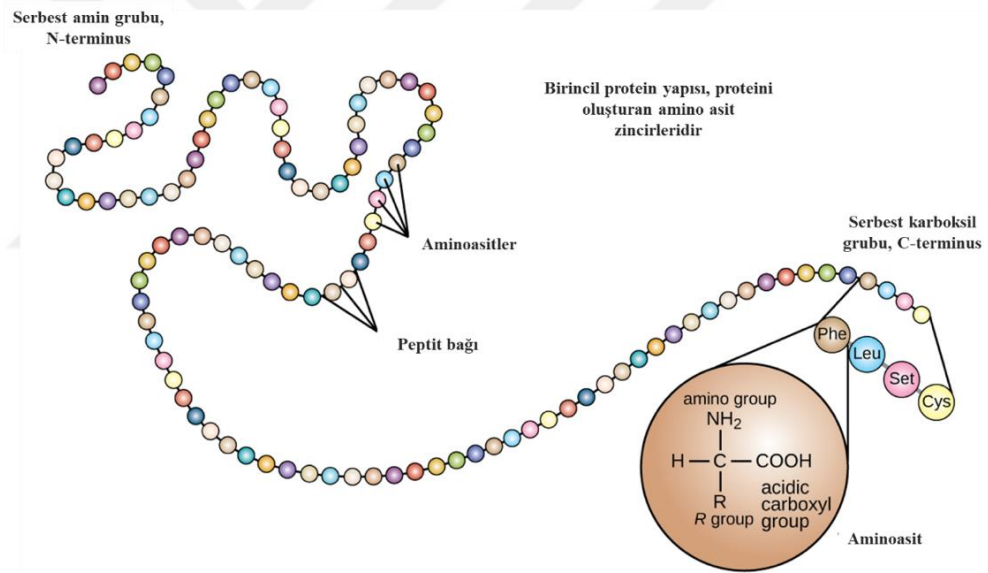
Şekil 2.2 : Polimerlerin sınıflandırılmasının şematik gösterimi.

2.1.1.1 Poli(amino asit)

Amino asitler en az iki fonksiyonel gruba sahiptir ve bu nedenle biyolojik olarak parçalanabilen makromoleküllerin oluşturulduğu polimerizasyonlar için monomer olarak kullanılabilirler. Peptit bağlarıyla bağlanan poli(amino asit)'ler diğer adı ile polipeptitler, doğal proteinleri taklit eden yapılara sahip olan, biyolojik olarak parçalanabilen ve biyouyumlu benzersiz polimer yapılar olarak görülmüşlerdir [12-14]. Ayrıca, biyolojik moleküller olarak polipeptitlerden tiyol, karboksilik asit, amin ve alkol gibi modifiye edilebilir fonksiyonel gruplar sunan polimerler oluşturulabilir. Poliamino asitler, biyomoleküllerle modifiye edilebilir, ilaç yüklemesi veya salımı kontrol edilebilir ve yüzeyi değiştirilebilir böylece oluşturulan polimere daha fazla tıbbi değer katılabilir. Bu gibi doğal avantajlarından dolayı spesifik ve gelişmiş ilaç taşıyıcıları olarak polipeptitler büyük ilgi görmektedir [12].

Polipeptitler genellikle kimyasal sentez veya mikrobiyal fermantasyon ile sentezlenir. Kimyasal sentez için, amino asit *N*-karboksianhidritlerin (NCA) hem katı faz sentezi

hem de halka açılması polimerizasyonu (ROP) ile sentezi yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir. Katı faz sentezi çoğunlukla oligopeptitleri üretmek için kullanılmaktadır. Halka açılması polimerizasyonu (ROP), NCA monomerlerinin bir başlatıcıyla açılmasını ve bir araya gelerek yüksek molekül ağırlıklı ve iyi tasarlanmış polipeptit yapılarının oluşmasını sağlar [3]. Ayrıca, yüksek tekrarlanabilirlik ve minimum yan ürün oluşumu ile işlevselleştirilmesine izin vermektedir. Polipeptitlerin sudaki çözünürlüğü genellikle poli(etilen glikol) (PEG) kullanılarak artırılır. PEG, Gıda ve İlaç Dairesi (Food Drug Administration, FDA) tarafından GRAS (Genel Olarak Güvenli Olarak Kabul Edilir) olarak sınıflandırılmıştır ve pegilasyon, hidratlı bir koruyucu tabaka oluşturarak artırılmış sirkülasyon yarı ömürleri üretmek için başarılı bir yöntem haline gelmiştir. Buna ek olarak PEG gibi polimerlerin kullanımının poli(amino asitlerin) bağırsak enzimlerine karşı dirençlerini artırdığı bilinmektedir [15].



Şekil 2.1 : Polipeptitlerin genel şeması [16].

2.1.2 Polimerizasyon yöntemleri

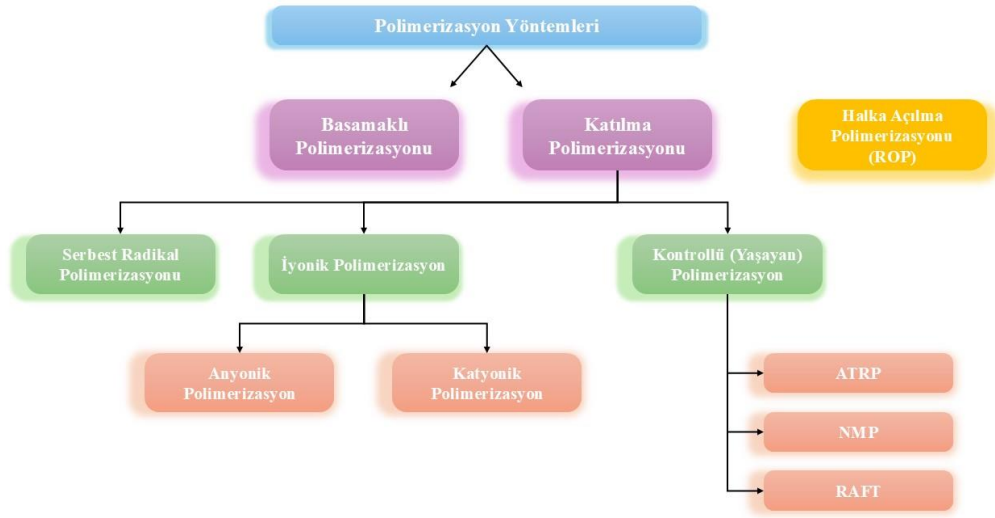
Polimerler, uzun yıllar boyunca gelişmeye devam ederek enerji, kozmetik, tarım, elektronik, sanayi, ilaç, sağlık, vb. pek çok farklı alanda hayatı kolaylaştırmak için kullanılmaktadır. Polimerlerin kullanılacağı alana bağlı olarak tasarımlarının farklı şekillerde yapılmasına imkân sunması en önemli avantajlarından biridir [17]. Polimerlerin oluşturduğu reaksiyonlar genel başlıkta polimerizasyon reaksiyonları olarak adlandırılır [18-21].

Polimerlerin sentezinde farklı kimyasal reaksiyonlardan yararlanır ve bu reaksiyonlar genel işleyiş mekanizmalarına göre;

- Basamaklı polimerizasyon
- Katılma polimerizasyonu

olarak sınıflandırılır [19].

Basamaklı polimerizasyon, birbiri ile reaksiyona girebilecek iki veya daha fazla fonksiyonel grup taşıyan monomerlerin arasında katılma tepkimeleri şeklinde gerçekleşir. Polimerizasyonun başlamasıyla birlikte ilk olarak iki monomer tepkimeye girerek dimer adı verilen yapıyı oluşturur. Daha sonrasında dimerler, bir monomerle veya başka bir dimer ile etkileşerek trimer veya tetramer yapılarını oluşturur. Bu şekilde devam eden katılma tepkimeleriyle zincirler büyürler ancak bu yavaş yavaş gerçekleşir ve uzun bir zaman sonrasında polimerin mol kütlelerinde artış ile sonuçlanır [22].



Şekil 2.2 : Genel polimerizasyon yöntemleri şeması.

Katılma polimerizasyonu, doymamış monomer moleküllerinin büyümeyen zincirin aktif merkezlerine hızla tek tek katılarak zincir büyümesi ile makromoleküllerin oluşumudur [23]. Polimerizasyon süresi arttıkça, monomer konsantrasyonu azalırken polimer verimi artar ve monomer polimer dönüşümü de artar [24]. Oluşan zincirin büyüme tepkimesi, monomer molekülleri ile aktif zincirler arasında gerçekleşir. Monomer olarak kullanılan moleküller genellikle vinil ve dien yapısı bulundurulur. Katılma polimerizasyonunda aktif radikal merkezi oluşturmak için genellikle başlatıcı

katalizör kullanılır. Benzoil peroksit (BPO), azobisisobütironitril (AIBN) gibi moleküller ısı yardımıyla aktif radikal merkezler oluşturacak şekilde bozunurlar ve polimerleşme başlar. Bunun dışında fiziksel etkenler olan ısı, ışık ve yüksek enerjili ışınlar kullanılarak başlatma radikali oluşturularak da polimerizasyon başlatılabilir. Bahsedilen bu aktif merkezlerin özelliğine bağlı olarak katılma polimerizasyonu;

- iyonik polimerizasyon
- serbest radikal polimerizasyonu
- kontrollü/yaşayan polimerizasyon

olarak üç alt başlığa ayrılır [25].

2.1.2.1 Kontrollü/yaşayan radikal polimerizasyonu

Kontrollü/”yaşayan” radikal polimerizasyonu (KRP) ilk kez sonlanma ve transfer reaksiyonları olmayan geleneksel polimerizasyonlardan ayrı bir yöntem olarak Matyjaszewski tarafından kullanılmıştır [26]. KRP yöntemi de, katılma polimerizasyonu gibi vinil ve dien yapısı bulduran monomelerin polimerleştirilmesinde kullanılabilir. Geleneksel polimerizasyonlara göre avantajı polimer zincirinin büyümesini kontrollü bir polimerizasyon ile sağlayarak molekül ağırlığı dağılımının kontrol edilebilmesi ve oluşan polimerlerin monodisperse yakın özellikte eldesine olanak sağlamasıdır. Geleneksel polimerizasyonlarla arasındaki diğer bir önemli fark ise geleneksel polimerizasyonlarda zincirin oluşuktan sonra çoğalıp ve kısa bir zaman içinde sonlanması ve bu süreçte polimer zinciri ile ilgili herhangi müdahalenin söz konusu olmamasıdır. Ancak, kontrollü/yaşayan radikal polimerizasyonunda polimer zinciri sonlanmaz ve bu durum sonrasında oluşan polimer zincirine müdahale şansı vererek karmaşık farklı yapılarda polimer üretimine olanak sağlar [27-30].

KRP’de monomerlerin tamamı bitene ya da polimerizasyon durdurulana kadar polimer zinciri büyümeye devam eder ve oluşan polimerin molekül ağırlığı polimerizasyon dönüşümü ile doğrusal bir bağıntı içindedir. Böylece polimerler de molekül ağırlığı kontrolü sağlanır. GPC ile ölçülen molekül ağırlık dağılımı (PDI) değerlerinin 1’e yakın olması dolayısıyla da dar bir molekül ağırlığı dağılımı ölçülür. Ayrıca polimer zincirinin sonu farklı fonksiyonel gruplar ile zenginleştirilerek kontrol edilebilir. Böylelikle araştırmacılara zengin bir polimer mimarisi sunar. Bunun sonucunda iyi

tanımlanmış di-, tri- blok, yıldız, fırça tipi veya aşı yapı özelliğine sahip zincirlerin sentezlenmesine imkan sağlamaktadır [31-34].

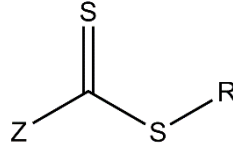
En yaygın kontrollü/’yaşayan’ polimerizasyon yöntemleri şunlardır;

- Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu (ATRP)
- Tersinir Katılma-Ayrışma Zincir Transfer Polimerizasyonu (RAFT)
- Nitroksi Başlatıcılı Polimerizasyon (NMP) [35, 36].

2.1.2.2 Tersinir katılma-ayrışma zincir transfer (RAFT) polimerizasyonu

RAFT polimerizasyonu, KRP yöntemleri arasında yakın bir geçmişe sahip yöntemdir. Rizzardo ve çalışma arkadaşları tarafından 1998 yılında ilk kez polimerizasyon tekniği olarak rapor edilmiştir. RAFT polimerizasyonu polimer zincirinin büyümesini zincir transfer reaksiyonuyla kontrol eder. RAFT polimerizasyonu ile sentezlenen polimerler için kullanılabilir geniş monomer aralığı; hedeflenen molekül ağırlığına sahip iyi tanımlanmış polimerlerin eldesi; polimerizasyonun kontrollü gerçekleştirilmesi ile molekül ağırlığı dağılımının (polidispersite) dar olduğu polimer eldesi; blok, graft, yıldız gibi farklı polimer mimarisinin kolaylıkla sentezlenmesi ve polimerizasyon koşullarının kolaylığı RAFT polimerizasyonunun avantajlı kılmaktadır. Ayrıca, ATRP polimerizasyonunda kullanılan metal katalizörün uzaklaştırılması ve NMP polimerizasyonu için gerekli olan yüksek sıcaklık gibi dezavantajlar sebebiyle RAFT polimerizasyon koşullarındaki kolaylıklar daha sık tercih edilmesi sebeplerindedir [37-41].

RAFT polimerizasyonunda, zincir transfer ajanı (CTA) diğer adıyla RAFT ajanı büyüyen veya sonlanmış polimer zincirlerinin ve aktif radikallerin arasında dinamik denge kurulabilmesiyle polimerizasyonun kontrollü bir şekilde yürütmesini sağlar. RAFT ajanı olarak adlandırılan polimerizasyon başlatıcıları, ditiyoesterler, trityokarbonatlar, ksantat ve ditiyokarbamatlar gibi tiyokarboniltiyo bileşikleridir (Şekil 2.3). RAFT ajanı olarak en sık ditiyoester bileşikleri kullanılır [42, 43]. RAFT ajanının yapısında “Z” ve “R” olarak gösterilen farklı işlevlerde iki fonksiyonel grup bulunur. Z fonksiyonel grubu, radikallerin tiyokarbonil bağına bağlanmasını sağlarken; R grubu, homolitik ayrılmayı gerçekleştirerek yeni monomerlerin eklenmesinden ve yeni polimer zincirlerinin başlatılmasından sorumludur. Bu iki fonksiyonel grubun uyum içinde çalışması gerekmektedir. Bu sebeple doğru RAFT ajanı seçimi çok önemlidir [44, 45].



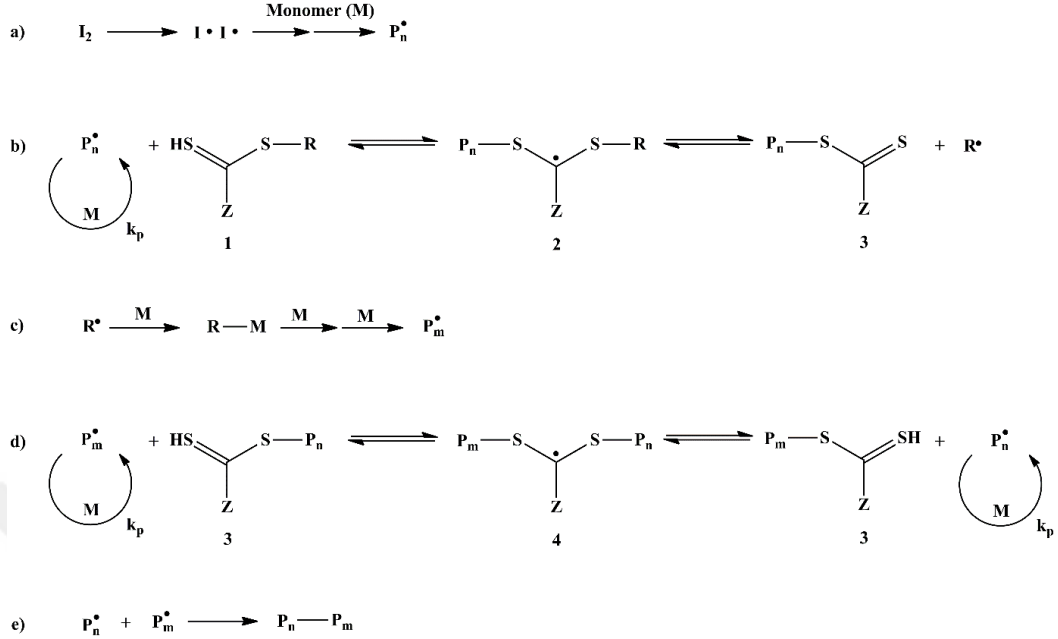
Şekil 2.3 : RAFT ajanının genel yapısı.

RAFT polimerizasyonunda, radikallerin toplam sayısı, aktivasyon-deaktivasyon boyunca sabit kalmalıdır ve bu durum, bir başlatıcının yani radikal kaynağının varlığını gerektirir [46]. Polimerizasyon için peroksit gibi geleneksel başlatıcılar da kullanılabilir ama 4,4'-azobis(4-siyanopentanoik asit) ve AIBN en sık kullanılan başlatıcıların başındadır [47].

RAFT polimerizasyonu 5 basamakta gerçekleşir (Şekil 2.4):

- a) Başlama basamağı, başlatıcıdan dış uyaranlar sayesinde radikal oluşturulur ve radikaller monomerler ile reaksiyona girip polimerizasyonu başlatarak aktif polimer zincirini (P_n) oluşturur.
- b) Katılma-ayırışma yolu ile tersinir zincir transferi basamağında, aktif polimer zincirinin ($P_n\cdot$) RAFT ajanına (1) katılmasıyla polimerik tiyokarboniltiyo bileşiği (3) oluşurken homolitik ayrılma ile -R fonksiyonel grubu ayrılarak radikal ($R\cdot$) oluşumu gerçekleşir.
- c) Yeniden başlama basamağında, bir önceki basamakta oluşan radikal ($R\cdot$) monomer ile tepkimeye girerek yeni aktif polimer zincirleri ($P_m\cdot$) oluşturur.
- d) Zincir dengesi basamağı RAFT polimerizasyonun temel basamağıdır. Pasif polimerik tiyokarboniltiyo bileşikleri tarafından büyümekte olan aktif radikal gruplarının ($P_n\cdot$ ve $P_m\cdot$) yakalanması ile oluşan bu basamak geleneksel radikal polimerizasyonlardaki zincir sonlanma basamağının RAFT polimerizasyonunda olmama sebebidir. Aktif radikal grupları, aktif ve inaktif adımlar arasında denge içerisinde. Bu da dar polidispersiteye sahip polimerlerin sentezine olanak sağlayacak şekilde bütün zincirlerin eşit büyümesine olanak sağlar. Başka bir deyişle bir polimer zinciri RAFT ajanına bağlı hareketsiz dururken, diğer polimer zinciri polimerleşme tepkimesi aktif olarak büyümektedir. Elde edilen bu denge sonucunda yaşayan polimerlerin elde edilmesi mümkün olur.

e) Sonlanma basamağında, polimer zincirlerinin çoğu tiyokarboniltiyo uç grubuna sahiptir. Böylece kararlı polimerler olarak elde edilebilir [39, 47-49].



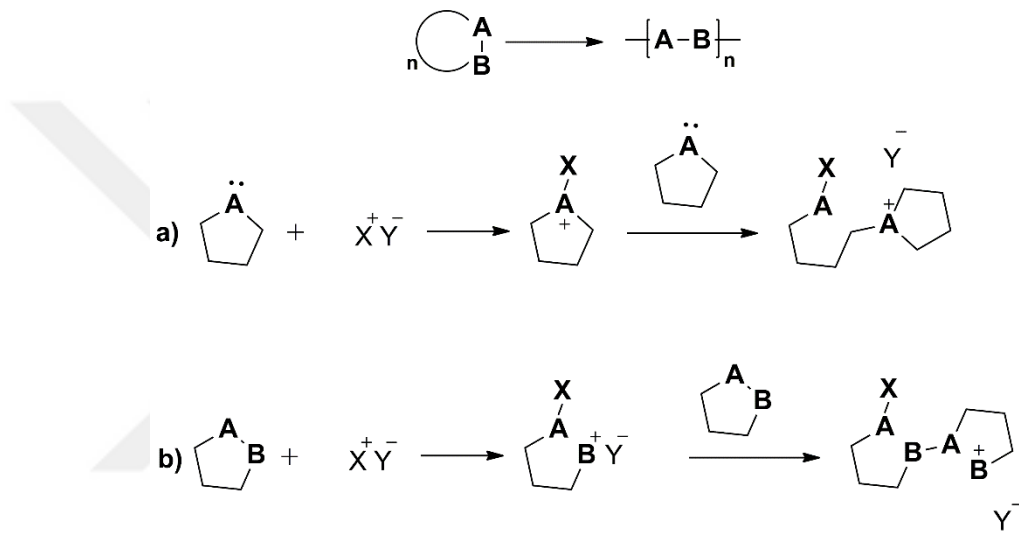
Şekil 2.4 : RAFT polimerizasyon mekanizması.

2.1.2.3 Halka açılma polimerizasyonu (ROP)

Halka açılma polimerizasyonu (ROP), halka yapısı içeren monomerlerin polimerleşmesini sağlayan polimerizasyon yöntemidir. ROP'un genel mekanizması katılma polimerizasyonuna benzer şekilde aktif zincirlere monomerler tek tek katılarak gerçekleşir. ROP için kullanılan en yaygın halkalı monomere laktonlar, laktamlar, siloksanlar, halkalı eterler ve halkalı aminler örnek olarak verilebilir. Halka açılma polimerizasyonu ile sentezlenen ticari polimerlere örnek olarak poli(bütlen oksit), polikaprolaktam (Naylon 6), poli(etilen oksit) ve poli(bütlen oksit) verilebilir.

ROP bazı özellikleri ile basamaklı polimerizasyona benzer iken bazı özellikleri ile katılma polimerizasyonuna benzer bu sebeple iki sınıftan ayrı bir başlıkta ele alınır. Örneğin monomer molekülleri, katılma polimerizasyonunda olduğu gibi birer birer zincirlere eklenir. Ayrıca, katılma polimerizasyonuna benzer şekilde, yalnızca aktif zincirler ile monomer molekülleri arasında reaksiyon gerçekleşir. Öte yandan ROP'ta, tıpkı basamaklı polimerizasyonlarda olduğu gibi, polimerizasyonun son aşamalarında yüksek molekül ağırlıklı polimerler oluşur. Ayrıca, ROP'ta basamaklı polimerizasyon tepkimelerinde görülen denge tepkimeleri ile ilerlenir [50-52].

Halkalı bileşiklerin bazılarında radikal halka açılma veya katalizör kullanmadan halka açılması gibi yöntemler kullanılarak polimerleşebilir de, genellikle halka açılma polimerizasyonları katyonik ya da anyonik mekanizmaları ile gerçekleşir. Polimerizasyonun başlangıcı için önerilen iki mekanizmadan ilkinin (Şekil 2.5 (a)), halkanın henüz açılmadan ilk olarak monomer ile katalizörün etkileşimi sonucu, daha sonra başlatıcı olarak işlev görecektir bir ara ürünün oluştuğu ileri sürülmektedir. Diğer bir önerilen mekanizmada (Şekil 2.5 (b)) katalizörün doğrudan halkaya atak edip açtığı ve bu etkileşim sonucunda iyonik uç grup meydana gelerek, başka bir monomerle reaksiyona girerek devam ettiği düşünülmektedir [53].



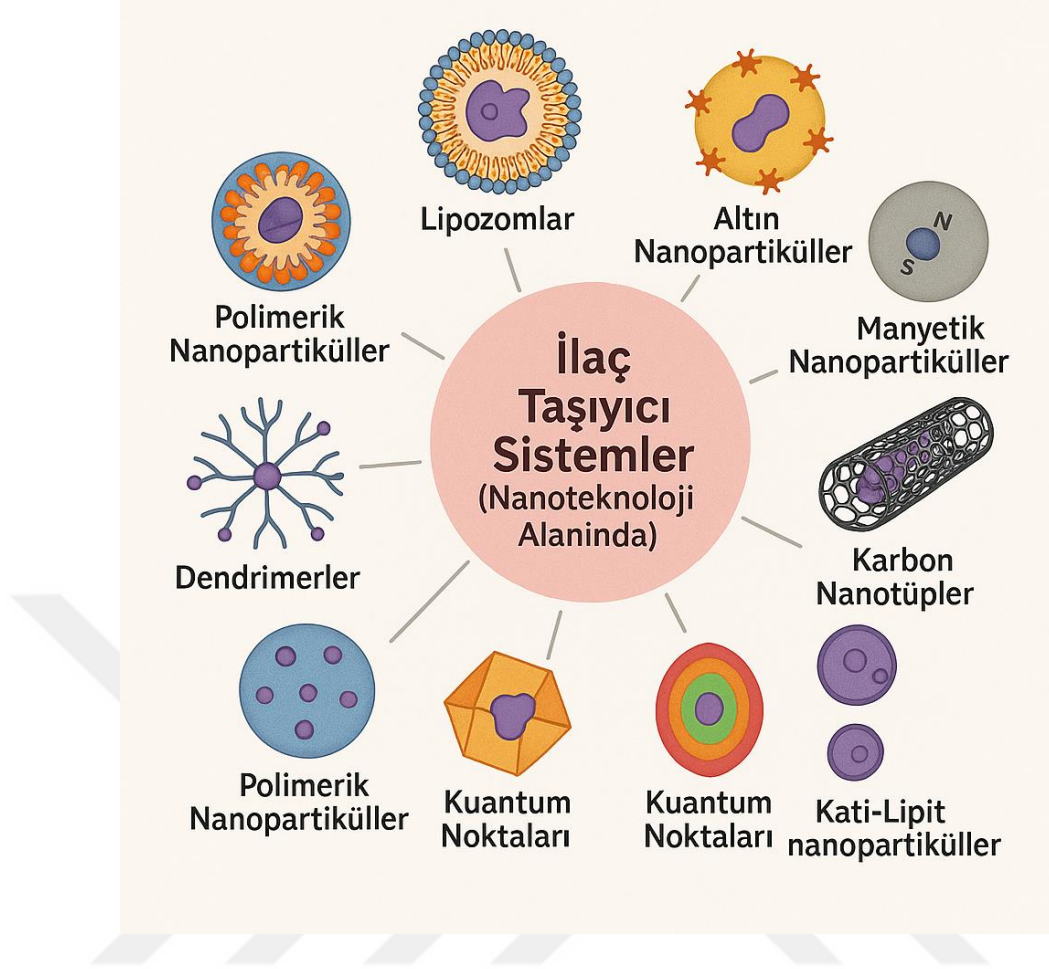
Şekil 2.5 : Halka açılma polimerizasyonunun mekanizmaları.

ROP'un gerçekleşebilmesi için kinetik ve termodinamik faktörler önemli rol oynarlar. Monomerin halka yapısındaki gerginliğin artması ile termodinamik kararlılık azalır. Monomerlerin polimerleşebilir kriterleri; halkasındaki süstitü sayısı, halkanın boyutu ve katalizör seçimidir. ROP için monomerlerin halka yapısı 3-8 atomludur. Altı halkaya sahip yapılar daha karardır ve halka gerginliği daha az olduğundan bu yöntemle polimerleşmezler [54, 55]. Halkayı oluşturan atom sayısından kaynaklı olan halka içi aç halkadaki gerginlik ile orantılıdır. Bu gerginlik kaynaklı 3-4 atomlu > 8 atomlu > 5-7 atomlu halkalı monomerlerde sırasıyla daha yüksek bir polimerleşme derecesine sahiptir [56]. Ayrıca, monomer halkası üzerinde bulunan bir heteroatom varsa elektrofilik veya nükleofilik başlatıcı saldırılarını kolaylaştırdığı için polimerleşme daha kolay gerçekleşir. Polimerizasyonun başlaması anyon, katyon veya

radikal ile olabilir. ROP, polipeptitler gibi polimerlerin sentezinde en sık kullanılan yöntemdir [57, 58].

2.2 İlaç Taşıyıcı Sistemler

Nanoteknoloji, NNI'daki genel tanımıyla, 1–100 nm boyut aralığındaki yapıları ifade eder. Son yıllarda, küçük ya da büyük moleküllerin iletiminde taşıyıcı sistemler ilgi çekici bir araştırma alanı haline gelmiştir [59]. Bu boyutlarda geliştirilen nanopartiküller, üretim teknikleri ve formülasyonlarının çeşitlenmesi sayesinde daha yüksek özgün çalışma alanları sunarak ilaç salımındaki yan etkileri ve sitotoksiteyi azaltmaya olanak tanımaktadır [60]. Nanoteknolojinin alt dallarından biri olan nanotıp alanı, hastalığın altında yatan patofizyolojinin daha iyi anlaşılması için hastalığın teşhisi, tedavisi ve önlenmesinde nano boyutlu yapılar kullanılarak yaşam kalitesinin artırılmasıdır [1]. Geleneksel ilaç tedavilerinde karşılaşılan biyoyararlanım eksikliği, hedef dışı dağılım ve toksisite gibi sorunları aşmak amacıyla geliştirilmiş ilaç taşıyıcı sistemler, modern farmasötik teknolojinin temel bileşenleri hâline gelmiştir. Bu sistemler, terapötik ajanların istenilen dokuya güvenli ve kontrollü bir şekilde iletilmesini sağlayarak hem etkinliği artırmakta hem de yan etkileri azaltmaktadır [61]. Nanoteknoloji alanında kullanılan ilaç taşıyıcı sistemler arasında lipozomlar, altın nanopartiküller, manyetik nanopartiküller, karbon nanotüpler, nanokristaller, kuantum noktaları, dendrimerler, polimerik nanopartiküller, katı-lipit nanopartiküller ve polimerik miseller sayılabilir (Şekil 2.6) [2]. Lipozomlar, fosfolipit çift tabakasından oluşan, hem hidrofilik hem de hidrofobik ilaçları taşıyabilen veziküler yapılardır. Hücre zarına benzer yapıları sayesinde biyouyumludurlar ve hedefe yönelik taşıma yetenekleri oldukça gelişmiştir [62]. Dendrimerler ise dallanmış, simetrik yapılı, çok fonksiyonlu yüzey gruplarına sahip makromoleküllerdir. Yüksek yükleme kapasitesi, kontrollü büyüklük ve fonksiyonelleştirilebilir yüzeyleri ile hem ilaç taşıyıcı hem de gen terapisi aracı olarak kullanılabilir [63]. Ayrıca, katı-lipit nanopartiküller (SLN) gibi diğer sistemler de farmasötik araştırmalarda hızla gelişmektedir. Bu yapılar, hem kontrollü salım hem de hedefleme özellikleriyle ilaç taşıma stratejilerinde büyük potansiyel taşımaktadır. Bir diğer önemli sistem olan polimerik miseller, kendiliğinden bir araya gelen amfifilik blok kopolimerlerden oluşur. Bu yapılar, özellikle hidrofobik ilaçların çözünürlüğünü artırmak ve sistemik dolaşımdaki stabilitesini sağlamak için kullanılır [64].



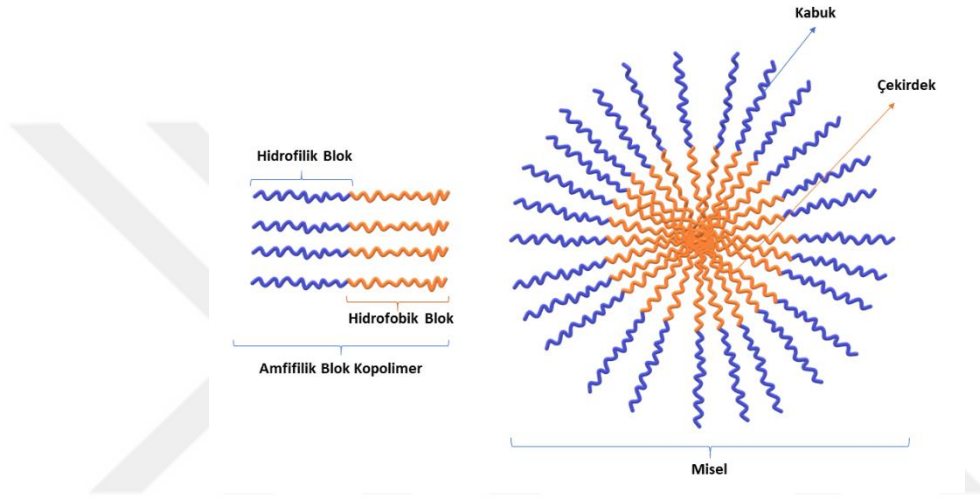
Şekil 2.6 : İlaç taşıyıcı sistemler [65].

Araştırılan bu ilaç taşıyıcı sistemleri içerisinde polimerik nanopartiküller en sık çalışma yapılan yapılar arasındadır. Polimerik nanopartiküller, etken maddeyi doğrudan hapsetme, bağlanma ve hedefleme gibi çeşitli uygulamalarda kullanılarak ilaç sektöründe önemli bir rol oynamaktadır [66]. Günümüzde, polimer bazlı ilaç taşıyıcılar ile ilgili yaygın bir şekilde çalışma yapılmaktadır ve ilaç taşıyıcı sistemlerde polimer seçimi ve tasarımı büyük önem taşımaktadır. Polimer seçiminde fizikokimyasal, ara yüzey, mekanik ve biyolojik özellikler önemli parametrelerdir [3]. Biyoteknoloji alanında polimer kimyasında ilaç taşıyıcı sistemler ile ilgili yapılan klinik çalışmalarda, spesifik dokuların hedeflenmesi ve fiziksel ya da kimyasal uyarılara duyarlı akıllı fonksiyonlara sahip polimerik misellerin önemini artırmıştır.

2.2.1 Polimerik miseller

Miseller, amfifilik özellikleri sayesinde kendiliğinden oluşabilen, kolayca kontrol edilebilen ve iyi farmakolojik niteliklere sahip yapılar olarak dikkat çekmeye

başlamıştır [61, 67]. Polimerik miseller, mükemmel biyoyumlulukları, uzun kan dolaşım süresi sağlama yetenekleri ve düşük toksisiteleri ile çeşitli terapötik ajanları taşıma alanındaki klinik çalışmalarda ilgi görmektedir [68]. Polimerik miseller, farklı hidrofilikliğe sahip iki veya daha fazla blok kopolimer zincirlerinin sulu bir ortamda bir araya gelmesi ile oluşan biyoyumlu yapılar olarak tanımlanabilir (Şekil 2.7). Hidrofobik kısımlar sulu ortamdan ayrılıp bir araya gelerek çekirdeği oluştururken, hidrofilik kısımlar bir araya gelerek sulu faz ile etkileşime giren dış kabuğu oluşturur [69].



Şekil 2.7 : Amfifilik kopolimer ve oluşturduğu misel yapısı.

Polimerik misellerin lipozom gibi taşıyıcılara nazaran partikül büyüklüğü açısından üstünlüğü, büyüklüğün çoğunlukla, blok kopolimerleri oluşturan hidrofobik ve hidrofilik kısımların kimyasal yapısı ve bu zincirlerin uzunluklarına bağlı olmasıdır [70]. Taşıyıcının boyutunun kolay ve hassas kontrolü, polimerik misellerin avantajlarından biridir. Partikül boyutunun, hazırlama yönteminden ziyade polimerlerin kimyasal yapısına bağlı olması ilaç taşıyıcı sistem olarak hazırlanan misellerin boyutlarının kolay ve daha hassas bir şekilde kontrolünü sağlamaktadır. Kan dolaşımı yoluyla ilaç hedeflemede, polimerik miselin partikül boyutunun 10-100 nm çap aralığında uygun olduğu düşünülmektedir çünkü bu boyuttaki taşıyıcı böbrekte klirensi etkili bir şekilde atılabilirken retikuloendotelial sistemlerde (karaciğer ve dalak) yakalanabilir [4].

İlaç taşıyıcı sistemler olarak misellerin sağladığı avantajlar; çözünürlüğü düşük etkin maddeleri çözünür hale getirmekte ve böylece biyoyararlanımlarını artırmaktadır. Misellerin, *in vitro* ve *in vivo* stabiliteleri arttırılabilir. Böylece hidrofobik kısma

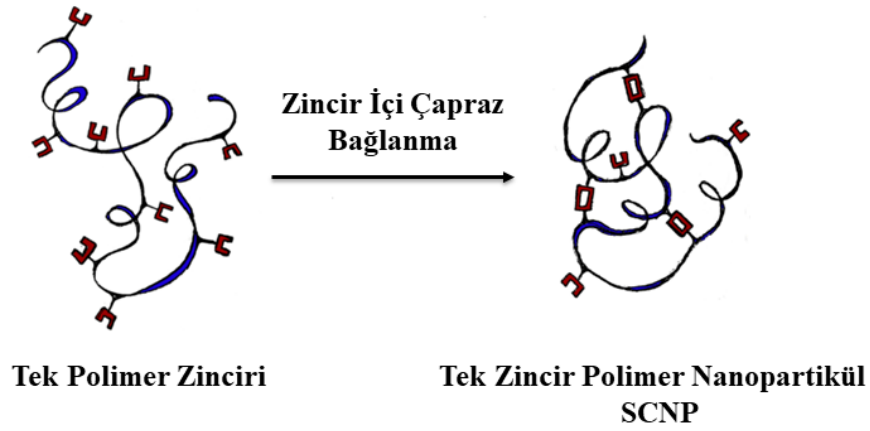
yüklenmiş etkin madde biyolojik ortamda inaktivasyondan korunabilir. Spesifik ligandların bağlanması ile hedeflendirme yapılabilir böylece istenmeyen yan etkiler azaltılabilir. Yeterince uzun süre vücutta (kanda) kalabilmesi ve gerekli bölgede kademeli olarak salınması sağlanabilir. Büyük miktarlarda, kolay ve tekrarlanabilir bir şekilde üretilebilmektedirler [71]. İlaç salımı ilaç taşıyıcı sistemlerin etkisini göstermesi açısından önemli bir faktördür. İlaç taşıyıcı sistemin hastalık bölgesini hedefleme etkinliği iyi olsa da etkin maddeyi hedef dokuda/hücrede salmaması ya da yavaş salması ya da hedef bölgeye ulaşmadan kan dolaşımında iken salınması tedavinin etkinliğini azaltacaktır. Bu sebeple etkin maddenin taşıyıcı sisteme yüklenmesi önem taşımaktadır [4].

Polimerik misellere etkin maddenin yüklenmesi kovalent ya da kovalent olmayan yöntemlerle gerçekleştirilmektedir [72]. Kovalent olmayan yöntemde etkin maddeler fiziksel olarak misellerin hidrofobik çekirdeklerine yüklenirler. Bu yöntem kovalent yöntemdeki gibi konjugasyon kimyası gerektirmediğinden etkin madde yükleme işlemi daha kolaydır ve dolayısıyla bu konuda daha çok çalışma mevcuttur [4]. Kovalent yöntemde ise etkin madde blok kopolimerin hidrofobik kısmına konjuge edilir ve bu monomerlerin oluşturduğu misellerden etkin madde salımı genellikle uyarılara duyarlı bağların kırılması ile sağlanır [73].

2.3 Tek-Zincir Polimer Nanopartiküller (SCNP'ler)

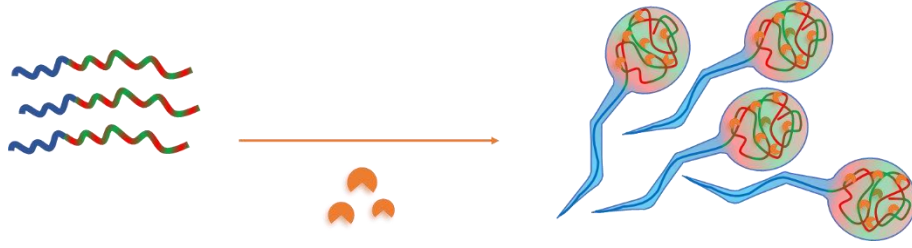
Polimerik ilaç taşıyıcı sistemler ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda hassas boyut kontrolü ve özel olarak işlevselleştirmeye izin veren nano boyutta nesnelere üretimi için sentetik teknikler geliştirilmeye ve araştırılmaya başlanmıştır. Biyolojik ortamdan ilham alarak araştırmacılar, enzim ve protein gibi biyomakromoleküllerin kendi içinde katlanmış yapılarını taklit ederek yeni bir polimerik taşıyıcı malzeme olarak SCNP'leri ortaya atmışlardır [74-78]. Son yirmi yılda, polimer biliminde gelişmekte olan ve günümüzde hızla büyüyen bir araştırma konusu olan SCNP teknolojisi 2001 yılında Mecerreyes, Miller ve arkadaşları tarafından ortaya atılan bir kavramdır [79]. SCNP, polimer zincirlerinin ayrı ayrı zincir içi çapraz bağlanma yoluyla nanoyapılara çökmesi veya katlanması ile oluşmaktadır (Şekil 2.8). Lineer polimer zincirlerinin ayrı ayrı katlanması veya çökmesinden dolayı SCNP'ler geleneksel polimer nanopartiküllere kıyasla çok daha küçük yaklaşık olarak 3-30 nm boyutunda yani protein ve virüs

boyutunda yapılarıdır. Yapıları nedeniyle ilgi görmekte ve son yıllarda oldukça fazla araştırılmaktadırlar [6, 80, 81].



Şekil 2.8 : Tek zincir polimer nanopartiküllerin kavramsal yapısı [82].

SCPN'lerin bir alt sınıfı olan iribaş (tadpole) tipi yapılar, amfipatik (hem hidrofilik hem hidrofobik) karakterleriyle ön plana çıkar ve adını kurbağa yavrularına (iribaş) benzer morfolojilerinden alır (Şekil 2.9). Bu tür yapılarda zincirin bir ucu daha yoğun veya fonksiyonel bir yapı (örneğin misel benzeri küresel bölge), geri kalan kısmı ise esnek bir kuyruk yapısı şeklindedir [83]. İribaş SCPN'ler, özellikle ilaç taşıyıcı ve katalitik nanoreaktör sistemleri gibi uygulamalarda dikkat çeker. Zincirin “kafa” kısmı genellikle hidrofobik çekirdekten oluşurken, kuyruk bölgesi sulu çözeltilerde çözünürlüğü artıran hidrofilik segmentlerden meydana gelir. Bu yapılar, çekirdek-kabuk tipi davranış sergileyerek hem kararlı hem de kontrollü salım yapabilen nanosistemler oluşturur [84]. Yapısal olarak iribaş SCPN'ler genellikle blok kopolimerler veya dallanmış makromonomerler kullanılarak sentezlenir. Hidrofobik kısımlar zincirin bir bölgesine yoğunlaştırılırken, hidrofilik kısımlar dış ortamla etkileşim için açık bırakılır. Bu konfigürasyon, zincirin kendi üzerine katlanarak kompakt ama asimetric bir morfolojiye ulaşmasını sağlar. Özellikle amfipatik dizilimler, çözücü kalitesine bağlı olarak yapının şekil ve boyutunu belirleyici rol oynar [85].



Şekil 2.9 : İribaş (tadpole) SCNP'lerin yapısı.

Polimerik misellerin büyüklüğünün tümör hedeflemeye etkisi ile ilgili yapılan bir çalışmada, kan dolaşımındaki davranışları benzer olan farklı büyüklükteki misellerin tümör penetrasyonu araştırılmıştır. Bu çalışmada, ilaç taşıyıcı sistemlerin derin tümör dokusuna penetrasyonunu engelleyebilecek yoğun bir interstisyel dokuya sahip pankreas tümörü modeli kullanılmış ve ancak en küçük partikül büyüklüğüne sahip miselin tümör dokusuna penetre olabildiği ve yüksek anti-tümör aktivite gösterdiği bildirilmiştir [86]. Ayrıca, yapılan başka bir çalışmada 30 nm'den küçük yumuşak madde bazlı iletim sistemlerinin karaciğer ve dalakta birikmeyi ve istenmeyen immünojenik reaksiyonları önlediği bildirilmiştir [87].

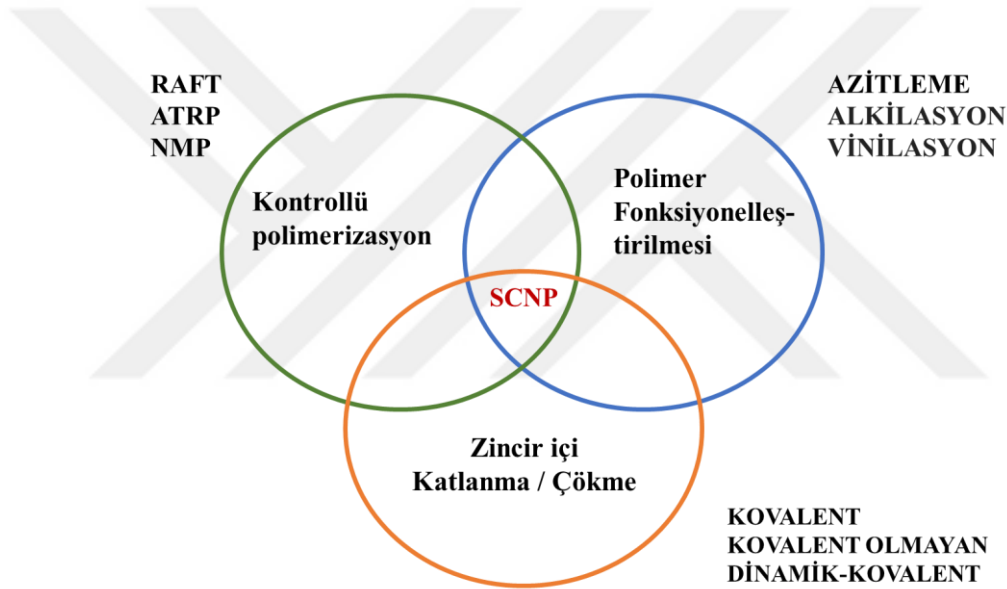
SCNP'lere polimerlerin ve partiküllerin özelliklerini vermek için çeşitli tasarım stratejileri geliştirilmiştir. Özellikle ultra küçük boyutlarının beklenmedik biyolojik dağılıma neden olacağı düşünülmektedir. Boyutu 6 nm'nin altında olan nanoparçacıkların biyolojik uyumluluğunu arttıracak, ancak potansiyellerini kısa süreli uygulamalarla sınırlandıracak şekilde tam renal klirensine sahip olması beklenir. Genel olarak nanomalzemelerin dağılım çalışmaları ile ilgili olarak, boyut önemli bir rol oynamaktadır. SCNP'lerin üç boyutlu yapılarının oluşturduğu molekül içi etkileşimleri ve son derece küçük boyutları nedeniyle biyomedikal uygulamalarda, özellikle beyin veya yoğun tümörler gibi dokulara ulaşmak için zor ve hassas hedefleri hedeflerken terapötik kargo olarak benzersiz avantajlar sağlayabileceği düşünülmektedir [88].

2.3.1 SCNP'lerin sentezi

SCNP'lerin oluşumu için bir dizi sentetik metodoloji geliştirilmiştir. Sentez genel olarak 3 aşamaya ayrılmıştır: SCNP sentezinin ilk adımı, katlanmaya uygun bir polimer zincirinin (öncüsünün) RAFT, ATRP gibi kontrollü polimerizasyon kullanılarak sentezlenmesidir. Bunun için genellikle reaksiyona girebilen fonksiyonel gruplar içeren polimerler tercih edilir. Özellikle yan zincirlerde bulunan azot, kükürt

veya karbonil grupları, katlanmayı sağlayacak intramoleküler bağlar için elverişlidir [85]. Eğer sentezlenen öncü polimer çapraz bağlanma için gereken grup yapılarından yoksunsa öncüye spesifik fonksiyonel grupların eklenmesi için polimer azitleme ve alkilleme gibi reaksiyonlar ile fonksiyonelleştirilir.

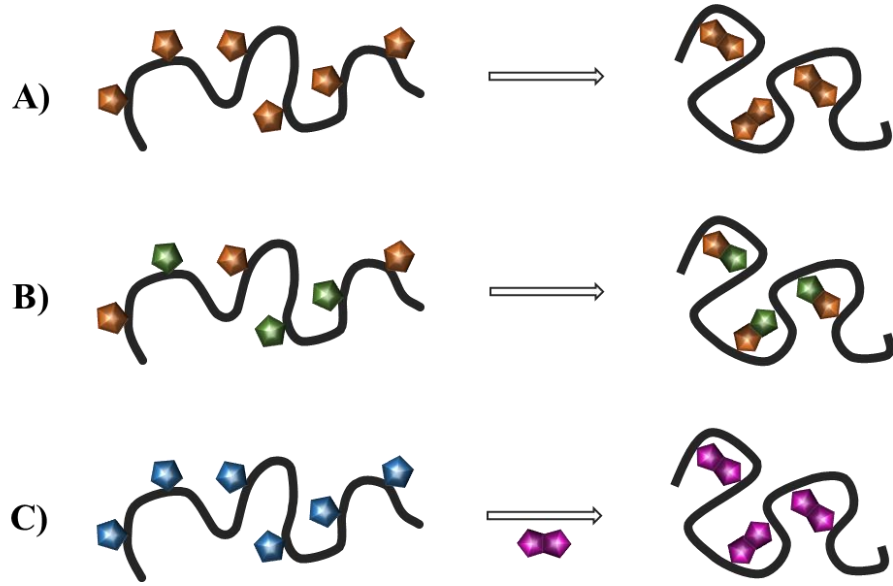
SCPN'lerin sentezinde son adım, ultra seyreltik ortamda kovalent, kovalent olmayan veya dinamik-kovalent bağlanma yoluyla zincirin kendi üzerine katlanması/çökmesidir (Şekil 2.10) [84, 89]. Yapılan çalışmalar seyreltik polimer çözeltilerinde (tipik olarak <1 mg/mL) post-polimerizasyon modifikasyon reaksiyonlarını içermektedir. Post-polimerizasyon çapraz bağlama reaksiyonları tipik olarak verimliliklerine göre seçilir; düşük verimli veya yan reaksiyonlar içeren reaksiyonlar istenmez [90, 91].



Şekil 2.10 : SCPN'lerin sentez şeması.

2.3.1.1 SCPN'lerin katlanma (çökme) mekanizmaları

SCPN'lerin sentezinde kullanılan stratejiler, polimer zinciri üzerindeki fonksiyonel grupların türüne ve bu gruplar arasındaki etkileşimlerin biçimine göre sınıflandırılır. Bu sınıflandırma kapsamında, katlanma süreci genellikle üç temel yaklaşımla açıklanır: homo-fonksiyonel, hetero-fonksiyonel ve çapraz bağlayıcı (cross-linker) kullanılarak zincir katlanması (Şekil 2.11) [84, 85].



Şekil 2.11 : SCPN'lerin sentezi için kullanılan stratejinin şematik gösterimi: A) homo-fonksiyonel zincir çökmesi, B) hetero-fonksiyonel zincir çökmesi ve C) çapraz bağlayıcı kullanılarak zincir çökmesi.

Homo-fonksiyonel zincir katlanması, polimer zinciri üzerinde aynı türden reaktif grupların yer alması ve bu grupların birbirleriyle intramoleküler reaksiyona girmesiyle gerçekleşir. Örneğin; hidrojen bağı, pi-pi etkileşimi veya yalnızca alkin grupları içeren bir zincir, uygun koşullarda kendiliğinden çapraz bağlanarak katlanabilir [92].

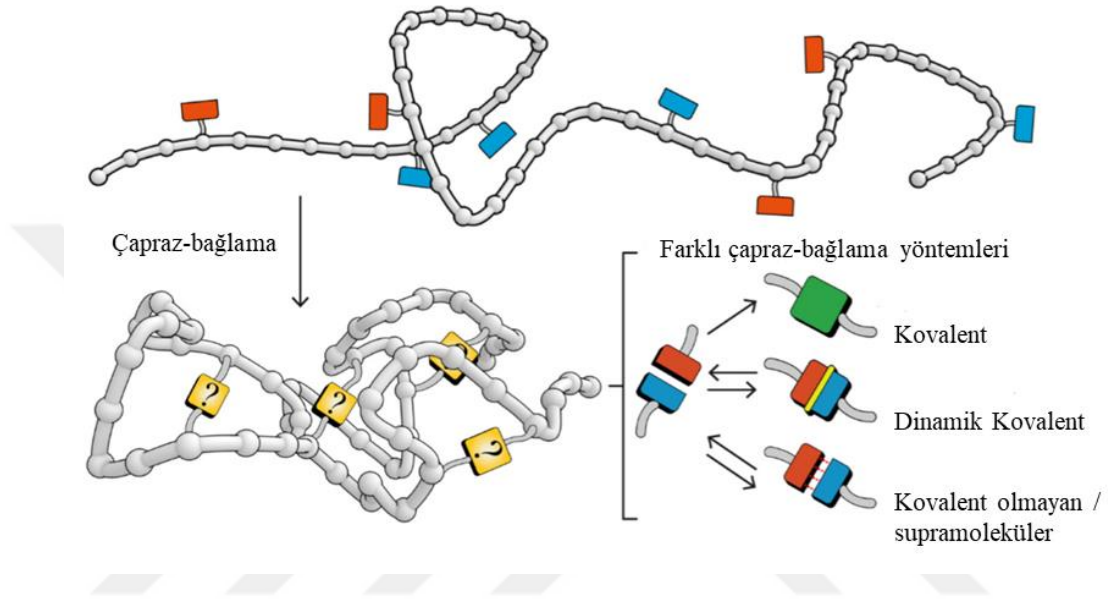
Hetero-fonksiyonel katlanma durumunda ise, birbirini tamamlayan reaktif grup çiftleri (örneğin KLİK reaksiyonu) zincir boyunca stratejik olarak yerleştirilir ve seçici tepkimeler yoluyla intramoleküler bağ oluşumu sağlanır [93].

Çapraz bağlayıcı kullanılarak katlanma, polimer zincirine dışarıdan eklenen bifonksiyonel veya polifonksiyonel bir molekül (çapraz bağlayıcı) sayesinde gerçekleştirilir. Bu tür bağlayıcılar, reaktif gruplar arasında köprü görevi görerek katlanma geometrisini ve bağ yoğunluğunu kontrol etme imkânı sunar. Bileşenlerden biri diğerine yavaş yavaş eklenerek istenmeyen moleküller arası çapraz bağlanmadan kaçınılır. Bu yöntemin ana faydaları, öncü polimerlerin daha kolay sentezlenmesi ve çapraz bağlayıcı yoluyla ekstra işlevsellik sağlama olasılığıdır. Polimer zincirlerinin iki yönlü çapraz bağlayıcı aracılı çöküşü, SCPN'lerin elde edilmesi için çok etkili ve basit bir yöntemdir [6, 80].

Bu üç yaklaşım; kovalent, dinamik kovalent veya supramoleküler bağlanma stratejileri ile birlikte ele alındığında, farklı yapı ve fonksiyonlara sahip SCPN'lerin tasarlanmasına olanak tanır [94].

2.3.1.2 SCPN'lerin kimyasal bağlanma mekanizmaları

SCPN'lerin sentezinde zincir içi katlanmayı ve stabil yapılar elde etmeyi mümkün kılan farklı kimyasal bağlanma stratejileri kullanılır. Bu stratejiler üç ana grupta sınıflandırılabilir: kovalent bağlanma, dinamik-kovalent bağlanma ve kovalent olmayan (supramoleküler) etkileşimler (Şekil 2.12). Her bir yaklaşımın kendine özgü avantajları, sınırlamaları ve uygulama alanları bulunmaktadır.



Şekil 2.12 : SCPN'lerin kimyasal bağlanma mekanizmaları [95].

Kovalent bağlara dayalı sentez, SCPN'lerin yapısal olarak en stabil formunun elde edilmesini sağlar. Bu yöntemde, polimer zinciri boyunca önceden yerleştirilmiş reaktif gruplar, kontrollü koşullarda çapraz bağlanarak geri dönüşümsüz bir katlanma oluşturur. Zincir içi çapraz bağlama etkileşimlerinde disülfid ve klik kimyası gibi kovalent çapraz bağ oluşumu için çözücüye konsantre bir polimer çözeltisinin eklendiği sürekli ekleme yöntemi kullanılır [96-100]. Sürekli ekleme tekniği, moleküller arası birleşmeyi önlerken daha az çözücü gerektirerek ultra seyreltik koşullardan çok daha etkilidir.

Kovalent olmayan bağlanma, doğadaki protein katlanmasına benzer şekilde zayıf ve tersinir etkileşimlere dayanır. Bu yöntemle SCPN'ler, çevresel uyaranlara son derece duyarlı ve kendiliğinden organize olan yapılar halinde üretilebilir. Kovalent olmayan, H-bağlanması ve π - π etkileşimleri gibi supramoleküler etkileşimler, katlanmış biyopolimerlerde en sık kullanılan zincir içi bağlanmalardır. Yapılan birçok

araştırmada monomerler, polimerlerin sentezleri sırasında agregatlar oluşturmasını önlemek için korunan hidrojen bağlama birimleri ile işlevselleştirilir [101-106].

Dinamik kovalent bağlanma, kovalent bağların tersinir şekilde oluşmasına izin verir. Bu sayede zincir, termodinamik olarak en uygun konformasyonu seğerek katlanabilir. Bu yöntemler, SCPN'lerin kendi kendini onarabilen veya çevresel uyarılara yanıt veren akıllı sistemler olarak tasarlanmasını mümkün kılar. SCPN'lerin sentezi, uyarlanabilir ve duyarlı nanoyapılar için ilginç bir yoldur. Belirli koşullar altında, bu bağlar geri dönüşümlüdür ve pH, oksidasyon, sıcaklık vb. çevresel koşullardaki değişime tepki olarak kinetik olarak sabitlenebilir veya parçalanabilir (asetal oluşumu ve disülfid bağı gibi) [90, 95, 107-109].

2.3.2 SCPN'lerin karakterizasyonu

Sentezi gerçekteştirilen SCPN'lerin karakterizasyonu ultra küçük boyutlarından dolayı zordur. Bu sebeple genellikle bu nanoyapıları karakterize etmek için çoklu teknikler kullanılarak verilerin doğrulanması gerekir. Çapraz bağlama kimyasında yer alan fonksiyonel grupların oluşumu veya kaybolması, polimer yapısının boyut ve morfolojisindeki değişiklikler farklı karakterizasyon teknikleri kullanılarak saptanabilir. Önemli olan, bu nanoyapıların tek molekül doğasını kanıtlamaktır, bunun için de moleküller arası çapraz bağlanma ile oluşturulabilecek küçük agregat konsantrasyonlarını tespit etmek gerekir.

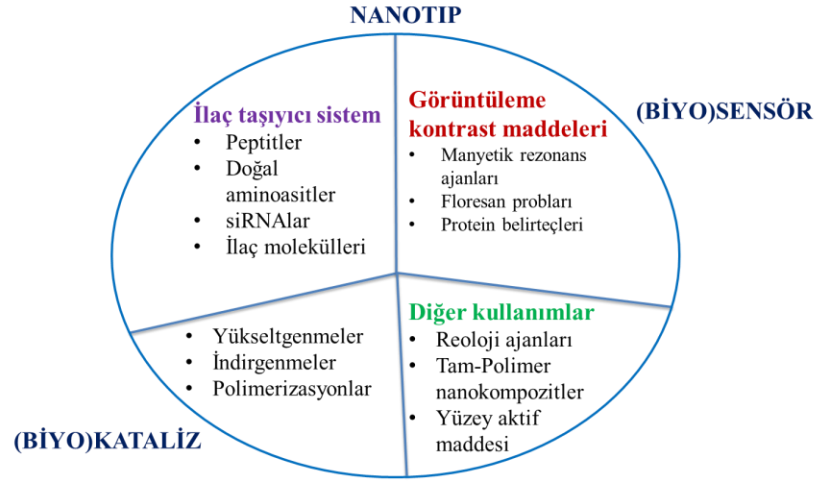
Yirmi yıldır yapılan çalışmalarda SCPN'lerin boyutunun belirlenmesinde en yaygın kullanılan tekniklerin başında dinamik ışık saçılımı (DLS) gelir. Bu teknik, partiküllerin çözelti içindeki hidrodinamik çapını verir ve katlanma derecesi hakkında dolaylı bilgi sunar. Ancak, SCPN'ler çok küçük ve tekil yapılar olduğundan, yüksek çözünürlüklü görüntüleme teknikleri de sıklıkla tercih edilir. Özellikle çözeltide küçük açılı X-ışını saçılımı (SAXS) ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM) gibi yöntemler, partikül boyutu ve morfolojisi hakkında doğrudan bilgi sağlar. Katlanmanın başarıyla gerçekteşip gerçekteşmediği, polimer zincirlerinin intramoleküler bağ yapılarından izlenebilir. Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi, özellikle spin-etiketleme yöntemleri ile zincir içi etkileşimlerin tespiti açısından güçlü bir tekniktir. Ayrıca, floresans rezonans enerji transferi (FRET) gibi tekniklerle, zincir uçları veya belirli segmentler arasındaki mesafeler ölçülerek katlanmanın etkinliği değerlendirilebilir. SCPN'lerin fonksiyonel uygulamalarda kullanılabilmesi için yüzey gruplarının analizi önemlidir. Fourier dönüşümlü kızılötesi

spektroskopisi (FT-IR) ve X-ışını fotoelektron spektrometresi (XPS) gibi teknikler sayesinde yüzey kimyası ve fonksiyonel grupların varlığı analiz edilebilir. Bu özellikler, özellikle hedefli ilaç taşıma ve katalitik aktivite gibi uygulamalarda belirleyici olur. SCPN'lerin polimer kimyası açısından önemli bir diğer özelliği de monodisperslik düzeyidir. Katlanma, sadece uygun molekül ağırlığında ve dar dağılım gösteren zincirlerde düzenli gerçekleşebilir. Bu nedenle, jel geçirgenlik kromatografisi (GPC/SEC) ile molekül ağırlığı analiz edilerek polimer zincirlerinin homojenliği değerlendirilir. Bazı SCPN sistemleri biyolojik ortamda işlevsel hale getirilmek üzere tasarlandığından, biyolojik stabilite, enzimlere karşı direnç, ve hücre içi alım gibi biyofiziksel karakterizasyon çalışmaları da gereklidir. Bu tür çalışmalar genellikle konfokal mikroskopi, *in vitro* hücre testleri ve biyoyumluluk analizleri ile gerçekleştirilir [84, 88, 110].

2.3.3 SCPN'lerin uygulama alanları

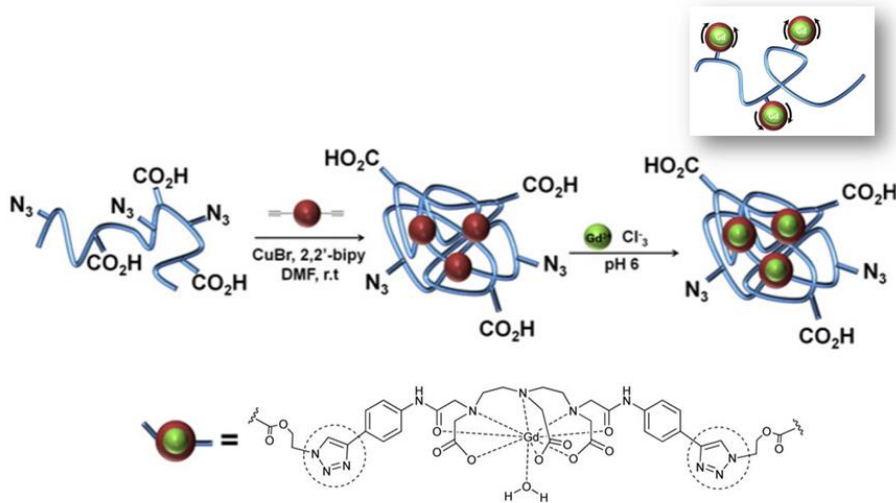
SCNP'lerin katalizör, sensör, nanoreaktör ve nanotıp gibi birçok alanda kendine uygulama alanı bulmuştur (Şekil 2.13). SCPN'leri içeren araştırmalar doğadan esas olarak temel almakla birlikte, bu malzemeler pratik kullanım alanları sunmaktadır. Tasarım açısından, parçacığın iç alanı yararlı bir kimyasal ortam sunmaktadır. İç kimyasal ortam, hidrofobik veya hidrofilik olabilir. Bu ortam ana polimerin molekül ağırlığı değiştirilerek, boyutu ve zincirler arası çapraz bağlama miktarı ile kontrol edilebilir. Ek olarak, kontrollü polimerizasyon teknikleri ve post-polimerizasyon modifikasyon teknikleri, istenen fonksiyon için seçici alanların dahil edilmesine olanak sağlar [84, 111].

Şu anda, SCPN'ler sentezi, ortaya koydukları çok çeşitli uygulamaların bir sonucu olarak, özellikle biyotıptaki herhangi bir araştırma konusundaki anahtar alanlardan biridir [6]. SCPN'lerin ilaç taşıma potansiyeline ve model ilaçların yüklenmesi hakkında bazı çalışmalar olmasına rağmen, SCPN'lerin terapötik ilaçların yüklenmesi için kullanımı hakkında çok az çalışma bulunmaktadır [112-114]. Hidrofobik ilaçların, SCPN'ler de dahil olmak üzere, küçük nanopartiküllerin fizikokimyasal özellikleri üzerinde önemli bir etki göstereceği öngörülmektedir. Polimerde bulunan hidrofobik monomer miktarının SCPN'nin katlanması üzerinde bir etkisi olduğu belirlenmiştir [105].

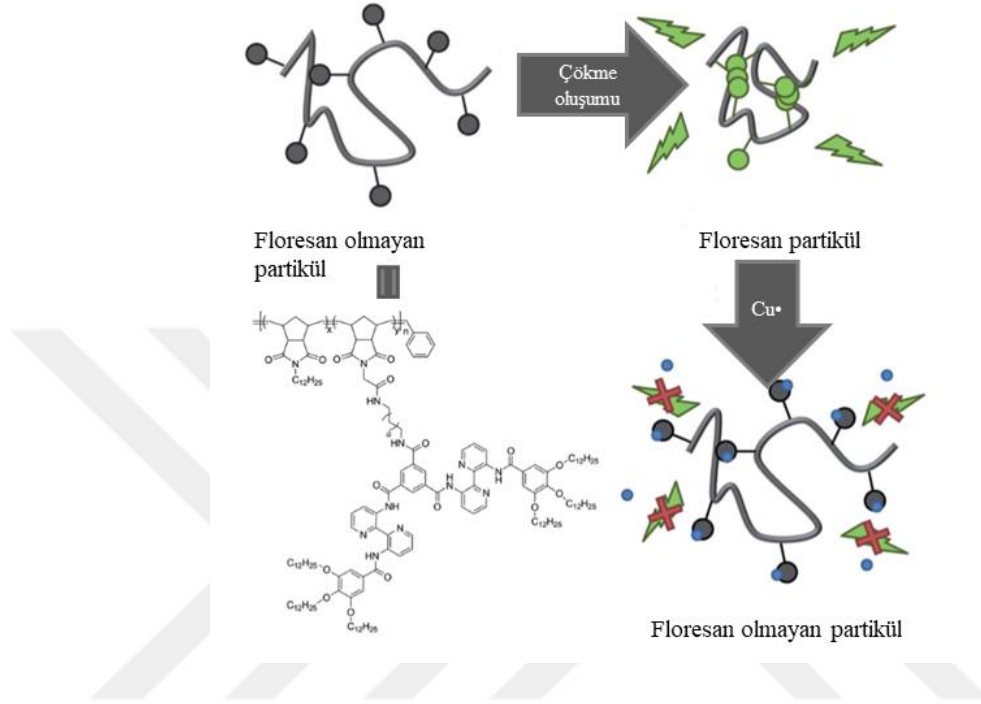


Şekil 2.13 : Tek zincir nanopartiküllerin uygulama alanlarının şematik gösterimi.

Bu uygulama alanları içerisinde Perez-Baena ve arkadaşları, MRI için potansiyel kontrast maddeleri olarak yeni bir gadolinyum (Gd) yüklü paramanyetik SCNP geliştirmiştir (Şekil 2.14). Bu orjinal yaklaşımın yeniliği, geleneksel bir şekilde polimerik zincir üzerine aşlamak yerine bir çapraz bağlayıcı şeklinde klik reaksiyonu kullanılarak şelatının oluşturulmasına dayanmaktadır. Bu Gd yapısı parçaların iç rotasyonunun kısıtlandığı konformasyonel olarak sert sistemlerin oluşmasıyla sonuçlanmıştır. Bu da Gd (III) şelatının makromoleküle rijit olmayan bir şekilde bağlanması veya iç esnekliğin genellikle birden fazla Gd (III) merkezi içeren polimerlerin gevşemesini sınırlayan faktörler olduğunu göstermiştir [115].

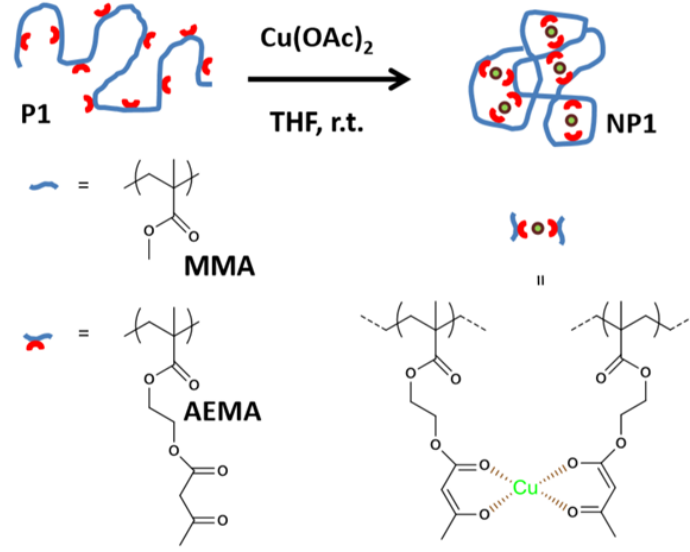


Gillissen ve arkadaşları tarafından çapraz bağlanma ile katlanma sonucu floresan etkisi ortaya çıkan bir floresan probu oluşturulmuştur (Şekil 2.15). Ayrıca, bakır bağlanması sonucu kaybolan floresan etki ile bu probun, çok fonksiyonlu çapraz bağlayıcı metal algılama için de uygulanabileceği gözlenmiştir [116].



Şekil 2.15 : Floresan etkili tek-zincir nanopartikül (SCNP) oluşumunun şematik gösterimi.

Metal iyonlarının ayrı kendiliğinden katlanan polimer zincirlerine katılması, metaloenzimlerin sentetik taklitlerini hazırlamak için kolay bir yol sunmaktadır. Rubio-Cervilla ve arkadaşları hafif ve çok yönlü eşzamanlı bağlanma/katlama stratejisi aracılığıyla kompleks Cu (II) iyonları içeren metal-katlanmış polimer zincirlerine dayalı katalitik olarak aktif tek-zincir nanopartiküller sentezlemişlerdir (Şekil 2.16). SCPN'lerin doğal proteinlerin katlanmasından farklı olarak şişmiş halde gevşek bir şekilde çökmeleri sonucu, SCPN'lerin substratlara erişilebilirliği arttırılmıştır. Ek olarak, polimerik çerçeve tarafından sağlanan ikinci koordinasyon küresinin metal iyonlarının katalitik aktivitesini arttırması amaçlanmıştır [14].



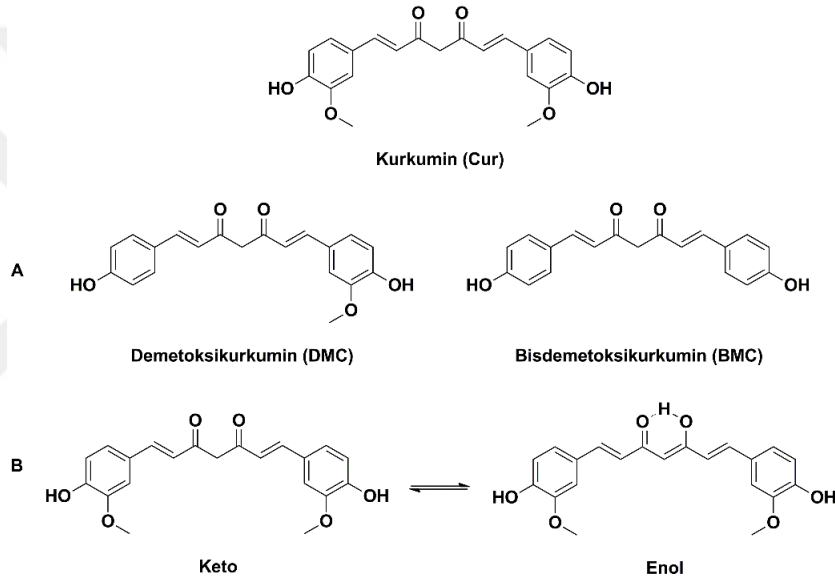
Şekil 2.16 : Katalitik tek-zincir nanopartikül (SCNP) oluşumunun şematik gösterimi.

Zhi-Yu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, platin iyonları (Pt (II)) için koordinasyon bölgesi olarak asılı trifenilfosfinli stirenik kopolimerler ve gizli reaktif grup olarak benzosiklobüten sentezlenmiştir. Zincirde bulunan trifenilfosfin grupları platin (II) ile koordine olabilir ve seyreltik solüsyonda hafif tek-zincir katlanmaya destek olabilir. Benzosiklobütenin halka açılma reaksiyonunun neden olduğu intramoleküler çapraz bağlanma ile SCNP iki kez katlanmış olur ve seyreltik solüsyonda stabil SCNP'ler oluşturur. İkinci çökmenin derecesi, çapraz bağlanma derecesi ile pozitif olarak ilişkilendirilebilir. Kompozit SCNP'ler indirgendikten sonra, SCNP'lerde koordine edilen platin iyonları platin atomlarına indirgenebilir ve kovalent olarak çapraz bağlı SCNP'lerin ağısı yapısına gömülebilir. Bu da platin kümelerinin ve hatta tek platinin olası varlığı nedeniyle daha iyi katalitik performans sergileyebilir. SCNP'lerde sabit ve atomik olarak dağılmış olan Pt (0), p-nitrofenolün p-aminofenole indirgenmesi için normal polimerde taşınan platin parçacıklarından daha iyi katalitik özellikler sergiler [13]. Gelişmekte olan SCNP'ler için kullanım alanlarının daha da genişlemesi ve yapılan çalışmaların zamanla çeşitleneceği düşünülmektedir.

2.4 Kurkumin

Kurkumin (Cur), zencefilgiller (zingiberaceae) ailesine ait olan ve Güneydoğu Asya'da yaygın olarak yetiştirilen zerdeçal bitkisi *Curcuma longa* L.'nin köksapından elde edilen doğal sarı veya turuncu renkli bir bileşiktir [117-120]. Zerdeçal bitkisi,

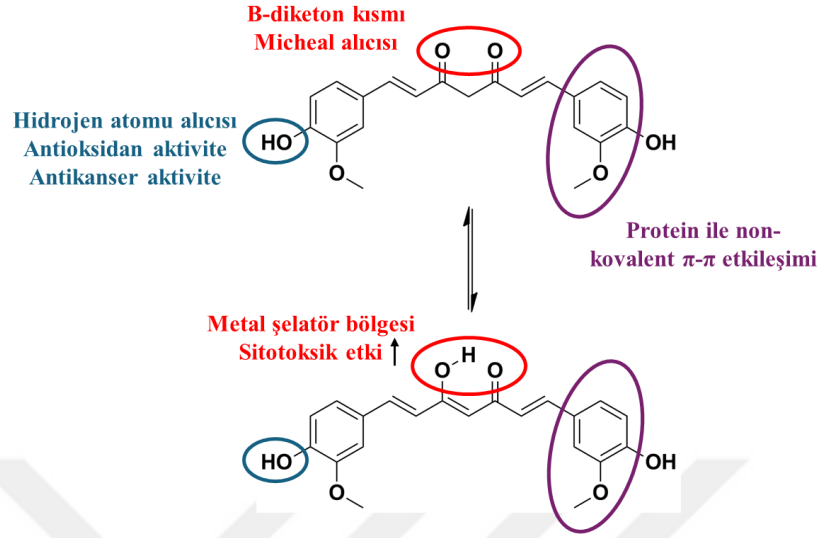
Kurkuminoids olarak bilinen, Kurkumin (1,7-bis-4-hidroksi-3-metoksifenil-1,6-heptadien-3,5-dion, Cur I, ~%77), demetoksikurkumin (1,4-hidroksi-3-metoksifenil-7,4-hidroksifenil-hepta-1,6-dien-3,5-dion, Cur II, ~%17) ve bisdemetoksikurkumin (1,7-bis-4-hidroksifenil-hepta-1,6-dien-3,5-dion, Cur III, ~%3)'den oluşan bir sınıf bileşik içermektedir (Şekil 2.17) [117, 121-123]. Cur, zerdeçalın %3-5'ini oluşturan; molekül ağırlığı 368.38 g/mol ve molekül formülü C₂₁H₂₀O₆ olan bileşiktir. Oda sıcaklığında, suda çözünmeyen Cur, hücre zarına kolaylıkla nüfuz edebilen lipofilik bir bileşiktir. Metanol, aseton, DMSO, dietileter ve etanol gibi solventlerde çözünebilir. Işık duyarlılığı fazla olmakla birlikte sıcaklığa karşı yüksek kararlılığa sahiptir [123-126].



Şekil 2.17 : Kurkuminoidlerin yapısı. A) Kurkuminoidlerin kimyasal formülü ve B) Kurkuminin iki tautomerik formu.

Vogel ve Pelletier tarafından 1842'de *Curcuma longa* L. bitkisinin köksapından izole edilmiştir. Ardından Vogel Jr tarafından 1845 yılında ilk kez saflaştırılmıştır [127, 128]. Cur'in -keto ve -enol olmak üzere iki tautomerik formu bulunmaktadır (Şekil 2.17B). Oda sıcaklığında, nötr ve asidik pH'lı sulu ortamlarda çözünmemektedir. Alkali koşullarda ise enol formunda, nötr ve asidik pH'da keto formunda bulunmaktadır [129-133]. Kurkumin hidrojen atomu alıcısı, Michael alıcısı ve metal şelatör olmak üzere üç aktif bölgeye sahiptir (Şekil 2.18). Metal şelatör bölgesi, birkaç metal iyonu ile kompleksler oluşturur ve bu özelliği Alzheimer, kanser, depresyon ve

artrit gibi hastalıklarda terapötik bir ajan olarak kullanımını için büyük umut vadetmektedir [134].



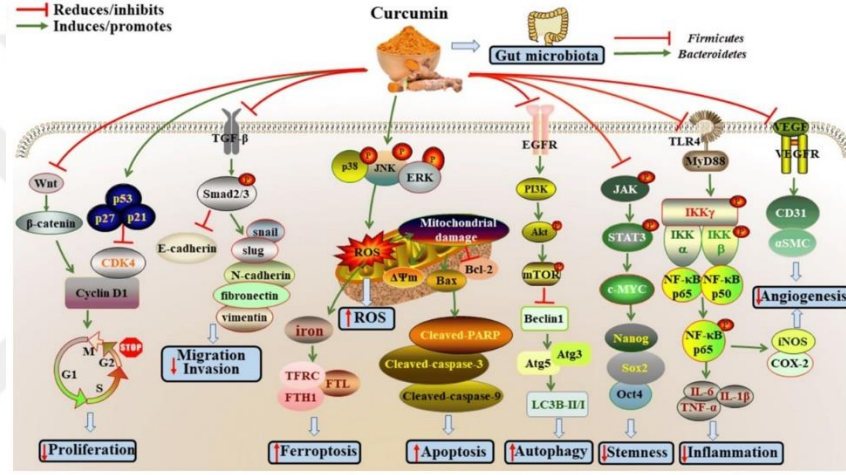
Şekil 2.18 : Cur'in aktif bölgeleri.

2.4.1 Biyolojik etkileri

Cur'in anti-inflamatuar, antiproliferatif, antioksidan ve antianjiyojenik aktiviteler ve bunlara ek olarak şeker, alerjik reaksiyonlar, artrit, demans, Alzheimer hastalığı ve diğer kronik hastalıklar da dahil olmak üzere çeşitli terapötik etkilere sahip olduğu bilinmektedir [135]. Birçok alandaki etkilerinin keşfedilmesinden sonra kanser alanında da çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Hem kemoprevensiyon hem de tedavi açısından bazı antikanser özelliklerinin farklı mekanizmalar üzerinden gerçekleştirebileceği birçok laboratuvar ve klinik çalışmada gösterilmiş ve rapor edilmiştir (Şekil 2.19) [120, 136]. Cur, diyabette kandaki glikoz ve hemoglobin düzeylerini azaltmakta böylece anti-hiperlipidemik ve anti-hiperglisemik etki gösterebilmektedir [137-140].

Yapılan bazı çalışmalarda, Cur metastatik kolorektal kanser hücre ve HCT-116 dizilerinde çoğalmayı önleyici aktivite göstermiştir [141]. Ayrıca, Garcea ve arkadaşları yaptıkları çalışmayla, kolorektal kanser hastalarına uygulanan Cur tedavisinin tümör hücrelerinde apoptozu destekleyecek şekilde P53 seviyelerinin aşırı eksprese edildiğini bildirmiştir. Buna ek olarak Cur uygulamasının malign kolorektal dokuda COX-2 protein seviyelerinin değişmediğini ve M(1)G protein seviyelerinde azalmaya sebep olduğunu bildirmişlerdir [142].

Cur; büyüme faktörü, transkripsiyon faktörü, sitokinler, hücre döngüsü proteinleri, protein kinazlar ve enzimler dahil çeşitli biyolojik hedefler ve hüresel yollar üzerinde etkili olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır [128, 143, 144]. Buna örnek olarak Cur, transkripsiyon faktörü (NFkB)'nin aktivasyonunu inhibe ederek; sitokin üretimi ve hücre sağkalımı gibi bazı hüresel işlevlere etki edebilir [143, 145]. Tümör baskılayıcı, kaspaz yolları, protein kinaz ve ölüm reseptörü yolları dahil olmak üzere çoklu sinyal yollarını düzenleyerek tümör büyümesini modüle edebilir [118, 146]. Cur farklı kimyasal özellikleriyle, kanserin başlaması ve ilerlemesinde rol alan çok sayıda hücre içi ve hücre dışı molekül ile etkileşime girerek kanserin ilerlemesini engelleyebilmektedir [147].



Şekil 2.19 : Cur'in kanserler üzerindeki etkileri ve mekanizmaları. (1) Wnt/ β -katenin yolağını inhibe ederek, p21 p27 ve p53 seviyelerini artırır; bunun yanında Siklin D1 ve CDK4 seviyelerinin inhibisyonunu sağlayarak hücre döngüsünü zayıflatır böylece hücre çoğalmasını baskılayabilir. (2) TGF- β /Smad2/3 yolağını baskılayarak E-kadherin seviyelerinde artış sebep olabilir ve N-kadherin, vimentin ve fibronektin seviyelerinde azalmayı tetikleyebilir böylece göçü ve invazyonun inhibisyonunu edebilir. (3) JNK, p38 MAPK ve ERK yolağının aktivasyonunu sağlayarak ROS üretimini tetikleyebilir. (4) Ferroptozu uyararak TFRC, FTL ve FTH1 seviyelerinde artışa sebep olabilir (5) Apoptotik proteinlerin (Bax, Cleaved-PARP, Cleaved-caspase-3 ve Cleaved-caspase-9) ekspresyonunu artışa sebep olup; antiapoptotik proteinlerin (Bcl-2) ekspresyonunu inhibe edip apoptozu destekleyebilir. (6) Beclin1, Atg5, Atg3 ve LC3B-II/I ekspresyonunda artışa sebep olarak; PI3K/Akt/mTOR yolağıyla otofajiyi destekleyebilir. (7) JAK/STAT3 yolağında inhibisyona sebep olarak kök hücrelerini baskılamak adına Oct4, Sox2 ve Nanog seviyelerini azaltabilir. (8) İnflamasyonu hafifletmek için TLR4/NF- κ B sinyal yolağını baskılayabilir (TNF- α , IL-6 ve IL-1 β). (9) VEGF, CD31, α SMC, iNOS ve COX-2 ekspresyonlarının inhibisyonunu sağlayarak anjiyogenezisi azaltabilir. (10) Firmicutes/Bacteroidetes oranında azalmayı tetikleyerek bağırsak mikrobiyotasını düzenleyebilir [148].

2.4.2 Farmakokinetik özellikleri ve biyoyararlanımı

Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından Cur tüketim için onaylanmış olsa da, zayıf biyoyararlanımı çeşitli hastalıkların tedavisindeki kullanım etkisini sınırlamaktadır [149]. Birçok çalışmada Cur'in yüksek antikanser potansiyeli gösterilmiş olsa da zayıf emilimi ve hızlı metabolizması nedeniyle biyoyararlanımının düşük olduğu bulunmuştur [150]. Zayıf biyoyararlanımın yanı sıra fizyolojik pH durumunda, özellikle bağırsaklarda bozunum gösterebilmektedir [151].

Bu sorunlar nanotaşıyıcıların kullanımıyla aşılmaya çalışılmıştır [152]. Cur biyoyararlanımını artırmak için lipozomlar, nanopartiküller ve fosfolipit kompleksleri gibi birçok ilave bileşikler kullanılarak çeşitli Cur formülasyonu geliştirilmiştir [153, 154]. Ancak, bu dağıtım yöntemlerinin çoğu, tipik olarak kısa bir salım döngüsü olan kaçınılmaz bir ani salımla sonuçlanan fiziksel kapsülleme yöntemi ile Cur yüklenmesi kullanmıştır. Kimyasal konjugasyon gibi ilacın ve taşıyıcı sistemin uyarılara duyarlı ayrılabilir bir yükleme çeşidi kullanılması, fiziksel kapsüllemeye üstün bir alternatif gibi görünmektedir. Bu yaklaşım, ani salımı önleyerek ilaç yükleme içeriği ve salım profili üzerinde daha fazla kontrol sağlar [155, 156]. Cur'in kimyasal yapısında bulunan iki aktif hidroksi grubunun varlığı, polimer-ilaç kombinasyonunun esterleşmesini kolaylaştırır [157]. Asit ve esteraz tepkili Cur salımı için ester bağımlı nötr koşullar altında kademeli olarak hidroliz edilmesi veya asit/esteraz ile hızla parçalayarak Cur'in sürekli salımının sağlanması mümkündür [158].

2.5 Sisplatin

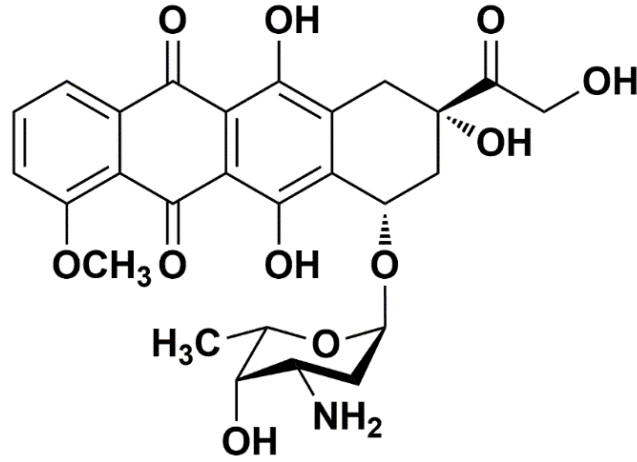
Sisplatin, ilk olarak 1978'de FDA tarafından antineoplastik ajan olarak yumurtalık ve testis kanserinde kullanım için onaylanmış bir ilaçtır. Metaller, insan hücresindeki biyolojik işlemlerin çoğu için gereklidir ve sisplatin, metalik-platin içeren bir ilaçtır. Onkoloji alanındaki ilerlemelere rağmen sisplatin hala kemoterapötik ajanlar arasında sık tercih edilen maddelerden biridir [159]. Sisplatin bazlı kombinasyon kemoterapi, testis, yumurtalık, baş, boyun, akciğer, meme, servikal, mide, prostat kanserleri, Hodgkin ve Hodgkin olmayan lenfomalar, nöroblastoma, sarkomlar, multipl miyelom, melanom ve mezotelyoma kanserlerine karşı önemli antitümör aktivite gösterir [160]. Sisplatinin antikanser aktivitesini birden fazla yere saldırarak gösterdiği bulunmuştur. Genellikle genomik DNA (gDNA) veya mitokondriyal DNA (mtDNA) ile DNA lezyonları oluşturmak; DNA, mRNA ve proteinlerin üretimini bloke etmek; DNA

replikasyonunu durdurarak sonunda hücreyi nekroza veya apoptoza yol açan çeşitli transdüksiyon yollarını etkinleştirmektedir [161].

En iyi bilinen mekanizma, DNA sentezi ve onarımı üzerindeki etkisidir; bu, hücre döngüsünün durmasına neden olur [159]. Sisplatin bir hücreye girdiğinde, klorür ligandları protein, RNA ve DNA eklentileri oluşturmak için hücre içi makromoleküller üzerindeki nükleofilik bölgeler ile reaksiyona girebilen pozitif yüklü sulu bir tür oluşturan su molekülleri ile değiştirilir [160]. Araştırmalar ayrıca, çoğu metal gibi sisplatinin de reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunda rol oynadığını, tümör baskılayıcı protein p53'ü etkilediğini, ölüm reseptörü-tümör nekroz faktörü etkileşimi yoluyla apoptozu indüklediğini ve intrinsik kaspazların mitokondriyal disfonksiyona neden olduğunu göstermiştir. Buna ek olarak endoplazmik retikulum üzerindeki stres yoluyla hücrede kalsiyum sinyallemesini etkiler. Bunlar, anti-neoplastik etkilerini uygulayan mekanizmalardan sadece bazılarıdır [159].

2.6 Doksorubisin (DOKS)

Doksozobisin (DOKS), 1967'de bir mantar türü olan *Streptomyces peucetius variete caesiu* kültürünün bir mutant türünden izole edilmiştir [162-167]. DOKS, lipofilik bir aminoglikoz grubundan (daunosamin) ve tetrasiklik çekirdekten oluşan antrasiklin halkasına sahiptir. İlaça kırmızı rengini veren tetrasiklik halka olup bu halkaya komşu kinon ve hidrokinon grupları vardır (Şekil 2.20) [168]. Halkanın doymuş ucunda birçok amino şeker ve hidroksil grubu bulunur [168, 169]. DOKS, $C_{27}H_{29}NO_{11}$ molekül formülüne sahip ve kimyasal yapısının adlandırması (7S,9S)-7-[(2R,4S,5S,6S)-4-amino-5-hidroksi-6 metiloksan-2-il]oksi-6,9,11-trihidroksi-9-(2-hidroksiasetil)-4-metoksi 8,10-dihidro-7H-tetrasen-5,12-dion'dur [170].



Şekil 2.20 : DOKS'un kimyasal yapısı.

DOKS, antrasiklin türevi bir antibiyotik ve kanser kemoterapisinde kullanılan bir ilaçtır [171]. Rutin olarak akciğer, mide, meme, mesane, multipl miyelom, sarkom, yumurtalık, tiroid ve pediatrik kanserler gibi çeşitli kanserlerin tedavisinde tek başına veya diğer antikanser ajanları veya radyasyon ve cerrahiyle birlikte birinci savunma hattı olarak yaygın olarak kullanılan sitotoksik bir kemoterapi ajanıdır [166, 172, 173].

DOKS'un kanser hücreleri üzerindeki etkisini açıklayabilecek iki mekanizma vardır:

- DNA ile iç içe geçip topoizomerez-II aracılı DNA onarımının bozulması
- Serbest radikallerin oluşması aracılığıyla hücre membranları, DNA ve proteinlere zarar verilmesi [174, 175]

DOKS, DNA'nın üç boyutlu yapısının düzenlenmesinden sorumlu bir enzim olan topoizomerezlar ile etkileşime girmektedir. Böylelikle tek ve çift sarmallı DNA baz çiftlerinin arasına girerek topoizomerez II aracılığıyla DNA kırılmalarına yol açar. Ayrıca, DNA interkalasyonu ile büyük moleküllerin sentezlenmesinin engellenmesi, ROS üretimi ve demir bağlaması; lipid peroksidasyonu ve DNA hasarı, DNA'ya bağlanma ve alkalizasyon, apoptozun indüksiyonu ve direkt membran etkisi mekanizmalarıyla etkilerini göstermektedir [176].

DOKS geniş spektrumlu antineoplastik aktiviteye sahip olmasına rağmen, kardiyotoksisite gibi yan etkiler kullanımını kısıtlamıştır [177-180]. Bu durum özellikle hastalığı ilerlemiş yüksek doz gerektiren hastalarda böyledir [181]. Doza bağlı olan akut ve kronik toksik yan etkilere neden olur. Çeşitli hastalarda çoklu organ toksisitesi oluşturma potansiyeline sahiptir [182]. Buna ek olarak klinikte saç

dökülmesi, mukozit, ekstrevasyon zedelenmesi, kemik iliği baskılanması, radyosensitizasyon, nefrotoksisite ve gastrointestinal toksisite gibi yan etkileri bulunmaktadır [183-185]. Bu nedenle kanser tedavisinde güçlü bir ajan olan DOKS'un kullanımında yan etkisini azaltmaya yardımcı olacak ajanlarla çalışılmaktadır [186, 187]. Ayrıca, bu olumsuz etkileri azaltmak için lipozomal ve misel formülasyonları gibi ilaç taşıma sistemleri geliştirilmiştir [188]. DOKS'u nanotaşıyıcılar içinde kapsülleyerek, ilacın sağlıklı dokulara maruziyetini azaltırken tümör bölgesine daha yüksek konsantrasyonların iletilmesini sağlamak mümkündür. Bu bağlamda, özellikle çapraz bağlama ile stabilize edilen polimer misel önemli bir umut vadetmektedir [189].



3. MATERYAL ve METOD

3.1 Malzemeler

Metakrilik asit (MAA, inhibitör olarak 250 ppm MEHQ içerir, %99, Aldrich), poli(etilen glikol) metakrilat (PEGMA, ortalama $M_n=300/500$, inhibitör olarak 500-800 ppm MEHQ içerir, Sigma Aldrich), metil metakrilat (MMA, $\geq\%99$, Sigma Aldrich) monomerleri bazik aluminadan geçirilerek kullanılmıştır. *N*-izopropilakrilamid (NIPAM, $\geq\%99$, Sigma Aldrich), 4-siyano-4[(dodesilsülfaniltiyokarbonil)sülfanil]pentanoik asit (CDTP, min. %97, Strem Chemicals), poli(etilen glikol) metil eter (PEG, $M_n=5000$ g/mol, Aldrich), 4-dimetilamino piridin (DMAP, Merck), *N,N'*-disikloheksilkarbodiimit (DCC, %99, Sigma-Aldrich), 2-bromoetanol (%95, Sigma-Aldrich), potasyum karbonat (K_2CO_3 , $\geq\%99$, Sigma-Aldrich), trietilamin (TEA, Sigma-Aldrich), metakriloil klorür (Aldrich), sodyum sülfat (Na_2SO_4 , Merck) ve hekzan (Merck), benzil amin (ReagentPlus®, %99, Sigma-Aldrich), L-Glutamik asit γ -benzil ester ($\geq 99.0\%$ (T), Sigma-Aldrich), H-Lys(Z)-OH (Bachem), L-Alanin (BioUltra, $\geq 99.5\%$ (NT), Sigma-Aldrich), metoksi polietilen glikol amin (PEG-NH₂, $M_n=2000$, etiketleme derecesi: ≥ 0.4 mmol/g NH₂ yüklemesi), α -pinen (%98, Sigma-Aldrich), trifosgen (reagent grade, 98%), kurkumin (Sigma), cis-diaminoplatin(II) diklorür (CDDP, ≥ 99.9 , Sigma-Aldrich), etil asetat (EtOAc, anhydrous, %99.8, Sigma-Aldrich), n-heptan (Emplura), dietileter (Chem-Lab), aseton (İSOLAB), etanol (İSOLAB), trifloroasitik asit (TFA, ReagentPlus®, %99, Sigma-Adrich) ve asetik asit içinde %33 HBr (Sigma-Aldrich) satın alındığı gibi kullanılmıştır. 2,2'-Azobis(2-metilpropiyonitril) (AIBN, Aldrich) metanolden kristallendirildikten sonra kullanılmıştır. Diklorometan (DCM, Merck), tetrahidrofuran (THF, Merck) ve *N,N*-dimetilformamit (DMF, Daejung) 4Å moleküler sieve ile kurutularak kullanılmıştır.

3.2 Kullanılan Cihazlar

Fourier dönüşümlü infrared (FT-IR) spektrumları platin-ATR aksesuarı ile (ZnSe kristali) ALPHA Bruker spektrometresinde kaydedilmiştir. ¹H NMR ölçümleri 500 MHz'lik Bruker NMR cihazında CDCl₃ veya DMSO-D₆ çözücüsü kullanılarak alınmıştır. Jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) ölçümleri analiz edilecek polimerlere bağlı olarak iki farklı cihazda gerçekleştirilmiştir. Polipeptitler için harici bir Wyatt Technologies Dawn Heleos-II çok açılı ışık saçılım (MALS) dedektörüne ve bir Wyatt Technologies DynaPro NanoStar dinamik ışık saçılım (DLS) dedektörüne bağlı Tosoh EcoSEC ikili dedektör (RI ve UV) SEC sistemi kullanılmıştır. Eluent olarak 45°C'de 0.5 mL/dk akış hızında DMF kullanılmıştır. Sistem, seri olarak bağlanmış bir Tosoh TSKgel G5000HHR kolonu (7.8 x 300 mm), bir Tosoh TSKgel G3000HHR kolonu (7.8 x 300 mm), EcoSEC için bir Tosoh TSKgel SuperH-RC referans kolonu ve bir Tosoh TSKgel HHR-H guard kolonu (6 x 40 mm) içermektedir. Molekül ağırlıkları ve molekül ağırlık dağılımları Astra 7.1.2 yazılım paketi kullanılarak hesaplanmıştır. Diğer polimerlerin analizleri Viscotek GPCmax ve 2001 Autosampler sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu sistem bir pompa ve Viscotek 3580 kırılma indisi (RI) dedektöründen oluşmaktadır. Üç adet Viscotek GPC kolon (T3000, LT4000L ve LT5000L; iç çap 7.8 mm, uzunluk 300 mm) seri olarak bağlanmış ve bir Tosoh koruma kolonu (TSKgel® HXL-H, kolon boyutu 6 mm iç çap x 4 cm, partikül boyutu 13 µm) kullanılmıştır. Eluent olarak 35°C'de 1 mL/dk akış hızında THF kullanılmıştır. SCNP oluşturulması sırasında enjeksiyonlar 14.50 mm çaplı şırıngalar kullanılarak Sujipuli Technology NE-1600 6 kanallı programlanabilir şırınga pompasında 5 mL/sa enjeksiyon hızıyla yapılmıştır. SCNP, TSCNP ve misellerin ortalama partikül boyutları ve boyut dağılımları, Malvern NanoZSP dinamik ışık saçılımı (DLS) cihazı kullanılarak 25 °C'de distile suda ve 173° (geri saçılım) ölçüm açısında belirlenmiştir. Her durumda, beş ölçümün ortalamaları alınmıştır. Polimerik miseller, CHRIST Alpha 3-4 LSCbasic liyofilizasyon sistemi kullanılarak dondurularak Kurutulmuştur. İlaç enkapsülasyon verimliliği ve ilaç salım çalışmaları için BioTek mikropilaka okuyucu (Synergy™ H1) kullanılmıştır. Geçirimli elektron mikroskop (TEM) görüntüleri, JEOL JEM-2100PLUS geçirimli elektron mikroskobu ile elde edilmiştir. Örnekler, misel çözeltisinin bir bakır ızgara üzerine dökülmesiyle hazırlanmış, hava ile

Kurutulmuş ve ardından uranil asetat ile negatif boyanma yapılmıştır. TEM boyut dağılımı, her örnek için 100 partikül üzerinde ImageJ yazılımı ile analiz edilmiştir.

3.3 Deneysel Kısım

3.3.1 Çapraz bağlayıcı olarak sisplatin kullanılarak SCNP'lerin oluşturulması

3.3.1.1 RAFT polimerizasyonu ile poli[poli(etilen glikol) metil eter metakrilat-*r*-metakrilik asit] (P(PEGMA-*r*-MAA)) sentezi

[M]/[RAFTajanı]/[AIBN] 100/1/0.33 olacak şekilde toplam monomer molü 0.009815 olmak üzere PEGMA (3.926 g, 3.6 mL, 7.852 mmol/ 4.417 g, 4.089 mL, 8.834 mmol) ve MAA (0.169 g, 0.166 mL, 1.963 mmol/ 0.0845 g, 83 µL, 9.815 mmol) monomerleri, CPCTT (0.0274 g, 0.09815 mmol) ve AIBN (0.0053 g, 0.03238 mmol), 5.5 mL 1,4-dioksan içinde Schlenk tüp içerisine konulup 3 kere dondur-vakumla-çöz (freze-pump-thaw) döngüsü tekrarlandı. Daha sonra oda sıcaklığına getirilen tüp 70°C'deki yağ banyosuna yerleştirilerek 24 saat karışıma bırakıldı. Reaksiyon sonunda Schlenk tüp soğutularak havaya açıldı. Polimer dietil eterde çöktürülüp dekante edildikten sonra vakum etüvünde kurutuldu. Elde edilen kopolimer ¹H NMR, GPC ve DSC ile karakterize edildi.

3.3.1.2 PEG-CTPA'nın sentezi

Poli(etilen glikol) metil eter (PEG, $M_n = 5000$ g/mol) (1.5 g, 0.3 mmol), 4-siyano-4[(dodesilsülfaniltiyokarbonil)sülfanil] pentanoik asit (0.1816 g, 0.45 mmol) ve DMAP (0.036 g, 0.3 mmol), 30 mL kuru diklorometan (DCM) içerisinde tamamen çözüldürüldü. Bu çözeltiliye 15 mL kuru DCM içerisindeki DCC (0.1395 g, 0.675 mmol) soğukta damla damla ilave edildi. Reaksiyon oda sıcaklığında azot atmosferi altında 24 saat karışıma bırakıldı. 24 saat sonunda filtre edilerek polimer dietil eterde çöktürüldü ve nuçe erleninden süzülerek vakum etüvünde kurutuldu (Verim= % 68). Elde edilen makroRAFT ajanı ¹H NMR ve FT-IR ile karakterize edildi.

3.3.1.3 RAFT polimerizasyonu ile poli(etilen glikol)-*b*-poli(*N*-izopropilakrilamit-*r*-metakrilik asit) (PEG-*b*-P(NIPAM-*r*-MAA)) sentezi

[M]/[makroRAFTajanı]/[AIBN] 200/1/0.33 olacak şekilde toplam monomer molü 0.01963 olmak üzere NIPAM (1.1694 g, 0.0103 mol), MAA (0.2224 g, 0.219 mL, 2.5835 mmol), PEG-CTPA (0.347 g, 0.06459 mmol), AIBN (0.0035 g, 0.02134 mmol)

ve 3 mL kuru THF bir Schlenk tüp içerisine konularak 3 kere dondur-vakumla-çöz (freze-pump-thaw) döngüsü tekrarlandı. Daha sonra oda sıcaklığına getirilen tüp 70°C'deki yağ banyosuna yerleştirilerek karışıma bırakıldı. Reaksiyon sonunda karışım soğutulurak havaya açıldı. Polimer soğuk dietil eterde çöktürülerek nuçe erleninden süzülde ve vakum etüvünde kurutuldu. Ardından tekrar DCM'da çözümdürülüp dietil eterde çöktürüldü ve tekrar süzülerek kurumaya bırakıldı. Elde edilen kopolimer ¹H NMR, GPC ve DSC ile karakterize edildi.

3.3.1.4 Sisplatin ile P(PEGMA-*r*-MAA) kopolimerinden SCNP'lerin oluşturulması

P(PEGMA-*r*-MAA) (25 mg) ve NaOH (0.60 mg, 0.015 mmol) distile su (98 mL) içerisinde çözümlenerek aşırı seyreltik bir ortam hazırlanıp gece boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Başka bir şişede distile su (2 mL) içinde sisplatin (1.87 mg, 0.00624 mmol) ve gümüş nitrat ([AgNO₃]/[CDDP]= 1.955) ilave edilerek 4 saat karanlıkta karıştırılarak sulu kompleks oluşturuldu. Kompleks oluşumu sırasında beyaz gümüş klorür çökeltisi gözlemlendi ve 9000 rpm'de santrifüj yapılarak AgCl'ün tamamen çökmesi sağlandı. Süpernatant 0.22 µL'lik filtreden geçirilerek 5 mL/saat enjeksiyon hızında bir şırınga pompası kullanılarak polimer çözeltisine damlatıldı. Damlatma işlemi bittikten sonra çözelti 37°C'de karanlıkta 2 gün karışıma bırakıldı. Elde edilen SCNP'ler DLS ile karakterize edildikten sonra liyofilize edildi.

3.3.1.5 Sisplatin ile PEG-*b*-P(NIPAM-*r*-MAA) kopolimerinden iribaş yapılu TSCNP'lerin oluşturulması

PEG-*b*-P(NIPAM-*r*-MAA) (10 mg), distile su içerisinde 98 mL içerisinde çözümlenerek aşırı seyreltik bir ortam hazırlanıp gece boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Başka bir şişede distile su (2 mL) içinde sisplatin (1.3 mg, 0.00445 mmol) ve gümüş nitrat ([AgNO₃]/[CDDP]= 1.955) ilave edilerek 4 saat karanlıkta karıştırılarak sulu kompleks oluşturuldu. Kompleks oluşumu sırasında beyaz gümüş klorür çökeltisi gözlemlendi ve 9000 rpm'de santrifüj yapılarak AgCl'ün tamamen çökmesi sağlandı. Süpernatant 0.22 µL'lik filtreden geçirilerek 5 mL/saat enjeksiyon hızında bir şırınga pompası kullanılarak polimer çözeltisine damlatıldı. Damlatma işlemi bittikten sonra çözelti 37°C'de karanlıkta 2 gün karışıma bırakıldı. Elde edilen SCNP'ler DLS ile karakterize edildikten sonra liyofilize edildi.

3.3.1.6 γ -Benzil-L-glutamat *N*-karboksianhidrit (Glu-NCA) sentezi

L-Glutamik asit γ -benzil ester (1 g, 4.21 mmol) ve α -pinen (2 mL, 12.64 mmol) 8 mL etil asetat ile 30 dakika reflüks altında 90°C yağ banyosunda karıştırıldı. Ayrı bir beher içinde trifosgen (0.5956 g, 2.01 mmol) 4 mL etil asetat içinde çözüldü. 30 dakika sonra trifosgen çözeltisi, glutamik asit çözeltisine damla damla ilave edildi. Şişenin dibinde katı glutamik asit kalmadığında reaksiyon durduruldu. Reaksiyon, n-heptan içine dökülerek çöktürüldü ve santrifüj sonucu elde edilen madde kurutuldu. Kuruyan madde etil asetat ve hekzan ile kristallendirilerek, beyazımsı katı kristaller elde edildi. Glu-NCA, ¹H NMR ve FT-IR ile karakterize edildi.

3.3.1.7 $N\epsilon$ -Benzilkarbonil-L-lizin *N*-karboksianhidrit (Liz-NCA) sentezi

$N\epsilon$ -Benzilkarbonil-L-lizin (2 g, 7.13 mmol) ve α -pinen (4.3047 mL, 27.11 mmol) 20 mL etil asetat ile 30 dakika reflüks altında 90°C yağ banyosunda karıştırıldı. Ayrı bir beher içinde trifosgen (1.0586 g, 3.56 mmol) 10 mL etil asetat içinde çözüldü. 30 dakika sonra trifosgen çözeltisi lizin çözeltisine damla damla ilave edildi. Çözücünün bir kısmı uçurularak çözeltinin hacmi düşürüldü ve n-heptan içine dökülerek çöktürüldü ve santrifüj sonucu elde edilen madde kurutuldu. Kuruyan madde etil asetat ve hekzan ile kristallendirilerek, beyazımsı katı kristaller elde edildi. Liz-NCA, ¹H NMR ve FT-IR ile karakterize edildi.

3.3.1.8 L-alanin *N*-karboksianhidrit (Ala-NCA) sentezi

Öğütülmüş L-alanin (2 g, 22.45 mmol) ve α -pinen (13.5447 mL, 85.31 mmol) 80 mL etil asetat ile 30 dakika reflüks altında 90°C yağ banyosunda karıştırıldı. Ayrı bir beher içinde trifosgen (3.3308 g, 11.22 mmol) 20 mL etil asetat içinde çözüldü. Yarım saat sonra trifosgen çözeltisi alanin çözeltisine damla damla ilave edildi. Alanin'in tamamı reaksiyon esnasında çözünmediği için 6 saat sonra reaksiyon durdurularak filtre edildi. Çözücünün bir kısmı uçurularak çözeltinin hacmi düşürüldü, n-heptan içine dökülerek çöktürüldü ve santrifüj sonucu elde edilen madde kurutuldu. Kuruyan madde etil asetat ve hekzan ile kristallendirilerek, beyazımsı katı kristaller elde edildi. Ala-NCA, ¹H NMR ve FT-IR ile karakterize edildi.

3.3.1.9 Poli[(γ -benzil-L-glutamat *N*-karboksianhidrit)-*r*-(N_{ϵ} -benzilkarbonil-L-lizin *N*-karboksianhidrit)] [P(Glu-NCA-*r*-Liz-NCA)] sentezi

Polimerizasyon azot gazı altında yapılmıştır. Glu-NCA (0.1 g 0.38 mmol) ve Liz-NCA (1.0472 g, 3.42 mmol) 12 mL DMF içinde çözüldü. Tüm monomerler çözüldükten sonra 1 mL DMF içinde benzilamin (0.0041g, 0.04 mmol) konularak hazırlanan stok çözeltisi reaksiyonu etkinleştirmek için ilave edildi. Reaksiyon 72 saat karışıma bırakıldıktan sonra polimer dietil eter içinde çöktürülerek filtrelendi. Dietil eterde yeniden çöktürüldükten sonra filtre edilerek elde edilen beyaz toz 30°C'de vakum altında kurutuldu. Elde edilen polimer ¹H NMR ve FT-IR ile karakterize edildi.

3.3.1.10 Poli[(γ -benzil-L-glutamat)-*r*-(N_{ϵ} -benzilkarbonil-L-lizin)] [P(Glu-*r*-Liz)] sentezi

Poli(Glu-NCA-*r*-Liz-NCA) (1 g), 18 mL trifloroasetik asit içerisinde çözüldürüldü. Polipeptit tamamen çözüldükten sonra çözeltiliye 14 mL asetik asit içinde % 33 HBr ilave edilip 24 saat karışıma bırakıldı ve sonra dietil eterde çöktürülüp kurutuldu. Kuruyan polimer DMSO'da çözümlenerek suya karşı 3 gün diyalizi yapıldı ve sonrasında liyofilizatör ile kurutuldu. P(Glu-*r*-Liz) ¹H NMR, GPC ve FT-IR ile karakterize edildi.

3.3.1.11 Sisplatin ile P(Glu-*r*-Liz) kopolimerinden SCNP'lerin oluşturulması

Öncelikle sisplatin stok çözelti hazırlamak için 2 mL distile su içine 2 mg sisplatin ve 2.2 mg gümüş nitrat konularak karanlıkta 24 saat boyunca karıştırılarak sulu kompleks oluşturuldu. Kompleks oluşumu sırasında beyaz gümüş klorür çökeltisi gözlemlendi ve 20 dk santrifüj yapılarak AgCl'ün tamamen çökmesi sağlandı. Ardından P(Glu-*r*-Liz) (0.025 g) 98 mL distile su içinde 1 gece oda sıcaklığında karışıma bırakıldı. Bir gece sonrasında hazırlanan stok çözelti süpernatant 0.22 mL'lik filtreden geçirildikten sonra 37°C'de yarım saat karışan polimer kopolimer çözeltisine 5 mL/saat enjeksiyon hızında bir şırınga pompası kullanılarak damlatıldı. Damlatma işlemi bittikten sonra çözelti 37°C'de 2 gün karışıma bırakıldı. Liyofilize edilerek elde edilen SCNP DLS ile karakterize edildi.

3.3.1.12 Poli(etilen glikol)-*b*-poli[(γ -benzil-L-glutamat *N*-karboksianhidrit)-*r*-(L-alanin *N*-karboksianhidrit)] [PEG-*b*-P(Glu-NCA-*r*-Ala-NCA)] sentezi

Glu-NCA (0.327 g) ve Ala-NCA (0.6133 g) 5 mL DMF ve 6 mL kloroform içinde çözüldü. Tüm monomerler çözüldükten sonra 1 mL DMF içinde PEG-NH₂ (0.3066 g,

0.092 mmol) konularak hazırlanan stok çözeltisi reaksiyonu etkinleştirmek için ilave edildi. Reaksiyon azot atmosferinde 72 saat karışıma bırakıldıktan sonra, polimer dietil eter içinde çöktürülerek filtrelendi. Dietil eterde yeniden çöktürüldükten sonra filtre edilerek elde edilen beyaz toz 30°C'de vakum altında kurutulup ¹H NMR ve FT-IR ile karakterize edildi.

3.3.1.13 Poli(etilen glikol)-*b*-poli[(γ -Benzil-L-glutamat)-*r*-(L-alanin)] [PEG-*b*-P(Glu-*r*-Ala)] sentezi

PEG-*b*-P(Glu-NCA-*r*-Ala-NCA) (1 g), 18 mL trifloroasetik asit içerisinde çözüldü. Poli(amino asit) tamamen çözüldükten sonra çözeltiliye 14 mL asetik asit içinde % 33 HBr ilave edildi 24 saat karışıma bırakıldı ve sonra dietil eterde çöktürülüp kurutuldu. Kuruyan polimer DMSO'da çözülerek suya karşı 3 gün diyalizi yapıldı ve sonrasında liyofilizatör ile kurutuldu. PEG-*b*-P(Glu-*r*-Ala) ¹H NMR, GPC ve FT-IR ile karakterize edildi.

3.3.2 Çapraz bağlayıcı olarak Cur kullanılarak SCNP'lerin oluşturulması

3.3.2.1 2-Bromoetil metakrilat (BrMA) sentezi

2-Bromoetanol (878 μ L, 0.0124 mol) 25 mL kuru DCM içerisinde oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra trietilamin (1.558 mL, 0.0112 mol) soğukta eklenerek 15 dakika karıştırıldı. Bu çözeltiliye soğukta azot altında 10 mL kuru DCM içerisindeki metakriloil klorür (1 mL, 0.0103 mmol) damla damla ilave edildi. Reaksiyon ışıktan korunarak oda sıcaklığında azot (N₂) atmosferi altında 24 saat karışıma bırakıldı. Çözelti filtre edilip sıvı kısım iki kere 50 mL doymuş sodyum bikarbonat çözeltisi ile ve iki kere 50 mL distile su ile ekstrakte edildi. Organik kısım Na₂SO₄ ile kurutuldu ve filtre edilerek çözücü uçurularak BrMA monomeri elde edildi. (Verim= %63). Elde edilen monomer ¹H NMR ve FT-IR ile karakterize edildi.

3.3.2.2 RAFT polimerizasyonu ile poli[poli(etilen glikol metil eter metakrilat)-*r*-(2-bromoetil metakrilat)] (P(PEGMA-*r*-BrMA)) sentezi

[M]/[RAFTajanı]/[AIBN] 100/1/0.33 olacak şekilde toplam monomer molü 0.009815 olmak üzere PEGMA (2.3556 g, 7.852 mmol), BrMA (0.3789 g, 1.963 mmol), CPCTT (0.0274 g, 0.09815 mmol) ve AIBN (0.0053 g, 0.03238 mmol), 3 mL toluen içinde Schlenk tüp içerisinde konuldu. Üç kere dondur-vakumla-çöz (freze-pump-thaw)

döngüsü tekrarlandıktan sonra oda sıcaklığına getirilen tüp 70°C'deki yağ banyosuna yerleştirilerek 24 saat karışıma bırakıldı. Reaksiyon sonunda Schlenk tüp soğutulmuş havaya açıldı ve polimer dietil eterde çöktürülüp dekante edildikten sonra vakum etüvünde kurutuldu. Elde edilen kopolimer ¹H NMR, GPC ve DSC ile karakterize edildi.

3.3.2.3 Cur ile P(PEGMA-*r*-BrMA) polimerlerinden SCNP'lerin oluşturulması

P(PEGMA-*r*-BrMA) polimerinin konsantrasyonu 0.2 mg/mL olacak şekilde aseton içinde bir gece oda sıcaklığında karışıma bırakıldı. Aseton (5 mL) içinde çözünen Cur ve potasyum karbonat da 1 gece karışıma bırakıldıktan sonra polimer çözeltisine damla damla eklendi. Damlatma işlemi bittikten sonra çözelti 70°C'de reflüks altında karanlıkta 24 saat karışıma bırakıldı. Daha sonra çözücünün bir kısmı döner buharlaştırıcıda uçurularak filtre edildi ve 3 kere distile su ile ekstraksiyon yapıldı. Organik kısım Na₂SO₄ ile kurutuldu ve filtre edilerek çözücünün bir kısmı uçurularak heksanda çöktürüldü. Cur'i uzaklaştırmak için 3 kez dietil eter ile yıkanıp vakum etüvünde kurutuldu. Elde edilen kopolimer ¹H NMR, GPC, DLS, DSC ve TEM ile karakterize edildi.

3.3.2.4 SCNP-2'nin ilaç salım çalışması

SCNP-2 (10 mg), 1 mL PBS vey asetat tamponu içinde çözüldükten sonra diyaliz membranına (MWCO = 3500 kDa) yerleştirildi. Diyaliz membranı, 20 mL Tween® 80 (%5 v/v) içeren PBS tamponu (0.01 M, pH 7.4) ve asetat tamponu (0.01 M, pH 5.0) içeren beherlerin içine konularak 37 °C 100 rpm'de inkübatörde karışıma bırakıldı. Önceden belirlenmiş sürelerde inkübe edilmiş çözeltiden 3 mL alındı ve yerine 3 mL taze tampon çözelti ilave edildi. Cur salım değerleri, UV spektrometrisinde 420 nm'de absorbans değerleri ölçülerek belirlendi.

3.3.2.5 Antioksidan aktivite tayini

1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikal temizleme testi literatürde açıklanan yöntemle göre belirlendi [190, 191]. DPPH çözeltisi (0.1 mM) metanolde hazırlandı. Bileşiklerin çözeltileri metanolde dört farklı konsantrasyonda hazırlandı. Örnek çözeltiler (40 µL) düz tabanlı 96 kuyulu bir plakaya aktarıldı. Daha sonra 160 µL 0.1 mM DPPH çözeltisi eklendi ve karışımlar karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Son olarak, inhibisyon (%) her konsantrasyon için boş bir değere göre 517

nm'de ölçülen absorbans değerleri kullanılarak belirlendi. DPPH serbest radikal temizleme aktivitesi denklem 3.1 kullanılarak hesaplandı:

$$\text{İnhibisyonu (\%)} = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}} / A_{\text{kontrol}}) \times 100 \quad (3.1)$$

3.3.2.6 Antiinflamatuvar aktivite tayini

Cur ve SCNP farklı miktarlarda tartılarak DMSO içinde çözündürüldükten sonra distile su ile seyreltilerek farklı konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltilerden bovin serum albümini sulu çözeltisinden (1mL, %1'lik) 1mL, PBS (pH 6,4) çözeltisinden 1mL alınarak karıştırılmıştır. Kontrol grubu olarak distile suda (1 mL) çözülmüş diklofenak sodyum (10 mg) kullanıldı. Örnek (100 µL) ve kontrol çözeltileri (100 µL) düz tabanlı 96 kuyulu bir plakaya aktarıldı. Örnekler $37 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de 15 dakika inkübe edildi ve ardından 70°C 'de 5 dakika ısıtıldı. Oda sıcaklığına soğutulduktan sonra, 660 nm'dek absorbans değerleri ölçüldü [192].

3.3.2.7 Hücre kültürü

MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) insan meme kanseri hücre hattı ve CCD-986Sk (ATCC® CRL-147) insan sağlıklı deri hücre hattı, %10 fetal sıgır serumu (FBS) ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM/F12 ortamında, %5 CO₂ içeren nemli bir atmosferde 37°C 'de kültüre edildi.

3.3.2.8 SCNP-2'nin *in vitro* hücresel alımı

MDA-MB-231 hücreleri 24 kuyucuklu plakalara (kuyu başına 5×10^4 hücre) ekildi ve 37°C 'de 24 saat inkübe edildi. Daha sonra kültür ortamı, 10 µM SCNP içeren taze ortamla değiştirilerek 3, 6 ve 24 saat inkübe edildi. PBS ile yıkandıktan sonra hücreler FBS ve fenol kırmızısı içermeyen F-10 ortamına aktarıldı ve hücre çekirdeklerini boyamak için 10 µg/mL Hoechst boyası ile 10 dakika inkübe edildi. Görüntüleme, 20x büyütmede bir floresan mikroskobu (Zeiss Axio Observer Z1) kullanılarak gerçekleştirildi. Hücre çekirdeklerini görselleştirmek için Hoechst (uyarılma: 352 nm, emisyon: 455 nm) ve yeşil GFP kanalı Cur'i tespit etmek için kullanıldı (uyarılma: 488 nm, emisyon: 509 nm).

3.3.2.9 SCNP-2'nin *in vitro* sitotoksitesi

MDA-MB-231 ve CCD-986Sk hücreleri 96 kuyulu plakalara (kuyu başına 1×10^4 hücre) ekildi ve 37°C 'de 24 saat inkübe edildi. Daha sonra hücreler, her biri P(PEGMA-*r*-BrMA), SCNP-2 ve Cur'den oluşan altı farklı konsantrasyonu ($25 \mu\text{M}$ ile $0.78 \mu\text{M}$) içeren taze kültür ortamıyla 37°C 'de 24 saat inkübe edildi. Herhangi bir bileşik içermeyen ortamla inkübe edilen hücreler negatif kontrol grubu olarak kullanıldı. Kültür ortamı, MTT içeren taze ortamla değiştirildi ve 3 saat daha inkübe edildi. Daha sonra MTT içeren ortam $50 \mu\text{L}$ DMSO ile değiştirildi ve çözeltinin absorbansı, spektrofotometrik bir mikro plaka okuyucusu (BioTek Synergy H1, ABD) kullanılarak 570 nm 'de ölçüldü. Hücre canlılığı, denklem 3.2 kullanılarak hesaplandı:

$$\text{Canlılık (\%)} = \frac{(\text{OD}_t - \text{OD}_b)}{(\text{OD}_c - \text{OD}_b)} \times 100 \quad (3.2)$$

Burada OD_b arka plan absorbansını, OD_t örnek içeren çözeltinin absorbansını ve OD_c örnek içermeyen çözeltinin absorbansını ifade etmektedir. Canlılık seviyesi, GraphPad Prism 9.0 ile iki yönlü ANOVA kullanılarak analiz edildi.

3.3.3 Çapraz bağlayıcı olarak Cur kullanılarak TSCNP'lerin oluşturulması

3.3.3.1 RAFT polimerizasyonu ile poli(etilen glikol)-*b*-poli[(metil metakrilat)-*r*-(metakrilik asit)] (PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA)) sentezi

$[\text{M}]/[\text{RAFTajani}]/[\text{AIBN}]$ oranı $200/1/0.33$ olacak şekilde toplam monomer molü 12.918×10^{-3} olarak ayarlanarak farklı oranlarda MMA ve MAA monomeri, PEG-CTA (0.347 g , $6.4588 \times 10^{-5} \text{ mol}$) ve AIBN (0.0035 g , $2.1314 \times 10^{-5} \text{ mol}$) ve 3 mL etanol Schlenk tüp içerisine konuldu. Üç kere dondur-vakumla-çöz (freze-pump-thaw) döngüsü tekrarlandıktan sonra oda sıcaklığına getirilen tüp 70°C 'deki yağ banyosuna yerleştirilerek 24 saat karışıma bırakıldı. Reaksiyon sonunda Schlenk tüp soğutulmuş havaya açılıp, polimer dietil eter içinde çöktürülüp filtre edildikten sonra vakum etüvünde kurutuldu. Elde edilen kopolimer $^1\text{H NMR}$, GPC ve DSC ile karakterize edildi.

3.3.3.2 Cur ile PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA) kopolimelerinden TSCNP'lerin oluşturulması

PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA) polimerlerin konsantrasyonu 0.2 mg/mL olacak şekilde DCM içinde bir gece oda sıcaklığında karışıma bırakıldı. Ertesi gün reaksiyona DMAP ve DCC eklenerek yarım saat daha karıştırıldıktan sonra 5 mL DCM içinde çözünen Cur polimer çözeltisine 5 mL/saat enjeksiyon hızında bir şırınga pompası kullanılarak damlatıldı. Damlatma işlemi bittikten sonra çözelti oda sıcaklığında karanlıkta 2 gün karışıma bırakıldı. Daha sonra çözücünün bir kısmı döner buharlaştırıcıda uçuruldu ve Cur'i uzaklaştırmak için 3 kez dietil eterde çöktürülerek vakum etüvünde kurutuldu. Elde edilen kopolimer GPC, DLS, DSC ve TEM ile karakterize edildi.

3.3.3.3 TSCNP'lerden misel oluşturulması

TSCNP miselleri diyaliz membran yöntemi ile oluşturuldu. TSCNP-2 (10 mg) ve TSCNP-5 (10 mg), 1 mL DMF içerisinde çözüldü ve 1 saat oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra içerisine enjeksiyon pompası ile 9 mL distile su 0.5 mL/dk hızla damlatıldı. Bir gece oda sıcaklığında karışıma bırakıldı ve daha sonra diyaliz membran (MWCO= 6-8 kDa) içerisine alınarak suya karşı 24 saat diyaliz yapıldı. Elde edilen miseller +4 °C'de depolandı ve DLS cihazı ile partikül boyutu ölçümleri yapıldı.

3.3.3.4 TSCNP'lerden DOKS yüklü misel oluşturulması

DOKS yüklü TSCNP miselleri diyaliz membran yöntemi ile oluşturuldu. TSCNP-5 (10 mg) ve DOKS (0.004 g, 0.006896 mmol) 2 mL DMF içerisinde çözüldü ve 2 saat oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra içerisine enjeksiyon pompası ile 8 mL distile su 0.5 mL/dk hızla damlatıldı. Bir gece oda sıcaklığında karışıma bırakıldı ve daha sonra diyaliz membran (MWCO= 6-8 kDa) içerisine alınarak suya karşı 24 saat diyaliz yapıldı. Elde edilen miseller +4 °C'de depolandı ve DLS cihazı ile partikül boyutu ölçümleri yapıldı.

3.3.3.5 Kritik misel konsantrasyonunun (KMK) belirlenmesi

Misellerin KMK'ları, floresans boya çözündürme yöntemi kullanılarak ölçüldü. Hidrofobik olan piren mikroortam polaritesine bağlı olarak iyi bilinen değişikliklere uğramaktadır. Bu nedenle floresans probu olarak piren kullanıldı. Piren (5 mg) üzerine 5 mL aseton eklenip çözüldü. Bu çözeltiden numaralandırılan 14 adet eppendorf tüpü içerisine 10'ar µL eklenip çeker ocağın içine asetonun uçması için bırakıldı. Daha

sonra 10 mg kopolimere 10 mL distile su eklenip çözüldü ve polimer sulu çözeltisi 1×10^{-4} ile 1 mg/mL arasındaki konsantrasyonlarda olacak şekilde ependorflara 1'er mL eklendi. Birkaç saniye vorteksle iyice karışması sağlanan numuneler 1 gece bekletildi. Ertesi gün kuyucuklara 200'er µl konulup ELISA'da ölçüm alındı. Çözeltiler 334 nm'de uyarılarak 384 nm ve 373 nm'deki intensite değerleri oranlandı (I_3/I_1). Bu intensite oranı kopolimer konsantrasyonunun logaritmasına karşı grafiğe geçirilerek en uygun iki doğrunun kesişim noktasından sulu ortamda kararlı misellerin oluşumu için gereken minimum polimer konsantrasyonuna karşılık gelen KMK belirlendi.

3.3.3.6 İlaç yükleme kapasitesi (İYK) ve ilaç yükleme veriminin (İYV) belirlenmesi

Misellere yüklenen DOKS miktarı ELISA cihazı ile 485 nm'de ölçülen absorbans değeri kullanılarak aşağıda verilen denklem 3.3 ve 3.4 kullanılarak hesaplandı. Öncelikle 5 mg DOKS 10 mL DMSO içerisinde çözüldü ve 7 farklı konsantrasyon olacak şekilde DMSO ile seyreltme yapıldı. Elde edilen DOKS çözeltilerinin 485 nm'deki absorbans değerleri ölçülerek bir kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. TSCNP-5 ile elde edilen DOKS yüklü misellerden alınarak 1 mL DMSO içerisinde 1 gün bekletildi. Daha sonra 485 nm'de ölçülen absorbans değeri kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklemde yerine konularak mg/mL değeri hesaplandı. İYK ve İYV, denklem 3.3 ve 3.4 kullanılarak hesaplandı.

$$\%İYK = \frac{\text{misel içerisindeki ilaç kütlesi}}{\text{misel kütlesi}} \times 100 \quad (3.3)$$

$$\%İYV = \frac{\text{misel içerisindeki ilaç kütlesi}}{\text{yüklenen toplam ilaç kütlesi}} \times 100 \quad (3.4)$$

$$\%TİY = \frac{\text{ilaç kütlesi}}{\text{toplam kütle}} \times 100 \quad (3.5)$$

3.3.3.7 MTSCNPDOKS'in ilaç salım çalışması

TSCNP-5'den elde edilen ilaç yüklü misel çözeltisi (1 mL) diyaliz membrana (MWCO = 3500 kDa) aktarıldı ve Tween 80 (%1 v/v) içeren 20 mL PBS çözeltisinde (pH: 5 ve 7.4) 37 °C'de 100 rpm karıştırma hızıyla inkübe edildi. Önceden belirlenmiş sürelerde inkübe edilmiş çözeltiden 2 mL alındı ve yerine 2 mL taze PBS 20 mL'lik medyuma ilave edildi. Örneklerden 200 µL alınarak 96 kuyucuklu plakaya konuldu ve ELISA

okuyucu kullanılarak DOKS salım değerleri ölçüldü. Örnekler 480 nm’de uyarılarak değeri ölçüldü ve ilaç salım grafiği oluşturuldu.

3.3.3.8 Antioksidan aktivite tayini

DPPH radikal temizleme aktivitesi literatürde açıklanan yöntemeye göre belirlendi [190, 191]. DPPH çözeltisi (0.1 mM) metanolde hazırlandı. Bileşiklerin çözeltileri metanolde dört farklı konsantrasyonda hazırlandı. Örnek çözeltiler (40 µL) düz tabanlı 96 kuyulu bir plakaya aktarıldı. Daha sonra 160 µL 0,1 mM DPPH çözeltisi eklendi ve karışımlar karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Son olarak, inhibisyon (%) her konsantrasyon için boş bir değere göre 517 nm’de ölçülen absorbans değerleri kullanılarak belirlendi. DPPH serbest radikal temizleme aktivitesi denklem 3.1 kullanılarak hesaplandı.

3.3.3.9 Hücre kültürü

MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) insan meme kanseri hücre hattı ve CCD-986Sk (ATCC® CRL-147) insan sağlıklı deri hücre hattı, %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM/F12 ortamında, %5 CO₂ içeren nemli bir atmosferde 37°C’de kültüre edildi.

3.3.3.10 M_{TSCNPDOKS}’un *in vitro* hücresel alımı

MDA-MB-231 hücreleri, kuyu başına 5×10^4 hücre yoğunluğunda 24 kuyucuklu plakalara ekildi ve 24 saat boyunca 37°C’de inkübe edildi. Ortam daha sonra 10 µM M_{TSCNPDOKS} içeren taze kültür ortamı ile değiştirilerek 3, 6 ve 24 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hücreler PBS ile yıkandı, FBS ve fenol kırmızısı içermeyen F-10 ortamına aktarıldı ve çekirdekleri boyamak için 10 µg/mL Hoechst boyası ile 10 dakika inkübe edildi. Floresan görüntüleme, 20x büyütmede bir Zeiss Axio Observer Z1 mikroskobu kullanılarak gerçekleştirildi. Hücre çekirdeklerini görselleştirmek için mavi kanal (uyarılma: 405 nm, emisyon: 435–480 nm) kullanılırken, DOKS’u tespit etmek için kırmızı kanal (uyarılma: 633 nm, emisyon: 650–680 nm) kullanıldı.

3.3.3.11 M_{TSCNPDOKS}’un *in vitro* sitotoksitesitesi

MDA-MB-231 ve CCD-986Sk hücreleri, kuyu başına 1×10^4 hücre yoğunluğunda 96 kuyucuklu plakalara ekildi ve 37°C’de 24 saat inkübe edildi. Daha sonra hücreler 24,

48 ve 72 saat boyunca altı konsantrasyonda (100 μ M ila 3.12 μ M) M_{TSCNP} , M_{POL} , Cur, $M_{TSCNPDOKS}$, DOKS ve DOKS-Cur içeren taze ortamla muamele edildi. Muamele edilmemiş hücreler negatif kontrol olarak kullanıldı. Muameleden sonra ortam, MTT reaktifi içeren taze ortamla değiştirildi ve 3 saat inkübe edildi. Daha sonra MTT solüsyonu çıkarıldı ve formazan kristallerini çözmek için 50 μ L DMSO eklendi. 570 nm'deki absorbans, bir BioTek Synergy H1 mikropılaka okuyucusu kullanılarak ölçüldü. Hücre canlılığı, denklem 3.2 kullanılarak hesaplandı. Hücre canlılığı, istatistiksel analizi GraphPad Prism 9.0'da iki yönlü ANOVA kullanılarak gerçekleştirildi.



4. BULGULAR ve TARTIŞMA

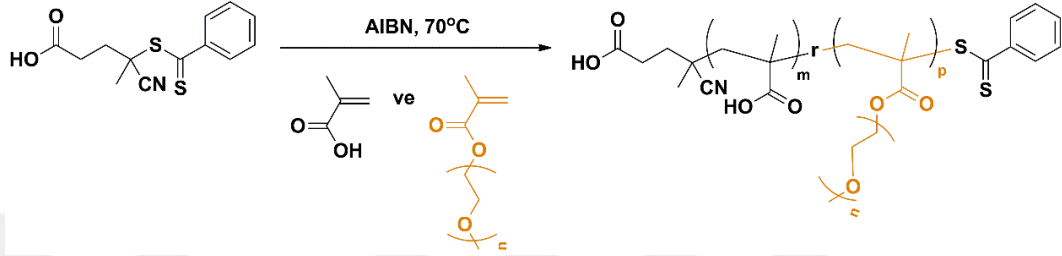
Bu çalışmada, ilaç taşıyıcı sistemler olarak SCNP'lerin kullanılması hedeflenerek 3 farklı çalışma gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalarda ilaç molekülleri çapraz bağlayıcı olarak kullanılarak sentezlenen amfifilik ve hidrofilik kopolimerlerin zincir içi çökmesi sağlanmış ve SCNP'lerin ilaç taşıyıcı olarak kullanılması hedeflenmiştir. Böylelikle SCNP'lerde ekstra herhangi bir ilaç yüklemesine ihtiyaç duyulmayacaktır. Çalışmada elde edilen tüm polimerler, GPC, ¹H NMR ve DSC teknikleri ile karakterize edilmiştir. Elde edilen SCNP ve TSCNP'ler GPC, DSC, DLS ve TEM analizleri ile çapraz bağlanmaya bağlı değişen molekül ağırlığı, boyut, camsı geçiş sıcaklığı ve morfolojisi açısından karakterize edilmiştir. İlaç yükleme verimliliği ve salım davranışı UV-Vis absorpsiyon spektroskopisi ve mikropilaka okuyucu ile izlenmiştir. SCNP, TSCNP ve misellerin sitotoksitesi ile hücresel alımları klorimetrik testlerle incelenmiştir. Yapılan çalışmalar SCNP'lerin ilaç taşıyıcı sistemler olarak potansiyelini ortaya koymaktadır.

4.1 Çapraz Bağlayıcı Olarak Sisplatin Kullanılarak SCNP'lerin Oluşturulmasına Dair Bulgular

Sisplatin molekülü çapraz bağlayıcı olarak kullanılarak SCNP'ler oluşturulmuştur. Bunun için ilk aşamada sentezlenecek bütün amfifilik kopolimerler için CPCTT RAFT ajanı ve PEG kullanılarak makroRAFT ajanı sentezlenmiştir. Ardından RAFT polimerizasyonu ile P(PEGMA-*r*-MAA) hidrofilik kopolimeri ve PEG-*b*-P(NIPAM-*r*-MAA) amfifilik kopolimeri sentezlenmiştir. Aynı zamanda halka açılma polimerizasyonu kullanılarak P(Glu-*r*-Liz) hidrofilik kopolimeri ve PEG-*b*-P(Glu-*r*-Ala) amfifilik kopolimeri sentezlenmiştir. Bu öncü polimerlerin sisplatin molekülü ile ultra seyreltik koşullarda reaksiyonu sonucunda SCNP'ler oluşturulması hedeflenmiştir.

4.1.1 RAFT polimerizasyonu ile P(PEGMA-*r*-MAA) sentezi ve karakterizasyonu

RAFT polimerizasyonu yöntemiyle, $[M]/[RAFTajarı]/[AIBN]$ oranı 100/1/0.33 olacak şekilde ayarlanmıştır. PEGMA ve MAA monomerleri, CPCTT ve AIBN 1,4-dioksan Schlenk tüp içerisine konulup 3 kere dondur-vakumla-çöz (freze-pump-thaw) döngüsü tekrarlandı. Elde edilen kopolimer 1H NMR, GPC ve DSC ile karakterize edildi.



Şekil 4.1 : RAFT polimerizasyonu ile P(PEGMA-*r*-MAA) sentezi.

Gerçekleştirilen polimerizasyonlar sonucunda elde edilen polimerlerin teorik olarak hesaplanan molekül ağırlıkları ve 1H NMR'dan hesaplanan molekül ağırlıkları Tablo 4.1'de karşılaştırılmıştır.

Polimerizasyon sonucunda elde edilen polimerin molekül ağırlıkları THF GPC ile ölçülmüştür ve sonuçlar Tablo 4.1'de verilmiştir. P(PEGMA-*r*-MAA) polimerleri için 24 saat etanol ve 1,4-dioksan içinde gerçekleşen polimerizasyonların dönüşümleri ve dolayısıyla teorik molekül ağırlıkları 25000-40000 g/mol arasında olduğu için farklı bir saat denemesi yapılmamıştır. Tablo 4.1'de gösterildiği üzere etanol ve 1,4-dioksan çözücüleri ile denenen polimerizasyonlar sonucunda GPC'den alınan sonuçlarda 1,4-dioksan ile yapılan polimerlerde PDI 1'e daha yakın olduğu için polimerin daha kontrollü olduğuna ve bu çözücü ile devam edilmesine karar verilmiştir. Bu sebeple P(PEGMA-*r*-MAA)-2 ve 3 polimerlerinin DSC ile karakterizasyonu yapılmış ve sispatin ile SCNP yapılmasında bu polimerlerin kullanımına karar verilmiştir.

Tablo 4.1 : RAFT polimerizasyonu ile elde edilen hidrofilik P(PEGMA-*r*-MAA) kopolimerlerinin oluşma koşulları ve sonuçları^a.

Kod	Besleme oranı [PEGMA]/[MAA] (%mol)	Çözücü	Dönüşüm ^b (%)	M _{n,th} ^b (g/mol)	M _{n,GPC} ^c (g/mol)	M _{n,NMR} ^d (g/mol)	Đ ^c	Ünite oranı [PEGMA]/[MAA] ^d
P(PEGMA- <i>r</i> -MAA)-1	80/20	Etanol	67	28357	49890	33023	1.199	83/17
P(PEGMA- <i>r</i> -MAA)-2	80/20	1,4- Dioksan	86	36160	33410	48085	1.159	88/12
P(PEGMA- <i>r</i> -MAA)-3	90/10	1,4- Dioksan	70	32382	36450	50882	1.208	90/10
P(PEGMA- <i>r</i> -MAA)-4	90/10	Etanol	72	33299	40730	47296	1.433	94/6

^a [M]/[RAFTajanı]/ [AIBN]=100/1/0.33, polimerizasyon süresi= 24 saat.

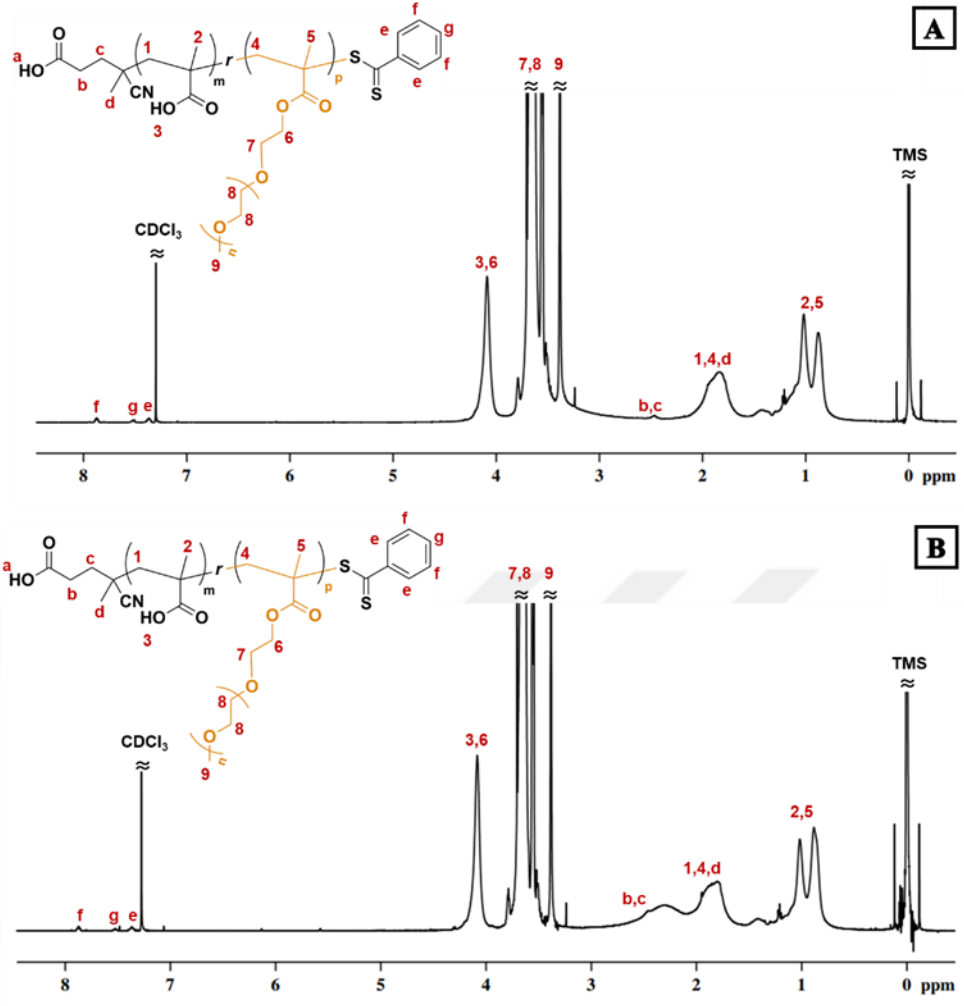
^b Gravimetrik olarak hesaplanmıştır.

^c GPC ile THF içerisinde 35°C'de ölçülmüştür.

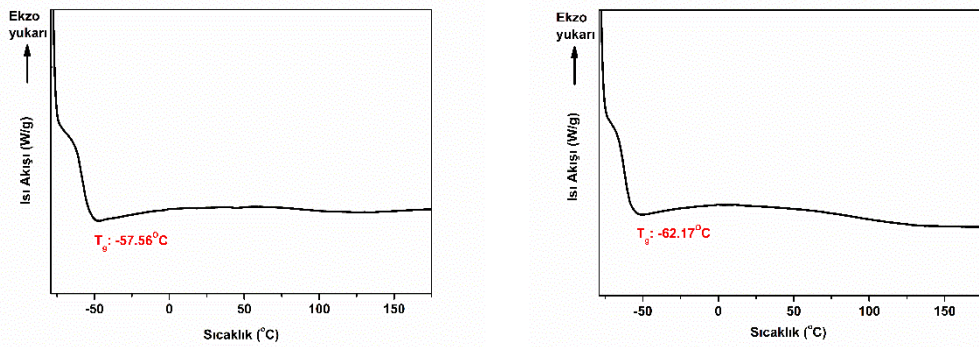
^d ¹H NMR ile belirlenmiştir.

Şekil 4.2’de P(PEGMA-*r*-MAA)-2 ve P(PEGMA-*r*-MAA)-3 kopolimerlerinin ¹H NMR spektrumları verilmiştir. RAFT ajanında bulunan benzen kısmına ait **e**, **f** ve **g** protonları 7.3-8 ppm’de gözlenmiştir. PEGMA ünitesinde bulunan metilden gelen **7** protonları ise 3.4 ppm’de gözlenmiştir. Polimerin ¹H NMR spektrumu incelendiğinde hem PEGMA hem de MAA bloklarının tüm karakteristik protonları açıkça görülmektedir. P(PEGMA-*r*-MAA)-2 ve P(PEGMA-*r*-MAA)-3 kopolimerlerinin [PEGMA]/[MAA] ünite sayıları ¹H NMR spektrumunda RAFT ajanında bulunan benzen halkasından gelen **e**, **f** ve **g** protonları baz alınarak PEGMA’dan gelen **7** protonu ve her iki monomerdeki -CH₃’den gelen **2** ve **5** protonlarının integrallerinin oranlanması ile hesaplanmıştır. Yapılan integral hesabıyla P(PEGMA-*r*-MAA)-2 ve P(PEGMA-*r*-MAA)-3 kopolimerleri için [PEGMA]/[MAA] ünite sayısı sırasıyla 93/13 ve 126/14 olarak bulunmuştur. Ayrıca, ilgili ünite sayıları kullanılarak hesaplanan monomer yüzdesi ve molekül ağırlıkları Tablo 4.1’de verilmiştir.

P(PEGMA-*r*-MAA)-2 ve P(PEGMA-*r*-MAA)-3 kopolimerlerinin ısısal davranışları DSC ile analiz edilmiş, yapılan DSC ölçümü sonucunda ikinci ısıtma basamağında gözlemlenen P(PEGMA-*r*-MAA)-2’nin camsı geçiş sıcaklığı (*T_g*) -57.56°C ve P(PEGMA-*r*-MAA)-3’ün camsı geçiş sıcaklığı (*T_g*) -62.17°C olarak belirlenmiştir.



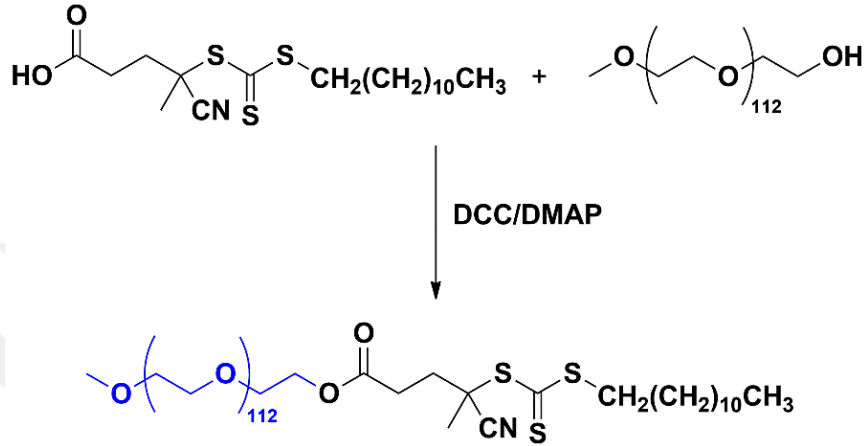
Şekil 4.2 : A) P(PEGMA-*r*-MAA)-2 ve B) P(PEGMA-*r*-MAA)-3'ün CDCl_3 içerisinde çekilmiş ^1H NMR spektrumları.



Şekil 4.3 : P(PEGMA-*r*-MAA)-2 (sol) ve P(PEGMA-*r*-MAA)-3 (sağ) kopolimerlerinin DSC grafikleri.

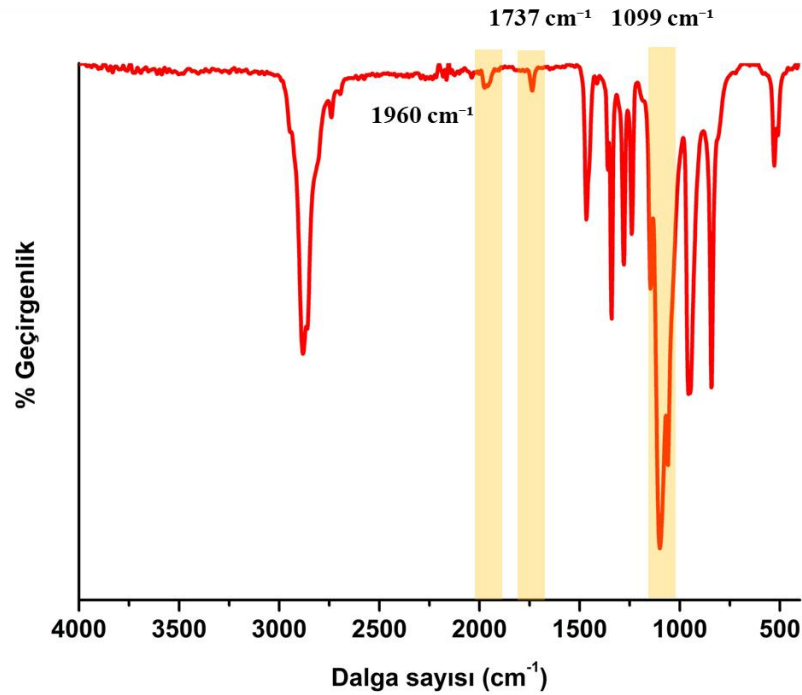
4.1.2 PEG-CTPA'nın sentezi ve karakterizasyonu

Amfifilik kopolimerlerin hidrofilik bloğunu oluşturmak için CTPA RAFT ajanı, poli(etilen glikol) metil eter ($M_n = 5000$ g/mol) ile DCC/DMAP varlığında esterifikasyon reaksiyonuna sokulmuştur (Şekil 4.4). Elde edilen makroRAFT ajanının (PEG-CTPA) sentezinin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği FT-IR, ^1H NMR ve DSC ile gösterilmiştir.



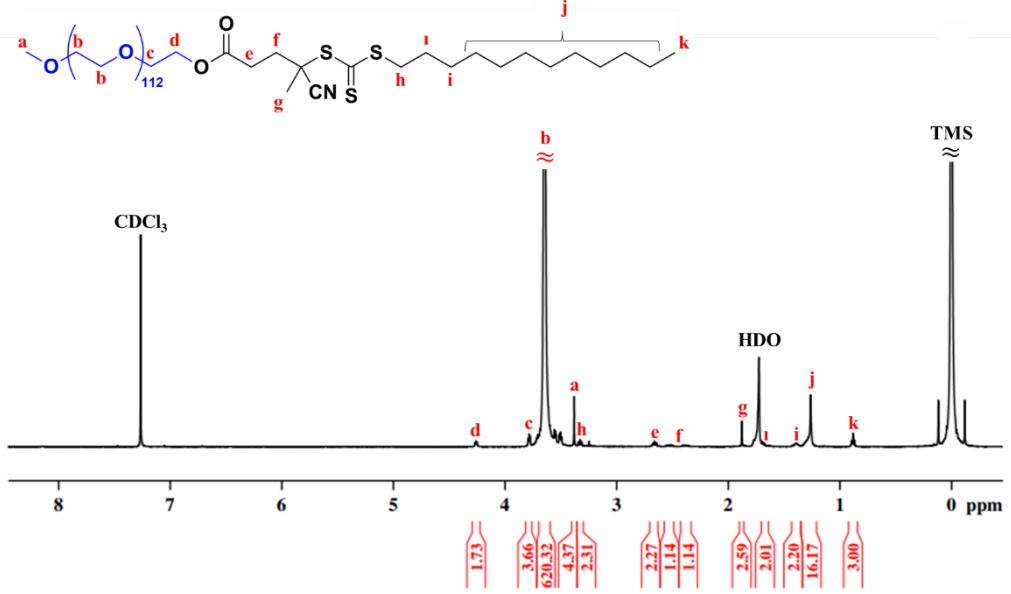
Şekil 4.4 : PEG-CTPA'nın sentezi

Şekil 4.5'te verilen FT-IR spektrumunda 3000 cm^{-1} 'de herhangi bir -OH bandı gözlenmemiş, 2233 cm^{-1} 'de zayıf nitril ($-\text{C}\equiv\text{N}$) gerilmesi ve 1087 cm^{-1} 'de PEG kısmından gelen kuvvetli eter bandı görülmüştür.



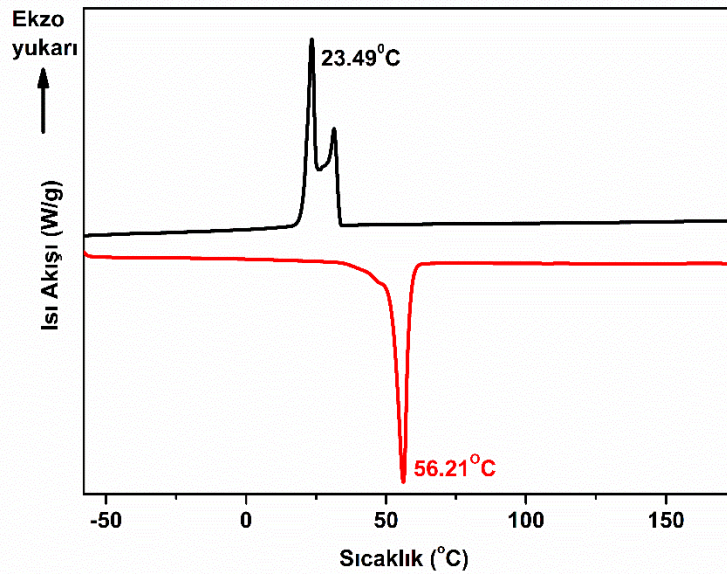
Şekil 4.5 : PEG-CTPA'nın FT-IR spektrumu.

Şekil 4.6, PEG-CTPA'nın ^1H NMR spektrumunu göstermektedir ve hem PEG hem de tritiyokarbonat yapı bloklarının tüm karakteristik proton sinyalleri spektrumda görülmektedir. PEG'den gelen tekrar eden $-\text{CH}_2-$ zincirindeki **b** protonları 3.7 ppm'de, RAFT ajanından gelen **k** protonları 0.86 ppm'de ve PEG ile RAFT ajanı arasındaki **d** protonları 4.24 ppm'de gözlenmiştir.



Şekil 4.6 : PEG-CTPA'nın CDCl_3 içerisinde çekilmiş ^1H NMR spektrumu.

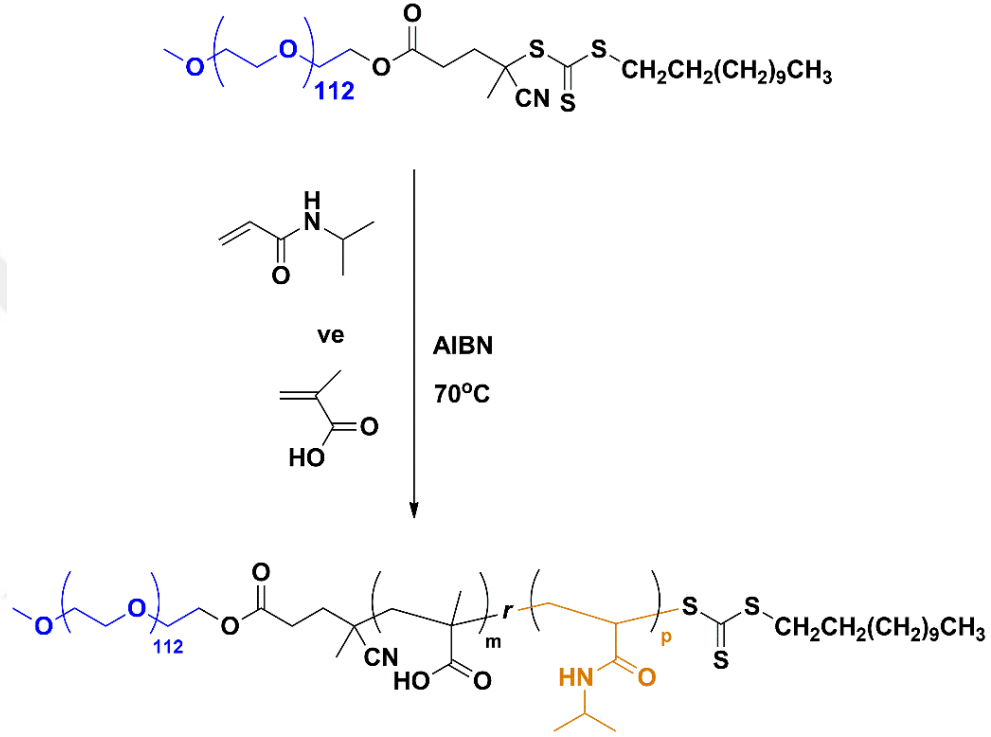
PEG-CTPA için gerçekleştirilen DSC ölçümü sonucunda PEG-CTPA'nın kristallenme sıcaklığı (T_c) 23.49°C olarak ve ikinci ısıtma basamağında gözlenen erime sıcaklığı (T_m) 56.21°C olarak bulunmuştur.



Şekil 4.7 : PEG-CTPA'nın DSC grafiği.

4.1.3 RAFT polimerizasyonu ile PEG-*b*-P(NIPAM-*r*-MAA) sentezi ve karakterizasyonu

Sentezlenen PEG-CTPA kullanılarak RAFT polimerizasyonu ile $[M]/[makroRAFTajani]/[AIBN]$ 200/1/0.33 olacak şekilde NIPAM ve MAA monomerleri AIBN varlığında THF içerisinde polimerleştirildi. Elde edilen kopolimerler GPC, 1H NMR ve DSC ile karakterize edildi.



Şekil 4.8 : RAFT polimerizasyonu ile PEG-*b*-P(NIPAM-*r*-MAA) sentezi.

Gerçekleştirilen polimerizasyonlar sonucunda elde edilen polimerlerin teorik olarak hesaplanan molekül ağırlıkları Tablo 4.2’de karşılaştırılmıştır.

Polimerizasyon sonucunda elde edilen polimerin molekül ağırlıkları DMF GPC ile ölçülmüştür ve sonuçlar Tablo 4.2’de verilmiştir. PEG-*b*-(NIPAM-*r*-MAA) polimerleri için THF çözücüsü içinde farklı saatlerde gerçekleşen polimerizasyonlar sonucunda 2.30-3.30 saatleri arasında polimerizasyon dönüşümünde ani bir artış gözlenmiştir.

Tablo 4.2 : RAFT polimerizasyonu ile elde edilen amfifilik PEG-*b*-P(NIPAM-*r*-MAA) kopolimerlerinin oluşma koşulları ve sonuçları^a.

Kod	Süre (sa)	Dönüşüm ^b (%)	M _{n,th} ^b (g/mol)	M _{n,GPC} ^c (g/mol)	Đ ^c	Ünite oranı [NIPAM]/[MAA] ^d
PEG- <i>b</i> -P(NIPAM- <i>r</i> -MAA)-1	24	98	15933	6959	1.018	81/19
PEG- <i>b</i> -P(NIPAM- <i>r</i> -MAA)-2	17	98	15933	6698	1.034	82/18
PEG- <i>b</i> -P(NIPAM- <i>r</i> -MAA)-3	3.30	96	15717	6660	1.021	77/23
PEG- <i>b</i> -P(NIPAM- <i>r</i> -MAA)-4	2.30	37	9360	4020	1.035	62/38
PEG- <i>b</i> -P(NIPAM- <i>r</i> -MAA)-5	1.30	30	8606	6674	1.029	60/40
PEG- <i>b</i> -P(NIPAM- <i>r</i> -MAA)-6	3	40	9685	6563	1.029	63/37

^a [M]/[makroRAFTajanı]/ [AIBN]=200/1/0.33, Besleme oranı [NIPAM]/[MAA] (%mol)= 80/20, çözücü= THF.

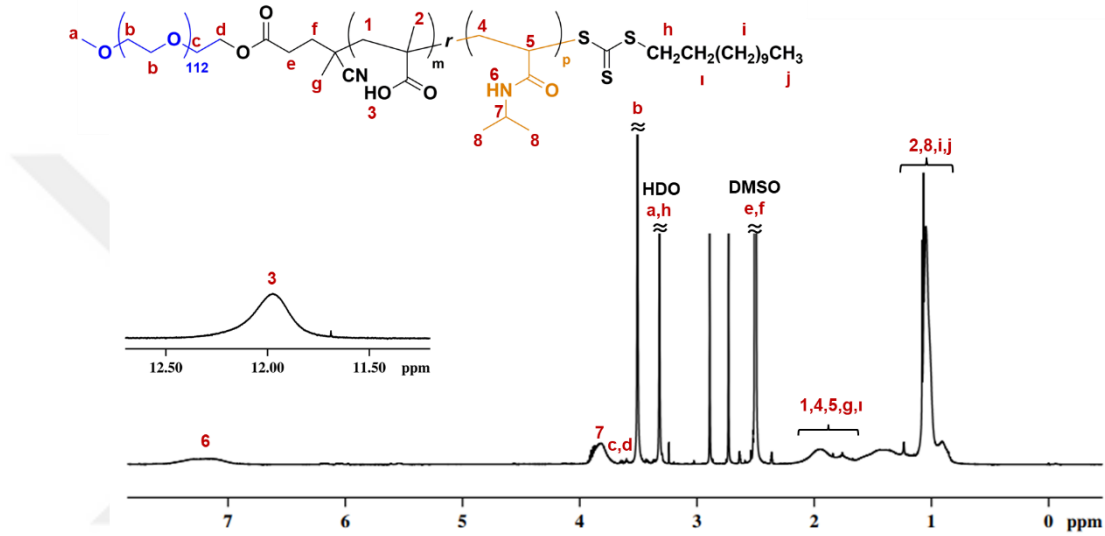
^b Gravimetrik olarak hesaplanmıştır.

^c GPC ile DMF içerisinde 40°C'de ölçülmüştür.

^d ¹H NMR ile belirlenmiştir.

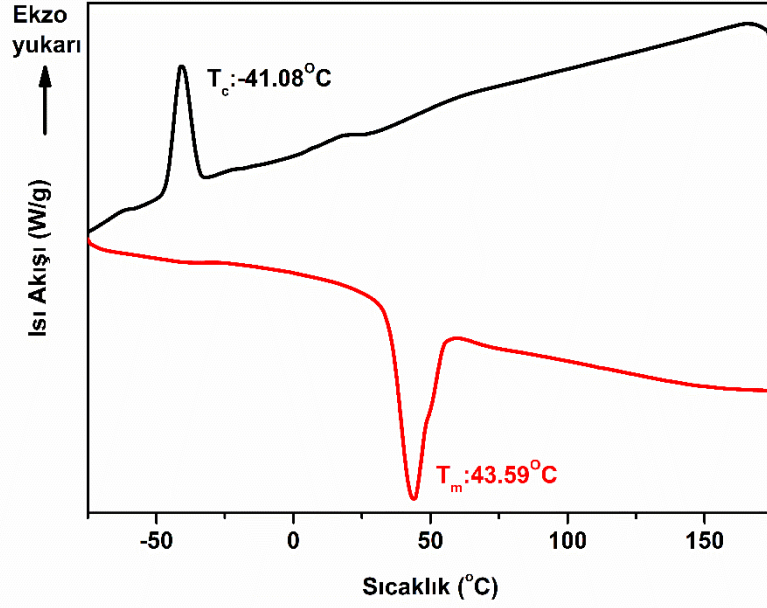
Bu sonuçlar sonrasında molekül ağırlığı ve PDI'na bakılarak PEG-*b*-(NIPAM-*r*-MAA)-3 polimerlerinin DSC ile karakterizasyonu yapılmış ve sispatin ile SCNP oluşturulmasında bu polimerin kullanımına karar verilmiştir.

Polimerin ¹H NMR spektrumu incelendiğinde hem MAA hem de NIPAM yapı bloklarının tüm karakteristik protonları açıkça görülmektedir. PEG-*b*-(NIPAM-*r*-MAA)-3 kopolimerlerinin ünite oranları ¹H NMR spektrumunda 6.8-7.66 ppm arasında gözlenen 6 protonlarının integrallerinin 11.72-12.23 ppm arasında gözlenen 3 protonlarının integrallerine oranlanması ile 77/23 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.9 : PEG-*b*-(NIPAM-*r*-MAA)-3'ün DMSO içerisinde çekilmiş ¹H NMR spektrumu.

PEG-*b*-(NIPAM-*r*-MAA)-3 polimerinin termal özelliğini incelemek amacıyla çekilen DSC grafiği Şekil 4.10'da verilmiş olup şekilde görüldüğü gibi -41.08°C'de bir T_c ve 43.59°C'de bir T_m gözlenmiştir.

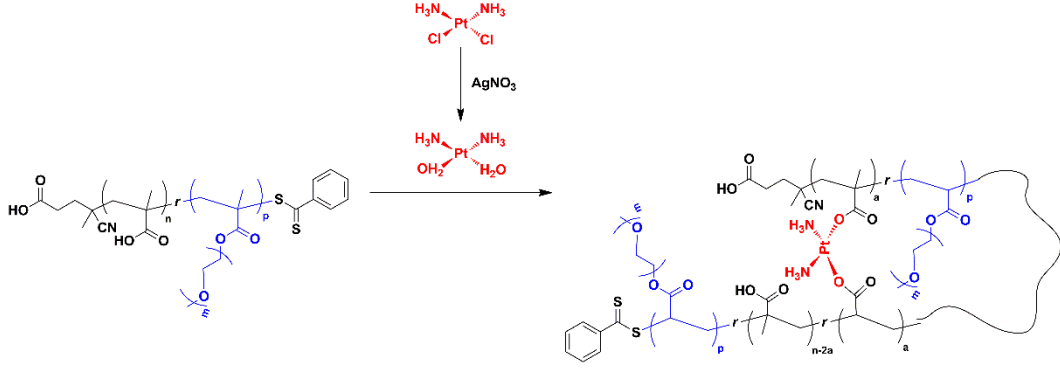


Şekil 4.10 : PEG-*b*-(NIPAM-*r*-MAA)-3'ün DSC grafiği.

4.1.4 Sisplatin ile P(PEGMA-*r*-MAA)-2 kopolimerinden SCNP'lerin oluşturulması ve karakterizasyonu

P(PEGMA-*r*-MAA)-2 kopolimeri AgNO₃ kullanılarak aktive edilen sisplatin ile su içerisinde seyreltik koşullarda reaksiyona sokularak SCNP oluşturulmaya çalışıldı (Şekil 4.11). Bunun için öncelikle P(PEGMA-*r*-MAA)-2 distile su içinde 1 gece oda sıcaklığında karışıma bırakıldı. Başka bir şişede distile su içinde sisplatin ve AgNO₃ karanlıkta karıştırılarak sulu kompleks oluşturuldu. Kompleks oluşumu sırasında beyaz AgCl çökeltisi gözlemlendi ve 20 dk santrifüj yapılarak AgCl'ün tamamen çökmesi sağlandı. Süpernatant 0.22 mL'lik filtreden geçirildikten sonra 37°C'de yarım saat karıştırıldı ve ardından 1M NaOH çözeltisi eklenen polimer çözeltisine 5 mL/saat enjeksiyon hızında bir şırınga pompası kullanılarak damlatıldı. Damlatma işlemi bittikten sonra çözelti 37°C'de karanlıkta 2 gün karışıma bırakılıp SCNP'lerin oluşması beklendi ve süre sonunda DLS ile karakterize edildi.

Farklı konsantrasyon ve koşullar denenerek en iyi sonucu veren SCNP elde edilmeye çalışıldı ve bu süreçte SCNP prosesi sonrasında DLS ile ilk karakterizasyon yapıldı. Bu denemeler sonucu elde edilen veriler Tablo 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.11 : Sisplatin ile P(PEGMA-*r*-MAA) kopolimerinden SCNP oluşturulması.

Tablo 4.3'te bahsedilen kriterlerden biri olan reaksiyon ortamına NaOH eklenmesi ilk denenen SCNP çalışmalarında liyofilizasyon sonrasında elde edilen SCNP boyutunun büyümesine sebep olduğu düşünülerek reaksiyon aşamasından çıkarılmasına karar verilmiştir. Ayrıca, yapılan denemelerde döner buharlaştırıcı kullanılarak suyun uçurulması sağlanmış ancak sonrasında DLS ile ölçülen partikül boyutlarının büyüdüğü belirlenmiştir. Bu durumun suyun uçurulması için yüksek ısılarla çıkılması gerekliliğinden kaynaklı olabileceği değerlendirilmiştir. Yapılan bu çalışmalar sonucunda liyofilizasyon yapılarak devam edilmesine karar verilmiştir. Elde edilen SCNP'ler içinde 0.25 mg/mL konsantrasyonda NaOH kullanılmadan yapılan SCNP-7'nin sonuçlarının daha iyi olduğu gözlenmiş ve SCNP-7 DLS, DSC, ve TEM ile karakterize edilmiştir.

Tablo 4.3 : Sisplatin ile P(PEGMA-*r*-MAA)-2 kopolimerinden SCNP'lerin oluşturulma koşulları ve DLS sonuçları.

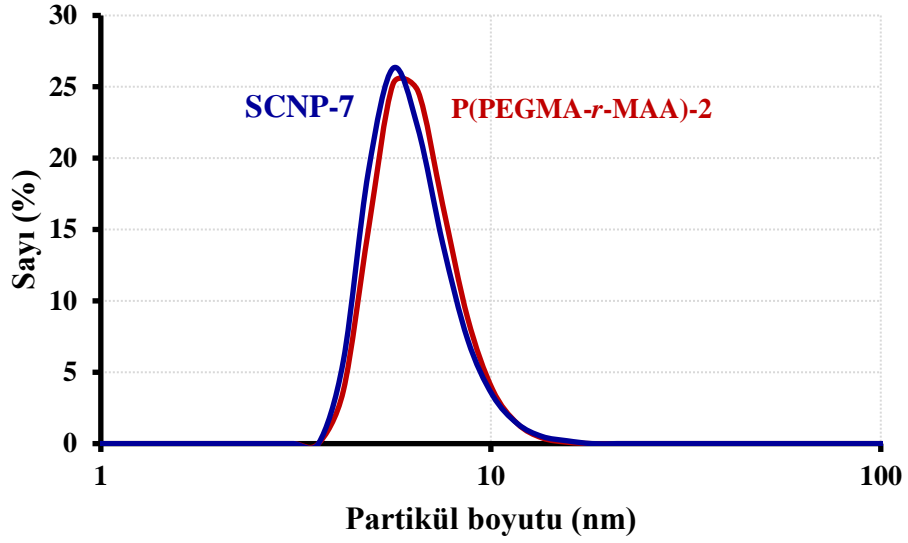
Numune Adı	Konsantrasyon ^a (mg/mL)	NaOH	[Sisplatin]/ [P(PEGMA- <i>r</i> - MAA)-2]	Partikül Boyutu ^b (nm)
P(PEGMA- <i>r</i> -MAA)-2	1	-	-	7.9 ± 0.37
SCNP-1	1	+	9.1	175.3 ± 25.46 ^c
SCNP-2	0.25	+	9.1	85.6 ± 15.3 ^c
SCNP-3	0.01	+	9.1	7.3 ± 0.89
SCNP-4	0.01	+	5	7.1 ± 0.3
SCNP-5	0.01	-	5	5.9 ± 0.9
SCNP-6	0.25	-	9.1	8.2 ± 0.33
SCNP-7	0.25	-	5	6.7 ± 1.84
SCNP-8	0.5	-	5	9.4 ± 0.99

^a Distile su içerisinde hazırlanmıştır.

^b DLS ölçümü sonucunda elde edilmiştir.

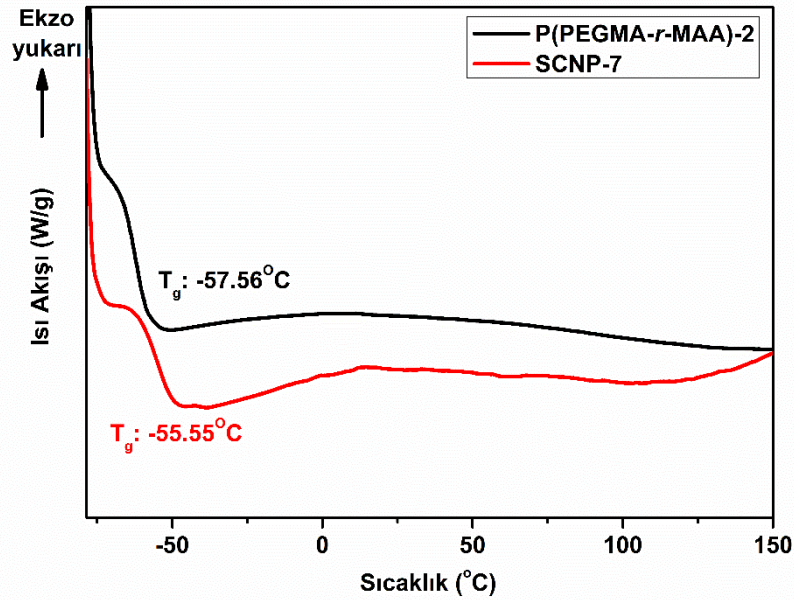
^c Liyofilizasyon sonrası alınan ölçüm.

P(PEGMA-*r*-MAA)-2 kopolimerinin distile su ile hazırlanan sulu kompleksinin DLS sonucu partikül boyutu 7.9 nm olarak ölçülmüştür. SCNP-7'nin oluşumu sonucunda bu boyutun küçülmesi beklenmektedir ve SCNP'in 0.25 mg/mL konsantrasyondaki sulu kompleksinin DLS ile elde edilen partikül boyutu 6.7 nm olarak ölçülmüştür. P(PEGMA-*r*-MAA)-2 ve SCNP-7'nin DLS ile elde edilen partikül boyutu dağılım eğrileri çizilerek Şekil 4.12'de verilmiştir. Gözlenen bu küçülme sonucunda SCNP-7 oluşumunun gerçekleştiği değerlendirilmiştir. Ayrıca, partiküllerin zeta potansiyeli ölçümünde Pt(II) iyonu ile SCNP oluşumu sonucu polimerin negatif yükünün azalması beklenmektedir. Zeta potansiyeli ölçümünde P(PEGMA-*r*-MAA)-2'nin zeta potansiyeli -2.84 mV iken SCNP'nin zeta potansiyeti -1.16 mV ölçülmüştür buda negatif yükte azalma olduğunu doğrulamıştır.



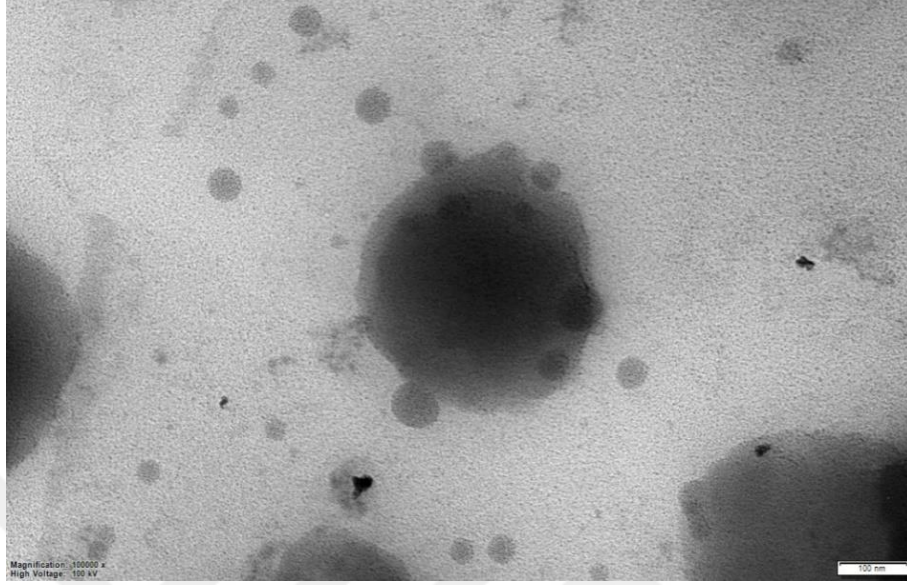
Şekil 4.12 : P(PEGMA-*r*-MAA)-2 ve SCNP-7'nin DLS ölçümü sonucunda elde edilen partikül boyutu dağılım eğrileri.

SCNP oluşumunda meydana gelen çapraz bağlanmalar sonucu polimerde gözlenen T_g değerinin artması beklenmektedir. DSC ile karakterize edilen kopolimerin T_g 'si -57.56 iken SCNP'nin T_g 'si -55.55 olarak ölçülmüştür (Şekil 4.13).



Şekil 4.13 : P(PEGMA-*r*-MAA)-2'nin ve SCNP-7'nin DSC grafikleri.

SCNP oluşumunu kanıtlamak için son olarak SCNP-7'nin TEM görüntülemesi alınmış ancak Şekil 4.14'de görüldüğü gibi küresel küçük partiküller olduğu gibi büyük agregat olmuş yapıların da olduğu gözlenmiştir.



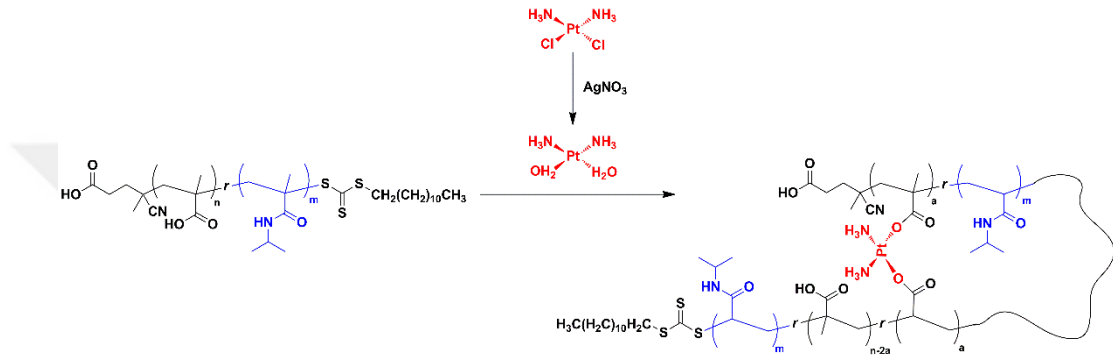
Şekil 4.14 : SCNP'in TEM görüntüsü.

Literatürde PEGMA ve MAA grupları arasında güçlü hidrojen bağlarının oluşabileceği [193, 194] bildirilmektedir. Dolayısıyla hidrofilik polimerde bulunan PEGMA ve MAA üniteleri arasında meydana gelen bu güçlü H bağları nedeniyle polimer zincirlerinin birbirinden yeteri kadar uzaklaşmadığı ve SCNP sentezinin beklenildiği şekilde sadece zincir içinde gerçekleşmediği zincirler arasında da meydana geldiği değerlendirilmiştir. Ayrıca, liyofilizasyon sonucu hidroksi gruplarının kendi arasında güçlü H-bağı oluşturduğunu gösteren makaleler de bulunmaktadır [195]. Liyofilizasyon sonrasında gözlenen partikül boyutu artışının da bu sebeple olabileceği değerlendirilmiştir. TEM görüntüsünde gözlemlenen büyüklü küçüklü agregatların bir sebebinin de suyun uzaklaştırılması sonrasında partiküller arasında meydana gelen güçlü H-bağları olabileceği düşünülmektedir.

4.1.5 Sisplatin ile PEG-*b*-P(NIPAM-*r*-MAA)-3 kopolimerinden TSCNP'lerin oluşturulması ve karakterizasyonu

PEG-*b*-(NIPAM-*r*-MAA)-3 kopolimer AgNO₃ kullanılarak aktive edilen sisplatin ile su içerisinde seyreltik koşullarda reaksiyona sokularak TSCNP oluşturulmaya çalışıldı (Şekil 4.15). Bunun için öncelikle sisplatin stok çözeltisi hazırlamak için distile su içine sisplatin konulup 50°C'de çözünmesi sağlandı ve oda sıcaklığında AgNO₃ ilave

edilerek karanlıkta 72 saat boyunca karıştırıldı. Kompleks oluşumu sırasında beyaz AgCl çökeltisi gözlemlendi ve 20 dk santrifüj yapılarak AgCl'nın tamamen çökmesi sağlandı. Ardından PEG-*b*-(NIPAM-*r*-MAA)-3 distile su içinde 1 gece oda sıcaklığında karışıma bırakıldı. Bir gece sonrasında hazırlanan stok çözeltiden belirlenen miktarda alınarak süpernatant 0.22 mL'lik filtreden geçirildi ve 37°C'de yarım saat karışan kopolimer çözeltisine 5 mL/saat enjeksiyon hızında bir şırınga pompası kullanılarak damlatıldı. Damlatma işlemi bittikten sonra çözelti 37°C'de karanlıkta 2 gün karışıma bırakıldı ve bu süre sonunda DLS ile karakterize edildi.



Şekil 4.15 : Sisplatin ile PEG-*b*-P(NIPAM-*r*-MAA) kopolimerinden iribaş yapılı TSCNP oluşturulması.

Farklı seyreltme koşulları ve farklı [CDDP]/[PEG-*b*-(NIPAM-*r*-MAA)-3] oranları kullanılarak oluşturulan TSCNP'lerin oluşturulma koşulları ve DLS ölçümleri sonucunda elde edilen partikül boyutları Tablo 4.4'te verilmiştir. Tablo 4.4'te görüldüğü gibi elde edilen TSCNP'lerin partikül boyutları beklenildiği şekilde başlangıç polimerinden daha düşük değerler sergilememiş tam tersine oldukça yüksek değerler ölçülmüştür. Partikül boyutlarındaki aşırı artışın sebebinin NIPAM'ın sıcaklığa verdiği bir tepki olabileceği düşünülerek ısı uygulaması olmadan da deneme yapılmıştır. Bu sebeple TSCNP-15 sentezlenirken ısı uygulanmamış oda sıcaklığında 48 saat karışıma bırakılmıştır. SCNP denemelerinde NaOH'nın çökmeye sebep olabileceği düşünüldüğü için TSCNP oluşturulmasında kullanılmamıştır.

Tablo 4.4 : Sisplatin ile PEG-*b*-(NIPAM-*r*-MAA)-3 kopolimerinden TSCNP'lerin oluşturulma koşulları ve DLS sonuçları.

Numune Adı	Konsantrasyon ^a (mg/mL)	[Sisplatin]/[PEG- <i>b</i> - (NIPAM- <i>r</i> -MAA)-3]	Partikül Boyutu ^b (nm)
PEG- <i>b</i> -(NIPAM- <i>r</i> -MAA)-3	1	-	5.4 ± 0.25
TSCNP-1	0.01	7	20.5 ± 11.04
TSCNP-2	0.01	5	8.6 ± 0.63
TSCNP-3	0.25	7	12.6 ± 5.62
TSCNP-4	0.01	3	110.7 ± 15.84
TSCNP-5	0.01	10	53.5 ± 8.58
TSCNP-6	0.01	5	33.5 ± 17.73 ^c

^aDistile su içerisinde hazırlanmıştır.

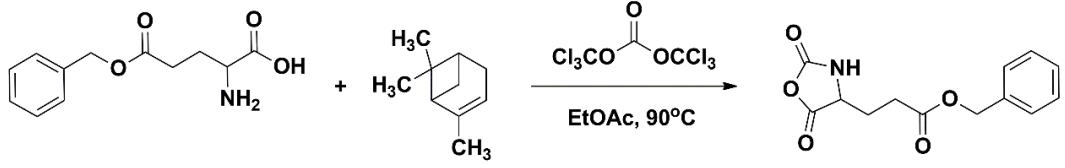
^bDLS ölçümü sonucunda elde edilmiştir.

^cOda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

Başarılı bir TSCNP oluşturulamamasının sebebinin sisplatinin çapraz bağlanma gerçekleşecek gruplarının birbirine yakın olması sebebiyle karboksil gruplarının yakınlaşmasında sterik engel olabileceği düşünülmüştür. Karboksil grupları zincirin içinde yeterince yakın değilse sisplatin zincir içi çapraz bağlanma yapmak yerine zincirler arası çapraz bağlanmayı tercih etmiş olabilir. Ayrıca, elde edilen amfifilik PEG-*b*-(NIPAM-*r*-MAA) kopolimerleri su içerisinde bir araya gelme eğilimi göstererek aggregasyona gitmeyi tercih etmiş olabilir. TSCNP oluşumunda çözücü olarak kullanılan suyun döner buharlaştırıcıda uçurulurken ısı uygulanması gerektiği için polimer zincirleri arasında kuvvetli H-bağı etkileşimlerinin gerçekleşmesi nedeniyle de aggregasyon görülmüş olabileceği değerlendirilmiştir.

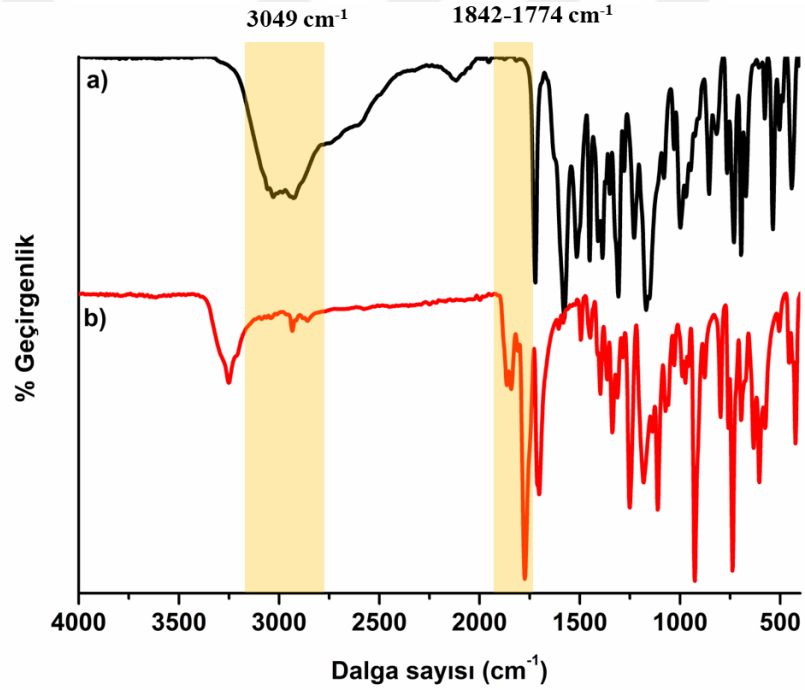
4.1.6 γ -Benzil-L-glutamat N-karboksianhidrit (Glu-NCA) sentezi ve karakterizasyonu

Glu-NCA monomerinin sentezi daha önce literatürde belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir [196]. Bunun için, L-Glutamik asit γ -benzil ester ve α -pinen etil asetat içerisinde reflüks altında 90°C'de karıştırılırken etil asetat içinde çözüldürülmüş trifosgen çözeltisi reaksiyon balonunun dibinde katı glutamik asit kalmayana kadar damla damla ilave edilmiştir (Şekil 4.16). Yüksek verimle (%82) elde edilen Glu-NCA bileşiği FT-IR ve ¹H NMR ile karakterize edilerek başarılı bir şekilde sentezlendiği kanıtlanmıştır.



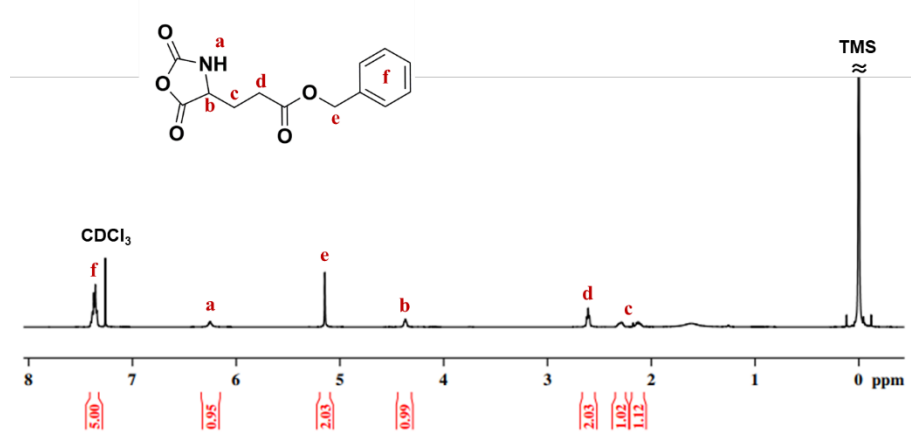
Şekil 4.16 : γ -Benzil-L-glutamat *N*-karboksianhidrit (Glu-NCA) sentezi.

Şekil 4.17’de γ -Benzil-L-glutamat *N*-karboksianhidrit ve başlangıç bileşiği L-glutamik asit γ -benzil esterin FT-IR spektrumları verilmiştir. L-Glutamik asit γ -benzil ester bileşiğinin 3049 cm^{-1} ’de gözlenen geniş fenolik $-\text{OH}$ bandı γ -benzil-L-glutamat *N*-karboksianhidritin FT-IR spektrumunda gözlemlenmemiştir. Ayrıca, 1842 cm^{-1} ve 1774 cm^{-1} ’de gözlenen $\text{C}=\text{O}$ gerilme titreşim piki Glu-NCA sentezini kanıtlar niteliktedir.



Şekil 4.17 : a) L-Glutamik asit γ -benzil ester ve b) Glu-NCA’nın FT-IR spektrumları.

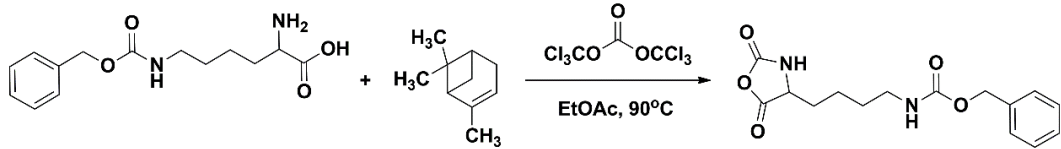
Şekil 4.18’de verilen ^1H NMR spektrumunda *N*-karboksianhidrit halkasında bulunan **a** ve **b** protonları sırasıyla 6.2 ve 4.4 ppm’de, benzen halkasındaki aromatik **f** protonları 7.4 ppm’de ve *N*-karboksianhidrit ile benzen arasında **c**, **d** ve **e** ile gösterilen $-\text{CH}_2-$ protonları sırasıyla 2.2, 2.6 ve 5.1 ppm’de gözlenmiştir.



Şekil 4.18 : Glu-NCA'nın CDCl_3 içerisinde çekilen ^1H NMR spektrumu.

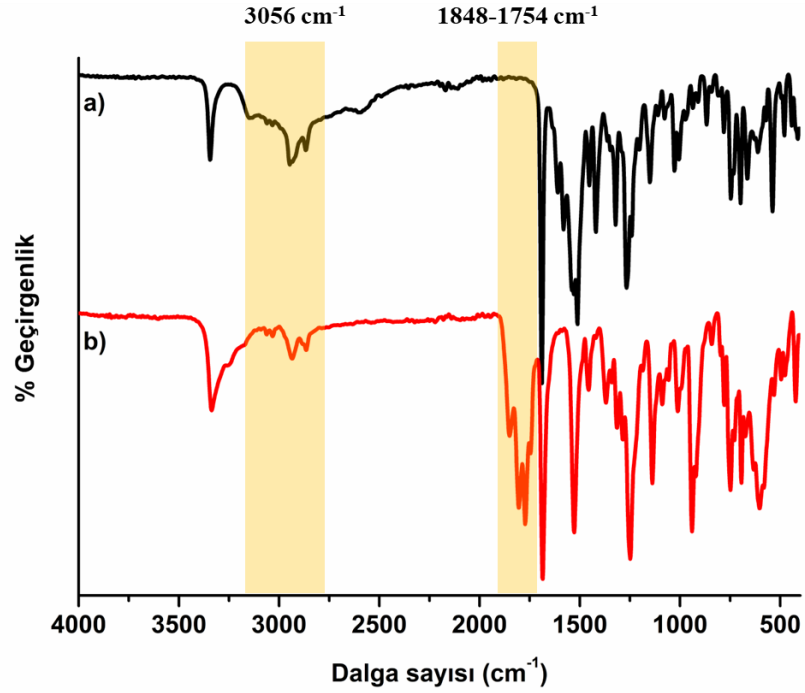
4.1.7 $N\epsilon$ -benzilkarbonil-L-lizin N -karboksianhidrit (Liz-NCA) sentezi ve karakterizasyonu

Liz-NCA monomerinin sentezi literatürde belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir [196]. $N\epsilon$ -Benzilkarbonil-L-lizin ve α -pinen etil asetat içerisinde reflüks altında 90°C 'de karıştırılırken etil asetat içinde çözündürülmüş trifosgen çözeltisi reaksiyon balonunun dibinde katı lizin kalmayana kadar damla damla ilave edilmiştir (Şekil 4.19). Yüksek verimle (%84) elde edilen Liz-NCA bileşiği FT-IR ve ^1H NMR ile karakterize edilerek başarılı bir şekilde sentezlendiği kanıtlanmıştır.

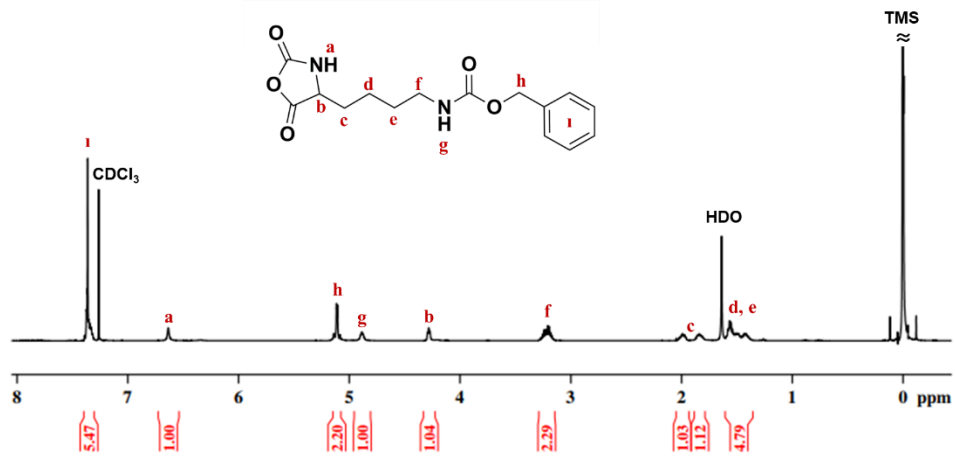


Şekil 4.19 : $N\epsilon$ -Benzilkarbonil-L-lizin N -karboksianhidrit (Liz-NCA) sentezi.

Şekil 4.20'de $N\epsilon$ -Benzilkarbonil-L-lizin N -karboksianhidrit ve başlangıç bileşiği $N\epsilon$ -benzilkarbonil-L-lizin FT-IR spektrumları verilmiştir. $N\epsilon$ -Benzilkarbonil-L-lizin bileşiğinin 3056 cm^{-1} 'de gözlenen geniş fenolik -OH bandı $N\epsilon$ -benzilkarbonil-L-lizin N -karboksianhidritin FT-IR spektrumunda gözlemlenmemiştir. Ayrıca, 1848 cm^{-1} ve 1754 cm^{-1} 'deki -C=O gerilme titreşim bandı Glu-NCA sentezini kanıtlar niteliktedir.



Şekil 4.20 : a) Nε-Benzilkarbonil-L-lizin ve b) Liz-NCA'nın FT-IR spektrumları. Şekil 4.21'de verilen ¹H NMR spektrumunda *N*-karboksianhidrit halkasında bulunan **a** ve **b** protonları sırasıyla 6.7 ve 4.2 ppm'de, benzen halkasındaki aromatik **i** protonları 7.4 ppm'de ve *N*-karboksianhidrit ile benzen arasında **c**, **d-e**, **f** ve **h** ile gösterilen -CH₂-protonları sırasıyla 1.9, 1.4, 3.2 ve 5.1 ppm'de gözlenmiştir. Amit protonu (**g**) ise 4.9 ppm'de görülmektedir.

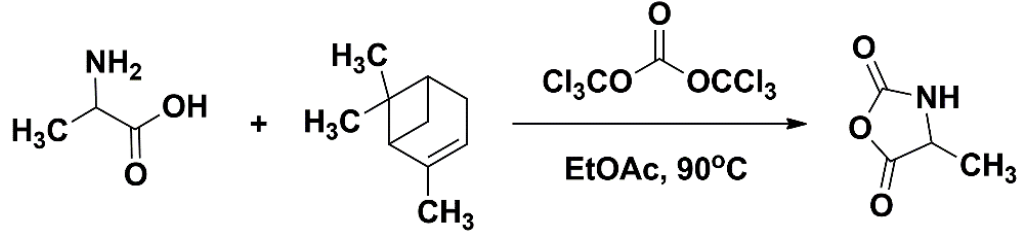


Şekil 4.21 : Liz-NCA'nin CDCl₃ içerisinde çekilen ¹H NMR spektrumu.

4.1.8 L-alanin *N*-karboksianhidrit (Ala-NCA) sentezi ve karakterizasyonu

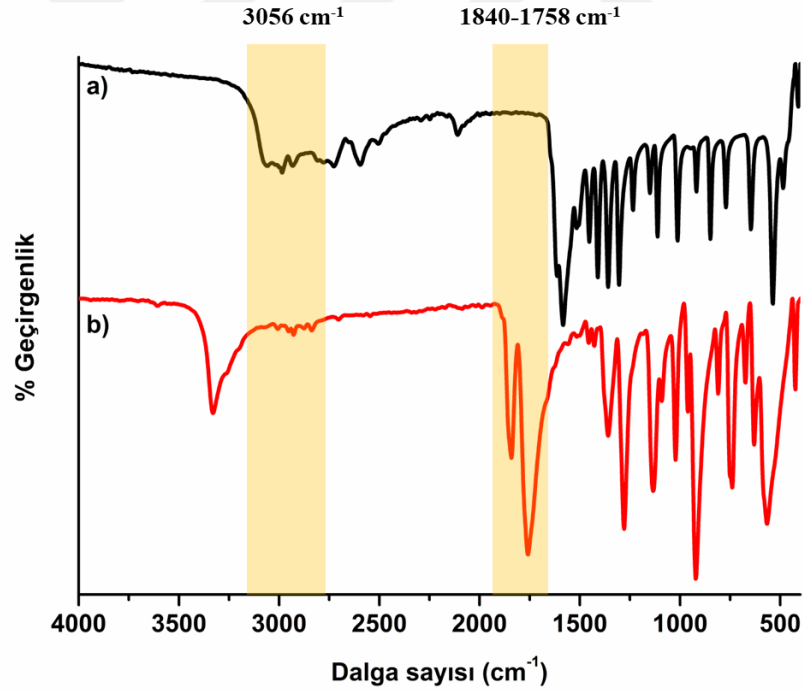
Ala-NCA monomerinin sentezi literatürde belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir [196]. L-alanin ve α-pinen etil asetat içerisinde reflüks altında 90°C'de karıştırılırken

etil asetat içinde çözüldürülmüş trifosgen çözeltisi reaksiyon balonuna damla damla ilave edilmiştir (Şekil 4.22). Elde edilen Ala-NCA bileşiği FT-IR ve ¹H NMR ile karakterize edilerek başarılı bir şekilde sentezlendiği kanıtlanmıştır (Verim= %52).



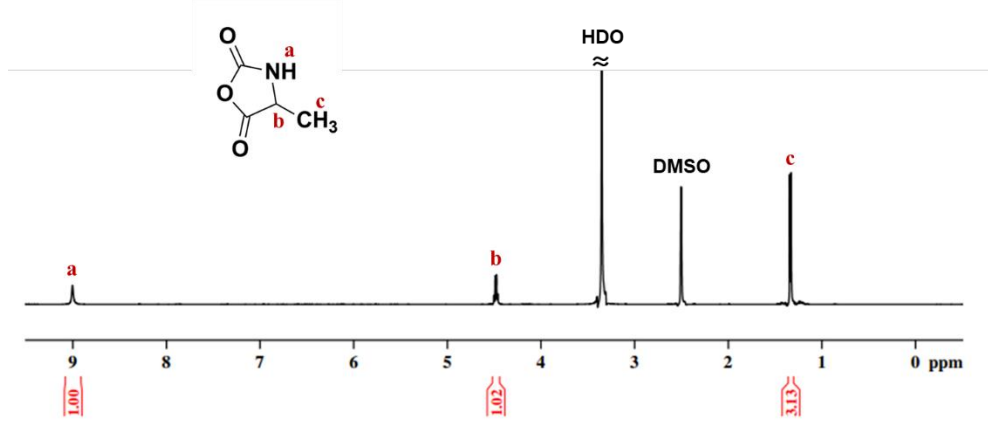
Şekil 4.22 : L-alanin *N*-karboksianhidrit (Ala-NCA) sentezi.

Şekil 4.23'te L-alanin *N*-karboksianhidrit ve başlangıç bileşiği L-alaninin FT-IR spektrumları verilmiştir. L-alanin bileşiğinin 3056 cm⁻¹'de gözlenen geniş fenolik -OH bandı L-alanin *N*-karboksianhidritin FT-IR spektrumunda gözlenmemiştir. Ayrıca, 1840 cm⁻¹ ve 1758 cm⁻¹'deki -C=O gerilme titreşim piki Ala-NCA sentezini kanıtlar niteliktedir.



Şekil 4.23 : a) L-alanin ve b) Ala-NCA'nın FT-IR spektrumları.

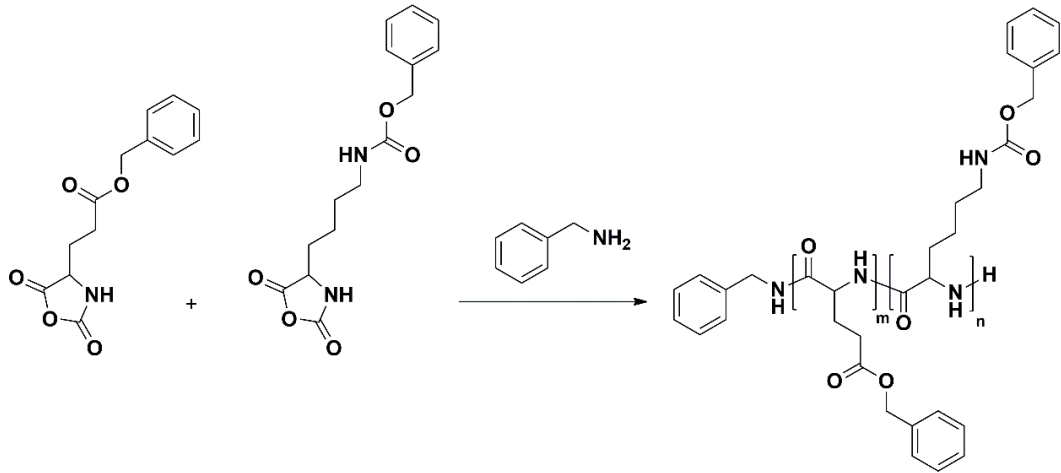
Şekil 4.24'de verilen ¹H NMR spektrumunda *N*-karboksianhidrit halkasında bulunan **a** ve **b** protonları sırasıyla 9 ve 4.5 ppm'de, *N*-karboksianhidrite bağlı **c** ile gösterilen -CH₃ protonları 1.2 ppm'de görülmüştür.



Şekil 4.24 : Ala-NCA'nın DMSO içerisinde çekilmiş olan ^1H NMR spektrumu.

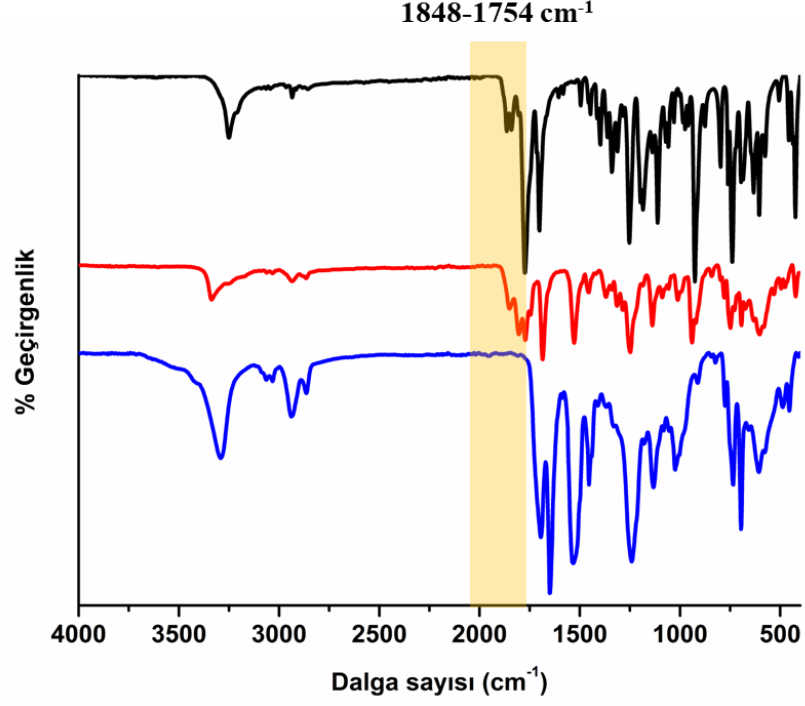
4.1.9 P(Glu-NCA-*r*-Liz-NCA) sentezi ve karakterizasyonu

Benzilamin başlatıcısı kullanılarak Glu-NCA ve Liz-NCA monomerleri halka açılma polimerizasyonu ile polimerleştirildi (Şekil 4.25). $[\text{M}]/[\text{benzilamin}]$ oranı 100/1 ve $[\text{Liz-NCA}]/[\text{Glu-NCA}]$ monomer oranları 90/10 olacak şekilde kuru DMF içerisinde 72 saatte gerçekleştirilen polimerizasyon sonucunda kopolimer dietil eterde çöktürülerek elde edildi. P(Glu-NCA-*r*-Liz-NCA) kopolimeri ^1H NMR ve FT-IR ile karakterize edildi.



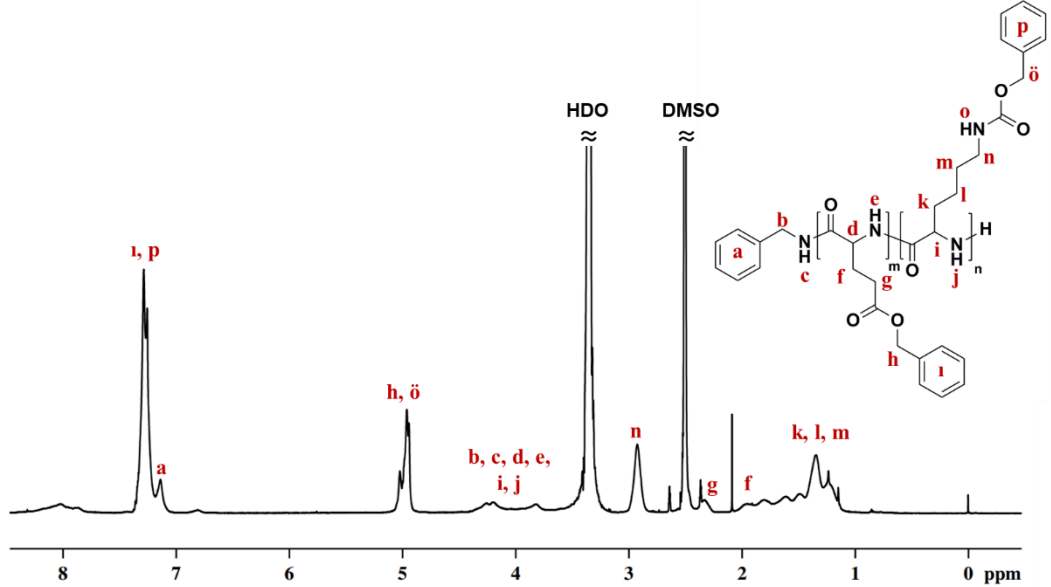
Şekil 4.25 : P(Glu-NCA-*r*-Liz-NCA) sentezi.

Şekil 4.26'da Glu-NCA, Liz-NCA ve P(Glu-NCA-*r*-Liz-NCA)'nın FT-IR spektrumları verilmiştir. Görüldüğü gibi hem Glu-NCA hem de Liz-NCA monomerlerinde bulunan *N*-karboksianhidritin açıldığı $1750\text{-}1850\text{ cm}^{-1}$ 'de bulunan $\text{C}=\text{O}$ gerilme titreşim bandının kaybolması ile kanıtlanmıştır.



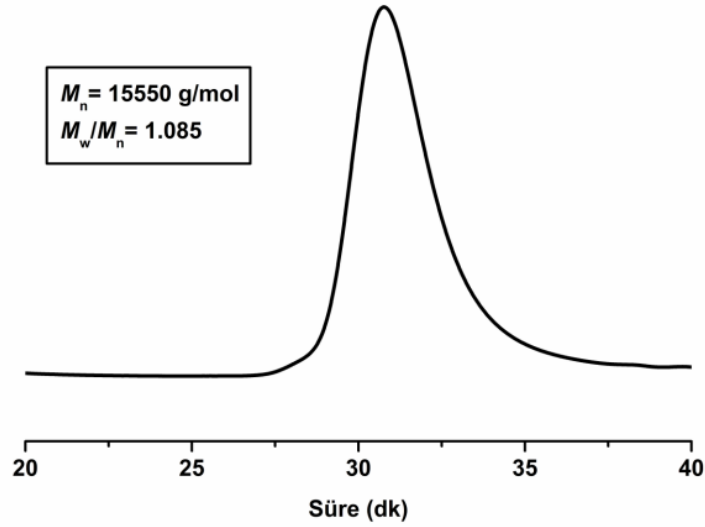
Şekil 4.26 : a) Glu-NCA, b) Liz-NCA ve c) P(Glu-NCA-*r*-Liz-NCA)'nın FT-IR spektrumları.

P(Glu-NCA-*r*-Liz-NCA) polimerinin ¹H NMR spektrumu incelendiğinde hem Glu-NCA hem de Liz-NCA yapı bloklarının tüm karakteristik protonları açıkça görülmektedir (Şekil 4.27).



Şekil 4.27 : P(Glu-NCA-*r*-Liz-NCA)'nin DMSO içerisinde çekilmiş olan ¹H NMR spektrumu.

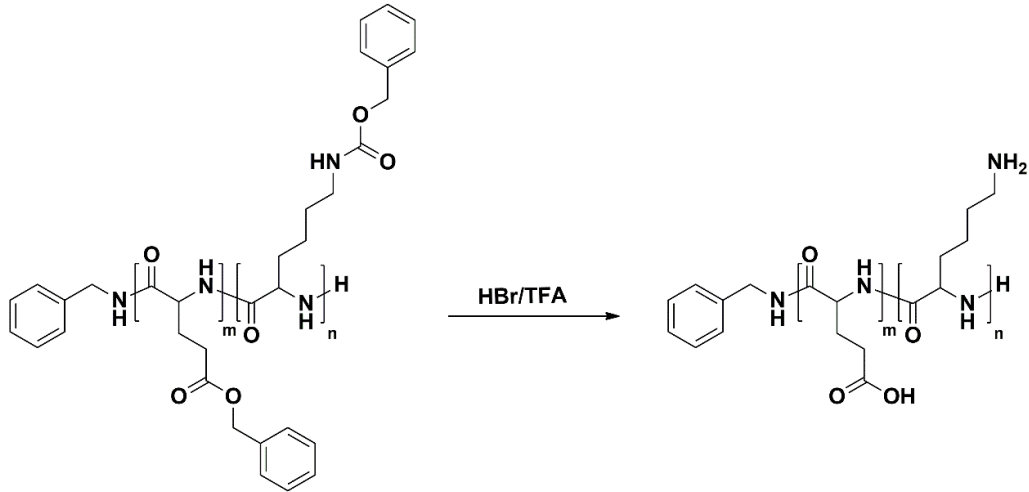
P(Glu-NCA-*r*-Liz-NCA) polimerinin molekül ağırlığı DMF GPC ile ölçüldü ve Şekil 4.28'de verildi. Polimerin molekül ağırlığının 15550 g/mol ve polidispersitesinin 1.085 olduğu belirlenerek kontrollü bir şekilde sentezlendiği değerlendirildi.



Şekil 4.28 : P(Glu-NCA-*r*-Liz-NCA) DMF içerisinde alınan GPC kromatogramı.

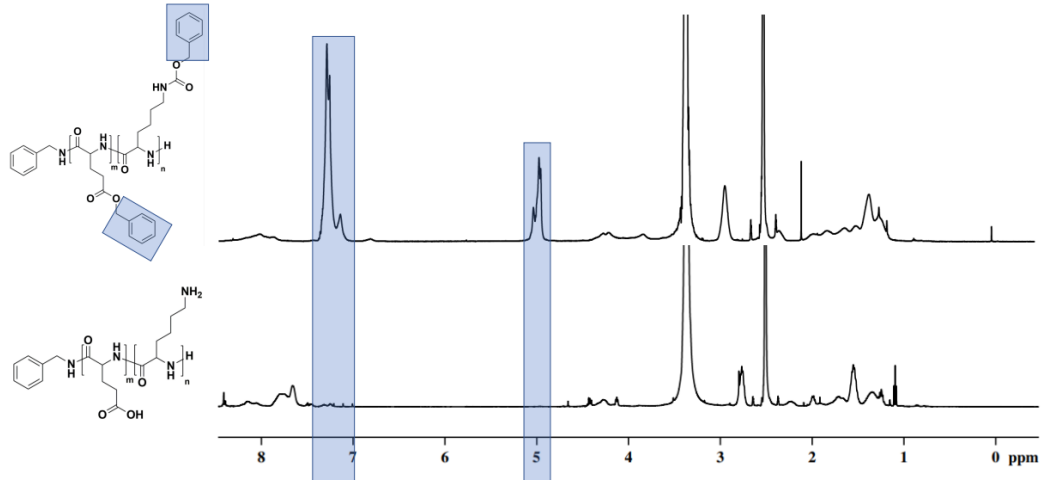
4.1.10 P(Glu-*r*-Liz) sentezi ve karakterizasyonu

P(Glu-NCA-*r*-Liz-NCA)'nın koruma grupları TFA içinde %33 HBr ile reaksiyonu sonucunda uzaklaştırıldı (Şekil 4.29).



Şekil 4.29 : P(Glu-*r*-Liz) sentezi.

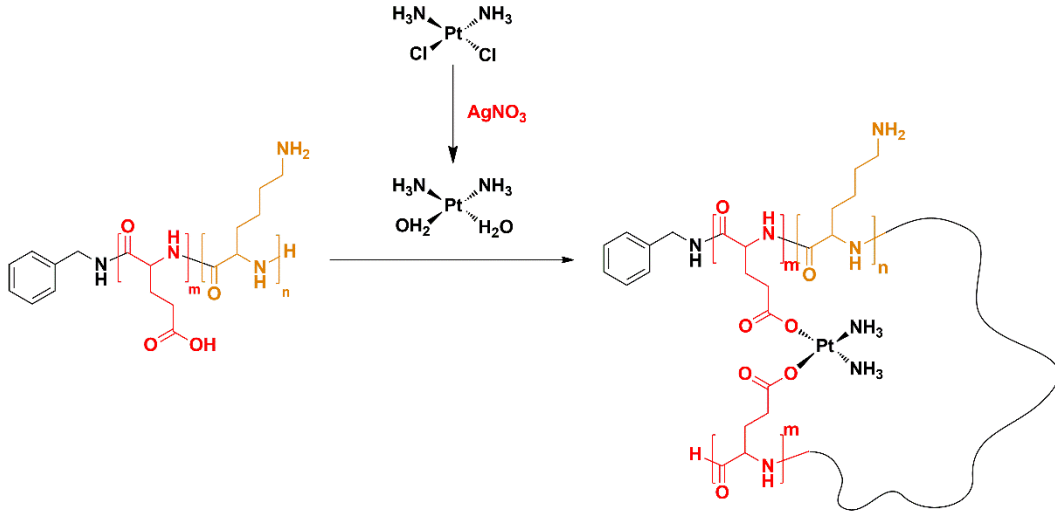
Şekil 4.30'daki karşılaştırılmalı ¹H NMR spektrumu incelendiğinde P(Glu-NCA-*r*-Liz-NCA) polimerinin monomer ucundaki koruyucu benzen halkalarının uzaklaştırıldığı ve P(Glu-*r*-Liz) polimerinin elde edildiği görülmektedir.



Şekil 4.30 : P(Glu-NCA-*r*-Liz-NCA) ve P(Glu-*r*-Liz) polimerlerinin D₂O içinde çekilmiş ¹H NMR spektrumları.

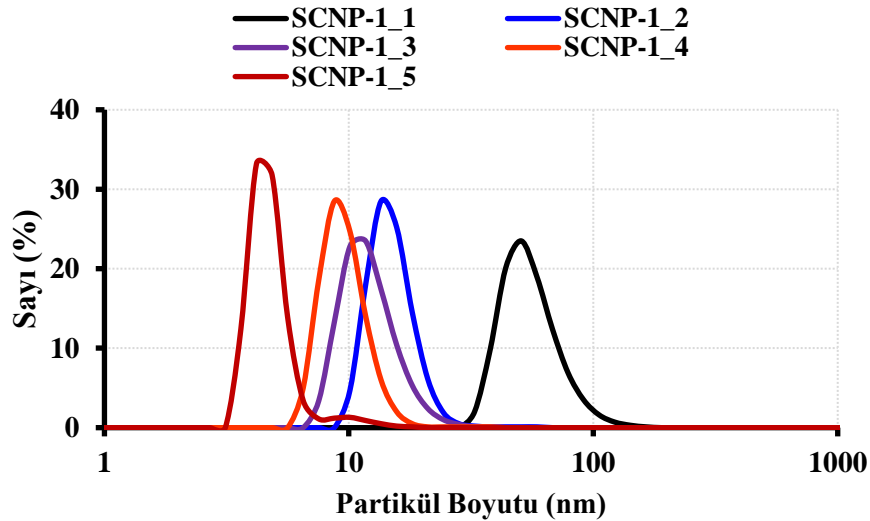
4.1.11 Sisplatin ile P(Glu-*r*-Liz) kopolimerinden SCNP'lerin oluşturulması ve karakterizasyonu

P(Glu-*r*-Liz) kopolimeri AgNO₃ kullanılarak aktive edilen sisplatin ile su içerisinde seyreltik koşullarda reaksiyona sokularak SCNP oluşturulmaya çalışıldı. Bunun için öncelikle sisplatin stok çözeltisi hazırlamak için distile su içine sisplatin konulup 50°C'de çözünmesi sağlandı ve oda sıcaklığında AgNO₃ ilave edilerek karanlıkta 72 saat boyunca karıştırıldı. Kompleks oluşumu sırasında beyaz AgCl çökeltisi gözlemlendi ve 20 dk santrifüj yapılarak AgCl'ün tamamen çökmesi sağlandı. Ardından P(Glu-*r*-Liz) distile su içinde 1 gece oda sıcaklığında karışıma bırakıldı. Bir gece sonrasında hazırlanan stok çözeltiden belirlenen miktarda alınarak süpernatant 0.22 µL'lik filtreden geçirildi ve 37°C'de yarım saat karışan kopolimer çözeltisine 5 mL/saat enjeksiyon hızında bir şırınga pompası kullanılarak damlatıldı. Damlatma işlemi bittikten sonra çözelti 37°C'de karanlıkta 2 gün karışıma bırakıldı ve bu süre sonunda DLS ile karakterize edildi (Şekil 4.32).



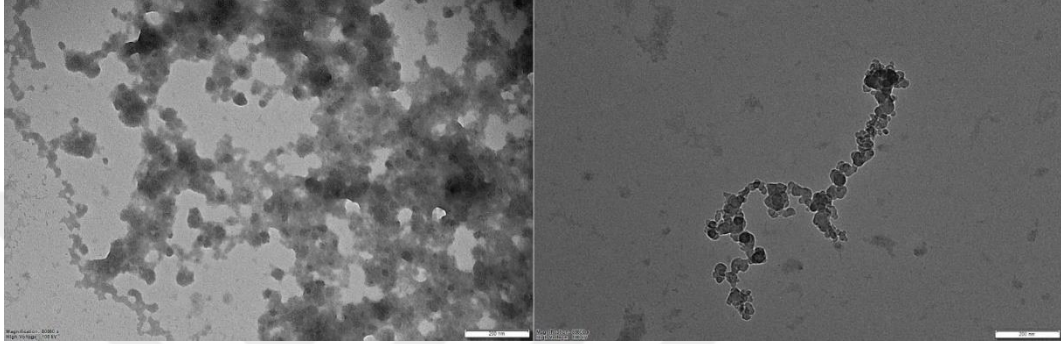
Şekil 4.31 : Sisplatin ile P(Glu-*r*-Liz) kopolimerinden SCNP'lerin oluşturulması

Ancak, SCNP'nin partikül boyutu her ölçümde farklı bir değer olarak elde edildi. Farklı konsantrasyonlarda farklı sisplatin oranlarıyla bir dizi çalışma yapıldı ancak tutarlı DLS sonucu elde edilemedi. Bu polimerde bulunan glutamik asit ve lizin ünitelerinin güçlü H-bağları oluşturduğu, dolayısı ile polimer zincirlerinin kendi içinde H-bağları yaparak bir araya gelme eğilimi gösterdiği ve SCNP oluşumunun gerçekleşmediği değerlendirildi. Elde edilen DLS sonuçlarının tutarsız olması nedeniyle SCNP oluşumunun gerçekleşmediği, bunun yerine zincirler arası reaksiyonların gerçekleşmiş olabileceği sonucuna varıldı. SCNP-1 için beş ölçüm gerçekleştirildi ve elde edilen DLS grafikleri Şekil 4.31'de verildi.



Şekil 4.32 : P(Glu-*r*-Liz) polimeri ile oluşturulan SCNP'nin için DLS grafiği.

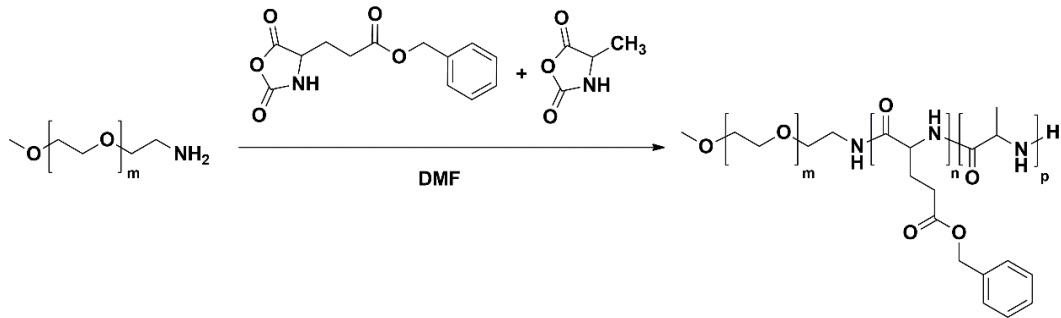
Benzer bir sonuç Şekil 4.33’de verilen SCNP-1’in TEM görüntülerinde de görüldü. Bir araya gelmiş büyüklü küçüklü yapılar P(Glu-*r*-Liz) zincirlerinin moleküller arasında da agrege olduğunu göstermektedir. Literatürde [197, 198] sulu çözeltiler içerisindeki polipeptitlerin kendiliğinden birleşme eğilimi gösterdiği bildirilmektedir. Bu durum, polimer zincirlerinin birbirinden uzaklaşmasını ve dolayısı ile sisplatin ile reaksiyona girmesini engellemektedir. Kopolimer için farklı çözücülerde çözünüp çözünmediği incelendi ancak su haricinde çözündüğü başka bir çözücü bulunamadı.



Şekil 4.33 : SCNP-1’in TEM görüntüleri.

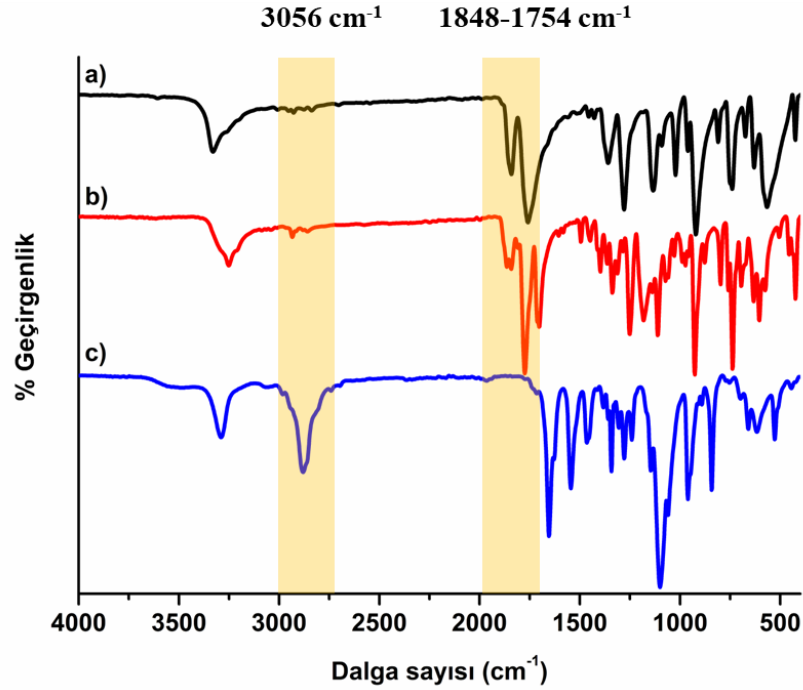
4.1.12 PEG-*b*-P(Glu-NCA-*r*-Ala-NCA) sentezi ve karakterizasyonu

PEG-NH₂ başlatıcısı kullanılarak Glu-NCA ve Ala-NCA monomerleri halka açılma polimerizasyonu ile polimerleştirildi (Şekil 4.34). [M]/[PEG-NH₂] oranı 100/1 ve [Ala-NCA]/[Glu-NCA] monomer oranları 90/10 olacak şekilde kuru DMF ve kloroform içerisinde 72 saatte gerçekleştirilen polimerizasyon sonucunda polimer dietil eterde çöktürülerek elde edildi.



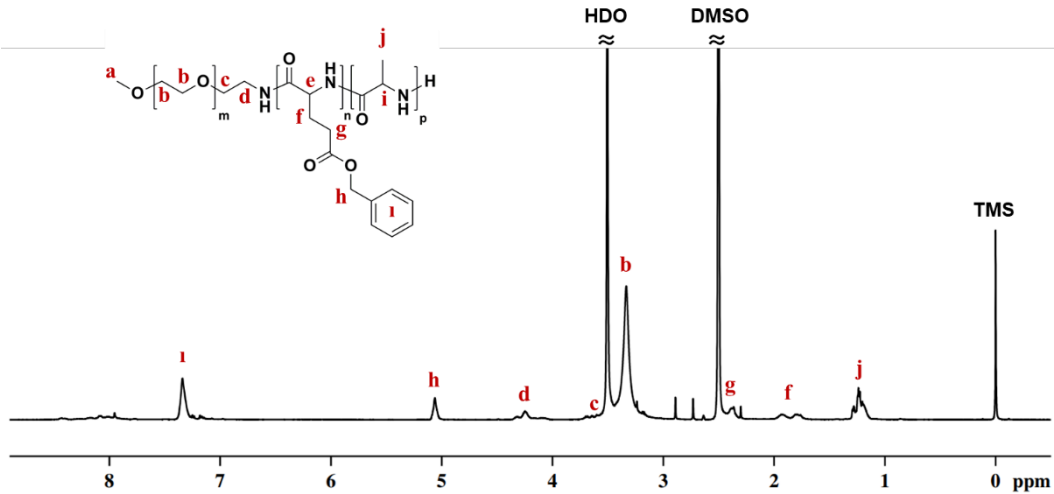
Şekil 4.34 : PEG-*b*-P(Glu-NCA-*r*-Ala-NCA) sentezi.

Şekil 4.35’de Ala-NCA, Glu-NCA ve PEG-*b*-P(Glu-NCA-*r*-Ala-NCA)’nın FT-IR spektrumları verilmiştir. Görüldüğü gibi hem Glu-NCA hem de Ala-NCA monomerlerinde bulunan *N*-karboksianhidritin açıldığı 1750-1850 cm⁻¹’de bulunan C=O gerilme titreşim bandının kaybolması sonucunda kanıtlandı.



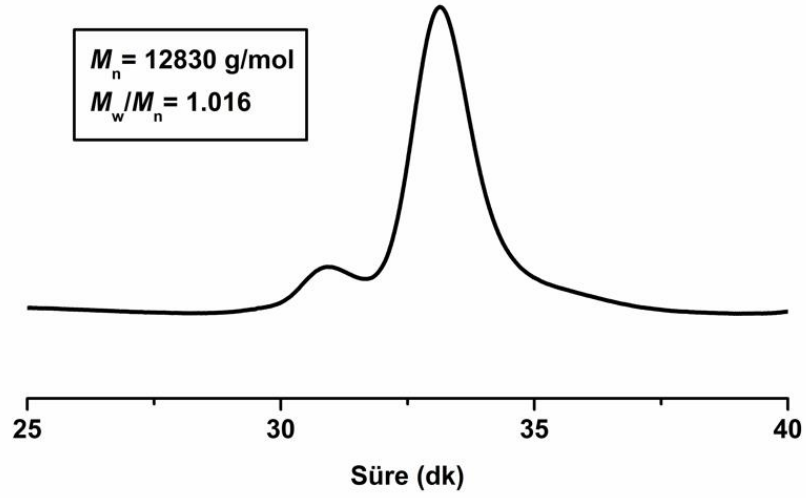
Şekil 4.35 : a) Ala-NCA, b) Glu-NCA ve c) PEG-*b*-P(Glu-NCA-*r*-Ala-NCA)'nın FT-IR spektrumları.

PEG-*b*-P(Glu-NCA-*r*-Ala-NCA) polimerinin ¹H NMR spektrumu incelendiğinde hem Glu-NCA hem de Ala-NCA yapı bloklarının tüm karakteristik protonları açıkça görülmektedir (Şekil 4.36).



Şekil 4.36 : PEG-*b*-P(Glu-NCA-*r*-Ala-NCA) polimerinin DMSO içerisinde çekilmiş ¹H NMR spektrumu.

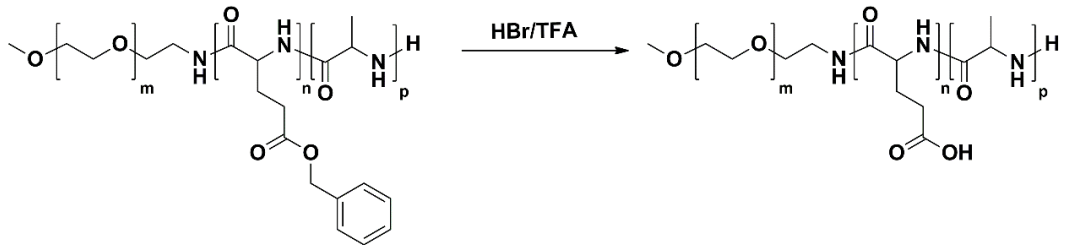
PEG-*b*-P(Glu-NCA-*r*-Ala-NCA) polimerinin molekül ağırlığı DMF GPC ile ölçüldü (Şekil 4.37). GPC sonucunda molekül ağırlığı 12830 g/mol ve PDI değeri 1.016 olarak belirlenerek kontrollü bir şekilde sentezlendiği değerlendirildi.



Şekil 4.37 : PEG-*b*-P(Glu-NCA-*r*-Ala-NCA) polimerinin DMF içerisinde alınmış GPC kromatogramı.

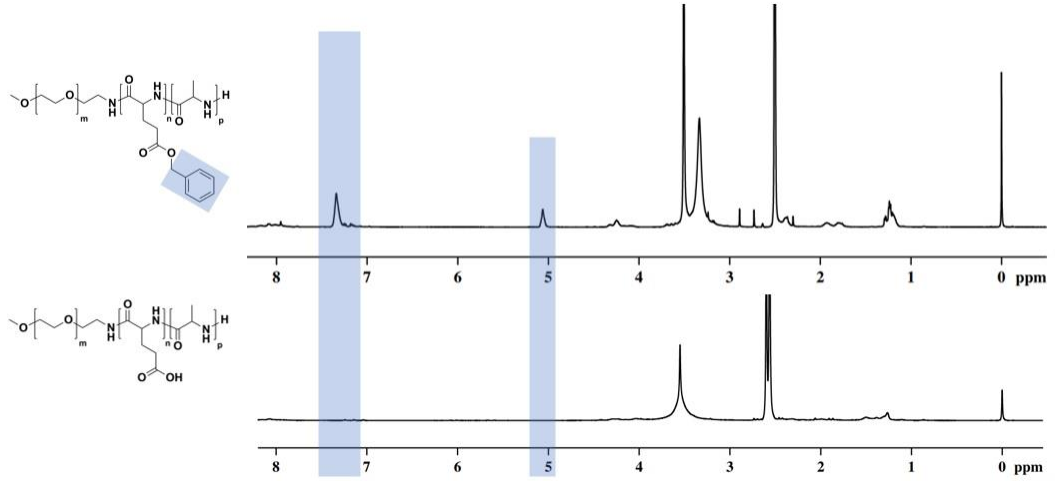
4.1.13 PEG-*b*-P(Glu-*r*-Ala) sentezi ve karakterizasyonu

PEG-*b*-P(Glu-NCA-*r*-Ala-NCA) polimeri TFA içinde çözündürülerek %33 HBr ile reaksiyona sokularak koruyucu grupların uzaklaştırılması sağlandı (Şekil 4.38).



Şekil 4.38 : PEG-*b*-P(Glu-*r*-Ala) sentezi.

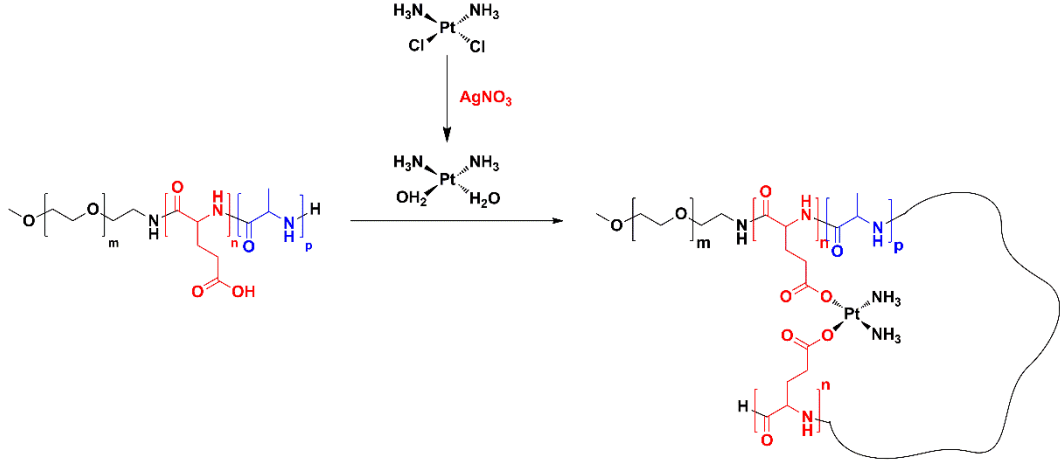
Şekil 4.39’da PEG-*b*-P(Glu-NCA-*r*-Ala-NCA) polimerinin monomer ucundaki koruyucu benzen halkalarının uzaklaştırılmasıyla elde edilen PEG-*b*-P(Glu-*r*-Ala)’ın karşılaştırılmalı NMR spektrumunda benzen grubuna ait pik gözlemlenmemektedir.



Şekil 4.39 : PEG-*b*-P(Glu-*r*-Ala) ve PEG-*b*-(Glu-*r*-Ala) polimerlerinin DMSO içinde çekilmiş ¹H NMR spektrumları.

4.1.14 Sisplatin ile PEG-*b*-(Glu-*r*-Ala) kopolimerinden TSCNP'lerin oluşturulması ve karakterizasyonu

Sisplatin ile TSCNP oluşturulması reaksiyonu suda gerçekleştirildiği için molekül ağırlığı 5000 g/mol olan PEG-NH₂ kullanılarak elde edilecek amfilik kopolimerin sudaki çözünürlüğünün daha fazla olması hedeflenmekteydi. Ancak, elde edilen PEG-*b*-(Glu-*r*-Ala) polimeri yapısında bulunan ve kendi içerisinde kuvvetli H-bağı oluşturan gruplar nedeniyle su içerisinde herhangi bir çözünürlük göstermemiştir. Ayrıca, DMSO içerisindeki çözünürlüğünün de çok zayıf olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, PEG-*b*-(Glu-*r*-Ala) polimeri su içerisinde çözünmediği için sisplatin ile yapılması planlanan TSCNP çalışması gerçekleştirilememiştir.



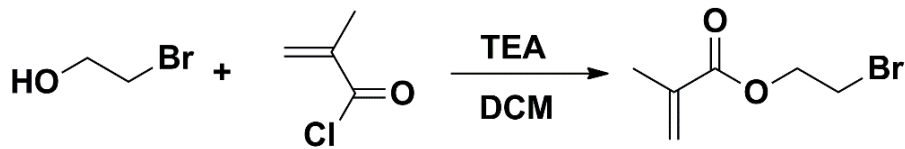
Şekil 4.40 : Sisplatin ile PEG-*b*-(Glu-*r*-Ala) kopolimerinden TSCNP'lerin oluşturulması

4.2 Çapraz bağlayıcı olarak Cur kullanılarak SCNP'lerin oluşturulmasına dair bulgular

Bu çalışmada Cur molekülü çapraz bağlayıcı olarak kullanılarak SCNP'ler oluşturuldu. Öncelikle RAFT polimerizasyonu ile P(PEGMA-*r*-BrMA) hidrofilik kopolimeri sentezlendi. Ardından P(PEGMA-*r*-BrMA) polimeri Cur ile ultra seyreltik koşullarda reaksiyona sokularak SCNP'ler oluşturuldu.

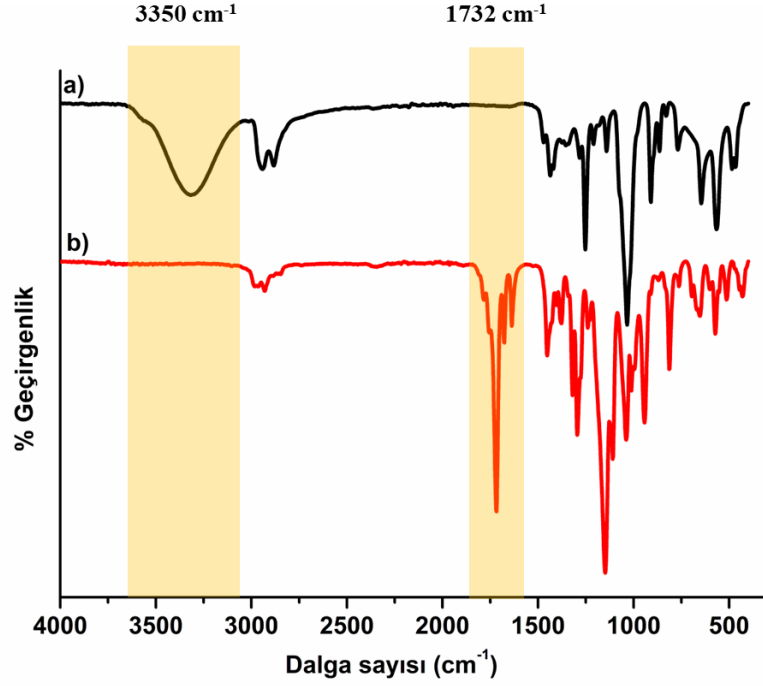
4.2.1 BrMA sentezi ve karakterizasyonu

Hidrofilik polimerde Cur ile çapraz bağ oluşturabilecek monomer olarak kullanılmak üzere kuru DCM içerisinde 2-bromoetanol ile metakrilol klorür bileşikler reaksiyona sokularak BrMA monomeri elde edildi (Şekil 4.41). Reaksiyon sonunda elde edilen sarı vizkoz madde FT-IR ve ¹H NMR ile karakterize edildi.



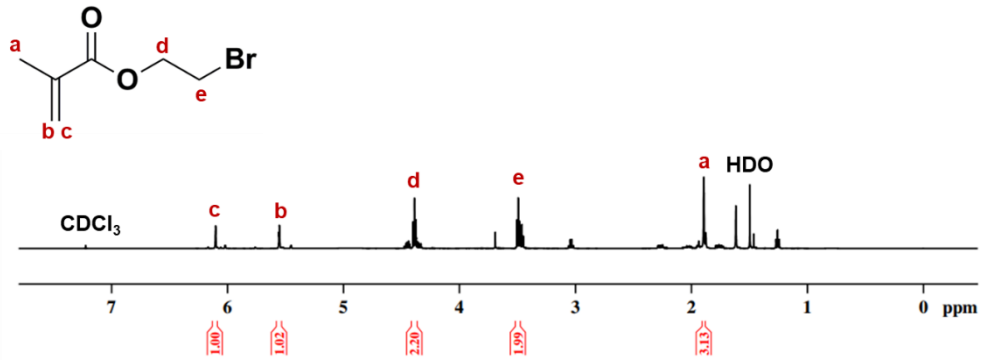
Şekil 4.41 : 2-Bromoetil metakrilat (BrMA) sentezi.

Şekil 4.42'de BrMA'nın FT-IR spektrumu verilmiştir. 2-Bromoetanolda gözlenen 3350 cm⁻¹'deki geniş -OH bandının BrMA'nın FT-IR spektrumunda kaybolması ve 1732 cm⁻¹'de -C=O gerilme titreşiminin gözlemlenmesiyle esterifikasyon reaksiyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiği görülmüştür.



Şekil 4.42 : a) 2-Bromoetanol ve b) BrMA'nın FT-IR spektrumları.

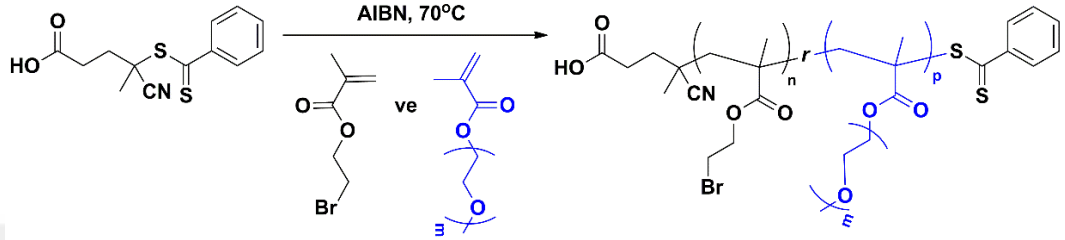
BrMA'nın başarılı bir şekilde sentezlendiği Şekil 4.43'de verilen ^1H NMR spektrumu ile de kanıtlanmıştır. NMR spektrumunda görüldüğü gibi metakrilat grubundaki **b** ve **c** çift bağ protonları sırasıyla 5.7 ve 6.1 ppm'de, **a** protonları ise 1.9 ppm'de gözlemlendi. Ayrıca, **d** ve **e** ile gösterilen $-\text{CH}_2-$ protonları sırasıyla 4.4 ve 3.5 ppm'de görülmektedir.



Şekil 4.43 : BrMA'nın CDCl_3 içerisinde çekilmiş ^1H NMR spektrumu.

4.2.2 RAFT polimerizasyonu ile P(PEGMA-*r*-BrMA) sentezi ve karakterizasyonu

CPCTT RAFT ajanı kullanılarak RAFT polimerizasyonu ile [M]/[RAFTajanı]/[AIBN] 100/1/0.33 olacak şekilde PEGMA ve BrMA monomerleri AIBN varlığında polimerleştirildi (Şekil 4.44). Elde edilen polimerler GPC, ¹H NMR ve DSC ile karakterize edildi.



Şekil 4.44 : RAFT polimerizasyonu ile P(PEGMA-*r*-BrMA) sentezi.

Gerçekleştirilen polimerizasyonlar sonucunda elde edilen polimerlerin teorik olarak hesaplanan, GPC ile ölçülen ve ¹H NMR'dan hesaplanan molekül ağırlıkları ile Tablo 4.5'de karşılaştırılmıştır.

Tablo 4.5 : RAFT polimerizasyonu ile elde edilen hidrofilik kopolimerlerin oluşma koşulları ve sonuçları.^a

Kod	Çözücü	Besleme oranı [PEGMA]/[BrMA] (%mol)	Dönüşüm ^b (%)	$M_{n,th}$ ^b (g/mol)	$M_{n,GPC}$ ^c (g/mol)	\bar{D} ^c	$M_{n,NMR}$ ^d (g/mol)	Ünite oranı [PEGMA]/[BrMA] ^d (%mol)
P(PEGMA- <i>r</i> -BrMA)-1	Toluene	90/10	94	27473	18853	1.27	26703	88/12
P(PEGMA- <i>r</i> -BrMA)-2	Toluene	80/20	78	22845	18912	1.44	46720	84/16
P(PEGMA- <i>r</i> -BrMA)-3	DMF	80/20	83	24292	21293	1.44	48498	85/15

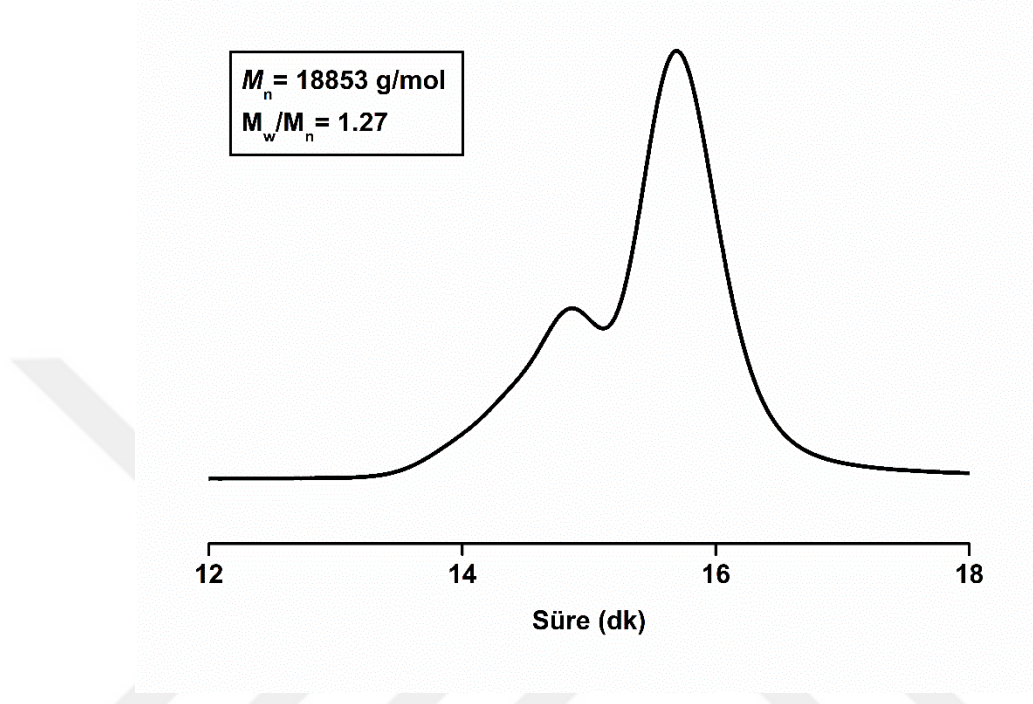
^a [M]/[RAFT]/ [AIBN]=100/1/0.33, polimerizasyon süresi= 17 saat.

^b Gravimetrik olarak hesaplanmıştır.

^c GPC ile THF içerisinde 35 °C’de ölçülmüştür.

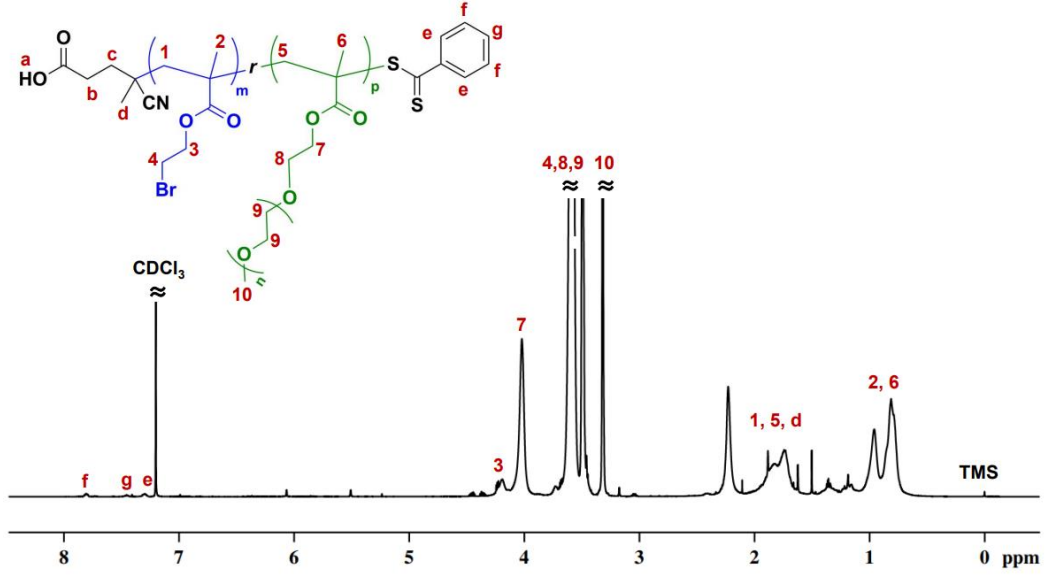
^d ¹H NMR ile belirlenmiştir.

Polimerizasyon sonucunda elde edilen polimerlerin molekül ağırlıkları THF GPC ile ölçüldü ve GPC kromatogramları Şekil 4.45 ve 4.48’de verildi. Toluen içinde gerçekleşen polimerizasyon ile elde edilen polimerin molekül ağırlığı 18853 g/mol ve PDI değeri 1.27 olarak belirlendi.



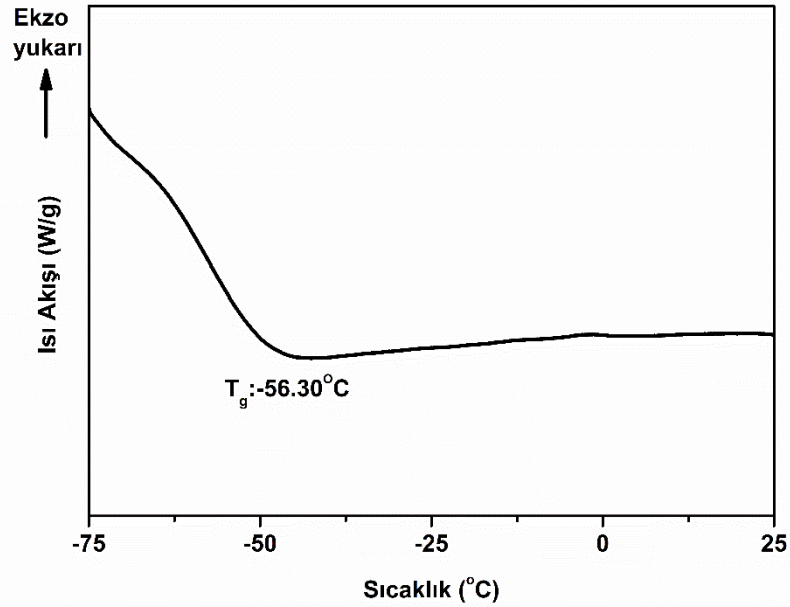
Şekil 4.45 : P(PEGMA-*r*-BrMA)-1 kopolimerinin THF GPC kromatogramı.

Şekil 4.44’te P(PEGMA-*r*-BrMA)-1’in CDCl_3 içerisinde çekilmiş ^1H NMR spektrumu görülmektedir. RAFT ajanında bulunan aromatik **f**, **g** ve **h** protonları 7.3-8 ppm’de ve PEGMA ünitesinde bulunan **10** protonları 3.3 ppm’de gözlemlendi. Polimerin ^1H NMR spektrumu incelendiğinde hem PEGMA hem de BrMA ünitelerinin tüm karakteristik protonları açıkça görülmektedir. (PEGMA-*r*-BrMA)-1 kopolimerinin ünite sayıları ^1H NMR spektrumunda RAFT ajanında bulunan **e**, **f** ve **g** protonları baz alınarak PEGMA’dan gelen **10** protonları ve her iki monomerdeki **2** ve **6** protonlarının integrallerinin oranlanması ile $[\text{PEGMA}]/[\text{BrMA}]$ hesaplandı. Yapılan integral hesabıyla PEGMA ünite sayısı 81 ve BrMA ünite sayısı ise 11 olarak belirlendi. İlgili ünite sayıları kullanılarak hesaplanan molekül ağırlıkları Tablo 4.5’te ayrıntılı olarak verildi.



Şekil 4.46 : P(PEGMA-*r*-BrMA)-1'in CDCl₃ içerisinde çekilmiş ¹H NMR spektrumu.

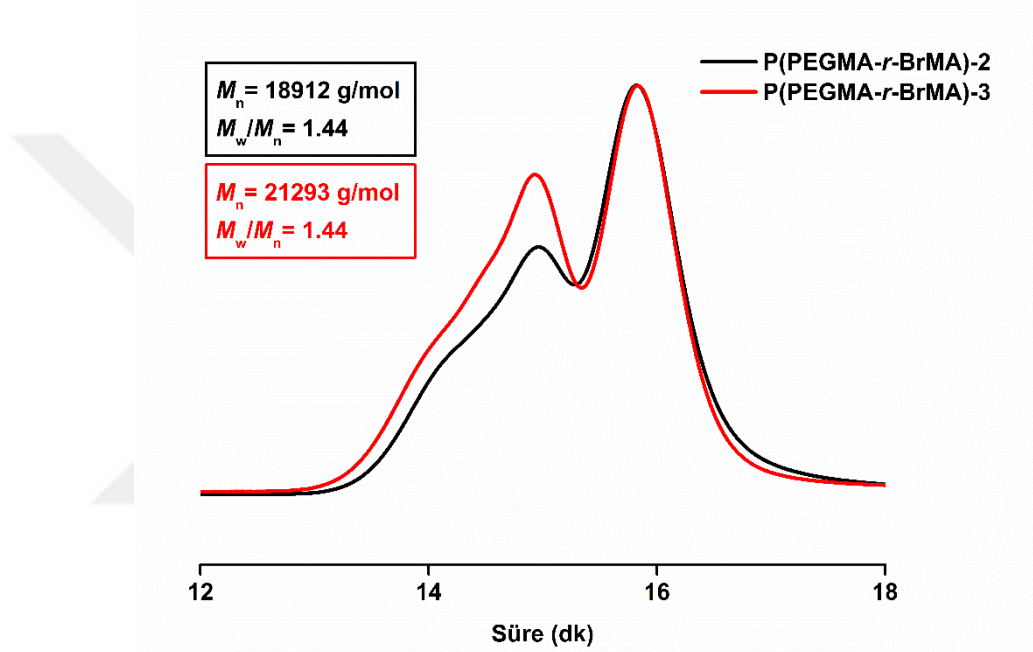
P(PEGMA-*r*-BrMA)-1 polimerinin termal özelliğini incelemek amacıyla çekilen DSC grafiği Şekil 4.47'de verilmiştir. P(PEGMA-*r*-BrMA)-1 polimerinin T_g değerinin -56.3°C olduğu belirlendi.



Şekil 4.47 : P(PEGMA-*r*-BrMA)-1 polimerinin DSC grafiği.

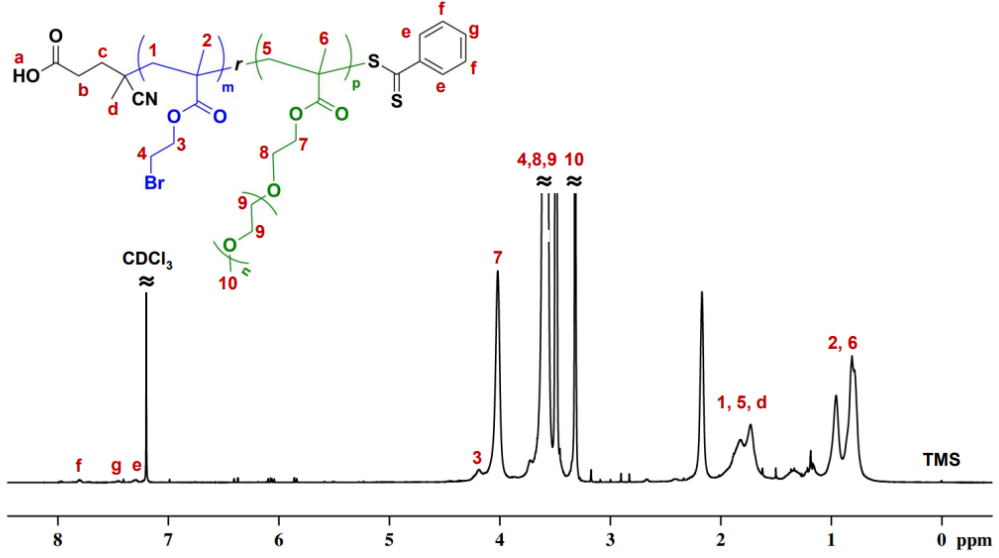
P(PEGMA-*r*-BrMA)-2 polimerinin molekül ağırlığı 18912 g/mol ve PDI değeri 1.44 olarak belirlenmiştir. GPC kromatogramlarında görüldüğü gibi her iki polimerin de

yüksek molekül ağırlığı bölgesinde boyunlu bir pik elde edilmiştir. Bu sebeple toluen yerine PEGMA polimerizasyonlarında sıklıkla tercih edilen bir çözücü olan DMF ile de 17 saatte bir polimer P(PEGMA-*r*-BrMA)-3 sentezlendi. Ancak, GPC sonucuna bakıldığında PDI değerinde bir değişiklik olmadığı halde yüksek molekül ağırlığı bölgesindeki boynun arttığı gözlemlendi. Bu sebeple P(PEGMA-*r*-BrMA)-2 polimeri ile çalışmalara devam edilmesine karar verildi. PEGMA monomeri ile sentezlenen polimerlerde boyunlu GPC pikleri gözlemlendiği bilinmekte olup daha az oranda (80/20) PEGMA içeren P(PEGMA-*r*-BrMA)-1 polimerinde boynun da az olduğu görüldü.



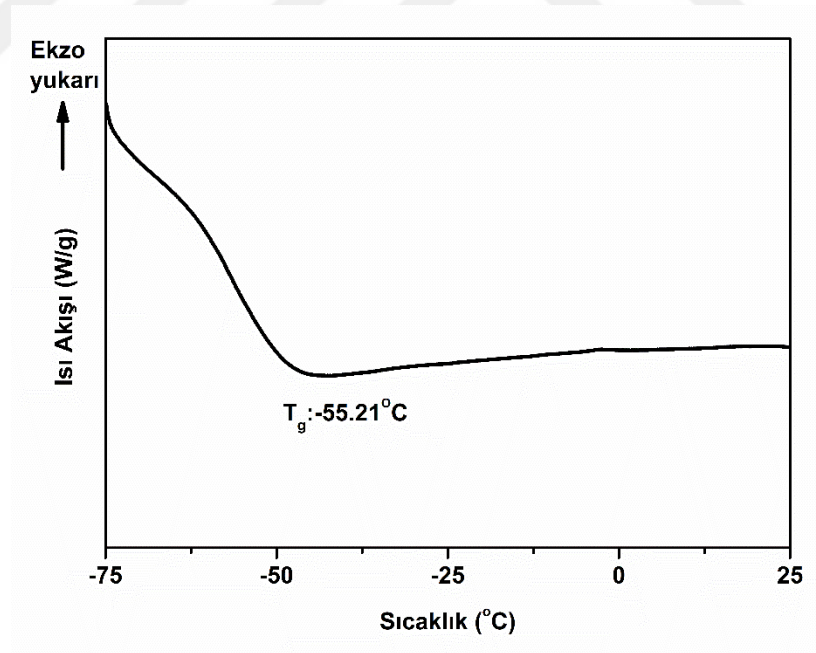
Şekil 4.48 : P(PEGMA-*r*-BrMA)-2 ve 3 kopolimerlerinin THF GPC kromatogramları.

İlk polimer ile benzer şekilde RAFT ajanında bulunan aromatik **f**, **g** ve **h** protonları 7.3-8 ppm'de ve PEGMA ünitesinde bulunan **10** protonları 3.4 ppm'de gözlemlendi. Polimerin ¹H NMR spektrumu incelendiğinde hem PEGMA hem de BrMA ünitelerinin tüm karakteristik protonları açıkça görülmektedir. P(PEGMA-*r*-BrMA)-2 kopolimerinin ünite sayıları ¹H NMR spektrumunda RAFT ajanında bulunan aromatik **e**, **f** ve **g** protonları baz alınarak PEGMA'dan gelen **10** protonları ve her iki monomerdeki **2** ve **6** protonlarının integrallerinin oranlanması ile hesaplandı. Yapılan integral hesabı sonucunda PEGMA ünite sayısı 136 ve BrMA ünite sayısı ise 26 olarak belirlendi.



Şekil 4.49 : P(PEGMA-*r*-BrMA)-2'nin CDCl₃ içerisinde çekilmiş ¹H NMR spektrumu.

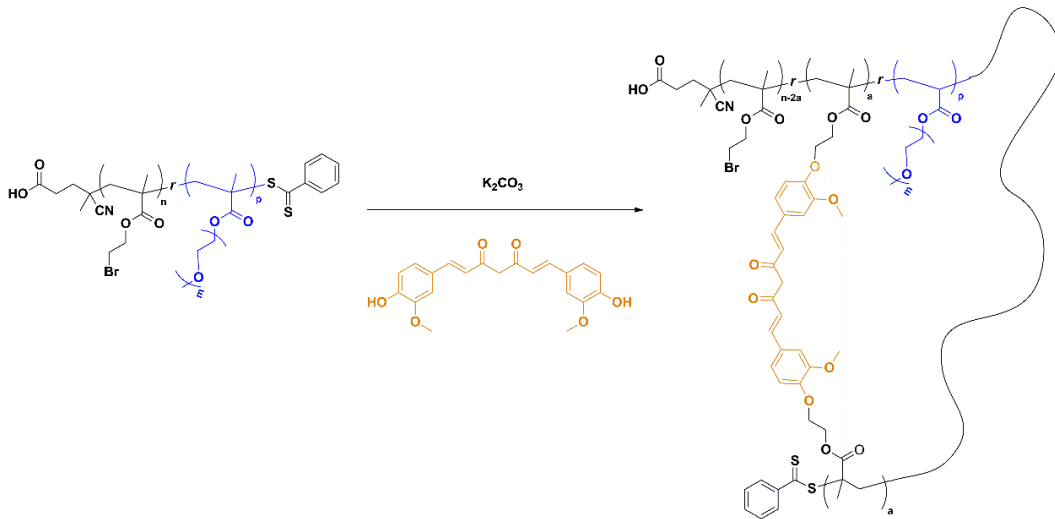
P(PEGMA-*r*-BrMA)-2 polimerinin ısısal özelliğini incelemek amacıyla çekilen DSC grafiği Şekil 4.50'de verilmiştir. P(PEGMA-*r*-BrMA)-2 polimerinin T_g değerinin -55.2°C olduğu belirlendi.



Şekil 4.50 : P(PEGMA-*r*-BrMA)-2 polimerinin DSC grafiği.

4.2.3 Cur ile P(PEGMA-*r*-BrMA) polimerlerinden SCNP'lerin oluşturulması ve karakterizasyonu

Kopolimer zincirlerinin iyi tanımlanmış SCNP'lere katlanmasını sağlamak amacıyla, ultra seyreltik koşullarda BrMA birimlerinin –Br grupları ile Cur'i fenol grupları arasında Williamson eterleşme reaksiyonu gerçekleştirildi (Şekil 4.51). Reaksiyonun ardından çözelti, çözücünün buharlaştırılması yoluyla yoğunlaştırıldı ve SCNP'ler hekzan içerisinde çöktürüldü. Elde edilen katı ürün, reaksiyona girmemiş Cur'u uzaklaştırmak amacıyla birkaç kez dietil eter ile yıkanarak saflaştırıldı. Saflaştırma sonrasında, öncü polimerin SCNP'ye dönüşümünü izlemek için ilk olarak GPC analizi yapıldı. THF kullanılarak gerçekleştirilen GPC ölçümlerinde, tutunma zamanında daha uzun sürelere kayma gözlemlendi; bu durum molekül ağırlığında azalmaya işaret ederek başarılı intramoleküler çapraz bağlanmayı ve SCNP oluşumunu doğruladı. P(PEGMA-*r*-BrMA)-1'den ve P(PEGMA-*r*-BrMA)-2'den elde edilen SCNP'lerin sayıca ortalama molekül ağırlıkları ($M_{n,GPC}$) ve DLS ölçümleri sonucunda belirlenen partikül boyutları Tablo 4.6'da verildi. Ayrıca, P(PEGMA-*r*-BrMA)-1 ve P(PEGMA-*r*-BrMA)-2'nin ilgili SCNP'ler ile karşılaştırıldığı GPC kromatogramları Şekil 4.52 ve 4.53'de verilmiştir. Her iki polimerden elde edilen SCNP'lerde de özellikle Cur konsantrasyonu azaldıkça tutunma zamanındaki kaymanın daha belirgin hale geldiği gözlemlenmiş olsa da en belirgin kaymanın P(PEGMA-*r*-BrMA)-1 kullanılarak oluşturulan SCNP'lerde olduğu görüldü.



Şekil 4.51 : Cur ile P(PEGMA-*r*-BrMA) polimerlerinden SCNP oluşturulması.

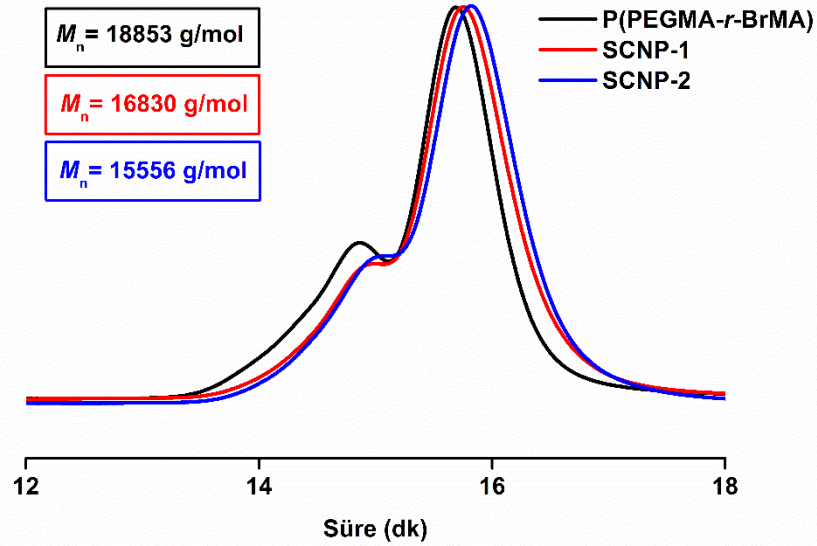
Tablo 4.6 : P(PEGMA-*r*-BrMA)-1 ve P(PEGMA-*r*-BrMA)-2 polimerleri ile Cur kullanılarak sentezlenen SCNP'lerin oluşma koşulları ve sonuçları.

Kod	Konsantrasyon ^a (mg/mL)	[Cur]/ [P(PEGMA- <i>r</i> - BrMA)]	$M_{n, GPC}^b$ (g/mol)	Partikül Boyutu ^c (nm)
P(PEGMA- <i>r</i> -BrMA)-1	-	-	18853	7.66 ± 0.40
SCNP-1	0.2	5	16830	6.22 ± 0.18
SCNP-2	0.2	3	15556	4.76 ± 0.34
P(PEGMA- <i>r</i> -BrMA)-2	-	-	18912	6.52 ± 0.28
SCNP-3	0.2	3	18628	7.15 ± 0.97
SCNP-4	0.2	2	17916	6.37 ± 0.47

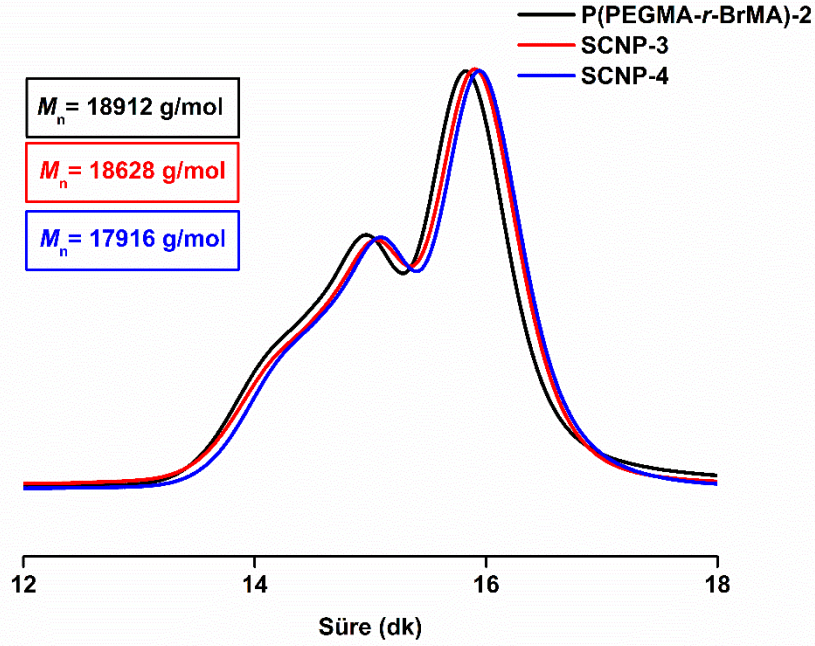
^a Aseton içerisinde hazırlanmıştır.

^b GPC ile THF içerisinde 35°C'de ölçülmüştür

^c DLS ölçümü sonucunda elde edilmiştir.



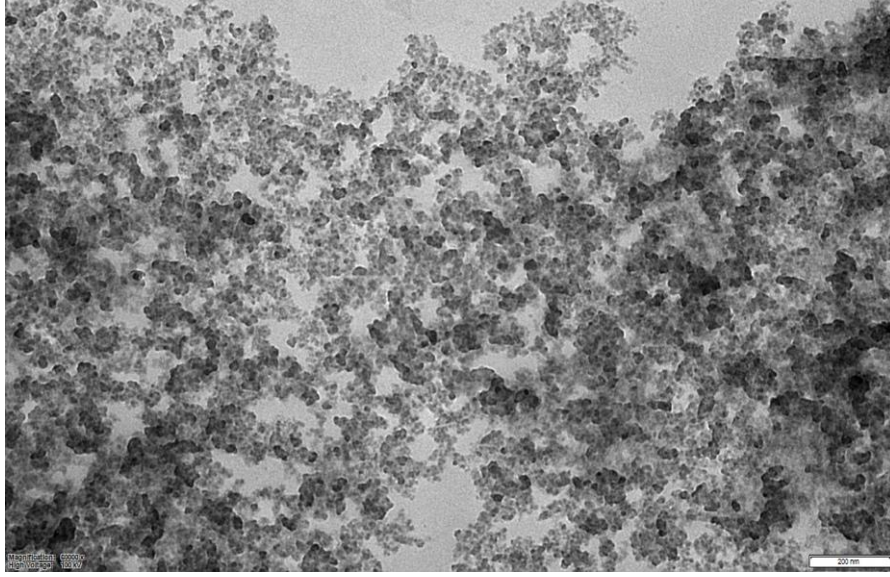
Şekil 4.52 : P(PEGMA-*r*-BrMA)-1 kopolimeri ve SCNP'lerin THF GPC kromatogramları.



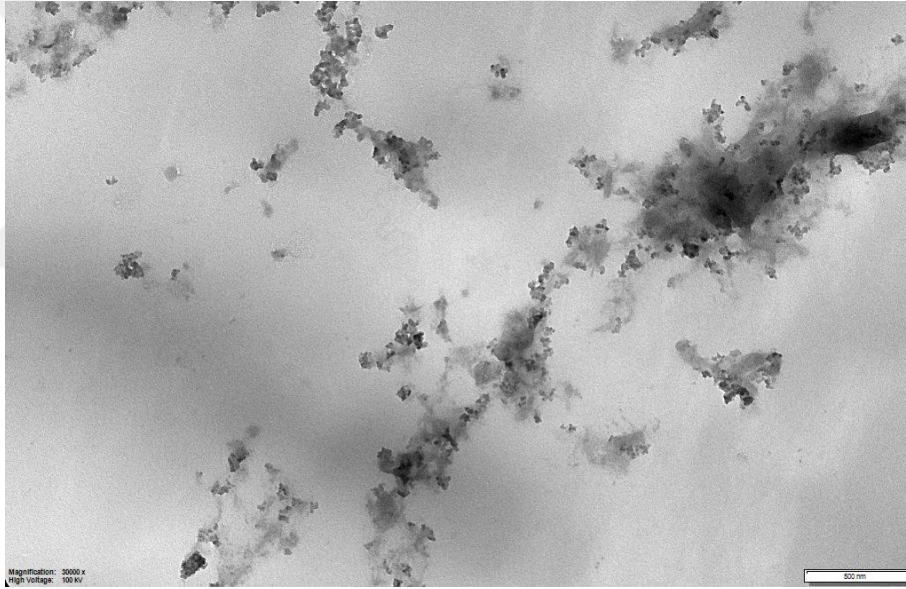
Şekil 4.53 : P(PEGMA-*r*-BrMA)-2 kopolimeri ve SCNP'lerin THF GPC kromatogramları.

DLS ölçümleri, GPC'de gözlenen eğilimi açık bir şekilde doğrulamıştır. Daha düşük Cur konsantrasyonu kullanılarak hazırlanan SCNP-2'nin hidrodinamik çapındaki azalma, daha yüksek Cur konsantrasyonu ile çöktürülen SCNP-1'e kıyasla daha belirgin olmuştur. P(PEGMA-*r*-BrMA)-1'in hidrodinamik çapı 7.66 nm iken, SCNP-2 için bu değer 4.76 nm'ye düşmüştür (Tablo 4.6). Benzer şekilde SCNP-4'ün hidrodinamik çapındaki azalma SCNP-3'e göre daha belirgindir.

SCNP oluşumuna görsel kanıt sağlamak amacıyla TEM analizi gerçekleştirildi. Karbon kaplı bakır gridler üzerine damlatılan ve sulu ortamda dağıtılan SCNP-2'nin ve SCNP-4'ün TEM görüntüleri, 1 mg/mL konsantrasyonda agregasyon oluştuğunu gösterdi (Şekil 4.54 ve 4.55). Bununla birlikte, agregatların SCNP-2 için yaklaşık 16 nm çapında ve SCNP-4 için yaklaşık 20 nm çapında daha küçük küresel yapılardan meydana geldiği de açıkça görüldü. Gözlenen agregasyon davranışının Cur birimleri arasındaki π - π etkileşimlerinden kaynaklanabileceği değerlendirildi.



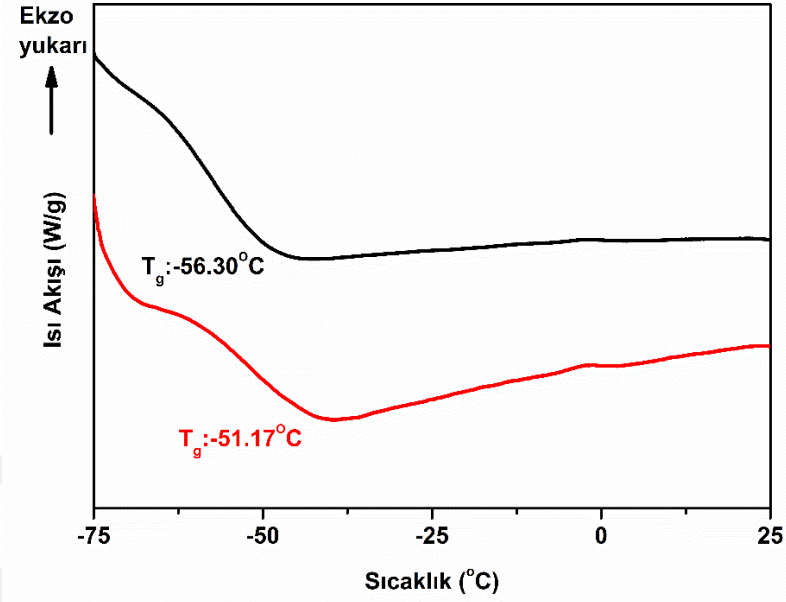
Şekil 4.54 : SCNP-2'nin TEM görüntüsü (ölçek= 200 nm).



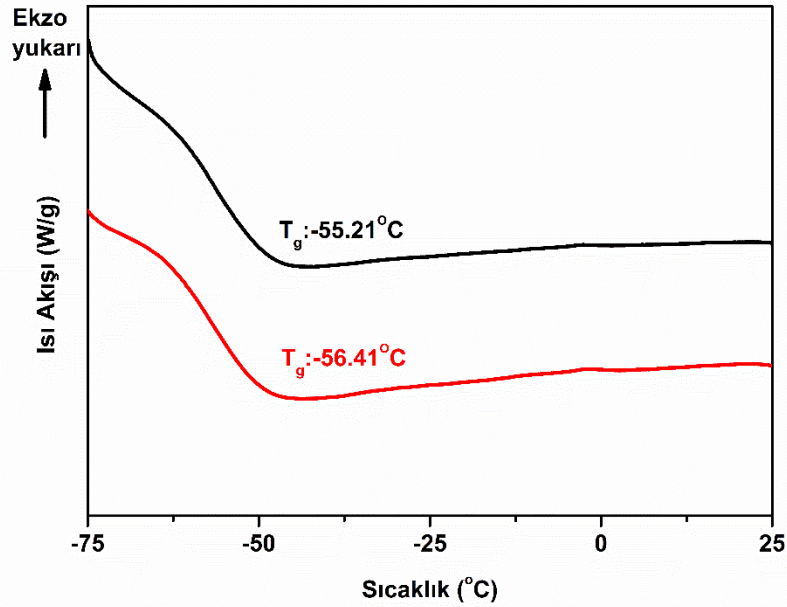
Şekil 4.55 : SCNP-4'ün TEM görüntüsü (ölçek= 500 nm).

SCNP'lerin başarılı bir şekilde oluşumunu desteklemek amacıyla DSC analizi gerçekleştirildi. Doğrusal kopolimere kıyasla, SCNP'lerde zincir hareketliliğinin azalması T_g değerinde bir artışa yol açmaktadır. Gerçekleştirilen ölçümler sonucunda, P(PEGMA-*r*-BEMA)-1 için -56.3°C olarak belirlenen T_g değerinin, SCNP-2'de -51.2°C 'ye yükseldiği gözlenmiş ve bu artış, intramoleküler çapraz bağlanmanın etkili bir şekilde gerçekleştiğini göstermiştir (Şekil 4.56). Ancak, P(PEGMA-*r*-BrMA)-2 ile SCNP-4'ün T_g değerleri arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 4.57). Bu durumun çapraz bağlanma miktarının az olmasından kaynaklı olduğu değerlendirilmiştir. Ayrıca, GPC ile elde edilen sonuçlar da SCNP-4'ün molekül

ağırlığında ve hidrodinamik çapındaki değişimin oldukça az olduğunu desteklemektedir.



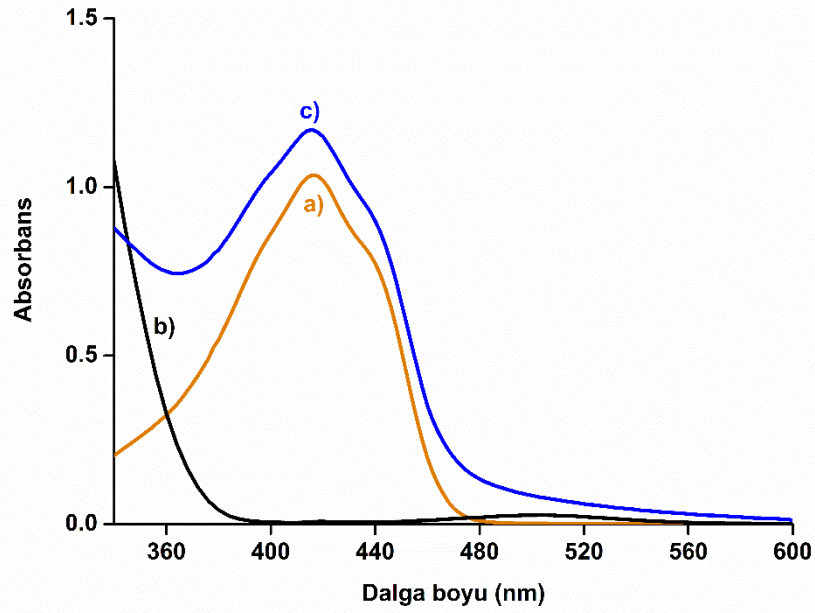
Şekil 4.56 : P(PEGMA-*r*-BrMA)-1'in (siyah) ve SCN-2'nin (kırmızı) DSC grafikleri.



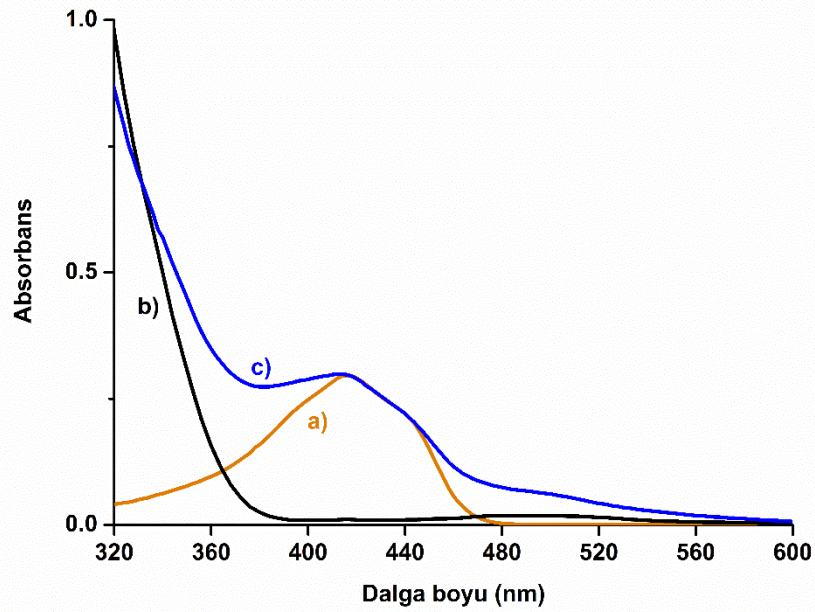
Şekil 4.57 : P(PEGMA-*r*-BrMA)-2'nin (siyah) ve SCN-5'in (kırmızı) DSC grafikleri.

SCNP-2 ve SCN-4'te Cur'in varlığını doğrulamak amacıyla UV/Vis analizleri gerçekleştirildi. Şekil 4.58 ve 4.59'da gösterildiği üzere, SCN-2 ve SCN-4'te Cur'e

özgü karakteristik absorbans bandı 425 nm'de gözlemlenirken, öncül polimerler bu bölgede herhangi bir absorbans sergilememiştir.



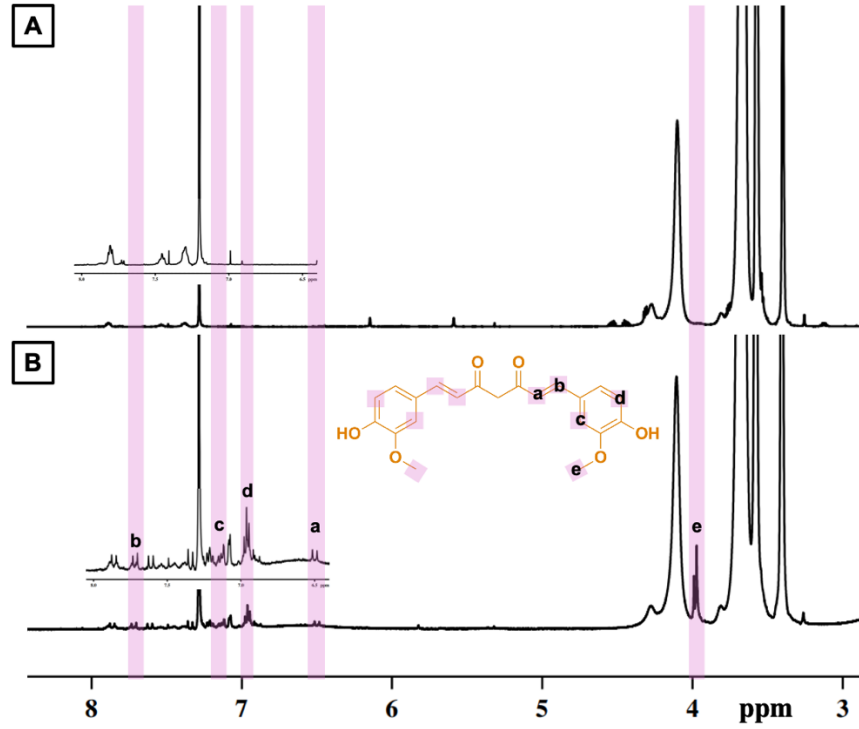
Şekil 4.58 : a) Cur (0.008 mg/mL), b) P(PEGMA-*b*-BrMA)-1 (5.76 mg/mL) ve c) SCN-2'nin (5.76 mg/mL) DCM içerisinde çekilmiş UV spektrumları.



Şekil 4.59 : a) Cur (0.002 mg/mL), b) P(PEGMA-*b*-BrMA)-2 (3.13 mg/mL) ve c) SCN-4'ün (3.13 mg/mL) DCM içerisinde çekilmiş UV spektrumları.

Ek olarak, SCN-2'nin ^1H NMR spektrumu incelenerek başlangıç (PEGMA-*r*-BrMA)-1 polimerini spektrumu ile karşılaştırıldı. Şekil 4.60'da görüldüğü üzere Cur'e ait aromatik **a-d** protonları 6.6–7.8 ppm aralığında, $-\text{OCH}_3$ protonları ise 4.9 ppm'de

belirgin olarak gözlemlendi. Bu sonuçlar, Cur moleküllerinin polimer zincirine başarıyla konjuge edildiğini açık bir şekilde doğrulamaktadır.

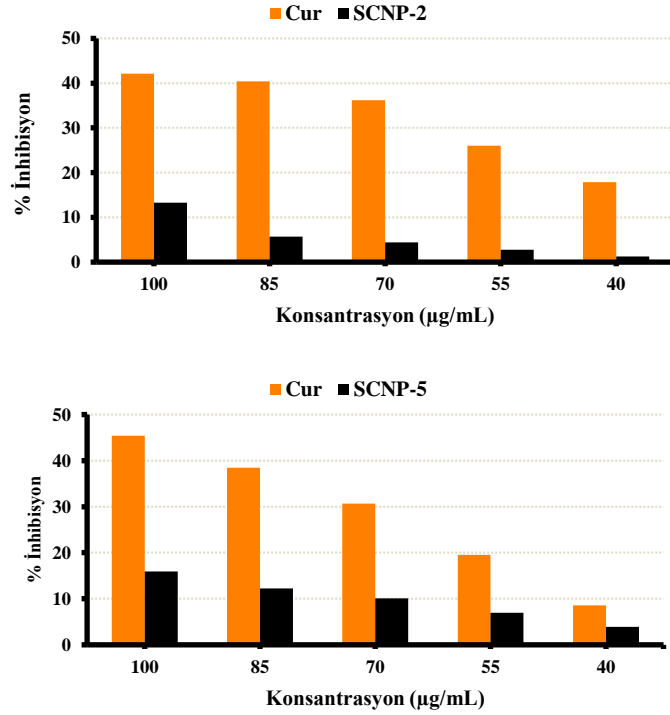


Şekil 4.60 : A) P(PEGMA-*r*-BrMA)-1 ve B) SCNP-2'nin CDCl₃ içerisinde çekilmiş ¹H NMR spektrumları.

4.2.4 Antioksidan aktivite tayini

DPPH testi, kimyasal bileşiklerin serbest radikal giderme kapasiteleri üzerinden antioksidan aktivitelerinin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. SCNP-2 ve SCNP-4'ün antioksidan kapasitesini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilen DPPH radikal giderme testi sonuçları, serbest Cur ile karşılaştırılmıştır. Artan Cur konsantrasyonu ile birlikte SCNP-2'nin ve SCNP-4'ün DPPH radikalleri üzerindeki giderme aktivitesinde artış gözlenmiş olsa da Cur'in öncül polimer zincirine konjugasyonu, radikal giderme kapasitesinin azalmasına neden olmuştur (Şekil 4.61). Önceki çalışmalar, Cur'in antioksidan aktivitesinin reaktif fenolik grupları ile β-diketon biriminden türeyen enol grubuna bağlı olduğunu göstermiştir. SCNP-2'nin azalan antioksidan kapasitesi, büyük olasılıkla eterifikasyon reaksiyonu sırasında Cur'in fenolik gruplarının kaybından kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte, konjuge edilen Cur molekülleri, β-diketon yapısından gelen

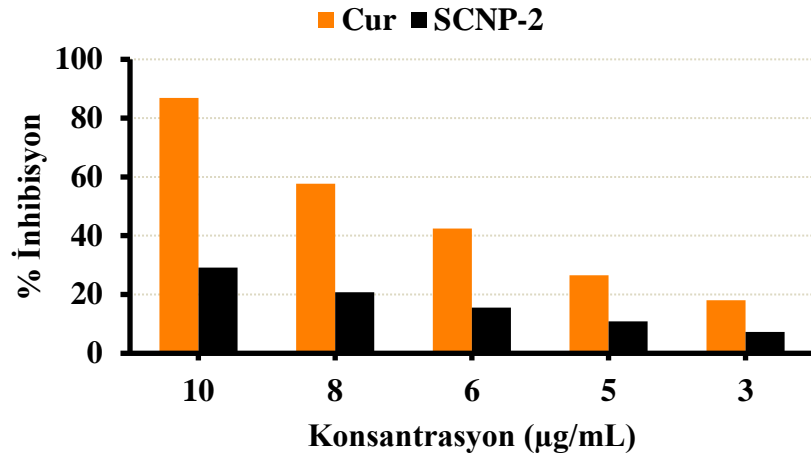
antioksidan özelliklerini koruyarak radikal giderme reaksiyonlarına katkıda bulunmaya devam etmektedir.



Şekil 4.61 : SCNP-2, SCNP-5 ve Cur'in DPPH radikal temizleme metodu ile belirlenen antioksidan aktivite grafikleri.

4.2.5 Antiinflamatuvar aktivite tayini

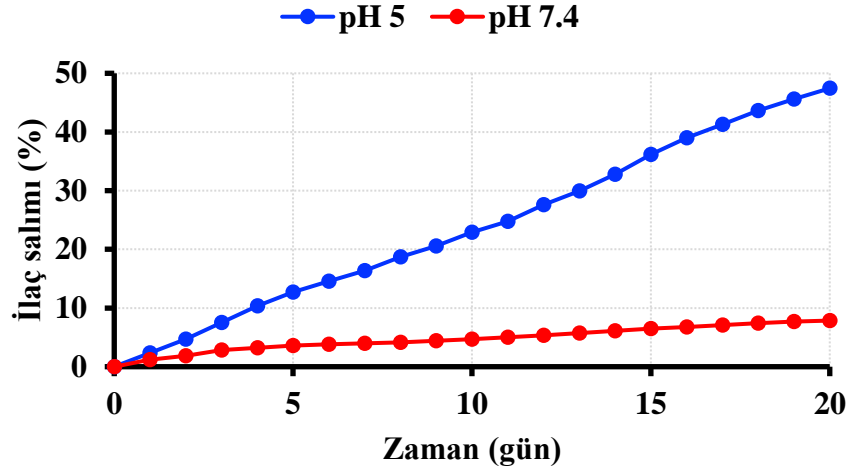
SCNP-2'nin anti-inflamatuvar özellikleri sığır serum albümini (BSA) denatürasyon yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Aktivite çalışmasında yaşanan Cur konsantrasyonunun azlığı sebebiyle yalnızca SCNP-2 için çalışma gerçekleştirilebildi. Elde edilen sonuçlar, hem Cur hem de SCNP-2 için artan konsantrasyonlarla birlikte yüzde inhibisyon oranında bir artış olduğunu ortaya koydu. Ancak, SCNP-2'nin gösterdiği yüzde inhibisyon oranı, serbest Cur'e kıyasla daha düşük bulundu ve bu durum, Cur'in anti-inflamatuvar aktivitesinde fenolik grupların belirleyici rol oynadığını açıkça ortaya koydu (Şekil 4.62).



Şekil 4.62 : SCNP-2 ve Cur'in sığır serum albümini denatürasyon yöntemi ile elde edilen anti-inflamatuar aktivite grafiği.

4.2.6 SCNP-2'nin ilaç salım çalışması

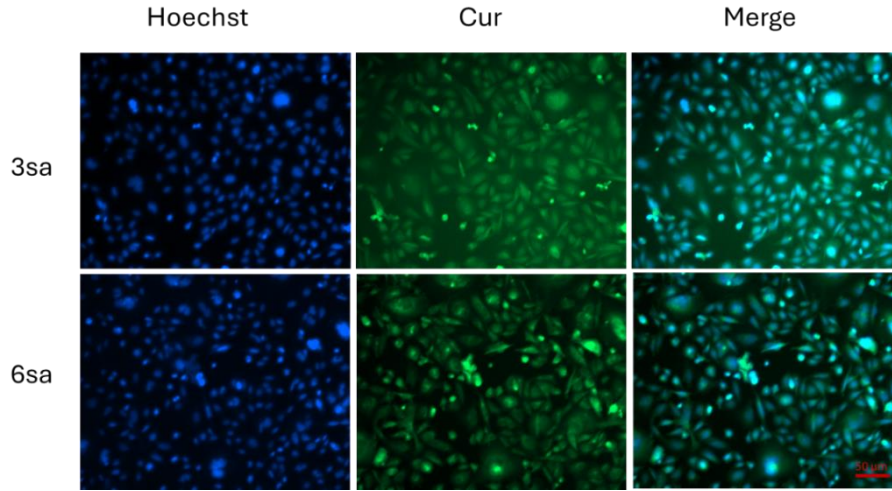
Elde edilen SCNP'lerin ilaç taşıyıcı olarak potansiyellerini tespit etmek için SCNP-2'den Cur salım profili ortam pH'sına bağlı olarak değerlendirildi. Cur ile konjuge edilmiş SCNP-2'nin *in vitro* salım davranışı, normal doku koşullarını (pH 7.4) ve tümör ortamını (pH 5.0) taklit eden koşullarda incelendi ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.63'de verildi. SCNP-2 örnekleri diyaliz torbasına yerleştirildi ve 37°C'de, %5 (v/v) Tween 80 içeren fosfat tamponu (pH 7.4) veya asetat tamponu (pH 5.0) içerisinde inkübasyona bırakıldı. Diyalizatlar günlük olarak toplandı ve 420 nm dalga boyunda absorbans değerleri UV spektroskopisi ile ölçülerek kümülatif Cur salım yüzdeleri hesaplandı. Şekil 4.61'de görüldüğü üzere, SCNP-2'den Cur'in 20 gün sonunda pH 7.4 ortamında yaklaşık %8 oranında, pH 5.0 ortamında ise yaklaşık %48 oranında salındığı belirlendi. Bu sonuçlar, Cur salımının pH'ya duyarlı bir şekilde gerçekleştiğini ve asidik ortamda önemli ölçüde arttığını ortaya koymaktadır.



Şekil 4.63 : SCNP-2'nin 37°C'de PBS tampon çözeltisi (pH= 7.4) ve asetat tampon çözeltisi (pH= 5.0) içindeki *in vitro* salım grafiği.

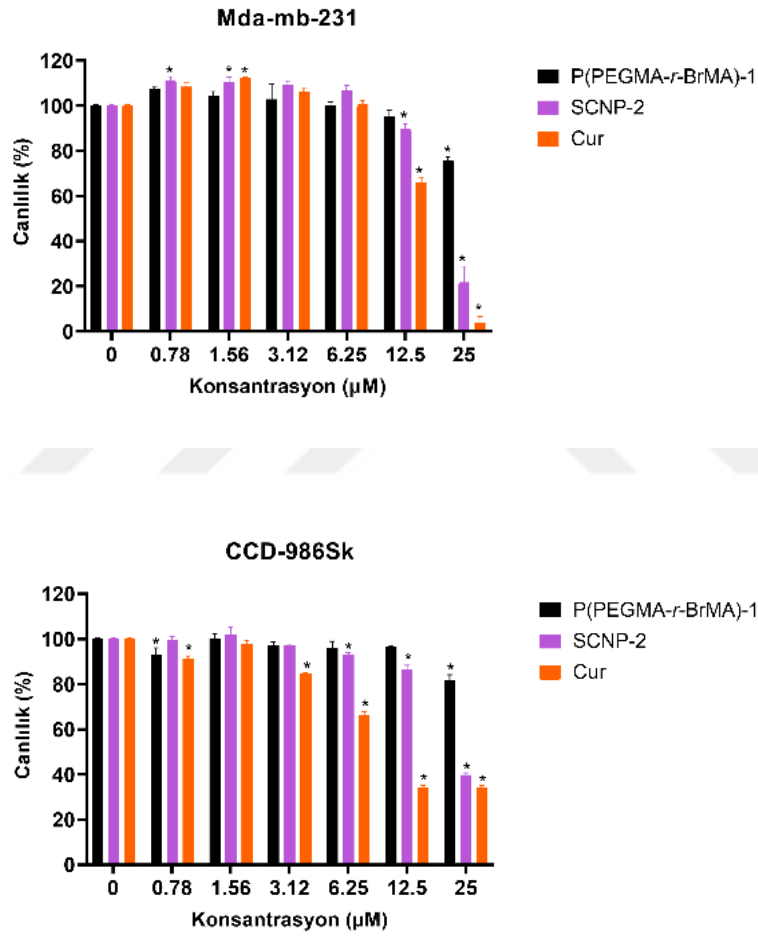
4.2.7 SCNP-2'nin *in vitro* hücresel alımı ve sitotoksitesi

Şekil 4.64, SCNP-2'nin 3 ve 6 saatlik inkübasyon sürelerinde MDA-MB-231 hücreleri tarafından *in vitro* hücresel alımını göstermektedir. Hücreler 10 μ M konsantrasyonunda SCNP-2 ile inkübe edildikten sonra yıkandı, Hoechst boyası ile boyanarak Zeiss Axio Observer Z1 floresan mikroskobu kullanılarak görüntülendi. Elde edilen floresan mikrograflar, her iki zaman noktasında da SCNP-2'nin hücreler tarafından etkin şekilde internalize edildiğini gösterdi. Ayrıca, yeşil floresan sinyalinin 24 saate kadar anlamlı bir azalma göstermeden devam ettiği gözlemlendi ve bu durum, SCNP-2'nin hücreler içerisinde uzun süreli birikimini destekledi.



Şekil 4.64 : SCNP-2'nin MDA-MB-231 hücreleri tarafından hücresel alımı. MDA-MB-231 hücreleri 10 μ M SCNP-2 ile muamele edildi ve 3 ve 6 saat inkübe edildi.

Şekil 4.65'te verilen hücre canlılığı test sonuçları, MDA-MB-231 ve CDD-996Sk hücrelerinin 0.78–25 μM konsantrasyon aralığında P(PEGMA-*r*-BrMA)-1, SCNP-2 ve Cur ile 24 saat inkübasyonu sonrasında elde edildi. Yüksek konsantrasyonlarda hem SCNP-2 hem de Cur hücre canlılığında azalmaya neden oldu. Ancak, bu etkinin MDA-MB-231 kanser hücrelerinde daha belirgin olduğu gözlemlendi. Bu durum, SCNP-2'nin kanser hücrelerine karşı seçici sitotoksik etki potansiyeline işaret etmektedir. Öte yandan, P(PEGMA-*r*-BrMA)-1 polimeri her iki hücre hattında da hücre canlılığını etkilememiş ve bu sonuçlar polimerin biyouyumlu yapısını desteklemiştir.



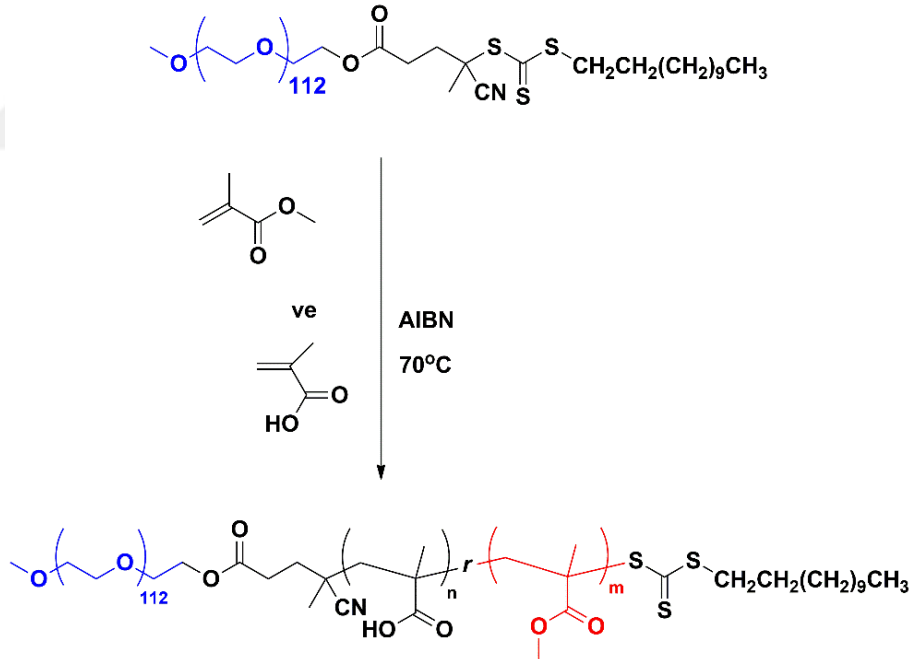
Şekil 4.65 : P(PEGMA-*r*-BrMA)-1, SCNP-2 ve Cur ile 24 saat inkübe edilen MDA-MB-231 ve CCD-987Sk hücrelerinin canlılık sonuçları (* $p < 0.05$).

4.3 Çapraz Bağlayıcı Olarak Cur Kullanılarak TSCNP'lerin Oluşturulmasına Dair Bulgular

Bu çalışmada Cur molekülü çapraz bağlayıcı olarak kullanılmasıyla iribaş yapılı TSCNP'ler ve miselleri oluşturulmuştur. RAFT polimerizasyonu ile hidrofilik amfifilik PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA) kopolimeri sentezlenmiş, ardından Cur ile ultra seyreltik koşullarda reaksiyona sokularak TSCNP'ler oluşturulmuştur. Oluşturulan TSCNP'ler kullanılarak diyaliz yöntemi ile DOKS yüklü miseller oluşturulmuştur.

4.3.1 RAFT Polimerizasyonu ile PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA) sentezi ve karakterizasyonu

RAFT polimerizasyonu ile sentezlenen makroRAFT ajanı kullanılarak, $[M]/[\text{makroRAFTajanı}]/[\text{AIBN}]$ 200/1/0.33 olacak şekilde MMA ve MAA monomerleri AIBN varlığında etanol içinde polimerleştirildi (Şekil 4.66). Elde edilen kopolimerler ^1H NMR, GPC ve DSC ile karakterize edildi.



Şekil 4.66 : RAFT polimerizasyonu ile PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA) sentezi.

Gerçekleştirilen polimerizasyonlar sonucunda elde edilen polimerlerin teorik olarak hesaplanan molekül ağırlıkları, GPC ile ölçülen ve ^1H NMR'dan hesaplanan molekül ağırlıkları ile Tablo 4.7'de karşılaştırılmıştır.

Polimerizasyon sonucunda elde edilen polimerin moleköl ağırlıkları THF GPC ile ölçüldü ve GPC kromatogramları Şekil 4.67 ve 4.68'te verildi. Etanol içinde gerçekleşen polimerizasyon ile elde edilen PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA)-1 ve PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA)-2 polimerinin moleköl ağırlıkları sırasıyla 18517 g/mol ve 19722 g/mol olarak belirlendi. İki polimerin de PDI değerleri 1'e yakın çıktığı için kontrollü polimerizasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiği değerlendirildi.



Tablo 4.7 : RAFT polimerizasyonu ile elde edilen amfililik kopolimerlerin (PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA)) oluşma koşulları ve sonuçları.^a

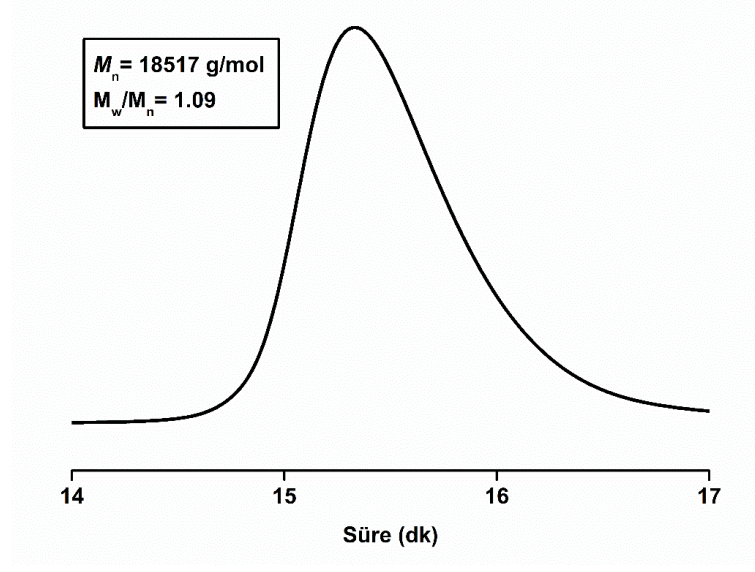
Kod	Besleme oranı [MMA]/[MAA] (%mol)	Dönüşüm ^b (%)	M _{n,th} ^b (g/mol)	M _{n,GPC} ^c (g/mol)	Đ ^c	M _{n,NMR} ^d (g/mol)	Ünite oranı [MMA]/[MAA] ^d
PEG- <i>b</i> -P(MMA- <i>r</i> -MAA)-1	80/20	86	22114	18517	1.09	20388	77/23
PEG- <i>b</i> -P(MMA- <i>r</i> -MAA)-2	90/10	80	19800	19722	1.10	24662	89/11

^a [M]/[PEG-CTA]/ [AIBN]=200/1/0.33, polimerizasyon süresi= 24 saat, polimerizasyon çözücüsü= Etanol.

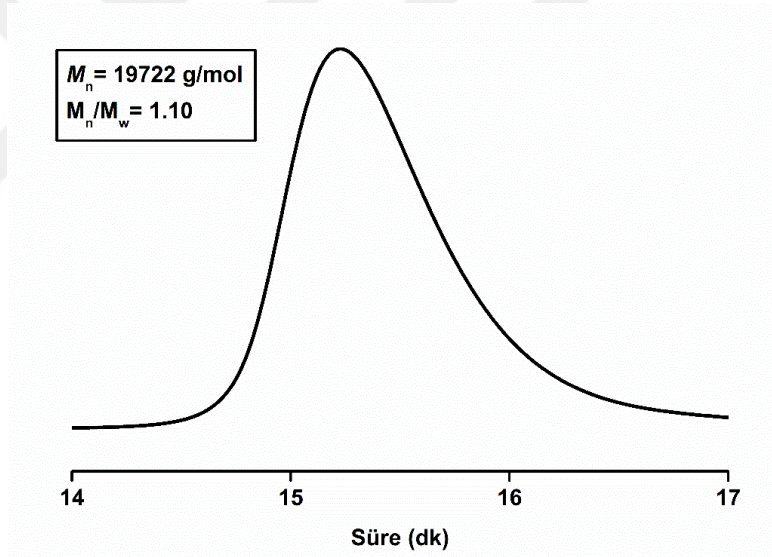
^b Gravimetrik olarak hesaplanmıştır.

^c GPC ile THF içerisinde 35°C’de ölçülmüştür.

^d ¹H NMR ile belirlenmiştir.



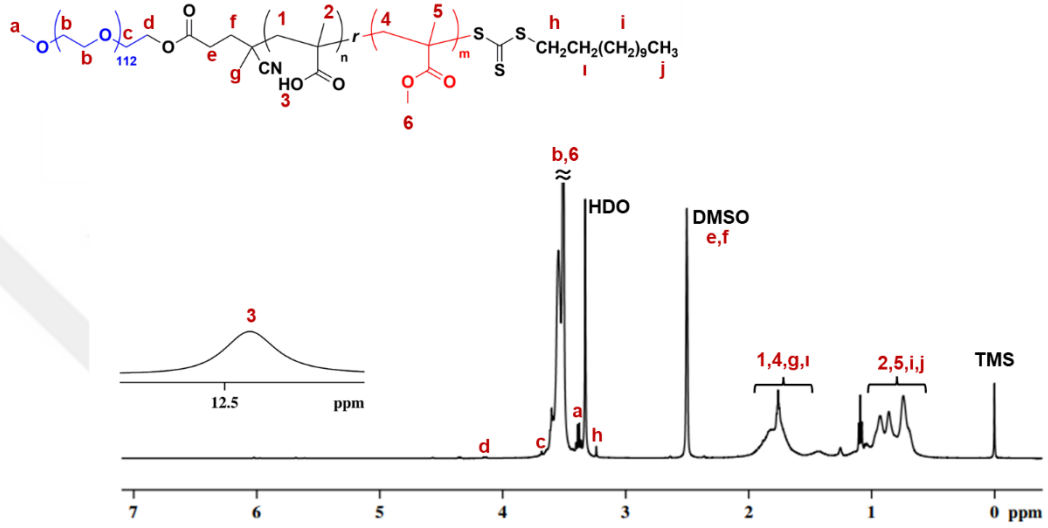
Şekil 4.67 : PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA)-1 kopolimerinin THF GPC kromatogramı.



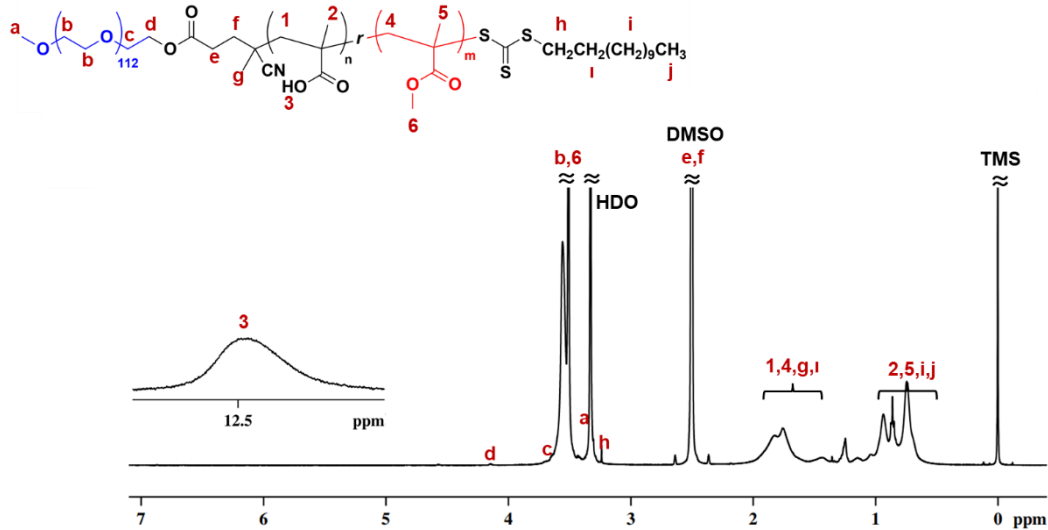
Şekil 4.68 : PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA)-2 kopolimerinin THF GPC kromatogramı.

Şekil 4.69 ve 4.70’de elde edilen kopolimerlerin ^1H NMR spektrumları verilmiştir. Her iki kopolimerin spektrumunda da görüldüğü gibi makroRAFT ajanında bulunan PEG kısmına ait **b** ile gösterilen $-\text{CH}_2$ protonları ile MMA ünitelerindeki bulunan ve **6** ile gösterilen metoksi protonlarıyla birlikte 3.5 ppm’de çıkmıştır. Ayrıca, MAA ünitelerine ait **3** protonları 12.4 ppm’de gözlenmiştir. Polimerlerdeki $[\text{MMA}]/[\text{MAA}]$ ünite sayıları 4.14 ppm’de gözlemlenen **d** protonları ile 3.55 ppm’de gözlenen **6** protonlarının integrallerinin 12.4 ppm civarında gözlenen **3** protonlarının integrallerine oranlanması ile hesaplandı. Yapılan integral hesabıyla PEG-*b*-P(MMA-

r-MAA)-1 için MMA ünite sayısı 119 ve MAA ünite sayısı ise 36 olarak belirlendi. PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA)-2 için MMA ünite sayısı 172 ve MAA ünite sayısı ise 24 olarak belirlendi. Ayrıca, ¹H NMR spektrumlarından yapılan hesaplamalar sonucunda elde edilen kopolimerlerdeki % monomer oranlarının besleme oranına yakın olduğu tespit edildi. İlgili ünite sayıları kullanılarak hesaplanan molekül ağırlıkları Tablo 4.7’de ayrıntılı olarak verildi.

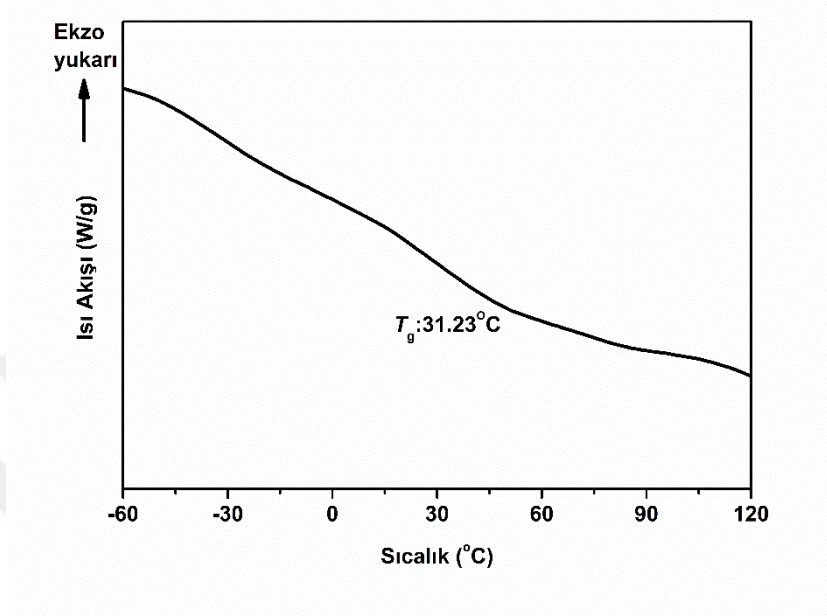


Şekil 4.69 : PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA)-1’in DMSO içerisinde çekilmiş ¹H NMR spektrumu.

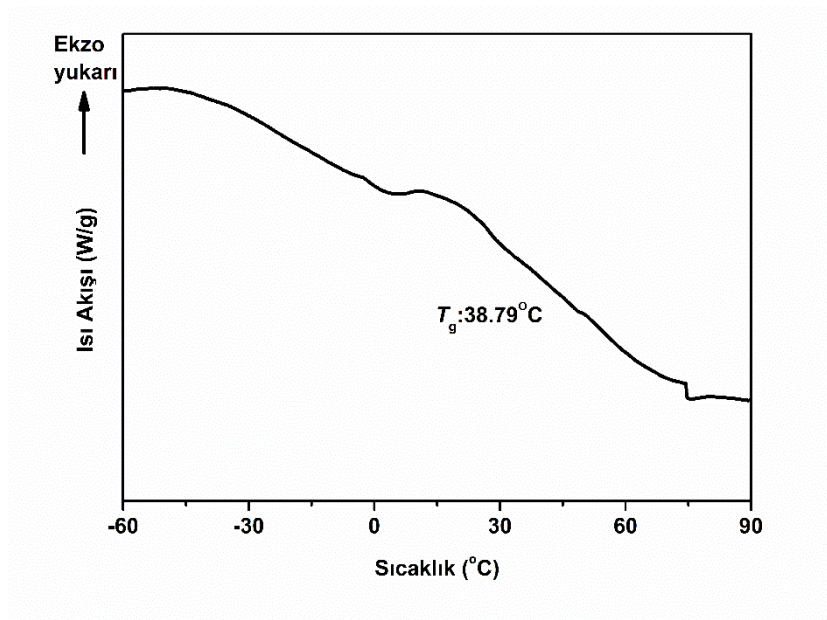


Şekil 4.70 : PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA)-2’nin DMSO içerisinde çekilmiş ¹H NMR spektrumu.

PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA)-1 ve PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA)-2 kopolimerlerinin termal davranışlarını incelemek amacıyla çekilen DSC grafikleri Şekil 4.71 ve 4.72’de verilmiştir. PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA)-1 polimerinin T_g değeri -31.2°C ve PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA)-2 polimerinin T_g değerinin -38.8°C olduğu belirlendi.



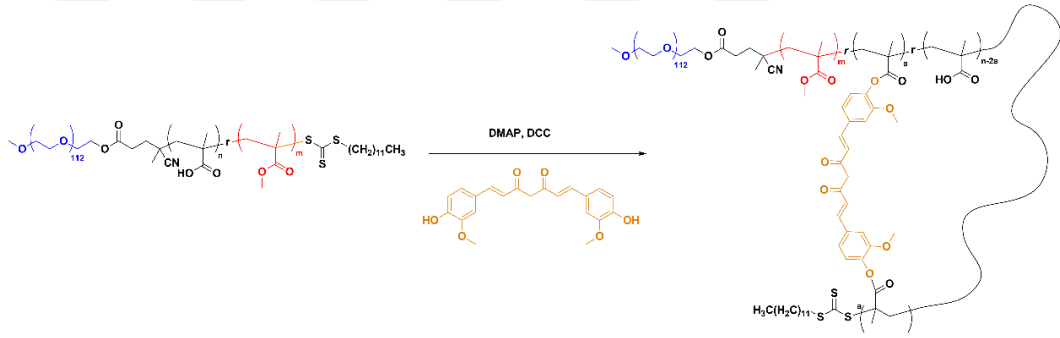
Şekil 4.71 : PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA)-1 polimerinin DSC grafiği.



Şekil 4.72 : PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA)-2 polimerinin DSC grafiği.

4.3.2 Cur ile PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA) kopolimelerinden TSCNP'lerin oluşturulması ve karakterizasyonu

İribaş TSCNP'ler, sentezlenen amfifilik kopolimerlerin MAA ünitelerinin bir kısmının Cur ile çapraz bağlanması sonucunda oluşturuldu (Şekil 4.73). Sentezlenen PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA)-1 polimeri ve DMAP kuru DCM içerisinde N₂ altında 24 saat karışıma bırakıldı. Ardından Cur ve kuru DCM içerisinde DCC karışımı şırınga pompası kullanılarak 5 mL/saat enjeksiyon hızında N₂ altında damlatıldı. Damlatma işlemi bittikten sonra oda sıcaklığında 48 saat karanlık ortamda karışıma bırakıldı. Reaksiyon sonunda DCM'in büyük kısmı uçurularak kalan kısım dietil eter içerisinde çöktürüldü ve TSCNP'ler çözücünün dekante edilmesi ve katı malzemenin Cur'in tamamen uzaklaştırılabilmesi için dietil eter ile yıkanarak kurutulması sonucunda elde edildi. Elde edilen TSCNP'ler GPC, DLS, UV, DSC ve TEM ile karakterize edildi.



Şekil 4.73 : Cur ile PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA) kopolimelerinden iribaş yapılı TSCNP'lerin oluşturulması.

TSCNP'lerin sentezi için kullanılan farklı konsantrasyonlar ve farklı [Cur]/[PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA)] oranları ile elde edilen TSCNP'lerin GPC ve DLS sonuçları Tablo 4.8'de karşılaştırılmıştır.

İribaş yapılı TSCNP oluşturulmasında ilk aşamada yüzey alanındaki küçülme sebebiyle GPC ölçümleri sonucunda elde edilen molekül ağırlığında azalma görülmesi beklenmektedir. PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA)-1 ile elde edilen TSCNP'lerden TSCNP-1 haricindeki diğerlerinde küçülme gözlemlendi (Şekil 4.74) ve ikinci basamak kabul edilen DLS ölçümleri gerçekleştirildi. DLS verilerinde de GPC sonucuna benzer şekilde küçülme beklenmektedir. Elde edilen verilere bakıldığında TSCNP-2'nin DLS ile ölçülen partikül boyutunda azalma görüldü. GPC ve DLS sonuçları göz önünde bulundurularak polimerin molekül ağırlığına göre en ideal küçülme TSCNP-2'de gözlemlendi. PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA)-2 kopolimeri ile oluşturulan TSCNP'lerden

ise GPC ve DLS sonuçlarına bakılarak polimerin molekül ağırlığına göre en ideal küçülme TSCNP-5 gözlemlendi (Şekil 4.75).

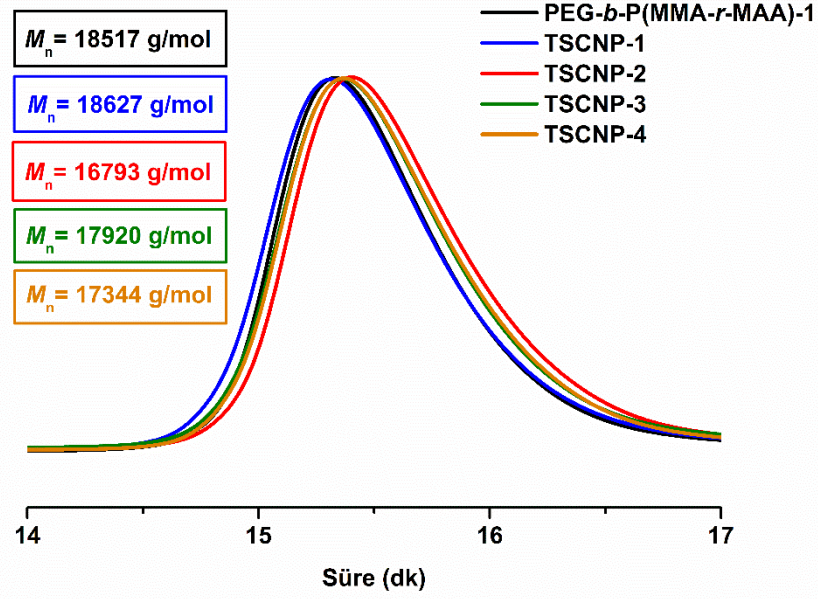
Tablo 4.8 : PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA)-1 ve PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA)-2 kopolimerleri ile Cur kullanılarak sentezlenen TSCNP'lerin oluşma koşulları ve sonuçları.

Kod	Konsantrasyon ^a (mg/mL)	[Cur]/ [PEG- <i>b</i> -(MMA- <i>r</i> - MAA)]	$M_{n,GPC}^b$ (g/mol)	Partikül Boyutu ^c (nm)
PEG- <i>b</i> -P(MMA- <i>r</i> -MAA)-1	-	-	18517	6.53 ± 0.43
TSCNP-1	0.33	3	18625	7.35 ± 0.19
TSCNP-2	0.2	3	16791	6.16 ± 0.66
TSCNP-3	0.2	5	17920	7.24 ± 0.78
TSCNP-4	0.2	7	17334	6.64 ± 0.60
PEG- <i>b</i> -P(MMA- <i>r</i> -MAA)-2	-	-	19722	6.81 ± 0.61
TSCNP-5	0.2	3	18923	6.50 ± 0.22
TSCNP-6	0.2	5	19355	8.34 ± 0.60

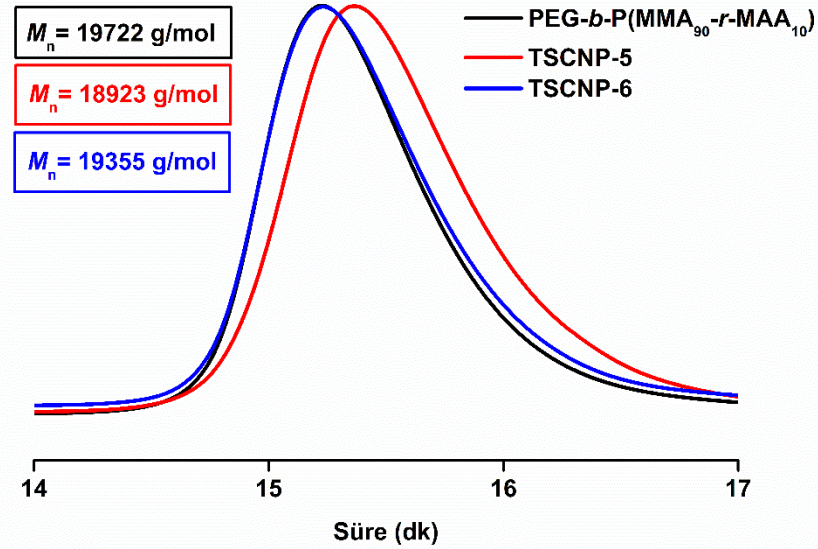
^a DCM içerisinde hazırlanmıştır.

^b GPC ile THF içerisinde 35°C'de ölçülmüştür

^c DLS ölçümü sonucunda elde edilmiştir.



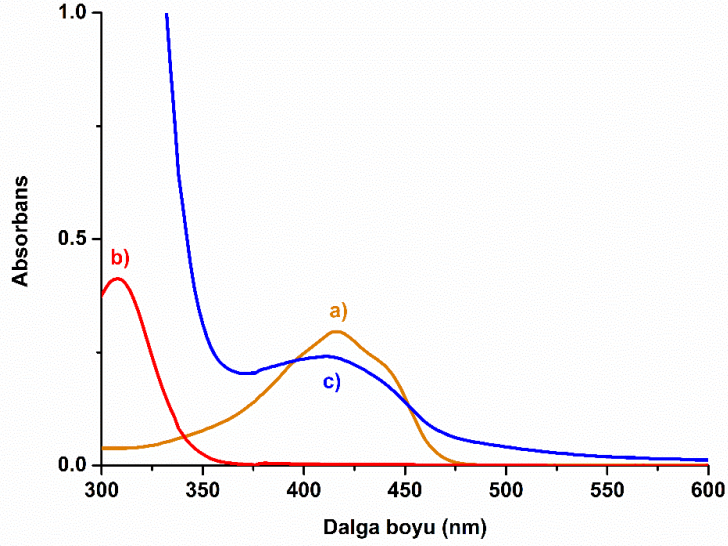
Şekil 4.74 : PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA)-1 kopolimeri ve TSCNP'lerin THF GPC kromatogramları.



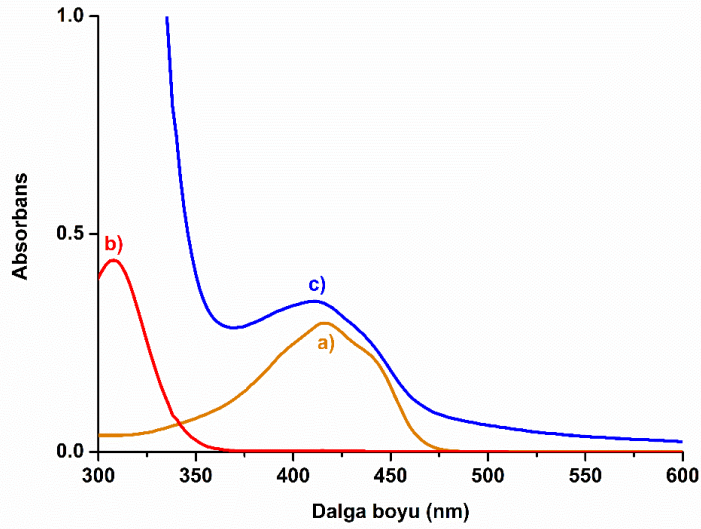
Şekil 4.75 : PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA)-2 kopolimeri ve TSCNP'lerin THF GPC kromatogramları.

DCM'de içerisinde belli bir konsantrasyonda hazırlanan Cur, PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA)-1, TSCNP-2, PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA)-2 ve TSCNP-5'in UV spektrumları

karşılaştırıldı. Aşağıda verilen Şekil 4.76 ve 4.77 incelendiğinde PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA)-1'de ve PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA)-2'de Cur'in 424 nm'de gözlenmeyen absorpsiyon pikinin TSCNP-2'de ve TSCNP-5'te gözlendiği görülmektedir.



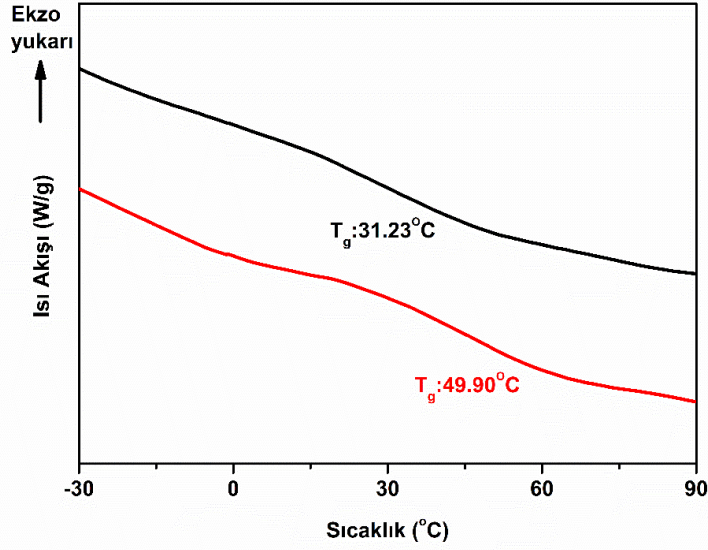
Şekil 4.76 : a) Cur (0.002 mg/mL), b) PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA)-1 (7 mg/mL) ve c) TSCNP-2'nin (7 mg/mL) DCM içerisinde çekilmiş UV spektrumları.



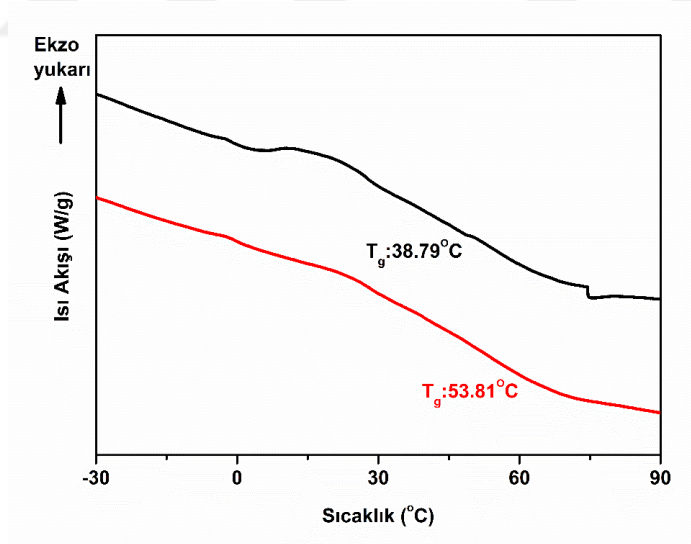
Şekil 4.77 : a) Cur (0.002 mg/mL), b) PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA)-2 (10 mg/mL) ve c) TSCNP-5'in (10 mg/mL) DCM içerisinde çekilmiş UV spektrumları.

Her iki polimerin ve bu polimerlerden oluşturulan TSCNP-2 ve TSCNP-5'in termal davranışları DSC ile incelenerek Şekil 4.78 ve 4.79'da verilmiştir. DSC grafiklerinde PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA)-1'in T_g değerinin 31.23°C ve TSCNP-2'nin T_g değerinin 49.90°C olduğu, PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA)-2'nin T_g değerinin 38.79°C ve TSCNP-5'in

T_g değerinin 53.81°C olduğu görülmektedir. T_g değerinde gözlenen bu artış TSCNP oluşumu desteklemektedir.

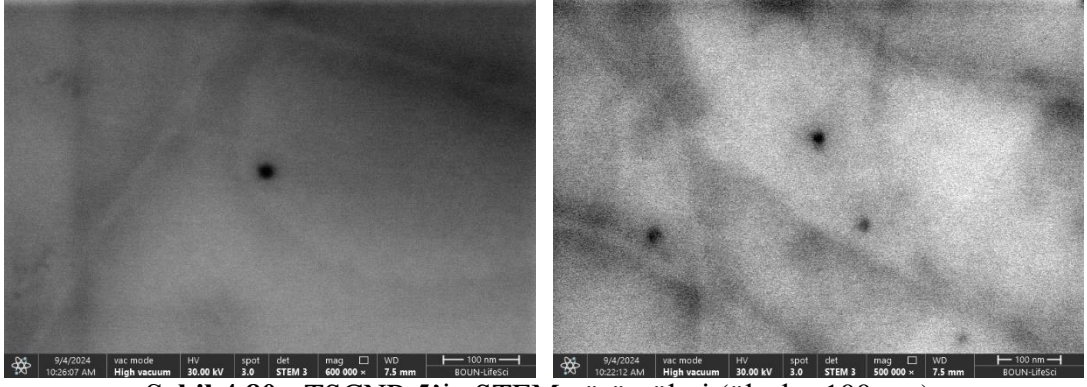


Şekil 4.78 : PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA)-1'in (siyah) ve TSCNP-2'nin (kırmızı) DSC grafikleri.



Şekil 4.79 : PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA)-2'nin (siyah) ve TSCNP-5'in (kırmızı) DSC grafiği.

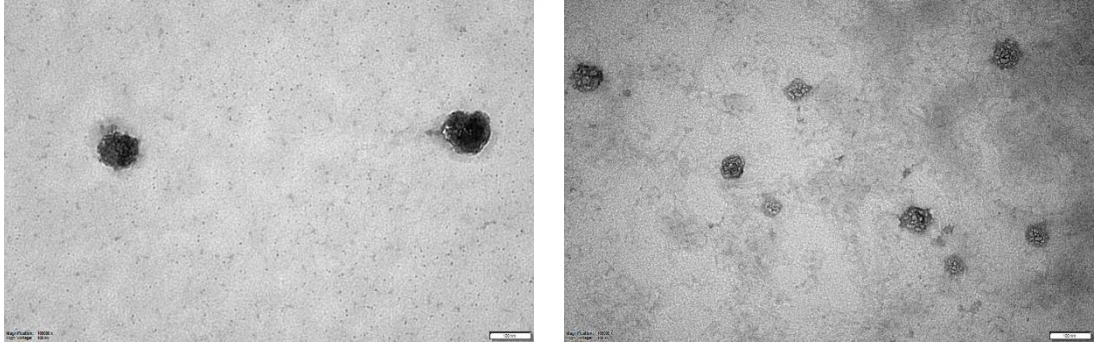
Son olarak, TSCNP-5'in morfolojisi TEM ile görüntülendi (Şekil 4.80) ve TSCNP-5'in 10-30 nm çapında monodispers ve küresel yapıda olduğu belirlendi.



Şekil 4.80 : TSCNP-5'in STEM görüntüleri (ölçek= 100 nm)

4.3.3 TSCNP'ler ile boş ve DOKS yüklü misellerin oluşturulması ve karakterizasyonu

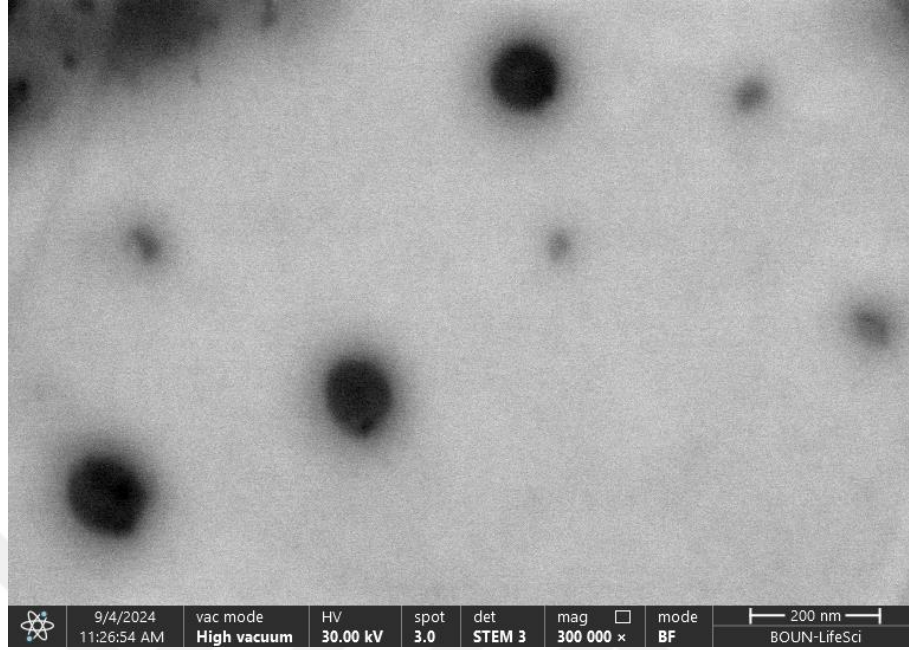
TSCNP-2 ve TSCNP-5 kullanılarak diyaliz yöntemi ile miseller oluşturuldu. Elde edilen misellerin karakterizasyonu için DLS ve TEM kullanıldı. DLS ölçümleri için misellerin 1 mg/mL olacak şekilde sulu çözeltileri hazırlandı. Yapılan ölçümler sonucunda misellerin ortalama partikül boyutlarının $M_{TSCNP-2}$ için 23.18 ± 1.88 nm ve $M_{TSCNP-5}$ için 35.13 ± 1.77 nm olduğu tespit edildi. Misellerin morfolojisi TEM ile görüntülendi (Şekil 4.81).



Şekil 4.81 : $M_{TSCNP-2}$ (sol) ve $M_{TSCNP-5}$ (sağ) miselinin TEM görüntüleri (ölçek= 100 nm).

Polimerlerin hidrofobik bileşenleri ile ilaç arasındaki hidrofobik etkileşimler ilaç kapsüllenmesinde ana itici güç olduğundan, DOKS yüklemesi için diyaliz yöntemini kullanıldı. $M_{TSCNP-5}$ miseli DOKS yüklemesinden sonra parçacık boyutunda ciddi bir artış gözlemlendi. Yapılan ölçümler sonucunda misellerin ortalama partikül boyutu 112.3 ± 6.92 nm olduğu tespit edildi. DOKS yüklü $M_{TSCNP-5}$ misellerinin morfolojisi de TEM ile incelenerek Şekil 4.82'de verildi. İYK ve İYV değerleri, daha önce oluşturulmuş kalibrasyon eğrileri kullanılarak numunelerin 485 nm'deki emiliminin

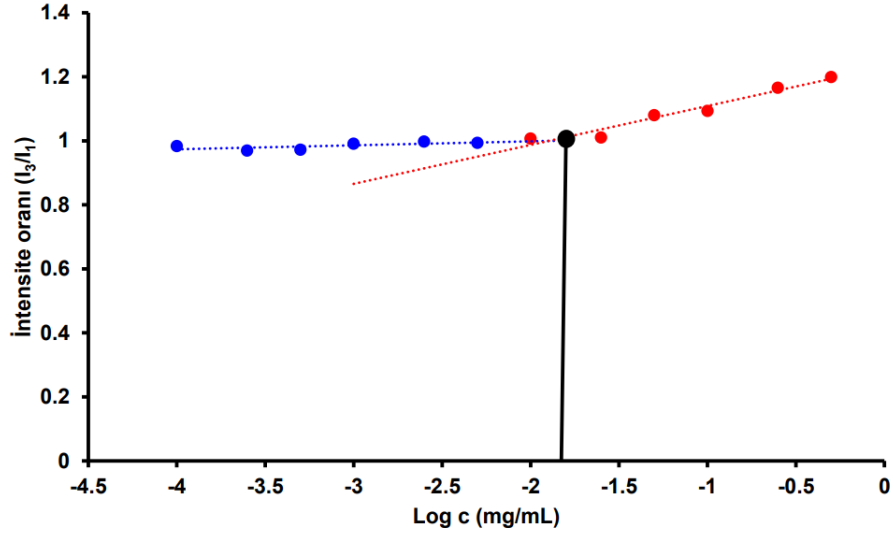
belirlenmesiyle hesaplandı. DOKS, %6'lık İYK ve %20'lik İYV'de $M_{TSCNP-5}$ misellerine iyi bir şekilde kapsüllendi.



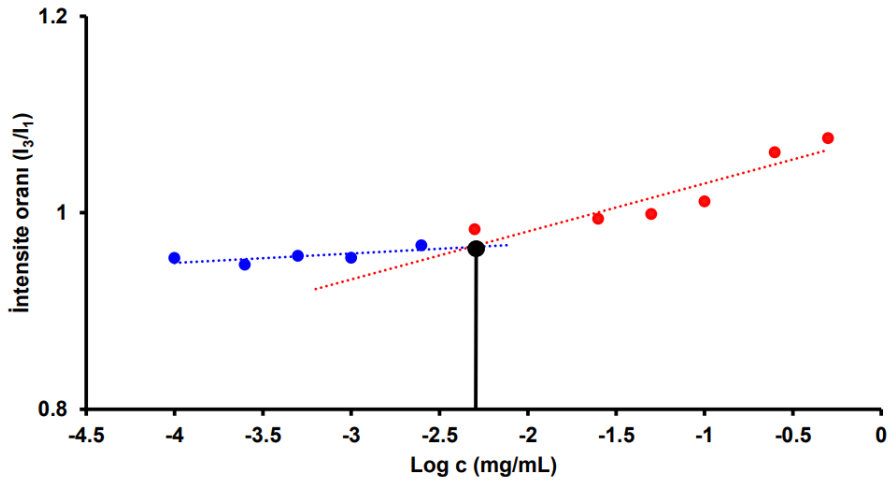
Şekil 4.82 : DOKS yüklü $M_{TSCNP-5}$ miselinin STEM görüntüleri (ölçek= 200 nm).

4.3.4 KMK'nın belirlenmesi

KMK'nın belirlenmesi için giderek azalan farklı konsantrasyondaki misel çözeltilerinin içine floresan özelliği olan piren molekülü eklendi ve ELISA ile floresans ölçümü alındı. Çözeltiler 334 nm'de uyarılarak 384 nm ve 373 nm'deki intensite değerleri oranlandı (I_3/I_1). Bu intensite oranı TSCNP konsantrasyonunun logaritmasına karşı grafiğe geçirilerek en uygun iki doğrunun kesişim noktasından sulu ortamda kararlı misellerin oluşumu için gereken minimum TSCNP konsantrasyonuna karşılık gelen kritik misel konsantrasyonu $M_{TSCNP-2}$ ve $M_{TSCNP-5}$ için sırasıyla 12.66 $\mu\text{g/mL}$ (Şekil 4.83) ve 1.21 $\mu\text{g/mL}$ (Şekil 4.84) olarak belirlendi. Gözlemlenen düşük KMK değerleri sebebiyle TSCNP-5'den elde edilen misellerinin çok düşük kopolimer konsantrasyonlarında stabil kalabileceğini ve bunun da ilacın dolaşım süresini artırabileceğini gösterdi. Bu sebeple de DOKS yüklemek için TSCNP-5'in kullanılmasına karar verildi.



Şekil 4.83 : $M_{TSCNP-2}$ 'nin sulu çözelti konsantrasyonunun (mg/mL) logaritmasına karşı floresans yoğunluk oranının I_3/I_1 grafiği.

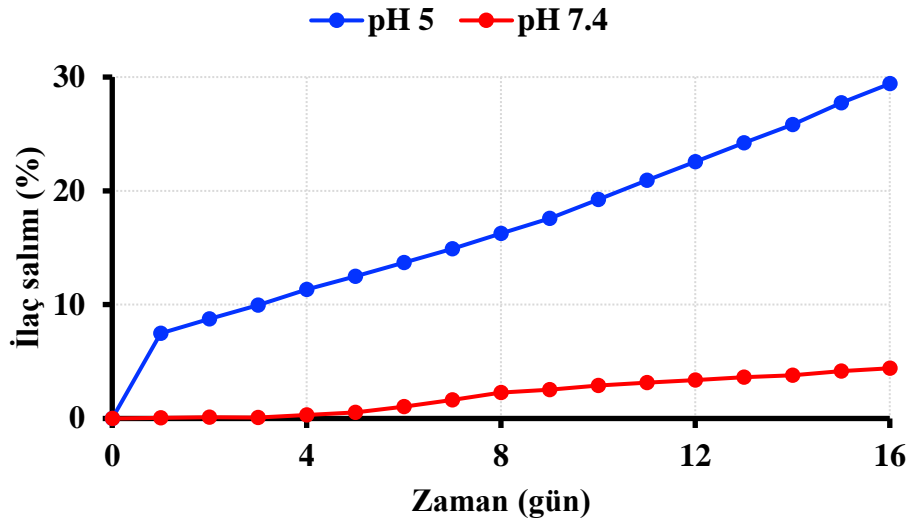


Şekil 4.84 : $M_{TSCNP-5}$ 'in sulu çözelti konsantrasyonunun (mg/mL) logaritmasına karşı floresans yoğunluk oranının I_3/I_1 grafiği.

4.3.5 $M_{TSCNPDOKS}$ 'un ilaç salım çalışması

Elde edilen miselin ilaç taşıyıcı olarak potansiyellerini tespit etmek için daha önceden oluşturulmuş DOKS yüklü miselin ilaç salım çalışması pH'a bağlı olarak PBS tampon çözeltisi içinde (pH= 7.4 ve pH= 5.0) içinde 37°C'de inkübe edilerek incelendi. Medyumlardan belirlenen süreler içerisinde örnekler alındı ve ELISA cihazı kullanılarak ölçümleri yapıldı. Kümülatif olarak birleştirilen sonuçlar sonrasında Şekil 4.85'te gösterildiği üzere TSCNP-5'ten elde edilen DOKS yüklü misellerin salım grafikleri elde edildi. Yapılan salım çalışmasında miselden pH 7.4'te salınan DOKS

miktarı %5 gibi bir oran ile ihmal edilebilir düzeydeydi. Salım ortamı pH'ı 5.0'e düşürüldüğünde, misel ilacı salmaya başladı ve salınan DOKS miktarı %29 oranına ulaştı. Bu tür farklılıklar, DOKS'un kan dolaşımı sırasında kapsüllenmesine ve asidik tümör bölgelerine ulaştıktan sonra salınmasına izin veren ilgili misellerden DOKS salımının pH bağımlılığını doğrulamaktadır. pH 7.4'te, polimer ile DOKS π - π etkileşimleriyle güçlü bir şekilde tutunduğu için DOKS tamamen hidrofobik çekirdek tarafından yakalandı [199]. Öte yandan, pH 5.0'te π - π etkileşimleri azalmakta ve bu da DOKS'un kaçmasına neden olmaktadır.

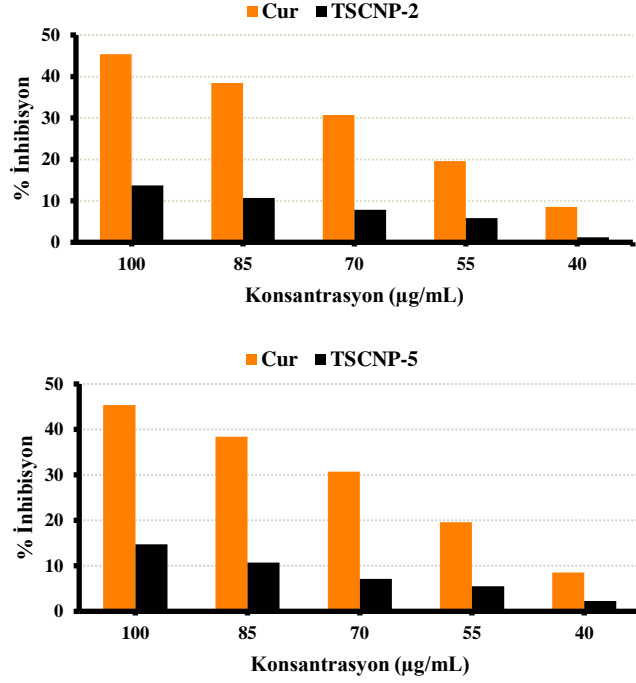


Şekil 4.85 : $M_{TSCNP_{DOKS}}$ 'un 37°C'de PBS tampon çözeltisinde (pH= 7.4 ve pH= 5.0) içindeki *in vitro* salım grafiği.

4.3.6 Antioksidan aktivite tayini

Antioksidan aktivite tayini için DPPH metodu radikal temizleme aktivitesini belirleyerek kimyasal bileşiklerin antioksidasyonunu ölçmek için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. TSCNP'lerin antioksidan kapasitesini test etmek için Cur ve taşıyıcı sistemler üzerinde bir DPPH radikal temizleme testi gerçekleştirildi. Şekil 4.86'da görüldüğü üzere yapılan taşıyıcılarda, Cur konsantrasyonunun artmasıyla DPPH radikalleri üzerinde artan temizleme aktivitesi gösterdi. Cur'in, polimerlere konjugasyonu radikal temizleme yeteneklerini azaltır. Yapılan önceki çalışmalar, Cur'in antioksidan aktivitesinin iki fenolik hidroksil grubu ve bir β -diketon kısmından bir enol dahil olmak üzere benzersiz reaktif gruplarından kaynaklandığını doğruladı. Napnopartiküllerin azaltılmış antioksidan kapasitesi, büyük olasılıkla molekülü bağlamak için Cur üzerindeki her iki fenol kısmının kullanılmasından

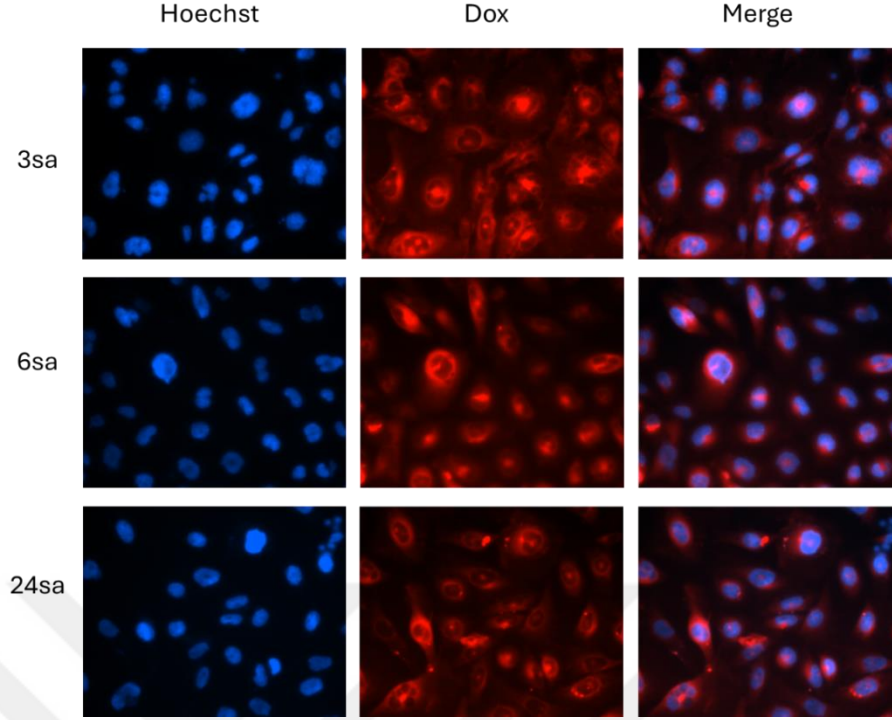
kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte, bağı Cur molekülleri, radikal söndürme reaksiyonlarına katkıda bulunan β -diketon kısmının antioksidan aktivitesini yansıtır.



Şekil 4.86 : TSCNP-2, TSCNP-5 ve Cur'in DPPH radikal giderme metodu ile belirlenen antioksidan aktivite grafikleri.

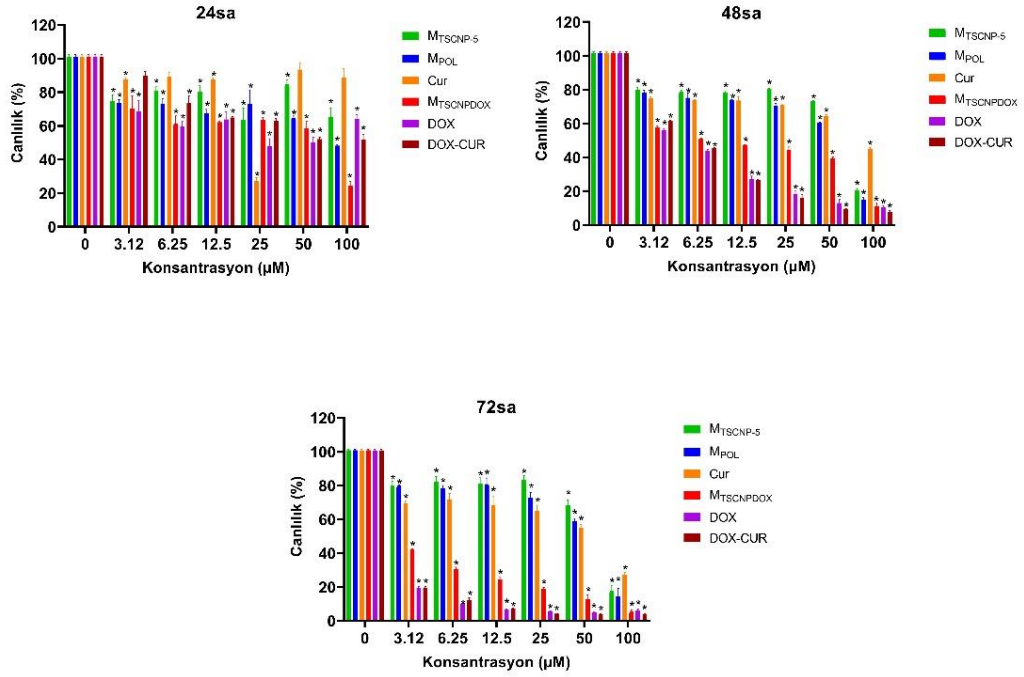
4.3.7 $M_{\text{TSCNPDOKS}}$ 'un *in vitro* hücresel alımı ve sitotoksitesi

Şekil 4.87'de $M_{\text{TSCNPDOKS}}$ 'un 3, 6 ve 24 saat inkübasyon sonrasında MDA-MB-231 hücreleri tarafından *in vitro* hücresel alımını göstermektedir. Hücreler $10 \mu\text{M}$ $M_{\text{TSCNPDOKS}}$ ile inkübe edildi. Ardından yıkandı, Hoechst boyama ile boyandı ve görüntüleme $40\times$ büyütmede floresan mikroskopisi (Zeiss Axio Observer Z1) kullanılarak görüntülendi. Mavi kanal Hoechst floresansını, kırmızı kanal ise DOKS floresansını tespit etmiştir. Floresan görüntüleri, tüm zaman noktalarında önemli alım olduğunu ve hücrelerde 24 saate kadar DOKS birikimini gösteren kalıcı kırmızı floresan sinyalini ortaya koymaktadır.



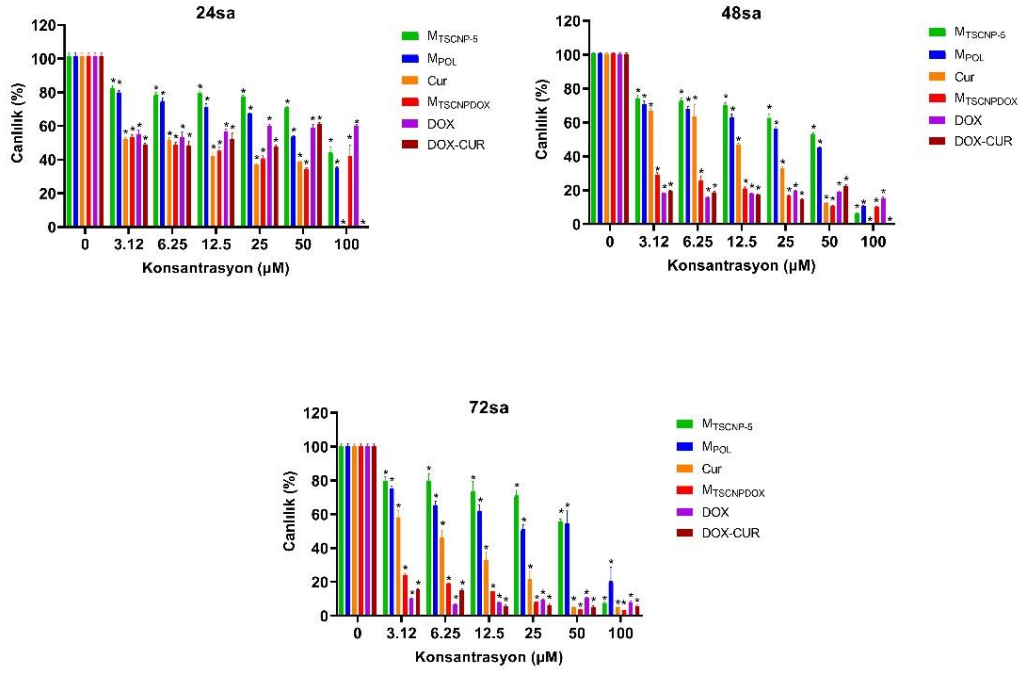
Şekil 4.87 : $M_{TSCNPDOKS}$ 'un MDA-MB-231 hücreleri tarafından hüresel alımı. MDA-MB-231 hücreleri $10 \mu M$ $M_{TSCNPDOKS}$ ile muamele edilerek 3, 6 ve 24 saat inkübe edildi.

$100 \mu M$ ile $3.125 \mu M$ arasında değişen konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saat boyunca $M_{TSCNP-5}$, M_{POL} , Cur, $M_{TSCNPDOKS}$, DOKS ve DOKS-Cur ile inkübe edilen MDA-MB-231 hücreleri için canlılık testi sonuçları Şekil 4.88'de gösterilmiştir. Hücre canlılığı, tüm bileşikler için zamana ve konsantrasyona bağlı bir şekilde azaldı ve en belirgin azalmalar 72 saat sonra gözlemlendi. $M_{TSCNP-5}$, M_{POL} , Cur sınırlı sitotoksosite gösterdi ve hücre canlılığını çoğu konsantrasyon ve zaman noktasında %60'ın üzerinde tuttu. Buna karşılık, $M_{TSCNPDOKS}$ daha yüksek sitotoksosite gösterdi ve çoğu zaman noktasında serbest DOKS ve DOKS-Cur'e oldukça benzedi. $M_{TSCNPDOKS}$ 'un en yüksek sitotoksitesisi, özellikle daha yüksek konsantrasyonlarda 72 saatte gözlemlendi. Özellikle, $M_{TSCNPDOKS}$ 'un serbest DOKS ve DOKS-Cur'e kıyasla 24 saatte daha fazla sitotoksosite gösterdiği, bunun da muhtemelen doksorubisinin akut salınımından kaynaklandığı dikkat çekicidir.



Şekil 4.88 : $M_{TSCNP-5}$, M_{POL} , Cur, $M_{TSCNPDOX}$, DOX ve DOX-Cur ile 100 μM ile 3.125 μM arasında değişen konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saat inkübe edilen MDA-MB-231 hücrelerinin canlılığı. Hücre canlılığı MTT testi kullanılarak değerlendirildi ve 570 nm'de emilim ölçüldü.

100 μM ile 3.125 μM arasında değişen konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saat boyunca $M_{TSCNP-5}$, M_{POL} , Cur, $M_{TSCNPDOX}$, DOX ve DOX-Cur'in sağlıklı CCD-986Sk hücreleri için canlılık testi sonuçları Şekil 4.89'da gösterilmiştir. MDA-MB-231 hücrelerine benzer şekilde, hücre canlılığı zamana ve konsantrasyona bağlı bir şekilde azaldı. $M_{TSCNP-5}$ ve M_{POL} , daha düşük konsantrasyonlarda canlılığı %60'ın üzerinde tutarak minimal sitotoksositeye neden oldu. $M_{TSCNPDOX}$, serbest DOX ve DOX-Cur ile karşılaştırılabilir sitotoksosite gösterdi ve canlılıktaki en büyük azalma daha yüksek konsantrasyonlarda ve 72 saatte gözlemlendi. İlginç bir şekilde, Cur, özellikle yüksek konsantrasyonlarda, MDA-MB-231 hücrelerine kıyasla CCD-986Sk hücrelerinde biraz daha yüksek sitotoksosite gösterdi.



Şekil 4.89 : MTSCNP-5, MPOL, Cur, MTSCNPDOX, DOX ve DOX-Cur ile 100 µM ile 3.125 µM arasında değişen konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saat inkübe edilen CCD-986Sk hücrelerinin canlılığı. Hücre canlılığı MTT testi kullanılarak değerlendirildi ve 570 nm'de emilim ölçüldü.

5. SONUÇ

İlk çalışmada sisplatin konjuge SCNP'ler sentezlenmeye çalışılmış ancak çözücü ortamının su olması nedeniyle SCNP'lerin eldesinde agregasyon sorunları; polimer içinde gerçekleşen hidrojen bağları kaynaklı farklı boyutlarda istenmeyen çökme oluşumlarının gözlenmesi gibi sebeplerden başarılı sonuçlar elde edilememiştir.

İkinci çalışmada Cur konjuge SCNP'lerin oluşturulması için RAFT polimerizasyonu yoluyla P(PEGMA-*r*-BrMA) hidrofilik kopolimeri sentezlenmiştir. Öncü kopolimer ile çapraz bağlayıcı olarak Cur kullanılmasıyla Williamson eterifikasyonu yoluyla SCNP oluşumu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen SCNP'ler GPC, DLS ve TEM analizleriyle doğrulandığı gibi iyi tanımlanmış yapılar sergilemiş ve fizyolojik ve tümör simülasyonu koşulları altında kontrollü Cur salımı göstermiştir. Yapılan hücre testlerinde SCNP yüksek hücresel alım ve seçici antikanser aktivite gösterirken, polimerin tek başına sağlıklı hücrelerde güvenli olduğu gösterilmiştir.

Son olarak Cur konjuge iribaş yapıları TSCNP'lerin oluşturulması için RAFT polimerizasyonu yoluyla PEG-*b*-P(MMA-*r*-MAA) amfifilik kopolimeri sentezlenmiştir. Bu polimerler ile Cur molekülünün Fischer esterifikasyonu yoluyla TSCNP oluşumu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen TSCNP'ler GPC, DLS ve TEM analizleriyle doğrulandığı gibi iyi tanımlanmış yapılar sergilemiş ve fizyolojik ve tümör simülasyonu koşulları altında kontrollü Cur salınımı göstermiştir. TSCNP'lerde karşılaşılan düşük Cur yükleme kapasitesini desteklemek amacıyla DOKS ile kombine çalışmalarını değerlendirmek için TSCNP-5'den DOKS yüklü misel oluşturulmuştur ve bu yapılarda fizyolojik ve tümör simülasyonu koşulları altında kontrollü DOKS salınımı göstermiştir. Yapılan hücre testlerinde M_{TSCNP} 'nin yüksek hücresel alım ve seçici antikanser aktivitesi gösterirken, polimer tek başına sağlıklı hücrelerde güvenlik göstermiştir. Bu sonuçlar Cur konjuge SCNP ve TSCNP'lerin ilaç taşıyıcılar olarak umut verici adaylar olduklarını göstermiştir. Farklı kanser modelleri ve terapötik

uygulamalar genelinde etkinliklerini keşfetmek için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.



KAYNAKLAR

- [1] **Duncan, R., Kreyling, W., Biosseau, P., Cannistraro, S., Coatrieux, J., Conde, J., Hennick, W., Oberleithner, H. and Rivas, J.** (2005). ESF scientific forward look on nanomedicine. *Eur Sci Found Policy Brief*, 1-6.
- [2] **Mukherjee, A. and Bhattacharyya, S.** (2020). Nanotechnology in medicine. *Biotechnology business-concept to delivery*, 57-64.
- [3] **Hu, W., Ying, M., Zhang, S. and Wang, J.** (2018). Poly (amino acid)-based carrier for drug delivery systems. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 14(8), 1359-1374.
- [4] **Glavas, L., Olsén, P., Odelius, K. and Albertsson, A.-C.** (2013). Achieving micelle control through core crystallinity. *Biomacromolecules*, 14(11), 4150-4156.
- [5] **Alani, A. W., Bae, Y., Rao, D. A. and Kwon, G. S.** (2010). Polymeric micelles for the pH-dependent controlled, continuous low dose release of paclitaxel. *Biomaterials*, 31(7), 1765-1772.
- [6] **Aiertza, M. K., Odriozola, I., Cabañero, G., Grande, H.-J. and Loinaz, I.** (2012). Single-chain polymer nanoparticles. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69, 337-346.
- [7] **Brown, W. H. and Poon, T.** (2016). *Introduction to organic chemistry*. John Wiley & Sons.
- [8] **Young, R. J. and Lovell, P. A.** (2011). *Introduction to polymers*. CRC press.
- [9] **Stevens, M. P.** (1999). *Polymer chemistry: an introduction. (No Title)*.
- [10] **Billmeyer, F. W.** (1984). *Textbook of polymer science*. John Wiley & Sons.
- [11] **Kiliman, L. B.** (1992) *Spacer Groups in Functionally Substituted Polymers*: Polytechnic University.
- [12] **Liu, X., Fan, R., Lu, B. and Le, Y.** (2018). Polypeptides micelles composed of methoxy-poly (ethylene glycol)-poly (L-glutamic acid)-poly (L-phenylalanine) triblock polymer for sustained drug delivery. *Pharmaceutics*, 10(4), 230.
- [13] **Hu, Z.-Y., Pu, H.-T. and Wu, J.-G.** (2021). Platinum atoms dispersed in single-chain polymer nanoparticles. *Chinese Journal of Polymer Science*, 39, 441-446.
- [14] **Sanchez-Sanchez, A., Arbe, A., Colmenero, J. and Pomposo, J. A.** (2014). Metallo-folded single-chain nanoparticles with catalytic selectivity. *ACS Macro Letters*, 3(5), 439-443.
- [15] **Khuphe, M. and Thornton, P. D.** (2018). University of Leeds, Leeds, West Yorkshire, United Kingdom. *Engineering of Biomaterials for Drug Delivery Systems: Beyond Polyethylene Glycol*, 199.
- [16] **Vadivelu, M., Kumar, C. R. and Joshi, G. M.** (2016). Polymer composites for thermal management: a review. *Composite Interfaces*, 23(9), 847-872.
- [17] **Mehta, R., Manna, P. and Bhattacharya, A.** (2019). *Encyclopedia of Polymer Applications, 3 Volume Set*.

- [18] **Odian, G. G.** (2004). *Principles of polymerization*. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience.
- [19] **Hasirci, V., Yigor, P., Endogan, T., Eke, G. and Hasirci, N.** (2011). Polymer Fundamentals: Polymer Synthesis. Vol. 1, pp. 349-371):
- [20] **Soroush, M. and Grady, M. C.** (2019). Chapter 1 - Polymers, Polymerization Reactions, and Computational Quantum Chemistry. In M. Soroush, (Ed.). *Computational Quantum Chemistry* pp. 1-16): Elsevier.
- [21] **Allen, G., Bevington, J. C., Aggarwal, S. L. and Russo, S.** (1989). Comprehensive polymer science: the synthesis, characterization, reactions & applications of polymers. (*No Title*).
- [22] **Tanzi, M., Fare, S. and Candiani, G.** (2019). Chapter 1-Organization, structure, and properties of materials. *Foundations of Biomaterials Engineering*, 3–103.
- [23] **Tsuruta, T. and Editör Mustafaev, M.** (2001). Polimer Kimyası, 24. *Baskı Seç Yayın Dağıtım, İstanbul*, 4-14.
- [24] **Misra, G. and Bajpai, U.** (1982). Redox polymerization. *Progress in Polymer Science*, 8(1-2), 61-131.
- [25] **Billmeyer, F.** (1984). *Textbook of polymer science*. John Wiley & Sons.
- [26] **Matyjaszewski, K., Gaynor, S., Greszta, D., Mardare, D. and Shigemoto, T.** (1995). ‘Living’ and controlled radical polymerization. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 8(4), 306-315.
- [27] **Matyjaszewski, K. and Braunecker, W.** (2009). Radical polymerization. *Controlled and living polymerizations: from mechanisms to applications*, 103-166.
- [28] **Braunecker, W. A. and Matyjaszewski, K.** (2007). Controlled/living radical polymerization: Features, developments, and perspectives. *Progress in polymer science*, 32(1), 93-146.
- [29] **Qu, Z., Hu, F., Chen, K., Duan, Z., Gu, H. and Xu, H.** (2013). A facile route to the synthesis of spherical poly (acrylic acid) brushes via RAFT polymerization for high-capacity protein immobilization. *Journal of colloid and interface science*, 398, 82-87.
- [30] **Duong, T. H., Bressy, C. and Margailan, A.** (2014). Well-defined diblock copolymers of poly (tert-butyldimethylsilyl methacrylate) and poly (dimethylsiloxane) synthesized by RAFT polymerization. *Polymer*, 55(1), 39-47.
- [31] **Ozturk, T. and Cakmak, I.** (2008). Synthesis of poly (ethylene glycol-b-styrene) block copolymers by reverse atom transfer radical polymerization. *Journal of Polymer Research*, 15, 241-247.
- [32] **Feldermann, A., Toy, A. A., Phan, H., Stenzel, M. H., Davis, T. P. and Barner-Kowollik, C.** (2004). Reversible addition fragmentation chain transfer copolymerization: influence of the RAFT process on the copolymer composition. *Polymer*, 45(12), 3997-4007.
- [33] **Smulders, W. W., Jones, C. W. and Schork, F. J.** (2004). Synthesis of block copolymers using RAFT miniemulsion polymerization in a train of CSTRs. *Macromolecules*, 37(25), 9345-9354.
- [34] **Hermanson, K. D., Liu, S. and Kaler, E. W.** (2006). Kinetic modeling of controlled living microemulsion polymerizations that use reversible addition–fragmentation chain transfer. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 44(20), 6055-6070.

- [35] **Goto, A. and Fukuda, T.** (2004). Kinetics of living radical polymerization. *Progress in Polymer Science*, 29(4), 329-385.
- [36] **Tsujii, Y., Ohno, K., Yamamoto, S., Goto, A. and Fukuda, T.** (2006). Structure and properties of high-density polymer brushes prepared by surface-initiated living radical polymerization. *Surface-initiated polymerization I*, 1-45.
- [37] **Öztürk, T., Gökteş, M. and Hazer, B.** (2010). Synthesis and characterization of poly (methyl methacrylate-block-ethylene glycol-block-methyl methacrylate) block copolymers by reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 48(1), 65-70.
- [38] **Chiefari, J., Chong, Y., Ercole, F., Krstina, J., Jeffery, J., Le, T. P., Mayadunne, R. T., Meijs, G. F., Moad, C. L. and Moad, G.** (1998). Living free-radical polymerization by reversible addition-fragmentation chain transfer: the RAFT process. *Macromolecules*, 31(16), 5559.
- [39] **Moad, G., Rizzardo, E. and Thang, S. H.** (2005). Living radical polymerization by the RAFT process. *Australian journal of chemistry*, 58(6), 379-410.
- [40] **Barner-Kowollik, C.** (2008). *Handbook of RAFT polymerization*. John Wiley & Sons.
- [41] **Zhu, J., Zhou, D., Zhu, X. and Chen, G.** (2004). Reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization of glycidyl methacrylate with 2-cyanoprop-2-yl 1-dithionaphthalate as a chain-transfer agent. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 42(10), 2558-2565.
- [42] **An, Z., Shi, Q., Tang, W., Tsung, C.-K., Hawker, C. J. and Stucky, G. D.** (2007). Facile RAFT precipitation polymerization for the microwave-assisted synthesis of well-defined, double hydrophilic block copolymers and nanostructured hydrogels. *Journal of the American Chemical Society*, 129(46), 14493-14499.
- [43] **Li, J., Jiang, T.-T., Shen, J.-n. and Ruan, H.-M.** (2012). Preparation and Characterization of PMMA and its Derivative via RAFT Technique in the Presence of Disulfide as a Source of Chain Transfer Agent. *Journal of Membrane and Separation Technology*, 1(2), 117.
- [44] **Chiefari, J., Mayadunne, R. T., Moad, C. L., Moad, G., Rizzardo, E., Postma, A., Skidmore, M. A. and Thang, S. H.** (2003). Thiocarbonylthio compounds (SC (Z) S- R) in free radical polymerization with reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT Polymerization). Effect of the activating group Z. *Macromolecules*, 36(7), 2273-2283.
- [45] **Lai, J. T., Filla, D. and Shea, R.** (2002). Functional polymers from novel carboxyl-terminated trithiocarbonates as highly efficient RAFT agents. *Macromolecules*, 35(18), 6754-6756.
- [46] **Semsarilar, M. and Abetz, V.** (2021). Polymerizations by RAFT: Developments of the Technique and Its Application in the Synthesis of Tailored (Co) polymers. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 222(1), 2000311.
- [47] **Lu, L., Zhang, H., Yang, N. and Cai, Y.** (2006). Toward rapid and well-controlled ambient temperature RAFT polymerization under UV- vis radiation: effect of radiation wave range. *Macromolecules*, 39(11), 3770-3776.
- [48] **Vasilieva, Y. A., Scales, C. W., Thomas, D. B., Ezell, R. G., Lowe, A. B., Ayres, N. and McCormick, C. L.** (2005). Controlled/living polymerization of

- methacrylamide in aqueous media via the RAFT process. *Journal of polymer science Part A: polymer Chemistry*, 43(14), 3141-3152.
- [49] **Göktaş, M.** (2010) *Tersinir/katımlı ayrışmalı zincir transfer polimerizasyonu ve halka açılma polimerizasyonu ile aynı anda ve tek basamakta gerçekleştirilen üç kollu blok kopolimerlerin sentezi: Fen Bilimleri Enstitüsü.*
- [50] **Jacobson, H. and Stockmayer, W. H.** (1950). Intramolecular reaction in polycondensations. I. The theory of linear systems. *The Journal of chemical physics*, 18(12), 1600-1606.
- [51] **ATMACA, H.** (2019) *ROP ve fotokimyasal polimerizasyon yöntemlerinin birleştirilmesi ile PLLA-PMMA ve PLLA-PCHO blok kopolimerlerin sentezi/Synthesis of PLLA-PMMA and PLLA-PCHO block copolymers by combination of ROP and photochemical polymerization methods*
- [52] **Öztürk, T., Göktaş, M., Atalar, M. N. and Hazer, B.** (2010). Aynı Anda Gerçekleştirilen Tersinir Ayrışmalı-Katımlı Zincir Transfer ve Halka Açılması Polimerizasyonu ile Blok-Graft Kopolimerlerin Sentezi ve Karakterizasyonu. *XXIV Ulusal Kimya Kongresi.*
- [53] **Saçak, M.** (2002). İletken polimerler. *Polimer Kimyası, Ankara Üniversitesi, Gazi Kitabevi, Ankara.*
- [54] **Penczek, S., Cypriak, M., Duda, A., Kubisa, P. and Słomkowski, S.** (2007). Living ring-opening polymerizations of heterocyclic monomers. *Progress in Polymer Science*, 32(2), 247-282.
- [55] **Seçkin, T.** (2015). *Polimer kimyası: fonksiyonel yaklaşım ve uygulamaları.* Seçkin Yayıncılık.
- [56] **Carothers, W. H., Dorough, G. and Natta, F. v.** (1932). Studies of polymerization and ring formation. X. The reversible polymerization of six-membered cyclic esters. *Journal of the American Chemical Society*, 54(2), 761-772.
- [57] **Li, C.-Y., Yu, C.-J. and Ko, B.-T.** (2013). Facile synthesis of well-defined titanium alkoxides based on benzotriazole phenoxide ligands: efficient catalysts for ring-opening polymerization of cyclic esters. *Organometallics*, 32(1), 172-180.
- [58] **Tsai, C.-Y., Du, H.-C., Chang, J.-C., Huang, B.-H., Ko, B.-T. and Lin, C.-C.** (2014). Ring-opening polymerization of cyclic esters initiated by zirconium, titanium and yttrium complexes. *RSC advances*, 4(28), 14527-14537.
- [59] **Mohanraj, V. and Chen, Y.** (2006). Nanoparticles-a review. *Tropical journal of pharmaceutical research*, 5(1), 561-573.
- [60] **Sharma, M., Pandey, C., Sharma, N., Kamal, M. A., Sayeed, U. and Akhtar, S.** (2018). Cancer nanotechnology-an excursion on drug delivery systems. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 18(15), 2078-2092.
- [61] **Torchilin, V. P.** (2006). Multifunctional nanocarriers. *Advanced drug delivery reviews*, 58(14), 1532-1555.
- [62] **Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M. and Nejati-Koshki, K.** (2013). Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale research letters*, 8, 1-9.
- [63] **Tomalia, D. A., Naylor, A. M. and Goddard Iii, W. A.** (1990). Starburst dendrimers: molecular-level control of size, shape, surface chemistry,

- topology, and flexibility from atoms to macroscopic matter. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 29(2), 138-175.
- [64] **Kwon, G. S.** (2003). Polymeric micelles for delivery of poorly water-soluble compounds. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 20(5).
- [65] **Silindir Gunay, M., Yekta Ozer, A. and Chalon, S.** (2016). Drug delivery systems for imaging and therapy of Parkinson's disease. *Current neuropharmacology*, 14(4), 376-391.
- [66] **Allen, T. M. and Cullis, P. R.** (2004). Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science*, 303(5665), 1818-1822.
- [67] **Wang, W., Li, W., Ma, N. and Steinhoff, G.** (2013). Non-viral gene delivery methods. *Current pharmaceutical biotechnology*, 14(1), 46-60.
- [68] **Kim, S. C., Kim, D. W., Shim, Y. H., Bang, J. S., Oh, H. S., Kim, S. W. and Seo, M. H.** (2001). In vivo evaluation of polymeric micellar paclitaxel formulation: toxicity and efficacy. *Journal of controlled release*, 72(1-3), 191-202.
- [69] **Duncan, R. and Gaspar, R.** (2011). Nanomedicine (s) under the microscope. *Molecular pharmaceutics*, 8(6), 2101-2141.
- [70] **Öztürk, N.** (2019). Hedeflendirilmiş Antikanser İlaç Yüklü Polimerik Nanotaşıyıcıların Formülasyonları ve Karakterizasyonları.
- [71] **Torchilin, V. P.** (2001). Structure and design of polymeric surfactant-based drug delivery systems. *Journal of controlled release*, 73(2-3), 137-172.
- [72] **Nishiyama, N., Matsumura, Y. and Kataoka, K.** (2016). Development of polymeric micelles for targeting intractable cancers. *Cancer science*, 107(7), 867-874.
- [73] **Shi, Y., Lammers, T., Storm, G. and Hennink, W. E.** (2017). Physico-chemical strategies to enhance stability and drug retention of polymeric micelles for tumor-targeted drug delivery. *Macromolecular bioscience*, 17(1), 1600160.
- [74] **Hanlon, A. M., Chen, R., Rodriguez, K. J., Willis, C., Dickinson, J. G., Cashman, M. and Berda, E. B.** (2017). Scalable synthesis of single-chain nanoparticles under mild conditions. *Macromolecules*, 50(7), 2996-3003.
- [75] **Huang, S.-Y. and Cheng, C.-C.** (2020). Spontaneous self-assembly of single-chain amphiphilic polymeric nanoparticles in water. *Nanomaterials*, 10(10), 2006.
- [76] **Murray, B. S. and Fulton, D. A.** (2011). Dynamic covalent single-chain polymer nanoparticles. *Macromolecules*, 44(18), 7242-7252.
- [77] **Mavila, S., Eivgi, O., Berkovich, I. and Lemcoff, N. G.** (2016). Intramolecular cross-linking methodologies for the synthesis of polymer nanoparticles. *Chemical reviews*, 116(3), 878-961.
- [78] **Nitti, A., Carfora, R., Assanelli, G., Notari, M. and Pasini, D.** (2022). Single-Chain polymer nanoparticles for addressing morphologies and functions at the nanoscale: A review. *ACS Applied Nano Materials*, 5(10), 13985-13997.
- [79] **Mecerreyes, D., Lee, V., Hawker, C. J., Hedrick, J. L., Wursch, A., Volksen, W., Magbitang, T., Huang, E. and Miller, R. D.** (2001). A novel approach to functionalized nanoparticles: self-crosslinking of macromolecules in ultradilute solution. *Advanced Materials*, 13(3), 204-208.
- [80] **Verde-Sesto, E., Blázquez-Martín, A. and Pomposo, J. A.** (2019). Advances in the phototriggered synthesis of single-chain polymer nanoparticles. *Polymers*, 11(11), 1903.

- [81] **Kröger, A. P. P., Hamelmann, N. M., Juan, A., Lindhoud, S. and Paulusse, J. M.** (2018). Biocompatible single-chain polymer nanoparticles for drug delivery—a dual approach. *ACS applied materials & interfaces*, *10*(37), 30946-30951.
- [82] **Hanlon, A. M., Lyon, C. K. and Berda, E. B.** (2016). What is next in single-chain nanoparticles? *Macromolecules*, *49*(1), 2-14.
- [83] **Thanneeru, S., Li, W. and He, J.** (2019). Controllable self-assembly of amphiphilic tadpole-shaped polymer single-chain nanoparticles prepared through intrachain photo-cross-linking. *Langmuir*, *35*(7), 2619-2629.
- [84] **Pomposo, J. A.** (2017). *Single-chain polymer nanoparticles: Synthesis, characterization, simulations, and applications*. John Wiley & Sons.
- [85] **Altintas, O. and Barner-Kowollik, C.** (2016). Single-chain folding of synthetic polymers: a critical update. *Macromolecular rapid communications*, *37*(1), 29-46.
- [86] **Garofalo, C., Capuano, G., Sottile, R., Talerico, R., Adami, R., Reverchon, E., Carbone, E., Izzo, L. and Pappalardo, D.** (2014). Different insight into amphiphilic PEG-PLA copolymers: influence of macromolecular architecture on the micelle formation and cellular uptake. *Biomacromolecules*, *15*(1), 403-415.
- [87] **Hamilton, S. K. and Harth, E.** (2009). Molecular dendritic transporter nanoparticle vectors provide efficient intracellular delivery of peptides. *ACS nano*, *3*(2), 402-410.
- [88] **Kröger, A. P. P. and Paulusse, J. M.** (2018). Single-chain polymer nanoparticles in controlled drug delivery and targeted imaging. *Journal of controlled release*, *286*, 326-347.
- [89] **Gonzalez-Burgos, M., Latorre-Sanchez, A. and Pomposo, J. A.** (2015). Advances in single chain technology. *Chemical Society Reviews*, *44*(17), 6122-6142.
- [90] **Lyon, C. K., Prasher, A., Hanlon, A. M., Tuten, B. T., Tooley, C. A., Frank, P. G. and Berda, E. B.** (2015). A brief user's guide to single-chain nanoparticles. *Polymer Chemistry*, *6*(2), 181-197.
- [91] **Altintas, O., Fischer, T. S. and Barner-Kowollik, C.** (2017). Synthetic Methods Toward Single-Chain Polymer Nanoparticles. *Single-Chain Polymer Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Simulations, and Applications*, 1-45.
- [92] **Perez-Baena, I., Asenjo-Sanz, I., Arbe, A., Moreno, A. J., Lo Verso, F., Colmenero, J. and Pomposo, J. A.** (2014). Efficient route to compact single-chain nanoparticles: photoactivated synthesis via thiol–yne coupling reaction. *Macromolecules*, *47*(23), 8270-8280.
- [93] **Hutchison, J. B.** (2003). *Crosslinked network synthesis by radical chain photopolymerization: Natural and directed evolution of macromolecular structure*. University of Colorado at Boulder.
- [94] **Rothfuss, H., Knöfel, N. D., Roesky, P. W. and Barner-Kowollik, C.** (2018). Single-chain nanoparticles as catalytic nanoreactors. *Journal of the American Chemical Society*, *140*(18), 5875-5881.
- [95] **ter Huurne, G. M., Palmans, A. R. and Meijer, E.** (2019). Supramolecular single-chain polymeric nanoparticles. *CCS Chemistry*, *1*(1), 64-82.
- [96] **Hoffmann, J. F., Roos, A. H., Schmitt, F. J., Hinderberger, D. and Binder, W. H.** (2021). Fluorescent and Water Dispersible Single-Chain Nanoparticles:

- Core–Shell Structured Compartmentation. *Angewandte Chemie*, 133(14), 7899-7906.
- [97] **Heiler, C., Offenloch, J. T., Blasco, E. and Barner-Kowollik, C.** (2017). Photochemically induced folding of single chain polymer nanoparticles in water. *ACS Macro Letters*, 6(1), 56-61.
- [98] **Schmidt, B. V., Fehler, N., Falkenhagen, J. and Lutz, J.-F.** (2011). Controlled folding of synthetic polymer chains through the formation of positionable covalent bridges. *Nature chemistry*, 3(3), 234-238.
- [99] **Zhang, J., Gody, G., Hartlieb, M., Catrouillet, S., Moffat, J. and Perrier, S.** (2016). Synthesis of sequence-controlled multiblock single chain nanoparticles by a stepwise folding–chain extension–folding process. *Macromolecules*, 49(23), 8933-8942.
- [100] **Wong, E. H., Lam, S. J., Nam, E. and Qiao, G. G.** (2014). Biocompatible single-chain polymeric nanoparticles via organo-catalyzed ring-opening polymerization. *ACS Macro Letters*, 3(6), 524-528.
- [101] **Cheng, C.-C., Chang, F.-C., Yen, H.-C., Lee, D.-J., Chiu, C.-W. and Xin, Z.** (2015). Supramolecular assembly mediates the formation of single-chain polymeric nanoparticles. *ACS Macro Letters*, 4(10), 1184-1188.
- [102] **Ter Huurne, G. M., Voets, I. K., Palmans, A. R. and Meijer, E.** (2018). Effect of intra-versus intermolecular cross-linking on the supramolecular folding of a polymer chain. *Macromolecules*, 51(21), 8853-8861.
- [103] **Berda, E. B., Foster, E. J. and Meijer, E.** (2010). Toward controlling folding in synthetic polymers: fabricating and characterizing supramolecular single-chain nanoparticles. *Macromolecules*, 43(3), 1430-1437.
- [104] **Foster, E. J., Berda, E. B. and Meijer, E.** (2009). Metastable supramolecular polymer nanoparticles via intramolecular collapse of single polymer chains. *Journal of the American Chemical Society*, 131(20), 6964-6966.
- [105] **Terashima, T., Sugita, T., Fukae, K. and Sawamoto, M.** (2014). Synthesis and single-chain folding of amphiphilic random copolymers in water. *Macromolecules*, 47(2), 589-600.
- [106] **Pal, S., Roy, S. G. and De, P.** (2014). Synthesis via RAFT polymerization of thermo- and pH-responsive random copolymers containing cholic acid moieties and their self-assembly in water. *Polymer Chemistry*, 5(4), 1275-1284.
- [107] **Whitaker, D. E., Mahon, C. S. and Fulton, D. A.** (2013). Thermoresponsive dynamic covalent single-chain polymer nanoparticles reversibly transform into a hydrogel. *Angewandte Chemie*, 125(3).
- [108] **Sanchez-Sanchez, A., Fulton, D. A. and Pomposo, J. A.** (2014). pH-responsive single-chain polymer nanoparticles utilising dynamic covalent enamine bonds. *Chemical Communications*, 50(15), 1871-1874.
- [109] **Tuten, B. T., Chao, D., Lyon, C. K. and Berda, E. B.** (2012). Single-chain polymer nanoparticles via reversible disulfide bridges. *Polymer Chemistry*, 3(11), 3068-3071.
- [110] **Frank, P., Prasher, A., Tuten, B., Chao, D. and Berda, E.** (2015). Characterization of single-chain polymer folding using size exclusion chromatography with multiple modes of detection. *Applied Petrochemical Research*, 5, 9-17.
- [111] **Sanchez-Sanchez, A., Pérez-Baena, I. and Pomposo, J. A.** (2013). Advances in click chemistry for single-chain nanoparticle construction. *Molecules*, 18(3), 3339-3355.

- [112] **Kröger, A. P. P., Paats, J.-W. D., Boonen, R. J., Hamelmann, N. M. and Paulusse, J. M.** (2020). Pentafluorophenyl-based single-chain polymer nanoparticles as a versatile platform towards protein mimicry. *Polymer Chemistry*, *11*(37), 6056-6065.
- [113] **Gracia, R., Marradi, M., Salerno, G., Pérez-Nicado, R., Pérez-San Vicente, A., Dupin, D., Rodriguez, J., Loinaz, I., Chiodo, F. and Nativi, C.** (2018). Biocompatible single-chain polymer nanoparticles loaded with an antigen mimetic as potential anticancer vaccine. *ACS Macro Letters*, *7*(2), 196-200.
- [114] **Vo, Y., Nothling, M. D., Raveendran, R., Cao, C. and Stenzel, M. H.** (2024). Effects of Drug Conjugation on the Biological Activity of Single-Chain Nanoparticles. *Biomacromolecules*, *25*(2), 675-689.
- [115] **Perez-Baena, I., Loinaz, I., Padro, D., García, I., Grande, H. J. and Odriozola, I.** (2010). Single-chain polyacrylic nanoparticles with multiple Gd (III) centres as potential MRI contrast agents. *Journal of Materials Chemistry*, *20*(33), 6916-6922.
- [116] **Gillissen, M. A., Voets, I. K., Meijer, E. and Palmans, A. R.** (2012). Single chain polymeric nanoparticles as compartmentalised sensors for metal ions. *Polymer Chemistry*, *3*(11), 3166-3174.
- [117] **Liang, M. T., Davies, N. M. and Toth, I.** (2005). Encapsulation of lipopeptides within liposomes: effect of number of lipid chains, chain length and method of liposome preparation. *International journal of pharmaceutics*, *301*(1-2), 247-254.
- [118] **Kotha, R. R. and Luthria, D. L.** (2019). Curcumin: biological, pharmaceutical, nutraceutical, and analytical aspects. *Molecules*, *24*(16), 2930.
- [119] **Chattopadhyay, I., Biswas, K., Bandyopadhyay, U. and Banerjee, R. K.** (2004). Turmeric and Curcumin: Biological actions and medicinal applications. *Current science*, 44-53.
- [120] **Aggarwal, B. B., Sundaram, C., Malani, N. and Ichikawa, H.** (2007). Curcumin: the Indian solid gold. *The molecular targets and therapeutic uses of Curcumin in health and disease*, 1-75.
- [121] **Jurenka, J. S.** (2009). Anti-inflammatory properties of Curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. *Alternative medicine review*, *14*(2).
- [122] **Hewlings, S. J. and Kalman, D. S.** (2017). Curcumin: A review of its effects on human health. *Foods*, *6*(10), 92.
- [123] **Peana, M., Butnariu, M., Bjørklund, G., Shanaida, M. and Lysiuk, R.** Yaşlanma Karşıtı Açısından Doğal Bileşikler ve Ürünler.
- [124] **Giordano, A. and Tommonaro, G.** (2019). Curcumin and cancer. *Nutrients*, *11*(10), 2376.
- [125] **Sharma, R. A., Steward, W. P. and Gescher, A. J.** (2007). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of Curcumin. *The molecular targets and therapeutic uses of Curcumin in health and disease*, 453-470.
- [126] **Wang, Y.-J., Pan, M.-H., Cheng, A.-L., Lin, L.-I., Ho, Y.-S., Hsieh, C.-Y. and Lin, J.-K.** (1997). Stability of Curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, *15*(12), 1867-1876.
- [127] **Suresh, K. and Nangia, A.** (2018). Curcumin: Pharmaceutical solids as a platform to improve solubility and bioavailability. *CrystEngComm*, *20*(24), 3277-3296.

- [128] Prasad, S., Gupta, S. C., Tyagi, A. K. and Aggarwal, B. B. (2014). Curcumin, a component of golden spice: from bedside to bench and back. *Biotechnology advances*, 32(6), 1053-1064.
- [129] Magee, J. T., Alworth, W. L. and Payton, F. L. (2004). Curcumin and derivatives. *Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications*, 60(8), o608-o610.
- [130] Jovanovic, S. V., Steenken, S., Boone, C. W. and Simic, M. G. (1999). H-atom transfer is a preferred antioxidant mechanism of Curcumin. *Journal of the American Chemical Society*, 121(41), 9677-9681.
- [131] Priyadarsini, K. I. (2014). The chemistry of Curcumin: from extraction to therapeutic agent. *Molecules*, 19(12), 20091-20112.
- [132] Priyadarsini, K. I. (2009). Photophysics, photochemistry and photobiology of Curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 10(2), 81-95.
- [133] Payton, F., Sandusky, P. and Alworth, W. L. (2007). NMR study of the solution structure of Curcumin. *Journal of natural products*, 70(2), 143-146.
- [134] Agarwal, R., Goel, S. K. and Behari, J. R. (2010). Detoxification and antioxidant effects of Curcumin in rats experimentally exposed to merCury. *Journal of Applied Toxicology*, 30(5), 457-468.
- [135] Liu, W., Zhai, Y., Heng, X., Che, F. Y., Chen, W., Sun, D. and Zhai, G. (2016). Oral bioavailability of Curcumin: problems and advancements. *Journal of drug targeting*, 24(8), 694-702.
- [136] Unlu, A., Nayir, E., Kalenderoglu, M. D., Kirca, O. and Ozdogan, M. (2016). Curcumin (Turmeric) and cancer. *J buon*, 21(5), 1050-1060.
- [137] Arun, N. and Nalini, N. (2002). Efficacy of turmeric on blood sugar and polyol pathway in diabetic albino rats. *Plant foods for human nutrition*, 57, 41-52.
- [138] Rao, D. S., Sekhara, N. C., Satyanarayana, M. and Srinivasan, M. (1970). Effect of Curcumin on serum and liver cholesterol levels in the rat. *The Journal of nutrition*, 100(11), 1307-1315.
- [139] Pivari, F., Mingione, A., Brasacchio, C. and Soldati, L. (2019). Curcumin and type 2 diabetes mellitus: prevention and treatment. *Nutrients*, 11(8), 1837.
- [140] Gutierrez, V. O., Pinheiro, C. M., Assis, R. P., Vendramini, R. C., Pepato, M. T. and Brunetti, I. L. (2012). Curcumin-supplemented yoghurt improves physiological and biochemical markers of experimental diabetes. *British Journal of Nutrition*, 108(3), 440-448.
- [141] Çalıbaşı Koçal, G., Pakdemirli, A., Bayrak, S., Ozupek, N., Sever, T., Başbınar, Y., Ellidokuz, H. and Yiğitbaşı, T. (2019). Curcumin effects on cell proliferation, angiogenesis and metastasis in colorectal cancer. *Journal of BUON*, 24(4).
- [142] Garcea, G., Berry, D. P., Jones, D. J., Singh, R., Dennison, A. R., Farmer, P. B., Sharma, R. A., Steward, W. P. and Gescher, A. J. (2005). Consumption of the putative chemopreventive agent Curcumin by cancer patients: assessment of Curcumin levels in the colorectum and their pharmacodynamic consequences. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 14(1), 120-125.
- [143] Carolina Alves, R., Perosa Fernandes, R., Fonseca-Santos, B., Damiani Victorelli, F. and Chorilli, M. (2019). A critical review of the properties and analytical methods for the determination of Curcumin in biological and

- pharmaceutical matrices. *Critical reviews in analytical chemistry*, 49(2), 138-149.
- [144] **Leiberer, A., Mündlein, A. and Drexel, H.** (2013). Phytochemicals and their impact on adipose tissue inflammation and diabetes. *Vascular pharmacology*, 58(1-2), 3-20.
- [145] **Kunnumakkara, A. B., Bordoloi, D., Padmavathi, G., Monisha, J., Roy, N. K., Prasad, S. and Aggarwal, B. B.** (2017). Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases. *British journal of pharmacology*, 174(11), 1325-1348.
- [146] **Hausman, D. M.** (2019). What is cancer? *Perspectives in biology and medicine*, 62(4), 778-784.
- [147] **Zhai, K., Brockmüller, A., Kubatka, P., Shakibaei, M. and Büsselberg, D.** (2020). Curcumin's beneficial effects on neuroblastoma: mechanisms, challenges, and potential solutions. *Biomolecules*, 10(11), 1469.
- [148] **Yang, Z.-J., Huang, S.-Y., Zhou, D.-D., Xiong, R.-G., Zhao, C.-N., Fang, A.-P., Zhang, Y.-J., Li, H.-B. and Zhu, H.-L.** (2022). Effects and mechanisms of Curcumin for the prevention and management of cancers: An updated review. *Antioxidants*, 11(8), 1481.
- [149] **Komal, K., Chaudhary, S., Yadav, P., Parmanik, R. and Singh, M.** (2019). The therapeutic and preventive efficacy of Curcumin and its derivatives in esophageal cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 20(5), 1329.
- [150] **Yang, K.-Y., Lin, L.-C., Tseng, T.-Y., Wang, S.-C. and Tsai, T.-H.** (2007). Oral bioavailability of Curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC–MS/MS. *Journal of chromatography B*, 853(1-2), 183-189.
- [151] **Wahlström, B. and Blennow, G.** (1978). A study on the fate of Curcumin in the rat. *Acta pharmacologica et toxicologica*, 43(2), 86-92.
- [152] **Ban, C., Jo, M., Park, Y. H., Kim, J. H., Han, J. Y., Lee, K. W., Kweon, D.-H. and Choi, Y. J.** (2020). Enhancing the oral bioavailability of Curcumin using solid lipid nanoparticles. *Food Chemistry*, 302, 125328.
- [153] **Yabas, M., Orhan, C., Er, B., Tuzcu, M., Durmus, A. S., Ozercan, I. H., Sahin, N., Bhanuse, P., Morde, A. A. and Padigar, M.** (2021). A next generation formulation of Curcumin ameliorates experimentally induced osteoarthritis in rats via regulation of inflammatory mediators. *Frontiers in Immunology*, 12, 609629.
- [154] **Gagliardi, S., Morasso, C., Stivaktakis, P., Pandini, C., Tinelli, V., Tsatsakis, A., Proserpi, D., Hickey, M., Corsi, F. and Cereda, C.** (2020). Curcumin formulations and trials: what's new in neurological diseases. *Molecules*, 25(22), 5389.
- [155] **Alves, T. F., das Neves Lopes, F. C., Rebelo, M. A., Souza, J. F., da Silva Pontes, K., Santos, C., Severino, P., Junior, J. M., Komatsu, D. and Chaud, M. V.** (2018). Crystalline ethylene oxide and propylene oxide triblock copolymer solid dispersion enhance solubility, stability and promoting time-controllable release of Curcumin. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 12(1), 65-74.
- [156] **Sahu, A., Bora, U., Kasoju, N. and Goswami, P.** (2008). Synthesis of novel biodegradable and self-assembling methoxy poly (ethylene glycol)–palmitate nanocarrier for Curcumin delivery to cancer cells. *Acta biomaterialia*, 4(6), 1752-1761.

- [157] **Liu, C., Cheng, F. and Yang, X.** (2017). Fabrication of a soybean Bowman–Birk inhibitor (BBI) nanodelivery carrier to improve bioavailability of Curcumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(11), 2426-2434.
- [158] **Fleige, E., Quadir, M. A. and Haag, R.** (2012). Stimuli-responsive polymeric nanocarriers for the controlled transport of active compounds: concepts and applications. *Advanced drug delivery reviews*, 64(9), 866-884.
- [159] **Manohar, S. and Leung, N.** (2018). Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature. *Journal of nephrology*, 31(1), 15-25.
- [160] **Kartalou, M. and Essigmann, J. M.** (2001). Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 478(1-2), 23-43.
- [161] **Ghosh, S.** (2019). Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic chemistry*, 88, 102925.
- [162] **Singal, P., Li, T., Kumar, D., Danelisen, I. and Iliskovic, N.** (2000). Adriamycin-induced heart failure: mechanisms and modulation. *Molecular and cellular biochemistry*, 207, 77-86.
- [163] **Hideg, K. and Kálai, T.** (2007). Novel antioxidants in anthracycline cardiotoxicity. *Cardiovascular toxicology*, 7, 160-164.
- [164] **Cottin, Y., Ribugt, C., Maupoil, V., Godin, D., Arnould, L., Brunotte, F. and Rochette, L.** (1994). Early incidence of adriamycin treatment on cardiac parameters in the rat. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 72(2), 140-145.
- [165] **Booser, D. J. and Hortobagyi, G. N.** (1994). Anthracycline antibiotics in cancer therapy: focus on drug resistance. *Drugs*, 47, 223-258.
- [166] **Arcamone, F., Cassinelli, G., Fantini, G., Grein, A., Orezzi, P., Pol, C. and Spalla, C.** (1969). Adriamycin, 14-hydroxydaimomycin, a new antitumor antibiotic from *S. Peucetius* var. *caesius*. *Biotechnology and bioengineering*, 11(6), 1101-1110.
- [167] **Wang, X., Tian, X., Wu, Y., Shen, X., Yang, S. and Chen, S.** (2018). Enhanced doxorubicin production by *Streptomyces peucetius* using a combination of classical strain mutation and medium optimization. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 48(6), 514-521.
- [168] **Aubel-Sadron, G. and Londos-Gagliardi, D.** (1984). Daunorubicin and doxorubicin, anthracycline antibiotics, a physicochemical and biological review. *Biochimie*, 66(5), 333-352.
- [169] **Xu, X., Chen, X., Wang, X. and Jing, X.** (2008). The release behavior of doxorubicin hydrochloride from medicated fibers prepared by emulsion-electrospinning. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 70(1), 165-170.
- [170] **Poudel, L.** (2014). *Electronic structure and partial charge distribution of doxorubicin under different molecular environments*. University of Missouri-Kansas City.
- [171] **Muggia, F. M. and Green, M. D.** (1991). New anthracycline antitumor antibiotics. *Critical reviews in oncology/hematology*, 11(1), 43-64.
- [172] **Young, R. C., Ozols, R. F. and Myers, C. E.** (1981). The anthracycline antineoplastic drugs. *New England Journal of Medicine*, 305(3), 139-153.
- [173] **Cortes-Funes, H. and Coronado, C.** (2007). Role of anthracyclines in the era of targeted therapy. *Cardiovascular toxicology*, 7, 56-60.

- [174] **Gewirtz, D.** (1999). A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical pharmacology*, 57(7), 727-741.
- [175] **Thorn, C. F., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T. E. and Altman, R. B.** (2011). Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenetics and genomics*, 21(7), 440-446.
- [176] **Müller, I., Niethammer, D. and Bruchelt, G.** (1998). Anthracycline-derived chemotherapeutics in apoptosis and free radical cytotoxicity. *International journal of molecular medicine*, 1(2), 491-495.
- [177] **Thigpen, J. T.** (2005). Innovations in anthracycline therapy: overview. *Community Oncol*, 2(1), 3-7.
- [178] **Swain, S. M., Whaley, F. S. and Ewer, M. S.** (2003). Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 97(11), 2869-2879.
- [179] **Carvalho, C., Santos, R. X., Cardoso, S., Correia, S., Oliveira, P. J., Santos, M. S. and Moreira, P. I.** (2009). Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Current medicinal chemistry*, 16(25), 3267-3285.
- [180] **Hortobagyi, G.** (1997). Anthracyclines in the treatment of cancer: an overview. *Drugs*, 54(Suppl 4), 1-7.
- [181] **Rivankar, S.** (2014). An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *Journal of cancer research and therapeutics*, 10(4), 853-858.
- [182] **Altieri, P., Barisione, C., Lazzarini, E., Garuti, A., Bezante, G. P., Canepa, M., Spallarossa, P., Tocchetti, C. G., Bollini, S. and Brunelli, C.** (2016). Testosterone antagonizes doxorubicin-induced senescence of cardiomyocytes. *Journal of the American Heart Association*, 5(1), e002383.
- [183] **Schimmel, K. J., Richel, D. J., Van den Brink, R. B. and Guchelaar, H.-J.** (2004). Cardiotoxicity of cytotoxic drugs. *Cancer treatment reviews*, 30(2), 181-191.
- [184] **Venkatesan, N., Punithavathi, D. and Arumugam, V.** (2000). Curcumin prevents adriamycin nephrotoxicity in rats. *British journal of pharmacology*, 129(2), 231-234.
- [185] **Bryant, J., Picot, J., Levitt, G., Sullivan, I., Baxter, L. and Clegg, A.** (2007). Cardioprotection against the toxic effects of anthracyclines given to children with cancer: a systematic. *Health Technology Assessment*, 11(27).
- [186] **Sun, J., Sun, G., Meng, X., Wang, H., Luo, Y., Qin, M., Ma, B., Wang, M., Cai, D. and Guo, P.** (2013). Isorhamnetin protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in vivo and in vitro. *PloS one*, 8(5), e64526.
- [187] **Zhan, L., Wang, X., Zhang, Y., Zhu, G., Ding, Y., Chen, X., Jiang, W. and Wu, S.** (2021). Benazepril hydrochloride protects against doxorubicin cardiotoxicity by regulating the PI3K/Akt pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 22(4), 1-9.
- [188] **Tardi, P., Boman, N. and Cullis, P.** (1996). Liposomal doxorubicin. *Journal of drug targeting*, 4(3), 129-140.
- [189] **Birhan, Y. S., Darge, H. F., Hanurry, E. Y., Andrgie, A. T., Mekonnen, T. W., Chou, H.-Y., Lai, J.-Y. and Tsai, H.-C.** (2020). Fabrication of core crosslinked polymeric micelles as nanocarriers for doxorubicin delivery: Self-assembly, in situ diselenide metathesis and redox-responsive drug release. *Pharmaceutics*, 12(6), 580.

- [190] O'Toole, M. G., Soucy, P. A., Chauhan, R., Raju, M. V. R., Patel, D. N., Nunn, B. M., Keynton, M. A., Ehringer, W. D., Nantz, M. H. and Keynton, R. S. (2016). Release-modulated antioxidant activity of a composite Curcumin-chitosan polymer. *Biomacromolecules*, 17(4), 1253-1260.
- [191] Kurt, B. Z., Durmus, Z. and Durmus, A. (2016). Preparation and characterization of platinum (Pt) and palladium (Pd) nanoparticle decorated graphene sheets and their utilization for the elimination of basic fuchsin and indigo carmine dyes. *Solid State Sciences*, 51, 51-58.
- [192] Saranya, T., Rajan, V., Biswas, R., Jayakumar, R. and Sathianarayanan, S. (2018). Synthesis, characterisation and biomedical applications of Curcumin conjugated chitosan microspheres. *International journal of biological macromolecules*, 110, 227-233.
- [193] Barszczewska-Rybarek, I. M. (2019). A guide through the dental dimethacrylate polymer network structural characterization and interpretation of physico-mechanical properties. *Materials*, 12(24), 4057.
- [194] Jones, J. A., Novo, N., Flagler, K., Pagnucco, C. D., Carew, S., Cheong, C., Kong, X. Z., Burke, N. A. and Stöver, H. D. (2005). Thermoresponsive copolymers of methacrylic acid and poly (ethylene glycol) methyl ether methacrylate. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 43(23), 6095-6104.
- [195] Le, H. V., Dulong, V., Picton, L. and Le Cerf, D. (2023). Lyophilization for formulation optimization of drug-loaded thermoresponsive polyelectrolyte complex nanogels from functionalized hyaluronic acid. *Pharmaceutics*, 15(3), 929.
- [196] Dmitrovic, V., Habraken, G. J., Hendrix, M. M., Habraken, W. J., Heise, A., With, G. d. and Sommerdijk, N. A. (2012). Random poly (amino acid) s synthesized by ring opening polymerization as additives in the biomimetic mineralization of CaCO₃. *Polymers*, 4(2), 1195-1210.
- [197] Li, T., Lu, X.-M., Zhang, M.-R., Hu, K. and Li, Z. (2022). Peptide-based nanomaterials: Self-assembly, properties and applications. *Bioactive materials*, 11, 268-282.
- [198] Zhang, Y., Song, H., Zhang, H., Huang, P., Liu, J., Chu, L., Liu, J., Wang, W., Cheng, Z. and Kong, D. (2017). Fine tuning the assembly and gel behaviors of PEG ylated polypeptide conjugates by the copolymerization of l-alanine and γ -benzyl-l-glutamate N-carboxyanhydrides. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 55(9), 1512-1523.
- [199] Zhuang, W.-R., Wang, Y., Cui, P.-F., Xing, L., Lee, J., Kim, D., Jiang, H.-L. and Oh, Y.-K. (2019). Applications of π - π stacking interactions in the design of drug-delivery systems. *Journal of controlled release*, 294, 311-326.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Hatice Kübra BATU

Doğum Tarihi ve Yeri :

E-posta :

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2018, Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Eczacılık Fakülte

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- Temmuz 2014, Kübra Eczanesi
- Ağustos 2015, Dr. Abdurrahman Yurtaslan Ankara Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi
- Temmuz 2016, Egem Eczanesi
- Ekim-Aralık 2017, İlknur Eczanesi

DOKTORA TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Batu, H. K., Öztürk Civelek, D., & Temel, B. A.** (2025). Curcumin-crosslinked single-chain polymer nanoparticles as potential polymer-drug conjugates. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 1-11.
- **Batu H. K., Temel, B. A.** (2023). "Synthesis and Characterization of Tadpole-Like Single-Chain Nanoparticles as Polymer-Drug Conjugates", 6. *International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences, EurasianBioChem*, October 11-13.

DİĞER YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Baysoy, B. S., Günaydın, İ., Batu, H. K., Civelek, D. O., & Temel, B. A.** (2025). Fabrication of Core-Crosslinked Polymer Micelles via Photoinduced Azide Crosslinking. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2400473.
- **Alemdar, M., Kirmic Cosgun, S. N., Ceylan, D., Batu, H. K., & Aydoğan Temel, B.** (2024). Synthesis and rheological analyzes of temperature and light sensitive gels comprising amphiphilic azobenzene polymers, chitosan and pluronic F127. *Polymers for Advanced Technologies*, 35(8), e6540.
- **Alemdar, M., Tuncaboğlu, D. C., Batu, H. K., & Temel, B. A.** (2022). Pluronic based injectable smart gels with coumarin functional amphiphilic copolymers. *European Polymer Journal*, 177, 111378.

- **Baysoy, B. S., Günaydın, İ., Batu, H. K., Civelek, D. O., & Temel, B. A. (2024).** " Fotoindüklenmiş Azit Çapraz Bağlanması ile Çekirdeği Çapraz Bağlı Polimerik Misellerin Sentezi ve Karakterizasyonu", IX. Uluslararası Katılımlı Polimer Bilim ve Teknoloji Kongresi, 16-18 Eylül.

