



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

SİKLOMATRİKS POLİ[SİKLOTRİFOSFAZEN-KO-(4,4'-METİLENBİS(2-
METİLSİKLOHEKZİLAMİN)] YAPILARININ SENTEZİ VE KONTROLLÜ
İLAÇ SALIM SİSTEMİ OLARAK KULLANIMLARI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ESRA DİLEK

Tez Danışmanı
PROF. DR. HAVA ÖZAY

ÇANAKKALE – 2023



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

SİKLOMATRİKS POLİ[SİKLOTRİFOSFAZEN-KO-(4,4'-METİLENBİS(2-METİLSİKLOHEKZİLAMİN)] YAPILARININ SENTEZİ VE KONTROLLÜ İLAÇ SALIM SİSTEMİ OLARAK KULLANIMLARI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ESRA DİLEK

Tez Danışmanı

PROF. DR. HAVA ÖZAY

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: FYL-2022-3907

ÇANAKKALE – 2023



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



Esra DİLEK tarafından Prof. Dr. Hava ÖZAY danışmanlığında hazırlanan ve **11/08/2023** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Siklomatriks Poli[Siklotrifosfazen-ko-(4,4'-Metilenbis(2-metilsikloheksilamin)] Yapılarının Sentezi ve Kontrollü İlaç Salım Sistemi Olarak Kullanımları**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü **Kimya Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Prof. Dr. Hava ÖZAY

(Danışman)

Prof. Dr. Osman DAYAN

Doç. Dr. Mehmet Rıza KIVANÇ

.....

.....

.....

Tez No :

Tez Savunma Tarihi : 11/08/2023

.....
Prof. Dr. Ahmet Evren ERGİNAL

Enstitü Müdürü

.././20..

ETİK BEYAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kuralları'na uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada; tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi taahhüt ve beyan ederim.

Esra DİLEK
07/09/2023

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim sürecince, bilgi ve deneyimleri ile benden bir an olsun desteğini esirgemeyen saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Hava ÖZAY'a teşekkürü borç bilirim.

Her zaman desteğini gördüğüm, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli hocam Prof. Dr. Özgür ÖZAY'a teşekkür ederim. Desteğini her zaman hissettiğim hocam Doç. Dr. Pınar ILGIN'a ve yardımlarıyla bana her zaman desteği olan Dr. Öğr. Üyesi Melek TERCAN YAVAŐOĐLU hocama teşekkür ederim.

Çalışmam süresince maddi ve manevi desteklerini her zaman hissettiğim, hayatımın her evresinde bana destek olan aileme teşekkür ederim.

Bu çalışma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FYL-2022-3907 nolu proje ile finansal olarak desteklenmiştir. Bu nedenle adı geçen kuruma teşekkür ederim.

Esra DİLEK
Çanakkale, 2023

ÖZET

SİKLOMETRİKS POLİ[SİKLOTRİFOSFAZEN-KO-(4,4'-METİLENBİS(2-METİLSİKLOHEKZİLAMİN) YAPILARININ SENTEZİ VE KONTROLLÜ İLAÇ SALIM SİSTEMİ OLARAK KULLANIMLARI

Esra DİLEK

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Hava ÖZAY

11/08/2023, 45

Bu çalışmada, siklomatriks tipi polimerik malzemelerin sentezlenmesi için heksaklorosiklotrifosfazen ve 4,4'-Metilenbis(2-metilsikloheksilamin) kullanıldı. Reaktif oranları farklı olarak sentezlenen partiküllerin yapısı ve morfolojisi FT-IR, TEM, SEM-EDX, XRD, TGA, XPS gibi tekniklerle belirlendi. HCCP ve MMCA mol oranları sırasıyla 1:1, 1:2, 1:3 olan p(CTP-ko-MMCA) mikroküreler küresel morfolojiye sahip olarak elde edildi. Sentezlenen polimerik yapılardan p(CTP-ko-MMCA) (1:3)'ün içi boş mikroküre formunda olduğu belirlendi. Sonraki adımda p(CTP-ko-MMCA) (1:3) mikroküreler, iki farklı yeşil indirgeyicinin kullanımıyla altın ve gümüş nanopartikülleri ile modifiye edildi. Elde edilen metal kompozit küreler karakterize edildi. p(CTP-ko-MMCA) mikroküreleri ile Ag^0 ve Au^0 kompozitleri ilaç salımı çalışmalarında model ilaç olarak seftriakson ve gen taşıyıcı olarak RNA salımında kullanıldı. p(CTP-ko-MMCA) mikroküreleri ve metal kompozitlerinin aynı zamanda gram negatif (*Pseudomonas Aeruginosa*) ve gram pozitif (*Staphylococcus Aureus*) ve *C.Albicans* 'a karşı antimikrobiyal aktiviteleri incelendi.

Anahtar Kelimeler: Biyomateryal, İlaç Salımı, Fosfazen, Siklotrifosfazen, Nanoküre, Polimer

ABSTRACT

SYNTHESIS OF CYCLOMATRIX POLY[CYCLOTRIPHOSPHAZENE-CO-(4,4'-METHYLENEBIS(2-METHYLCYCLOHEXYLAMINE))] STRUCTURES AND THEIR USE AS A CONTROLLED DRUG RELEASE SYSTEM

Esra DİLEK

Çanakkale Onsekiz Mart University

School of Graduate Studies

Master of Science Thesis in Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Hava ÖZAY

11/08/2023, 45

In this study, hexachlorocyclotriphosphazene and 4,4'-Methylenebis(2-methylcyclohexylamine) were used to synthesize cyclomatrix type polymeric materials. The structure and morphology of the particles synthesized with different reagent ratios were determined by techniques such as FT-IR, TEM, SEM-EDX, XRD, TGA, XPS. p(CTP-co-MMCA) microspheres with HCCP and MMCA molar ratios of 1:1, 1:2, 1:3, respectively, were obtained with spherical morphology. It was determined that p(CTP-co-MMCA) (1:3), one of the synthesized polymeric structures, was in the form of hollow microspheres. In the next step, p(CTP-co-MMCA) (1:3) microspheres were modified with gold and silver nanoparticles using two different green reductants. The obtained metal composite spheres were characterized. p(CTP-co-MMCA) microspheres and Ag⁰ and Au⁰ composites were used as model drug in drug release studies and RNA as gene carrier in release studies. The antimicrobial activities of p(CTP-co-MMCA) microspheres and metal composites were also investigated against gram negative (*Pseudomonas Aeruginosa*) and gram positive (*Staphylococcus Aureus*) and *C.Albicans*.

Keywords: Biomaterial, Drug Release, Phosphazene, Cyclotriphosphazene, Nanosphere, Polymer.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

| | |
|------------------------------|------|
| JÜRİ ONAY SAYFASI..... | i |
| ETİK BEYAN..... | ii |
| TEŞEKKÜR..... | iii |
| ÖZET | iv |
| ABSTRACT | v |
| İÇİNDEKİLER | vi |
| SİMGELER ve KISALTMALAR..... | viii |
| TABLolar DİZİNİ..... | ix |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | x |

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

| | |
|--|---|
| 1.1. Polifosfazen Bileşikleri..... | 3 |
| 1.1.1. Lineer Polifosfazenler..... | 4 |
| 1.1.2. Siklomatriks Tipi Polifosfazenler..... | 5 |
| 1.2. Mikropartiküllerin Yüzeylerinin Metal Nanoparçacıklar ile Modifiye Edilmesi..... | 6 |
| 1.2.1. Altın ve Gümüş Nanopartiküller ile Modifiye Edilen Polifosfazen Mikroküreler..... | 7 |
| 1.3. İçi Boş Mikroküreler..... | 8 |
| 1.4. İlaç Taşıyıcı Sistemler ve Özellikleri..... | 8 |

İKİNCİ BÖLÜM

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

| | |
|---|----|
| 2.1. Siklomatriks Tipi Polifosfazenlerin Uygulama Alanları..... | 10 |
|---|----|

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM
ARAŞTIRMA YÖNTEMİ/MATERYAL YÖNTEM

| | |
|---|----|
| 3.1. Materyal..... | 15 |
| 3.1.1. Kimyasal Maddeler..... | 15 |
| 3.1.2. Cihazlar..... | 15 |
| 3.2. Yöntem | 16 |
| 3.2.1 Siklomatriks Poli [Siklotrifosfazen-ko-(4,4' Metilenbis-(2-metilsikloheksilamin)] (p(CTP-ko-MMCA))Yapılarının Sentezi | 16 |
| 3.3. p(CTP-ko-MMCA)@Au Mikrokürelerinin Elde Edilmesi | 18 |
| 3.4. p(CTP-ko-MMCA)@Ag Mikrokürelerinin Elde Edilmesi..... | 19 |
| 3.5. İlaç Yükleme ve Salım Çalışmaları..... | 19 |
| 3.6. Antimikrobiyal Etkinlik İncelemesi..... | 20 |

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM
ARAŞTIRMA BULGULARI

| | |
|---|----|
| 4.1. p(CTP-ko-MMCA) Mikrokürelerinin ve Altın/Gümüş Kompozitlerinin Sentezi ve Karakterizasyonu..... | 21 |
| 4.2. p(CTP-ko-MMCA), p(CTP-ko-MMCA)@Au, p(CTP-ko-MMCA)@Ag Mikrokürelerinin İlaç Yükleme ve Salım Çalışması..... | 32 |
| 4.3. p(CTP-ko-MMCA), p(CTP-ko-MMCA)@Au, p(CTP-ko-MMCA)@Ag Mikrokürelerin Antibakteriyel ve Antifungal Etkilerinin Değerlendirilmesi.... | 37 |

BEŞİNCİ BÖLÜM
SONUÇ VE ÖNERİLER

| | |
|---|----|
| KAYNAKÇA | 41 |
| EK 1. TEZ KAPSAMINDA GERÇEKLEŞTİRİLEN BİLİMSEL BİLDİRİLER | I |
| ÖZGEÇMİŞ | II |

SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|----------------|--|
| HCCP | Hekzaklorosiklotrifosfazen |
| CTP | Siklotrifosfazen |
| MMCA | 4,4'-Metilenbis(2-metilsikloheksilamin) |
| TEA | Trietilamin |
| TA | Tannik Asit |
| PBS | Fosfat Tampon Çözeltisi |
| TSA | Triptik Soy Agar |
| UV-Vis | Ultraviyole ve görünür ışık absorpsiyon spektroskopisi |
| FT-IR | Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi |
| SEM | Taramalı Elektron Mikroskopu |
| XRD | X-Işını Kırınımı |
| TEM | Transmisyon Elektron Mikroskopisi |
| EDX | Enerji Yayılımlı X-Işını Analizi |
| XPS | X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi |
| TGA | Termogravimetrik Analiz |
| m | Örnek Kütlesi |
| mmol | Milimol |
| L | Litre |
| R ² | Regresyon Sabiti |
| Mg | Miligram |

TABLULAR DİZİNİ

| Tablo No | Tablo Adı | Sayfa No |
|-----------------|--|-----------------|
| Tablo 1 | p(CTP-ko-MMCA) partiküllerinin sentezinde kullanılan tepkime koşulları | 17 |
| Tablo 2 | Mikrokürelere ait seftriakson sodyum salımı için kinetik parametreler | 35 |
| Tablo 3 | Mikrokürelere ait RNA salımı için kinetik parametreler | 36 |



ŞEKİLLER DİZİNİ

| Şekil No | Şekil Adı | Sayfa No |
|----------|---|----------|
| Şekil 1 | Siklotrifosfazen halkası içeren polimerik yapıların uygulama alanları (Wan ve Huang 2017). | 4 |
| Şekil 2 | Siklomatriks konfigürasyonu, XL: Difonksiyonel çapraz bağlanma grubu (Stewart, vd., 2001). | 6 |
| Şekil 3 | Nanopartiküllerin uygulama alanları (Qasim, vd., 2014). | 7 |
| Şekil 4 | p(CTP-ko-MMCA) mikrokürelerinin sentezine ait şematik gösterim | 17 |
| Şekil 5 | p(CTP-ko-MMCA) (1:3) mikrokürelerinin altın ile modifiye edilmesi | 18 |
| Şekil 6 | p(CTP-ko-MMCA) mikrokürelerinin sentezi, ilaç yükleme ve salımına ait şematik gösterim | 22 |
| Şekil 7 | p(CTP-ko-MMCA) mikroküreleri ve başlangıç maddelerine ait FT-IR spektrumları | 23 |
| Şekil 8 | p(CTP-ko-MMCA) mikrokürelerine ait SEM görüntüleri | 24 |
| Şekil 9 | p(CTP-ko-MMCA) (1:3) mikrokürelerine ait EDX spektrumu | 25 |
| Şekil 10 | p(CTP-ko-MMCA) (1:3) mikrokürelerine ait TGA eğrisi | 26 |
| Şekil 11 | p(CTP-ko-MMCA)@Au ve p(CTP-ko-MMCA)@Ag kompozit mikrokürelerine ait TEM görüntüleri | 27 |
| Şekil 12 | p(CTP-ko-MMCA)@Au ve p(CTP-ko-MMCA)@Ag kompozit mikrokürelerine ait SEM ve elementel haritalama görüntüleri | 28 |
| Şekil 13 | p(CTP-ko-MMCA) mikroküreleri, p(CTP-ko-MMCA)@Au ve p(CTP-ko-MMCA)@Ag kompozit mikrokürelerine ait XRD desenleri | 29 |
| Şekil 14 | (a) p(CTP-ko-MMCA)@Au kompozit mikrokürelerine ait genel tarama XPS spektrumu, (b) p(CTP-ko-MMCA)@Au'nun 4f bölgesine ait XPS spektrumu | 30 |
| Şekil 15 | (a) p(CTP-ko-MMCA)@Ag kompozit mikrokürelerine ait genel tarama XPS spektrumu, (b) p(CTP-ko-MMCA)@Ag'ün 3d bölgesine ait XPS spektrumu | 31 |

Şekil 16 (a) p(CTP-ko-MMCA), p(CTP-ko-MMCA)@Au ve p(CTP-ko-MMCA)@Ag mikrokürelerinin zamana bağlı seftriakson salımı, (b) p(CTP-ko-MMCA), p(CTP-ko-MMCA)@Au ve p(CTP-ko-MMCA)@Ag mikrokürelerinin zamana bağlı RNA salımı

34

Şekil 17 (a) p(CTP-ko-MMCA), p(CTP-ko-MMCA)@Au (TA), p(CTP-ko-MMCA)@Ag (TA), p(CTP-ko-MMCA)@Au (AA), p(CTP-ko-MMCA)@Ag (AA) mikrokürelerinin *S. Aureus*, *P. Aeruginosa* ve *C. Albicans*'a karşı antimikrobiyal etkilerine ait fotoğraf (I) p(CTP-ko-MMCA)@Au (TA), (II) p(CTP-ko-MMCA)@Ag (TA), (III) p(CTP-ko-MMCA)@Au (AA), (IV) p(CTP-ko-MMCA)@Ag (AA), (V) p(CTP-ko-MMCA)

38

BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

İnşaat, ambalaj, tarım, gıda, yapı malzemeleri, tıp ve sanayi gibi çok çeşitli alanlardaki uygulamaları ile polimerler yaşamın temelini oluşturmaktadır. Uygulamalarda kullanılan polimerlerin çoğu, karbon atomu içerikli organik yapılardır. Özellikle biyouyumlu polimerik yapılar, farmakolojik ve tıbbi çalışmalarda kullanıldıklarında oldukça kolaylık sağlarlar (Luckachan ve Pillai, 2011).

Son yıllarda doğal polimerik malzemelerden yararlanılarak yeni polimerik malzemeler elde etmek için birçok çalışma yapılmıştır. Kontrollü ilaç dağıtımı, gen terapisi, doku mühendisliği ve biyonanoteknoloji uygulamalarında genellikle biyobozunur polimerik malzemeler seçilmektedir. Düşük toksisiteye sahip ve biyobozunur özellikli yeni polimerik malzemeler her geçen gün daha fazla ilgi görmektedir (Pillai, 2014).

Polimerlerin uygulama alanlarına bakıldığında, son yıllarda anorganik polimerlere olan ilginin arttığı görülmektedir. Anorganik polimerler, bağ açılarının değiştirilebilmesi sayesinde farklı özellikler gösterebilmektedir. Ayrıca polimerik malzemelerin bu grubu, içerdikleri farklı yan gruplar sayesinde yeni malzemelerin elde edilmesinde büyük öneme sahiptir. Polimerlerin bozunma, biyouyumluluk ve mekanik özellikleri yapı omurgasında yapılan değişikliklerle ayarlanabilir. Açısız ve burulma olarak serbestliğe izin veren polifosfazenler, esnek omurgaya sahip olmaları nedeniyle malzeme biliminde sıklıkla tercih edilmektedir (Martina ve Hutmacher, 2007).

Fosfazenler, yapılarında fosfor azot çift bağları içeren ve bu bağların yapı boyunca tekrarlandığı küçük moleküllerden polimerlere kadar çok sayıda üyesi bulunan bir bileşik sınıfıdır. Bununla birlikte, fosfazenler genel olarak düz zincirli, halkalı ve polimerik olarak üç ana grupta sınıflandırılabilir. Yapıda bulunan fosfor atomlarına bağlı halojen atomlarının farklı organik yan gruplar ile yer değiştirmesiyle, farklı özelliklere sahip fosfazen bileşikleri elde edilebilir. Fosfazen bileşikleri biyolojik açıdan uyumlu ve biyobozunur özelliğe sahip olmaları sebebiyle doku mühendisliği ve kontrollü ilaç salımı sistemlerinin geliştirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (Demircioğlu ve Örum, 2019).

Son yıllarda, ilaç taşıyıcı polimerik malzemeler giderek daha fazla ilgi görmektedir. İlaçların istenilen bölgeye iletilmesi, salım süresinin belirlenmesi ve ilacın etkili olmasında nanotaşıyıcılar büyük öneme sahiptir. Bu kapsamda, polifosfazenler organik yan gruplarının kolaylıkla değiştirilmesiyle istenilen fiziksel ve kimyasal özelliğe sahip malzemelerin hazırlanmasına imkan tanınması nedeniyle özellikle kontrollü ilaç taşıyıcı sistemlerde sıklıkla tercih edilmektedir. Bunun yanında fosfazen türevleri katalizör ve alev geciktirici malzemeler olarak farklı alanlarda uygulamalara sahiptirler (Hou, vd., 2019).

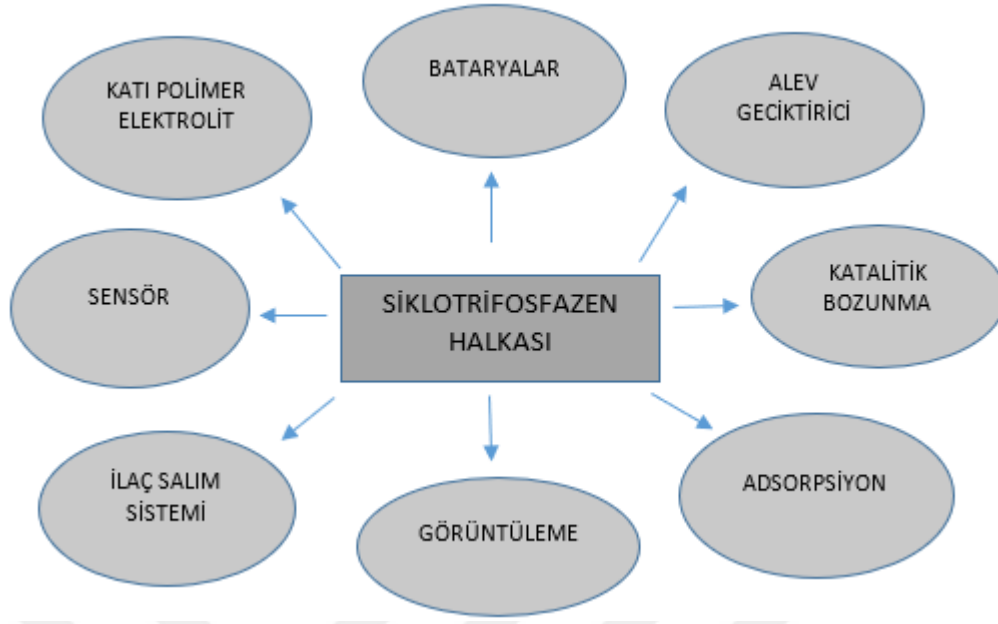
Bu çalışmada, siklomatriks tipi polimerik malzemelerin sentezlenmesi için başlangıç maddesi olarak heksaklorosiklotrifosfazen (HCCP) ve diamin bileşiği olan 4,4'-Metilenbis(2-metilsikloheksilamin) (MMCA) kullanıldı. HCCP:MMCA'nın farklı mol oranları kullanılarak sentezlenen çapraz bağlı siklomatriks tipi polimerik partiküllerin yapısı ve morfolojisi, Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), Fourier Dönüşümlü Kıızıl Ötesi (FTIR), Enerji Yayılımlı X -Işını analizi (EDX), Termogravimetrik analiz (TGA), X-ışını Fotoelektron Spektrometresi (XPS) ve X-Işını Kırınımı (XRD) gibi tekniklerle belirlendi. HCCP:MMCA mol oranları sırasıyla 1:1, 1:2, 1:3 olan p(CTP-ko-MMCA) mikroküreler neredeyse küresel morfolojiye sahip olarak elde edildi. Bu mikrokürelerden yapısal ve morfolojik özellikler göz önünde bulundurularak uygulama adımı için 1:3 mol oranına sahip p(CTP-ko-MMCA) mikroküreleri seçildi. Sonraki adımda p(CTP-ko-MMCA) (1:3) mikroküreleri biyolojik olarak önemleri bilinen altın ve gümüş nanopartikülleri ile modifiye edildi. Elde edilen mikroküreler ve metal kompozitleri uygulama aşamasında, model ilaç olarak seftriakson ve gen taşıyıcı olarak RNA salımında kullanıldı. Siklomatriks tipi polimerik yapılar ve metal kompozitlerinin aynı zamanda gram negatif (*Pseudomonas Aeruginosa*), gram pozitif (*Staphylococcus Aureus*) bakterilere ve mantarlara (*Candida Albicans*) karşı antibakteriyel aktiviteleri incelendi.

1.1. Polifosfazen Bileşikleri

Polifosfazen bileşikleri, fosfor ve azot atomları arasında çift bağ içeren makromolekül sınıfıdır. Fosfor-azot atomları arasındaki bağların burkulma enerjisinin düşük olması ve esnek olmaları nedeniyle polifosfazenler geniş uygulama alanına sahiptirler. Polifosfazenler, ısıya dirençli olmaları, suya olan toleransları, soğuk şartlara dayanıklı olmaları, radikalleşme dirençleri gibi fiziksel ve kimyasal özelliklere sahiptir (Zhao, vd., 2014)

Kullanılan sentez yöntemlerine göre farklı molekül ağırlıklı düz zincirli polifosfazenler ve halka şekilli, oluklu, küresel morfolojilere sahip çapraz bağlı polifosfazenler elde edilebilir. Polimer omurgasına bağlı iki yada daha fazla organik yan grup olduğundan polifosfazenlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri kontrol edilebilir ve bu yan gruplar ile yapıya esneklik kazandırılabilir. Biyolojik olarak bozunabilen polifosfazenlere bakıldığında yan grup olarak amino asit ester türevlerinin bulunduğu yapılar dikkat çekmektedir. Bu polifosfazenler, toksik olmayan yan ürünleri ve bozunma süresince oluşan ürünler sayesinde ortamın nötr pH'ını kontrol etmektedirler. Kontrollü ilaç salım sistemlerinde ilaç taşıyıcısı olarak, yüzey alanı geniş polifosfazen mikroküreler son yıllarda sıklıkla kullanılmaktadır (Xue, vd., 2011).

Poli(diklorofosfazenin) yer değiştirme reaksiyonlarındaki zorlukları aşmak için çok sayıda küçük molekül siklofosfazen reaksiyonları sonucu cazip başlangıç maddelerinin sentezi gerçekleştirilmiştir. Siklotrifosfazen türevlerinin molekül ağırlığı ve saflık gibi özelliklerinin kontrol edilmesi daha kolaydır. Bu sayede polifosfazen türevlerinin sentezi için de kolaylık sağlamış olur. Bu nedenle siklotrifosfazen birimleri içeren polifosfazen türevlerinin sentezi ve tasarımı biyomedikal uygulamalarda önemli bir yere sahip olmuştur. Siklotrifosfazen halkası içeren bu polimerik malzemelere yapısında vitaminler, ilaç ve amino asit grupları içerebilen, hidrojeller, mikroküreler ve misel şeklini alabilen çeşitli siklofosfazen türevleri örnek verilebilir (Qui, vd., 2015). Siklotrifosfazen halkası içeren polimerik yapıların kullanım olanağı bulunduğu uygulama alanlarının şematik bir gösterimi şekil 1'de verilmiştir (Wan ve Huang, 2017).



Şekil 1. Siklotrifosfazen halkası içeren polimerik yapıların uygulama alanları (Wan ve Huang, 2017).

1.1.1. Lineer Polifosfazenler

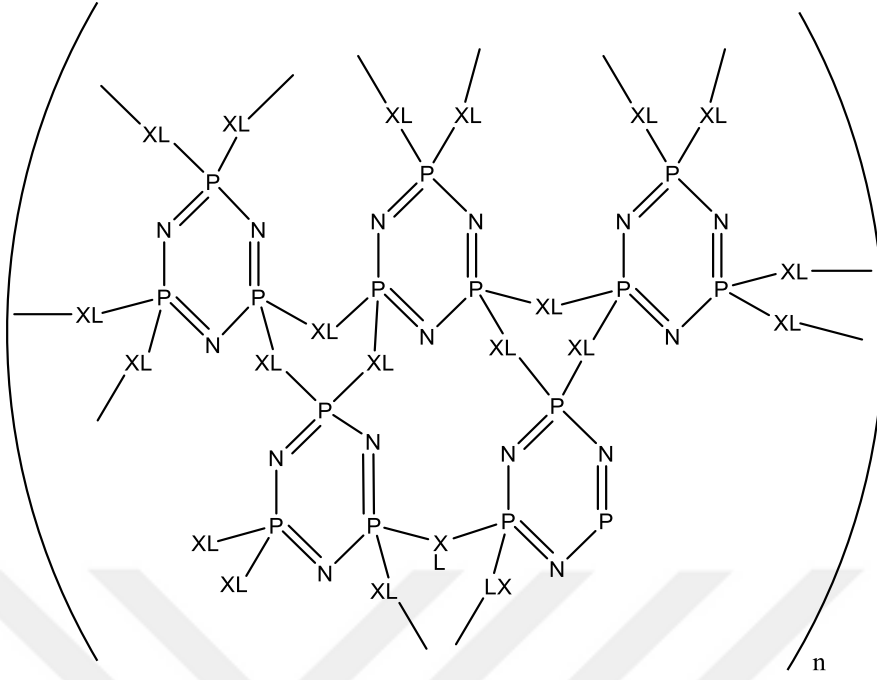
Polifosfazenlerin sentezi üzerine çok sayıda çalışma gerçekleştirilmekle birlikte bu çalışmalardan ilki H. N. Stokes tarafından 1895 yılında gerçekleştirilen ve HCCP'nin termal halka açılma polimerizasyonunu içeren çalışmadır (Stokes, 1895). Stokes tarafından gerçekleştirilen bu çalışmada, son ürün olarak elde edilen çapraz bağlı kauçuk benzeri polimer hidrolitik olarak kararsız olup bozunma ürünü olarak fosfatlar, amonyak ve hidroklorik asit oluşturan bir malzemeydi. "Anorganik kauçuk" olarak adlandırılan bu polifosfazen bileşiğinin çözünmez doğası ve hidrolitik kararsızlığı uygulama alanlarını kısıtlayan en önemli engellerdi (Ilayaperumal, vd., 2023). Bununla birlikte bilinen ilk çözünebilir polifosfazen olan lineer poli(diklorofosfazen) 1965 yılında Allcock ve Kugel tarafından HCCP'nin termal halka açılması tepkimesinde sıcaklığın ve tepkime süresinin kontrol altında tutulmasıyla başarıyla sentezlenmiştir (Allcock ve Kugel, 1965). Bu çözünür polifosfazeninde, yapısındaki polar ve oldukça reaktif P-Cl bağları nedeniyle hidrolitik olarak oldukça kararsız olmasının belirlenmesinin ardından, yine 1966'da P-Cl bağlarındaki klor atomlarının organik yan gruplar ile değiştirildiği ilk hidrolitik olarak kararlı, çözünür ve yüksek molekül ağırlığına sahip polifosfazen türevleri H. R. Allcock ve grubu tarafından hazırlanmıştır.

Yüksek sıcaklık ve vakum ortamı gerektiren HCCP'nin termal halka açılması tepkimesi yoluyla poli(diklorofosfazen) sentezi hala en çok tercih edilen yöntem olmakla birlikte, son yıllarda çapraz bağlanmaya neden olan yüksek sıcaklık engelini $AlCl_3$ gibi lewis asit katalizörlerin ve yardımcı katalizör olarak $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ ve $HSO_3(NH_2)$ 'in kullanıldığı düşük sıcaklık sentez yolları ile aşıldığı çalışmalar da mevcuttur. Bunun yanında hala yüksek sıcaklık gerektiren ve molekül ağırlığı kontrolünün mümkün olmadığı bu yöntemler son yıllarda yerini bu dezavantajların ortadan kalktığı canlı katyonik polimerizasyon tekniğine bırakmıştır. Bu teknikte monomerik trikloro(trimetilsilil) fosforaniminin oda sıcaklığında fosforpentaklorür ile vermiş olduğu kondenzasyon tepkimesi sonucu düşük molekül ağırlıklı poli(diklorofosfazen) türleri sentezlenebilmektedir (Ilayaperumal, vd., 2023); (Ogueri, vd., 2020).

1.1. 2. Siklomatriks Tipi Polifosfazenler

Siklomatriks tipi polifosfazenlerde, bir çapraz bağlayıcı halkası ve ikiden fazla donör atom içeren organik monomer bulunmaktadır. Siklomatriks tipi polifosfazen küreler, ultrasonik güç sayesinde çapraz bağlayıcı ve monomer arasında polikondenzasyon reaksiyonu ile elde edilir. HCCP, fosfazen sınıfında önemli yere sahiptir aynı zamanda stereospesifik olarak bağlanan fonksiyonel gruplara sahip çekirdek halka bulundurur. Çapraz bağlı polimerik malzemelerin elde edilmesinde kullanılmaktadır (Mehmood, vd., 2022).

Siklomatriks polifosfazenler, birkaç farklı yolla sentetik olarak elde edilebilir. Bu yöntemlerden büyük çoğunluğunda HCCP bileşiği başlangıç madde olarak tercih edilmektedir. Bu bileşiğin yapısında bulunan fosfor atomlarına bağlı klor atomları, amino grubu içeren monomerler ile yer değiştirebilir. Bu nükleofilik yer değiştirme sonucu siklomatriks yapı polifosfazenler oluşur (Şekil 2). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda siklomatriks tipi polifosfazenler, biyobozunurluk özellikleri ve bozunma ürünü olarak fosfatlar ve amonyağa parçalanması nedeniyle kontrollü ilaç dağıtım sistemlerinin geliştirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (Bi, vd., 2010).

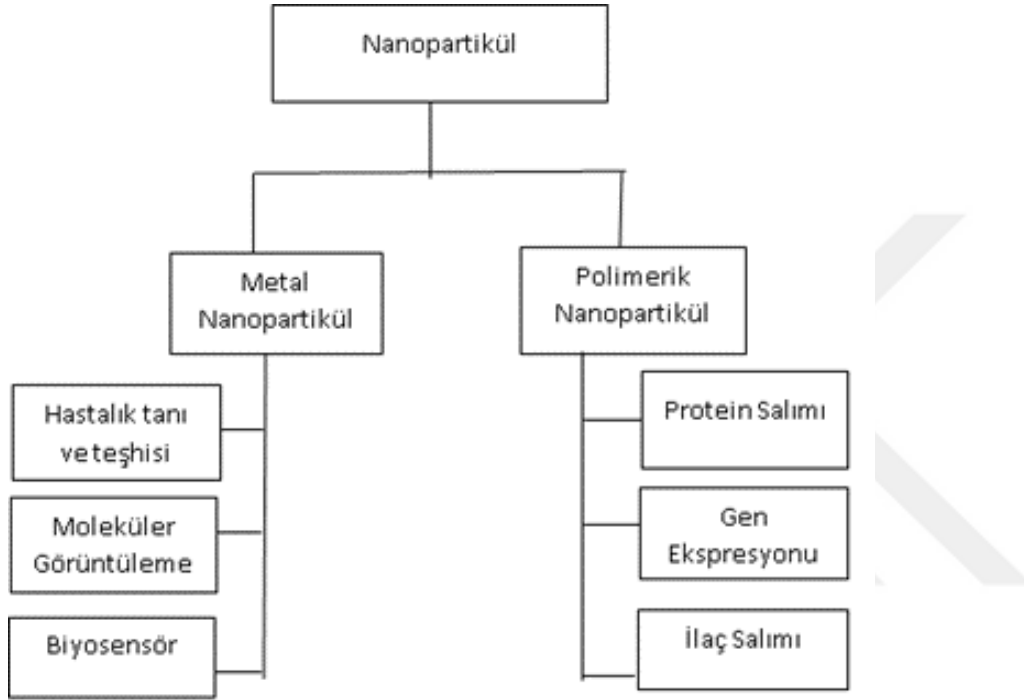


Şekil 2. Siklomatriks konfigürasyonu, XL: Difonksiyonel çapraz bağlanma grubu (Stewart, vd., 2001).

1.2. Mikropartiküllerin Yüzeylerinin Metal Nanoparçacıklar ile Modifiye Edilmesi

Mikropartiküllerin yüzeyleri metal nanoparçacıklar ile modifiye edilerek farklı işlevsel özellikler kazandırılabilir. Metal nanopartiküller, kimyasal sensör, biyoanaliz, elektronik gibi uygulama alanlarına sahiptir (Şekil 3). Çıplak metal nanoparçacıkların doğrudan kullanımı topraklanma eğilimleri nedeniyle zordur. Bu nedenle metal nanopartiküller, stabilizatörlerin varlığında hazırlanmaktadır. Bu noktada kontrol edilebilir morfolojiye sahip polimerler kullanılarak nanoparçacıkların stabilizasyonu sağlanabilir (Fu, vd., 2012).

Metal nanoparçacık-polimer kompozit uygulama alanları oldukça geniştir. Polimerik fosfazenlerin modifikasyonlarının kolay olması, nanokompozit yapıların istenilen özelliklere uygun olarak ayarlanmasına imkan sağlar. Literatürde gümüş, paladyum, altın, bakır gibi nanopartiküller halkalı fosfazen içeren yapılara dahil edilmiştir. Bu sistemlerin uygulama alanları arasında ilaç taşıyıcı sistemler, katalizör, manyetik özellikli malzemeler yer almaktadır (Wisian-Neilson ve Truong, 2020).



Şekil 3. Nanopartiküllerin uygulama alanları (Qasim, vd., 2014).

1.2.1. Altın ve Gümüş Nanopartikülleri ile Modifiye Edilen Polifosfazen Mikroküreler

Soy metaller kullanılarak elde edilen metal nanopartiküller, antimikrobiyal etkilere ve farklı kimyasal özelliklere sahiptir. Gümüş nanopartiküller, bakteri ve virüsler üzerinde antimikrobiyal etki göstermesinin yanında termal ve optik özellikler gösterir. Yaraların tedavisinde gümüş nanopartiküllerden faydalanılan çalışmalar da mevcuttur (Miranda, vd., 2021).

Altın nanopartiküller, yüzey modifikasyonun kolaylığı ve biyoyumluluğu ile ilgi görmektedir. Birçok biyomedikal uygulamada görüntüleme ve tedavi tekniklerinde altın nanopartiküllerin kullanıldığı bilinmektedir (Saverot, vd., 2015).

1.3. İçi Boş Mikroküreler

İçi boş mikro boyutlu ürünler, hem boyutları itibariyle hem de farklı bir molekülü kapsüllemek için bulundukları iç boşluklarıyla oldukça ilginç malzemelerdir. İçi boş yapılar aşağıda sayılan bazı avantajlara sahiptir. İlaç salımının düzenlenmesinde kabuk yapısı önemli rol oynar. Suda çözünürlüğü az olan ilaçlarda, içi boş yapının en büyük avantajlarından biri, ilaç partikül boyutunu azaltarak suda çözünürlüğü arttırmasıdır. İlaç adsorpsiyon yöntemiyle partiküle tutunur ve böylece ilaçların spesifik olarak hedefe iletilmesi sağlanır (Pan, vd., 2012).

İçi boş nanoküreler, yoğunluğun düşük olması, termal dirençlilik, geniş yüzey alanı, kabuktaki geçirgenlik, kontrollü depolama ve salma gibi birçok özelliği sayesinde potansiyel uygulama alanı bulabilmektedir. Biyolojik olarak parçalanabilen içi boş polimerik mikroküreler, kapsülleme özellikleri sayesinde kimyasal depolama ve kontrollü ilaç salınımı gibi alanlarda fayda sağlamaktadır. Polifosfazen mikrokürelerin sentezinde omurgaların ayarlanabilir biyobozunabilirliği etkili olmaktadır (Zhu, vd., 2008). Aynı zamanda kompozit malzemeler için fayda sağlayan içi boş mikroküreler, gaz sensör ve ilaç dağıtımı gibi uygulama alanlarına sahiptir (Han, vd., 2006).

1.4. İlaç Taşıyıcı Sistemler ve Özellikleri

İlaç salım sisteminde, genellikle polimer ve ilaç arasındaki bağlantının hidrolitik bölünmesi sayesinde taşıyıcıdan ilaç salınır. Bu ilaç salım süreci, biyolojik bozunma ve difüzyona bağlı olarak gerçekleşmektedir. İlaç, polimer nanopartikül matrisinde homojen olarak dağılır ve difüzyon yoluyla salınır. İlaç, matriks bozunmasına göre daha hızlı dağıldığında difüzyon gerçekleşir. Nanopartiküllerin ilaç salım davranışları, salım ortamının pH' sına bağlıdır (Mehmood, vd., 2020).

İlaç taşıyıcıların geliştirilmesi için pek çok doğal ve sentetik polimer sentezlenmiştir. Mikropartiküller, sürekli salım çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Kontrollü ilaç dağıtım sistemlerinin en önemli avantajı, zaman kontrollü olarak bölgeye özgü ilaç iletilmesini sağlamasıdır. Buna bağlı olarak ilaç dağıtımında güvenilir ve tekrarlanabilir bir yöntem kullanılmış olur. İlaç dağıtımının kontrollü olması, ilacın yan etkilerini azaltabilir. Bu sayede ilacın aktivitesi artarak tedavide gereken ilaç miktarı azalır (Ozay, vd., 2020).



İKİNCİ BÖLÜM

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Siklomatriks Tipi Polifosfazenlerin Uygulama Alanları

Günümüzde hastalıkların tedavisinde uygun dozlarda ilaç kullanılması için ilaç taşıyıcılar geliştirilmektedir. Nanotaşıyıcılar, bir maddenin veya terapötik ajanın hedeflenen bölgeye iletilmesi için kullanılan nanopartiküllerdir. Boyutları 1-100 nanometre (nm) çapındadır. Terapötik uygulamalarda nanotaşıyıcıların boyutunun 200 nm den az olması gerekir. Bu nanotaşıyıcılar, biyouyumluluk göstererek ilaç salımında uzun süre dolaşım periyoduna sahip olur. Nanotaşıyıcıların en önemli özellikleri arasında gelişmiş kararlılık, çözünürlük, toksisitenin azlığı ve hedefe yönelik ilaç dağıtımını sayılabilir (Chanmundeeswari, vd., 2019).

Siklotrifosfazen halkasına sahip polimerik fosfazenler ilaç salımı, katalizör, alev geciktirici gibi birçok uygulama alanına sahiptir (Şekil 1). Yüzey morfolojileri sayesinde nanopartiküller, kataliz ve ilaç salımı alanlarında fayda sağlamaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, nanopartiküller ilaç salımı uygulamalarında kullanılarak ilaç salım süreleri belirlenebilmektedir. Geliştirilen yeni ilaç dağıtım sistemlerinde, çeşitli hastalıklarda enfekte bölgeyi belirlemek ve spesifik olarak ilaç iletilmesi hedeflenmektedir (Mehmood, vd., 2022)

Ozay ve Ozay yaptıkları çalışmada, trimetoprim bazlı mikroküreler sentezlemiştir. Çapraz bağlayıcı olarak HCCP ve monomer olarak diamin grubuna sahip bir ilaç olan trimetoprim (TMP) kullanılmıştır. Monomer konsantrasyonu arttırılırken HCCP konsantrasyonu sabit tutulmuştur. TMP konsantrasyonunun arttırılması sonucu reaksiyon verimi de artmıştır. TMP konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak partikül boyutu önemli ölçüde etkilenmiş ve konsantrasyon artışıyla mikrokürelerin boyutunun arttığı rapor edilmiştir. Çalışmada sentezlenen mikrokürelerin biyolojik olarak bozunur olduğu belirlenmiştir. Elde edilen TMP bazlı polimerik yapılar, model ilaç olarak rodamin 6G ve vitamin B12'nin salımında kullanılmıştır. Fosfazen içerikli nanopartiküller, biyomedikal uygulamalarda kullanılabilir (Ozay ve Ozay, 2014)

Yapılan bir diğerk çalışmada aktif amino grupları içeren çapraz bağlı nanoküreler sentezlenmiştir. 4,4'-diaminodifenil eterin HCCP ile reaksiyonu ultrasonik banyoda yapılmıştır. Tepkimede kullanılan trietilamin (TEA), oluşan HCl'i ortamdan uzaklaştırarak fosfor ve klor bağları arasındaki nükleofilik yer değiştirme reaksiyonunu hızlandırır. FTIR analizine bakıldığında polikondenzasyonun başarılı olduğu görölmüştür. HCCP miktarı ve yüzey özellikleri birbiri ile bağlantılı olduğu belirtilmiştir. Aynı zamanda monomerden gelen -NH₂ grupları, yapıya çeşitli moleküllerin bağlanması sağladıkları için hazırlanan malzemenin oldukça geniş uygulama alanına sahip olabileceği rapor edilmiştir (Zhang, vd., 2009).

Wei ve diğerleri tarafından çapraz bağlayıcı olarak HCCP, monomer olarak 2,2'-bis(triflorometil)-4,4'-diamino difenil eter (6FODA) nın ultrasonik ortamdaki reaksiyonu sonucunda CP-6FODA mikroküreler elde edilmiştir. Mikrokürelerin boyutu ve morfolojisi HCCP ve 6FODA'nın konsantrasyonu ile orantılıdır. Bu durumun HCCP ve 6FODA'nın konsantrasyonu artırıldığında birincil çekirdeklerin çarpışma olasılığının artmasıyla mikrokürelerin istenilen boyutta elde edilmesini sağladığı bildirilmiştir. Polikondenzasyon reaksiyonu sonucu elde edilen polimerik yapılar endüstri ve tıbbi alanlarda uygulama potansiyeline sahip olduğu rapor edilmiştir (Wei, vd., 2017).

Siklomatriks tipi polifosfazenler üzerine gerçekleştirilen bir diğerk çalışmada Hou ve diğerleri tarafından poli(doksorubisin-ko-siklomatriks polifosfazen) bazlı nanopartiküller (DOX-CPPZ NP) sentezlenmiştir. SEM analizinde nanopartiküllerin ortalama çapı 125 nm ile 133 nm arasında bulunmuştur. Hedeflenen nanopartiküllerin başarıyla sentezlendiği FT-IR analizlerindeki sinyaller ile desteklenmiştir. Bunun yanında hazırlanan fosfazen esaslı nanopartiküllerden biyolojik olarak taklit edilen in vitro ortamda DOX salımı incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre DOX-CPPZ NP'nin biyolojik olarak bozunabilir bir ilaç kendi kendine salım sistemi (DFSDs) olduğu rapor edilmiştir (Hou, vd., 2019).

Yapılan bir başka çalışmada ise çapraz bağlayıcı HCCP ile 4,5-dibromofloresin (DBF)'in tepkimesinden elde edilen monodispers poli (siklotrifosfazen-ko-dibromofloresin) nanopartiküller sentezlenmiştir. Elde edilen nanopartiküller ortalama olarak 322-354 nm çapa sahiptir. Nanopartiküller, hücre görüntüleme çalışmalarında flüoresan ajan olarak kullanılmıştır (Meng, vd., 2015).

Ozay vd. yaptıkları diğler bir çalışmada tiyol grubu içeren fosfazen mikroküreler sentezlemişlerdir. Hazırlanan tiyol süstitüe polifosfazen mikrokürelerine trimethoprim ilacı yüklenerek hem antimikrobiyal özellikleri incelenmiş hemde biyolojik olarak taklit edilmiş farklı salım ortamlarında mikrokürelerden trimethoprim salım özellikleri incelenmiştir (Ozay, vd., 2020).

Yapılan başka bir çalışmada ise halkalı fosfazen olan HCCP ve 1-(2-Aminoetil) piperazin (AEP) kullanılarak küresel morfolojiye sahip siklomatriks polifosfazen nanopartikülleri elde edilmiştir. Elde edilen nanoparçacıklar Au ile modifiye edilip phz-AEP@Au nanokompozitler sentezlenmiştir. Nanoparçacıklar FT-IR, TEM, SEM-EDX, TGA, XRD, XPS yöntemleri ile karakterize edilmiştir. Sentezlenen nanopartiküller, ilaç ve gen taşıyıcı görevi görmüştür. Aynı zamanda nanoparçacıklar, antimikrobiyal özellik göstermiştir. Böylece çalışmada ilaç taşıyıcı sistemlere ve aşı uygulamalarına alternatif olarak yeni bir sistemin geliştirildiği bildirilmiştir (Özsoy ve Ozay, 2023).

Mehmood ve diğlerlerinin yaptıkları çalışmada HCCP ve luteolin kullanarak çapraz bağlı poli(siklotrifosfazen-ko-luteolin) (PCTPLT) mikroküreler elde edilmiştir. Reaksiyon ortamında oluşan tuzların uzaklaştırılması için trietilamin (TEA) ilave edilmiştir. Sentezlenen mikrokürelerin morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelendiğinde parçacık boyutunun kullanılan mol oranına bağlı olduğu görülmüştür. Mikroküreler, termogravimetrik analizleri (TGA) sonucunda termal özelliklerde artış gösterdiği, bunun mikrokürelerde güçlü bir kovalent çapraz bağların oluşmasının bir sonucu olduğu belirtilmiştir. Daha sonra mikrokürelere doksorubisin (DOX) yüklenmiş ve PBS ortamında ilaç salım davranışları incelenmiştir. DOX'un nanokürelerden 360 saat sonunda pH=7,4'de %48,1'inin salındığı belirlenmiştir (Mehmood, vd., 2022).

Yapılan diğerk bir çalışmada ilaç taşıyıcı sistem olarak silika nanoparçacıkları sentelenmiştir. Silika nanopartiküller ardışık olarak uygun reaksiyon koşullarında APTES, HCCP ve antibakteriyel ilaç TMP ile modifiye edilmiştir. Modifikasyon sonucu antibakteriyel silika nanopartiküller elde edilmiştir. Daha sonra nanopartiküller, kontrollü ilaç salımı çalışmalarında Rhodamine ve 6G (Rh6G) taşınmasında kullanılmıştır. İlaç salım alışmaları PBS ortamında gerçekleştirilmiştir. Belirli zaman aralıklarında ölçülen absorbans değerkleri kullanılarak ilaç salım miktarları belirlemiş ve salım grafikleri elde edilmiştir. Adsorbe edilen ilacın %70'inin salındığı belirlenmiştir. Modifiye edilmemiş ve modifiye silika nanopartiküllerin, ilaç yüklü nanopartiküllerin antibakteriyel aktivitesi incelenmiştir. TMP ile modifiye edilmiş ve Rh6G yüklü nanopartiküller en çok E.coli bakterisine karşı etki gösterdiği bildirilmiştir (Yılmaz ve Ozay, 2022).

Siklomatriks tipi biyobozunur polifosfazen mikro/nano yapılarına güzel bir rnek Onder ve Ozay tarafından 2021 yılında sentezlenmiştir. Asetonitril zc ortamında, pridin bazı varlığında, HCCP ve tannik asitin (TA) farklı mol oranlarının kullanılmasıyla ultrasonik banyoda (53 kHz) gerçekleştirilen reaksiyon serisiyle farklı boyut ve morfolojide polimerik partiküller elde edilmiştir. SEM analizleri ile gerçekleştirilen partiküllere ait morfolojik incelemede, bir polifenolik bileşik olan TA'in fenolik grup sayısının ortamda bulunan HCCP'nin P-Cl birimlerinin sayısına eşit olduğu stokiometrik oranın tam küresel morfolojide ve nano boyutta phz-TA siklomatriks polimerik partiküllerin sentezine imkan tanıdığı bildirilmiştir. Çalışma kapsamında elde edilen phz-TA nanopartikülleri model ilaç olan Rhodamine 6G'nin salımında biyobozunur ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmış ve pH=1,2 ve pH=7,0 ortamlarında 12 saatin sonunda partiküllerin tamamen bozunduğu ve yapısında bulunan model ilacın tamamını bu süre içerisinde saldığı rapor edilmiştir. Aynı zamanda antioksidan özelliğe sahip olan biyobozunur phz-TA nanopartiküllerinin ilaç taşıyıcı sistemler için cazip aday olduğu rapor edilmiştir (Onder ve Ozay, 2021).

İlaç taşıyıcı sistemlere alternatif olarak yapılan diğer bir çalışmada, çapraz bağlı mikroküreler çökeltme polimerizasyonu ile HCCP, ve epigallokateşin (EGC)'in çapraz bağlanması sonucu elde edilmiştir. Elde edilen kürelerin boyut ve şekli HCCP:EGC mol oranına bağlı olarak değişmektedir. Mikroküreler, antikanser ilaç taşıyıcı olarak kullanılmıştır. İlaçların kümülatif salımı pH'a bağlı olduğu rapor edilmiştir. Model ilaç olarak deksametazon (DEX) kullanılmıştır. Salım incelendiğinde, 384 saat sonra pH:4,0 da DEX'in %49,9 unun, pH:7,4 de ise %28,6 sının salındığı görülmektedir (Mehmood, vd., 2023).

Yapılan diğer bir çalışmada oktaklorosiklotetrafosfazen, flüoresin ve kersetin'in tek kap polimerizasyonu ile çapraz bağlı inorganik-organik hibrit polifosfazen küreler elde edilmiştir. Nanoküreler SEM, EDX, FT-IR, XRD teknikleri ile karakterize edilmiştir. Daha sonra hem antikanser ilaç hem monomer olan quercetin yüklenmiştir. Mikroküreler, inorganik-organik hibrit yapı olmaları ve çapraz bağlı yapıları sayesinde ultraviyole ışık altında flüoresan yoğunluğu göstermiştir. Aynı zamanda mikroküreler, organik çözücülerde ve sulu çözeltilerde dağılma özelliği göstermiştir. Bu özellikleri sayesinde kanser tedavisi, hücre görüntüleme, floresan etiketler gibi uygulamalarda yüksek potansiyele sahip olabileceği rapor edilmiştir (Metinoğlu Orum, 2022).

Başka bir çalışmada HCCP ve 4,7-dihidroksiizoflavon (4.7 DHF) kullanılarak çapraz bağlı polifosfazen mikroküreler elde edilmiştir. Ultrasonik güç ile yüksek verimli küreler sentezlemek için uygun çözücü, sıcaklık ve reaksiyon süresi seçilmiştir. En verimli polimerizasyonun 1:1 mol oranında 4.7 DHF ile sağlandığı görülmüştür. Reaksiyon sonunda trimer ve tetramer bazlı küresel morfolojiye sahip küreler elde edilmiştir. TGA, XRD ve FT-IR karakterizasyonları yapılan mikrokürelere daha sonra ibuprofen yüklenmiş ve ilaç salım çalışmaları yapılmıştır (Yuttaş Kırımlıoğlu, vd., 2021).

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal Maddeler

Fosfazen esaslı p(CTP-ko-MMCA) partiküllerinin sentezinde HCCP, MMCA (%99, Merck), TEA (%99, Sigma Aldrich), asetonitril (%99,8, Sigma Aldrich) kullanıldı. Au ve Ag nanokompozitlerinin hazırlanmasında metal iyon kaynağı olarak sodyum tetrakloroaurat (III) dihidrat ($\text{NaAuCl}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, %99, Sigma Aldrich), gümüş nitrat (AgNO_3 , %99, Sigma Aldrich) ve yeşil indirgeyici ajan olarak L-askorbik asit (AA) (%98, Sigma Aldrich), tannik asit (TA) (puris, Quality level 200, Sigma Aldrich) kullanıldı. İlaç salım çalışmalarında kullanılan ribonükleik asit (RNA, from torula yeast) ve seftriakson disodyum hemi (heptahidrat), Sigma Aldrich kimyasal firmasından temin edildi. İlaç salım çalışmalarında salım ortamı olarak kullanılan fosfat tampon çözeltisi (PBS), NaCl (%99,0, Sigma Aldrich), KCl (%99,0, Sigma Aldrich), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (%99,5, Sigma Aldrich), KH_2PO_4 (%99,0, Sigma Aldrich) kullanılarak hazırlandı. İlaç salım çalışmalarında selüloz zar diyaliz tüp (avg.flat width 25 mm (1.0 in), Sigma Aldrich) kullanıldı ve diyaliz zarın uçları sızdırmaz kapatıcılar kullanılarak kapatıldıktan sonra salım ortamına atıldı. Antimikrobiyal çalışmalarda kullanılan triptik soy agar (TSA) ve tirptik soya suyu (TSB) Merck kimyasal firmasından temin edildi. Çalışma boyunca deiyonize su kullanıldı. Bu çalışmada yapılan ilaç yükleme ve salım çalışmaları 3 tekrar yapıp ortalama değerler hesaplandı.

3.1.2. Cihazlar

Tez kapsamında hazırlanan p(CTP-ko-MMCA), p(CTP-ko-MMCA)@Au, p(CTP-ko-MMCA)@Ag partiküllerinin FT-IR spektrumları bir Perkin Elmer Spectrum 100 cihazda $4000\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ aralığında ATR aparatı kullanılarak kaydedildi. p(CTP-ko-MMCA) partiküllerine ait SEM görüntüleri ve EDX spektrumları numuneler altında kaplandıktan sonra Thermo Scientific Apreo S (EGE MATAL) ve Jeol JSM-7100-F (ÇOBİLTUM) marka cihazlar kullanılarak kaydedildi.

p(CTP-ko-MMCA)@Au ve p(CTP-ko-MMCA)@Ag kompozit partiküllerine ait SEM görüntüleri Jeol JSM-7100-F marka cihazda kaydedilirken, aynı cihazda p(CTP-ko-MMCA)@Ag kompozitindeki Ag nanopartiküllerine ait elementel haritalama görüntüleri de kaydedildi. p(CTP-ko-MMCA)@Au kompozitindeki Au nanopartiküllerine ait elementel haritalama görüntüsü kaplama işlemi yapılmaksızın FEI QUANTA FEG 250 (NABILTEM) marka cihazda kaydedildi. p(CTP-ko-MMCA)@Au ve p(CTP-ko-MMCA)@Ag kompozit partiküllerinin TEM görüntüleri Hitachi HighTech HT7700 marka (DAYTAM) cihaz kullanılarak kaydedildi. Bu amaçla öncelikle kompozit partiküller etanolde süspansiyon edildi. Bu süspansiyonun birkaç damlası karbon kaplı bakır grid üzerine damlatıldı. Çözücünün uzaklaşmasının ardından numuneler analizlendi. p(CTP-ko-MMCA), p(CTP-ko-MMCA)@Au ve p(CTP-ko-MMCA)@Ag partiküllerine ait XRD desenleri PANalytical Empyrean marka cihaz kullanılarak 5-80° (2 θ) aralığında kaydedildi. Kompozit partiküllere ait genel tarama XPS spektrumları ile Au (4f) ve Ag(3d) kısmi tarama XPS spektrumları Specs-Flex XPS cihazı (DAYTAM) kullanılarak kaydedildi. p(CTP-ko-MMCA) partiküllerinin termal özellikleri 25-800 °C aralığında 10 °C/dk ısıtma hızında Perkin ELMER TGA 8000 cihaz (ÇOBİLTUM) kullanılarak gerçekleştirilen analiz sonuçlarıyla incelendi. İlaç salım çalışmalarında partiküllere yüklenen ve partiküllerden salınan RNA ve seftriakson miktarı 1 cm ışık yoluna sahip kuartz hücre içerisindeki çözeltilerin bir PG Instruments T80+ UV-Vis spektrofotometre kullanılarak kaydedilen absorbans değerlerinden belirlendi.

3.2. Yöntem

3.2.1. Siklomatriks Poli[Siklotrifosfazen-ko-(4,4'-Metilenbis(2-metilsikloheksilamin))] (p(CTP-ko-MMCA)) Yapılarının Sentezi

Yüzey amin grubu içeren p(CTP-ko-MMCA) polimerik malzemeler ultrasonik banyoda katılma polimerizasyonu tekniğiyle sentezlendi. Bu amaçla Tablo 1'de verilen miktarlarda HCCP ve TEA içeren asetonitril (15 mL) ortamındaki reaksiyon karışımına MMCA'nın asetonitrildeki (10 mL) çözeltisi ilave edildi. Reaksiyon karışımı 3 saat boyunca 40 °C'de ultrasonik banyoda (53 kHz) karıştırıldı. Bu sırada reaksiyon karışımında beyaz renkli katıların oluştuğu gözlemlendi. Reaksiyon tamamlandığında, ortamda oluşan partiküller reaksiyon karışımının 6000 rpm'de 30 dakika boyunca santrifüjlenmesiyle ayrıldı. Beyaz renkli partiküller safsızlıklardan temizlenmek amacıyla sırasıyla su, etanol ve aseton çözücüleri kullanılarak üç kez yıkandı.

Mikroküreler oda sıcaklığında kurutuldu. HCCP ve MMCA'nın değişen mol oranlarının kullanıldığı reaksiyonlar sonucu üç farklı polimerik partikül hazırlandı. Yapısal ve morfolojik incelemeler sonucunda 1:3 HCCP:MMCA mol oranının kullanıldığı reaksiyon sonucu elde edilen p(CTP-ko-MMCA) partikülleri uygulama adımı için seçildi. Şekil 4'te başlangıç maddelerinin yapısı ve reaksiyon ortamının bir fotoğrafı şematik olarak verilmiştir.

Tablo 1

p(CTP-ko-MMCA) mikrokürelerinin sentezinde kullanılan tepkime koşulları

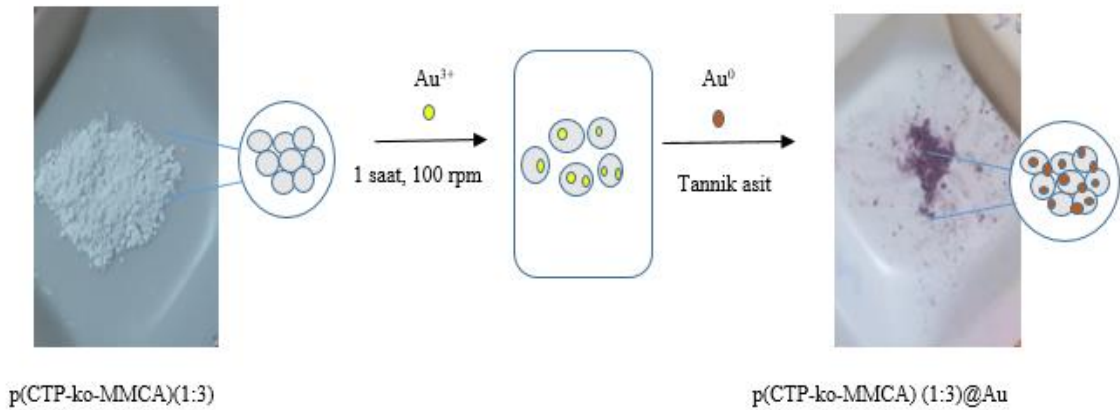
| HCCP:MMCA (Mol oranı) | HCCP (mM) | MMCA (mM) | TEA (mL) | Asetonitril (mL) |
|-----------------------|-----------|-----------|----------|------------------|
| 1:1 | 10,00 | 10,00 | 0,417 | 25 |
| 1:2 | 6,67 | 13,34 | 0,278 | 25 |
| 1:3 | 5,00 | 15,00 | 0,210 | 25 |



Şekil 4. p(CTP-ko-MMCA) mikrokürelerinin sentezine ait şematik gösterim.

3.3. p(CTP-ko-MMCA)@Au Mikrokürelerinin Elde Edilmesi

Mikrokürelerin altın ile modifiye işlemi iki adımda gerçekleştirildi. İlk olarak Au(III) iyonlarının p(CTP-ko-MMCA) partiküllerine adsorpsiyonu için 25 mg p(CTP-ko-MMCA) partikülü 250 mg/L konsantrasyona sahip Au(III) iyon çözeltisinin 10 mL'sine ilave edildi. Karışım oda sıcaklığında 1 saat boyunca 300 rpm'de manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Sürenin sonunda karışım 6000 rpm'de 20 dk santrifüj edildi. Au(III) iyonları adsorplanmış açık sarı renkli p(CTP-ko-MMCA) partikülleri ayrıldı. Partiküller 1 kez 20 mL'de deiyonize su ile yıkandı. İkinci adımda, Au(III) iyonlarının indirgeme işlemi için sarı renkli p(CTP-ko-MMCA)@Au^(III) partiküllerine hem 250 mg/L TA hem de 250 mg/L AA çözeltisinin 10 mL'si ayrı ayrı ilave edildi. Manyetik karıştırıcıda 70°C'de 1 saat boyunca 300 rpm hızda karıştırıldı. Mikrokürelerin renginin TA ile indirgeme sonucu kırmızı-mor renge, AA ile indirgeme sonucu siyahımsı yeşil renge döndüğü gözlemlendi. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında soğutulurak 6000 rpm'de 20 dakika santrifüjlendi. Bunun sonucunda p(CTP-ko-MMCA)@Au mikroküreleri elde edildi. Mikroküreler iki kez deiyonize su ile yıkandıktan sonra vakum etüvünde 30 °C'de kurutulurak uygulama ve karakterizasyon aşamaları için desikatörde saklandı.



Şekil 5. p(CTP-ko-MMCA) (1:3) mikrokürelerinin altın ile modifiye edilmesi.

3.4. p(CTP-ko-MMCA)@Ag Mikrokürelerinin Elde Edilmesi

Mikrokürelerin gümüş ile modifiye işlemi iki adımda gerçekleştirildi. İlk adımda 25 mg p(CTP-ko-MMCA) partikülü 250 mg/L konsantrasyona sahip Ag(I) çözeltisinin 10 mL'sine ilave edildi. Karışım oda sıcaklığında 1 saat boyunca 300 rpm'de manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Süre sonunda karışım 6000 rpm'de 20 dk santrifüjlenerek Ag(I) iyonları adsorplanmış gri renkli p(CTP-ko-MMCA)@Ag partikülleri ayrıldı. Partiküller 1 kez 20 mL'de deiyonize su ile yıkandı. İkinci adımda Ag(I) iyonlarının indirgeme işlemi için gri renkli p(CTP-ko-MMCA)@Ag^(I) partiküllerine hem 250 mg/L TA hem de 250 mg/L AA çözeltisinin 10 mL'si ayrı ayrı eklendi. Manyetik karıştırıcıda 70°C de 300 rpm hızda 1 saat boyunca karıştırıldı. Mikrokürelerin renginin TA ile indirgeme sonucu kahverengimsi gri renge, AA ile indirgenme sonucu ise koyu gri renge döndüğü gözlemlendi. Karışım oda sıcaklığında soğutulurak 6000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Çöktürme sonucu p(CTP-ko-MMCA)@Ag mikroküreleri elde edildi. Mikroküreler iki kez deiyonize su ile yıkandıktan sonra vakum etüvünde 30 °C'de kurutuldu ve desikatörde saklandı.

3.5. İlaç Yükleme ve Salım Çalışmaları

p(CTP-ko-MMCA) (1:3), p(CTP-ko-MMCA)@Au ve p(CTP-ko-MMCA)@Ag mikrokürelere ilaç yükleme ve salımı oda sıcaklığında aşağıda belirtilen yöntem ile gerçekleştirildi (Ozay ve Ozay, 2014).

Mikropartiküller ve metal kompozitleri, model ilaç olarak seftriakson sodyumun kontrollü salımında kullanılmıştır. İlaç yükleme işleminde 20 mg mikropartikül 250 ppm 20 mL ilaç çözeltisi (seftriakson veya RNA) içinde 24 saat manyetik karıştırıcıda 300 rpm'de karıştırıldı. 24 saat sonunda mikroküreler 6000 rpm'de 20 dakika santrifüjlendi. Her bir örnek tarafından adsorplanan seftriakson ve RNA miktarını belirlemek için çöktürme sonucu elde edilen sıvı kısmın UV-Vis spektrumunda seftriakson için $\lambda=241$ nm'deki ve RNA için $\lambda=260$ nm'deki absorban değerleri kullanılarak seftriakson ve RNA için oluşturulan kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak mikroküreler tarafından adsorplanan ilaç miktarı belirlendi.

Denklem 3.1'e göre p(CTP-ko-MMCA) mikrokürelerinin ve metal kompozitlerinin maksimum tuttuğu ilaç miktarı hesaplandı.

$$q_e = [(C_1 - C_e)V]/W \quad 3.1$$

Eşitlikte, C_1 :Başlangıç konsantrasyonu, C_e :Denge konsantrasyonu, V :Seftriakson sodyum veya RNA çözeltilisinin hacmi (L), W :Mikrokürelerin kuru kütleleridir.

İlaç ve gen salımı çalışmaları için, 6 cm uzunluğunda kesilen selüloz membran diyaliz tüpler içerisine başlangıç kütleleri 20 mg olan p(CTP-ko-MMCA) (1:3), p(CTP-ko-MMCA)@Au ve p(CTP-ko-MMCA)@Ag mikropartikülleri yerleştirildi. Diyaliz tüplerin açık uçları düğümsüz şekilde uçları kapatan ve sızdırmazlık sağlayan diyaliz membran kapaticılar ile kapatılarak 37 °C'de pH=7,4 olan PBS tampon çözeltilisinin 20 mL'si içerisine atıldı. Salım ortamından belirli aralıklar ile alınan numunelerin seftriakson için $\lambda=241$ nm'deki ve RNA için $\lambda=260$ nm'deki absorbans değerleri kullanılarak aynı dalga boyunda elde edilen kalibrasyon grafiklerinden yararlanılarak salınan miktarlar Denklem 3.1 kullanılarak hesaplandı. Salınan seftriakson ve RNA miktarı kullanılarak mg/g salım grafikleri elde edildi.

3.6. Antimikrobiyal Etkinlik İncelemesi

p(CTP-ko-MMCA) mikrokürelerinin ve metal kompozitlerinin antimikrobiyal özellikleri için gram negatif, gram pozitif bakteriler ve mantar kullanılarak kuyucuk açma yöntemi ile incelendi. Antibakteriyel testler için gram negatif bakteri olarak *P.aeruginosa* ATCC 27853 ve gram pozitif bakteri olarak *S.aureus* ATCC 6538 kullanıldı. Üçüncü mikrobiyal tür *C.Albicans* mantarlarıydı. Bu amaçla, kültür ortamında bulunan koloniler, 15 ml TSB ile süspansiyon edildi ve süspansiyon gece boyunca 37 °C'de 100 rpm'de karıştırıldı. Hazırlanan bakteri süspansiyonunun 25 µL'si, besi yeri olarak TSA içeren petri kaplarına yayıldı. Bakteri süspansiyonlu besiyerinin yüzeyine kuyucuk açılarak 100 µL DMSO ile süspansiyon edilen mikroküreler kuyucuk içerisine ekildi. Petri kapları 37°C'de 15 saat inkübe edildi. 15 saat sonunda mikrokürelere ve metal kompozitlere ait inhibisyon çapları ölçüldü.

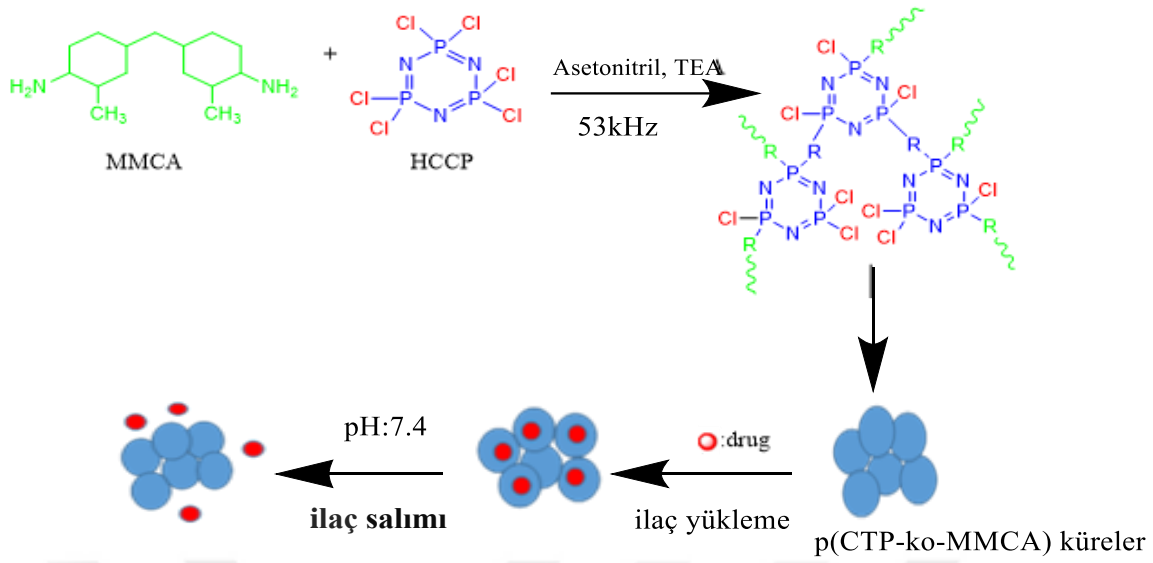
DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışmada biyomedikal uygulamalarda yararlanılabilecek siklomatriks tipi polifosfazenlerin sentezlenmesi hedeflenmiştir. HCCP ve MMCA kullanılarak içi boş p(CTP-ko-MMCA) mikroküreler ve p(CTP-ko-MMCA)@Au ve p(CTP-ko-MMCA)@Ag kompozit mikroküreler elde edilmiştir. Elde edilen mikroküreler kontrollü ilaç salımında kullanılmıştır.

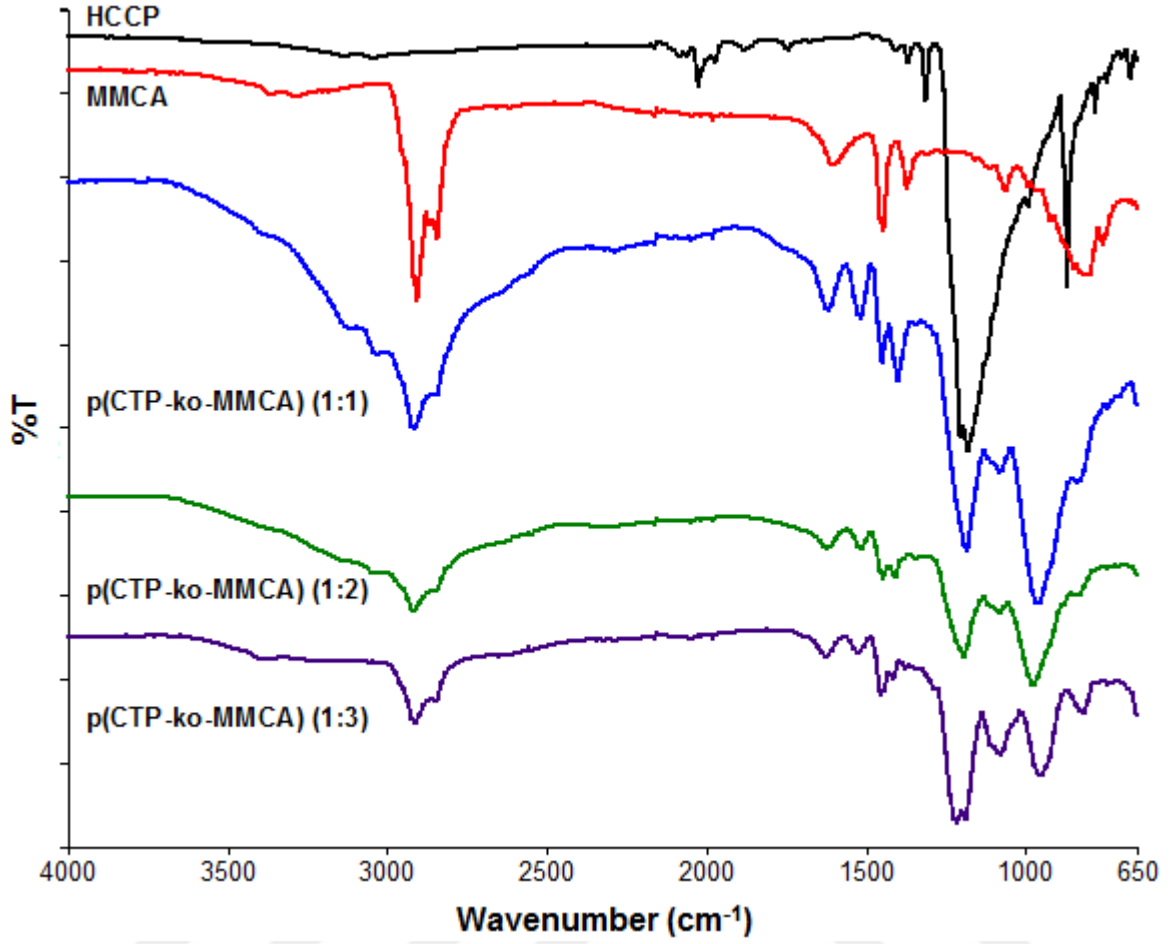
4.1. p(CTP-ko-MMCA) Mikrokürelerinin ve Altın/Gümüş Kompozitlerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

Polimerizasyon reaksiyonunda MMCA molekülündeki $-NH_2$ gruplarının HCCP üzerindeki P-Cl grupları ile nükleofilik yer değiştirmesi sonucu P-NH- bağları meydana gelir ve aynı zamanda HCl oluşur. Reaksiyon ortamında bulunan TEA molekülleri, reaksiyon sonucu oluşan HCl'i nötralleştirerek trietilamonyum klorür (TEA.HCl) tuzunu oluşturur. Bu tuz reaksiyon çözücüsü olarak kullanılan asetonitril içerisinde çözünür. Bu doğrultuda, çalışma kapsamında ultrasonik banyoda gerçekleştirilen reaksiyon sonucu siklotrifosfazen (CTP) halkası içeren p(CTP-ko-MMCA) mikroküreleri hazırlandı. Mikrokürelerin sentezine ait şematik bir gösterim Şekil 6'da verildi. Mikroküreler, yüzeylerinde kalan TEA.HCl ve reaktanlardan temizlenmek amacıyla sırasıyla su, etanol ve aseton ile yıkandı. Tablo 1' de gösterildiği gibi sentez aşamasında, reaksiyon ortamındaki toplam reaktif konsantrasyonu 20 mM'da sabit tutuldu. HCCP ile MMCA arasındaki mol oranları değiştirilerek 1:1, 1:2, 1:3 HCCP:MMCA mol oranına sahip p(CTP-ko-MMCA) mikroküreler elde edildi. Elde edilen p(CTP-ko-MMCA) mikroküreleri biyomedikal uygulamalar için cazip olan altın ve gümüş nanopartiküller ile modifiye edildi. Metalik nanopartiküllerin sentezlenmesi için indirgeyici ajan olarak doğal içerikli TA ve AA kullanıldı. p(CTP-ko-MMCA) mikroküreleri ve metal kompozitleri FT-IR, TEM, SEM-EDX, XRD, TGA ve XPS teknikleri ile karakterize edildi. Polimerik malzemeler model ilaç olarak seftriakson sodyumun ve RNA'nın salımında kullanıldı.



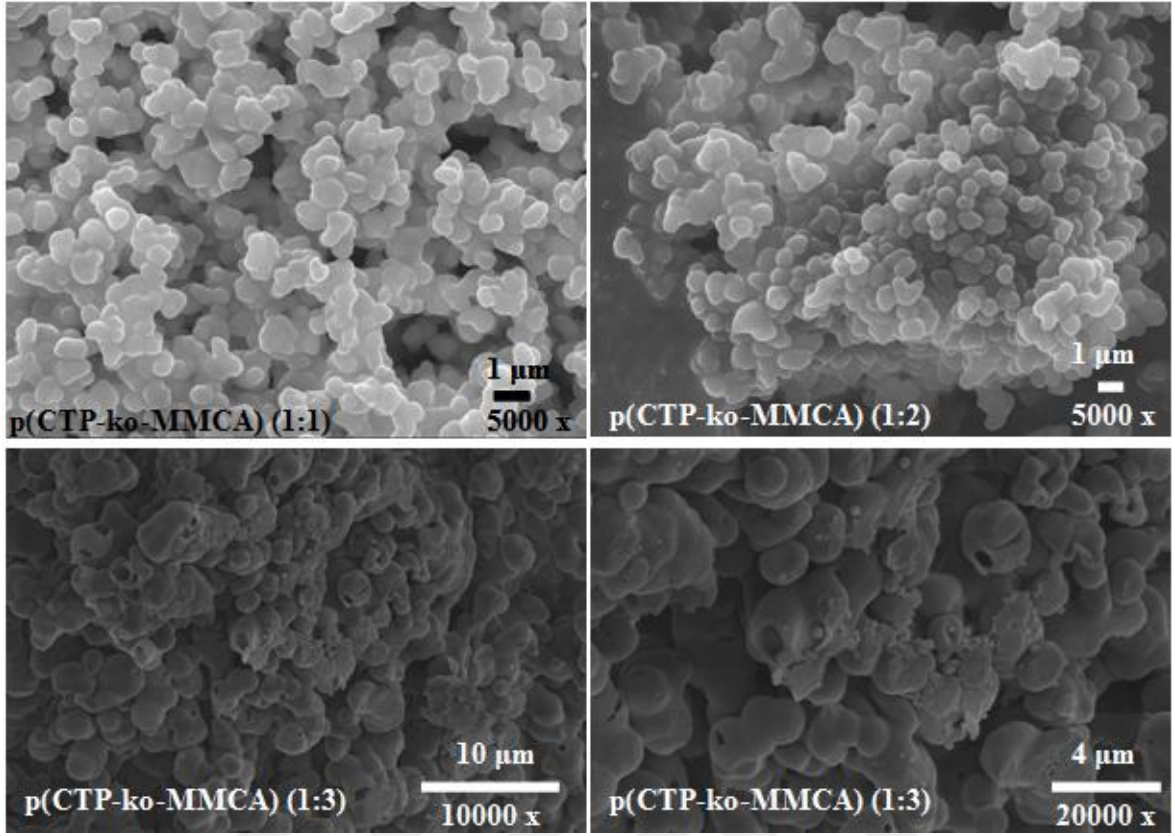
Şekil 6. p(CTP-ko-MMCA) mikrokürelerinin sentezi, ilaç yükleme ve salımına ait şematik gösterim.

Elde edilen mikrokürelerin kimyasal yapı analizinin gerçekleştirilmesi için HCCP, MMCA ve 1:1, 1:2, 1:3 HCCP:MMCA mol oranına sahip p(CTP-ko-MMCA) yapılarının FT-IR spektrumları alındı (Şekil 7). MMCA'nın spektrumuna bakıldığında, moleküle ait karakteristik N-H gerilmesi 3289 cm^{-1} de görülürken, alifatik C-H gerilme piki $2908-2844\text{ cm}^{-1}$ 'de, N-H eğilmesi 1603 cm^{-1} 'de gözlemlendi. Yüksek verimle elde edilen p(CTP-ko-MMCA) (1:3) mikrokürelere ait spektrum incelendiğinde ise MMCA monomerine ait karakteristik pikler C-H gerilmesi 2914 cm^{-1} 'de, N-H eğilme 1523 cm^{-1} 'de, P=N piki 1217 cm^{-1} 'de ve P-N gerilme piki 954 cm^{-1} 'de gözlemlendi. Ayrıca 1:1 ve 1:2 mol oranlarına sahip nanokürelerin spektrumlarına da bakıldığında P=N gerilmesine ait şiddetli pikler sırasıyla 1186 cm^{-1} ve 1191 cm^{-1} 'de görülmektedir (Coşkun, vd., 2019). Polimerik malzemelerde MMCA ve HCCP'nin tüm piklerinin gözlemlendiği ve polimerik yapının başarıyla sentezlendiği söylemek mümkündür.



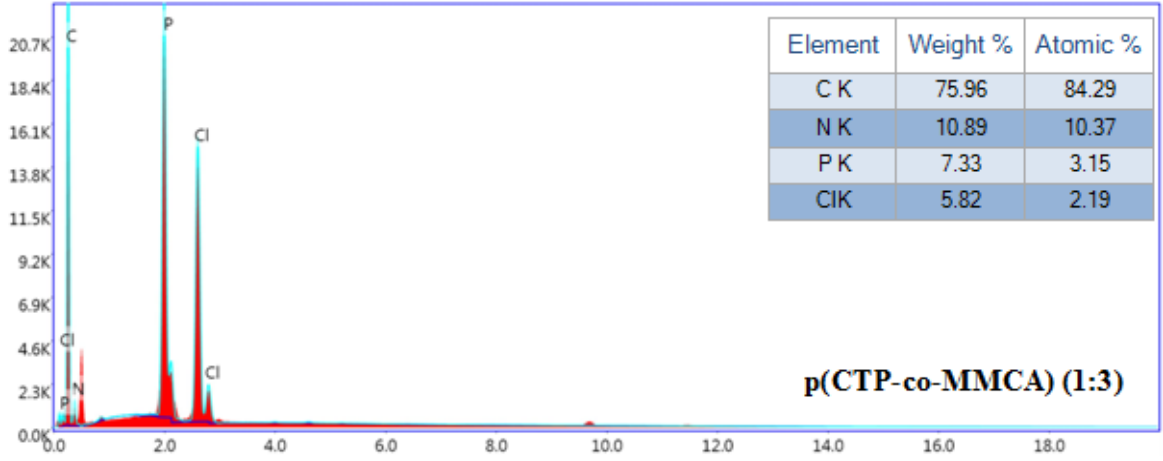
Şekil 7. p(CTP-ko-MMCA) mikrokürelere ve başlangıç maddelerine ait FT-IR spektrumları.

Siklomatriks tipi fosfazenlerde elde edilen partikülün boyutu, sentez aşamasında kullanılan trimer ve monomer oranlarına bağlı olarak değişir (Ozay ve Ozay, 2014). Farklı oranlarda HCCP ve MMCA kullanılarak sentezlenen p(CTP-ko-MMCA) partiküllerinin boyut ve morfolojisi SEM analizi ile incelendi. Bu amaçla karbon bant üzerine yapıştırılan toz partiküller altın ile kaplandıktan sonra SEM görüntüleri kaydedildi. 1:1, 1:2, 1:3 HCCP:MMCA mol oranlarına sahip p(CTP-ko-MMCA) mikrokürelere ait SEM görüntüleri Şekil 8’de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi MMCA miktarı arttıkça düzgün morfolojik yapıya sahip mikrokürelere elde edilirken, HCCP mol oranı arttıkça morfolojik olarak şekilsiz, bozuk yapıların oluştuğu gözlenmiştir. 1:1 HCCP:MMCA mol oranında hazırlanan polimerik malzemenin homojen olmayan bir dağılıma sahip olduğu, 1:3 oranındaki mikrokürelere homojen ve küre formuna sahip olup içi boş yapılar oluştuğu söylenebilir.



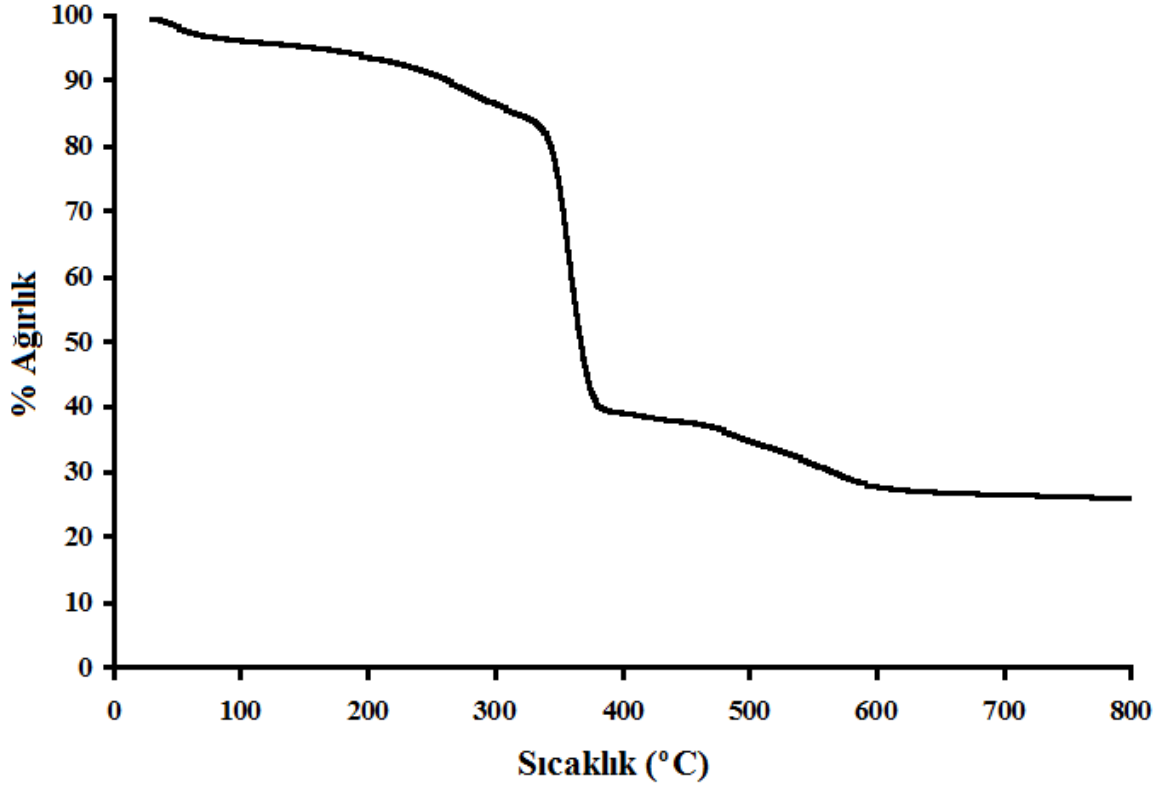
Şekil 8. p(CTP-ko-MMCA) mikrokürelere ait SEM görüntüleri.

p(CTP-ko-MMCA) (1:3) yüzey atomlarının incelenmesi için mikrokürelere EDX spektrumları kaydedildi. Şekil 9’da verilen EDX spektrumu incelendiğinde mikrokürelere başlangıç maddesi olan HCCP ve MMCA elementlerinin tamamını içerdiği görüldü. Mikropartikül yüzeyi, ağırlıkça % 10,89 oranında yoğun olarak N atomları içerir. Buna bağlı olarak yüzey amin gruplarına sahip polifosfazen mikrokürelere başarılı bir şekilde sentezlendiği söylenebilir.



Şekil 9. p(CTP-ko-MMCA) (1:3) mikrokürelerine ait EDX spektrumu.

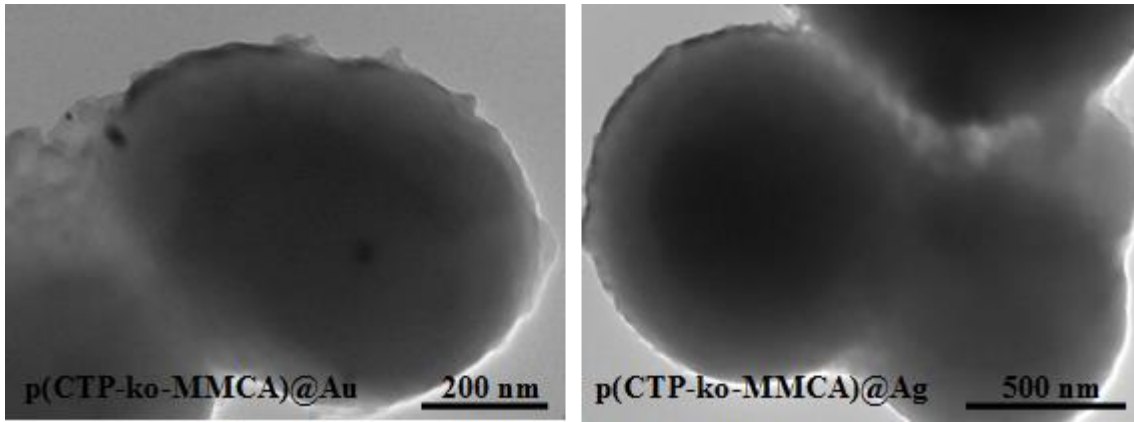
Fosfazen içerikli yapıların termal olarak kararlı yapılar olduğu bilinmektedir. Bu nedenle 1:3 HCCP:MMCA mol oranında sentezlenen p(CTP-ko-MMCA) mikrokürelerin termal analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 10'da verilen termogramdan görüleceği üzere 30-100 °C aralığında görülen % 3,80'lik ağırlık kaybı mikrokürelerdeki nemin uzaklaştırıldığını göstermektedir. İlk dikkate değer ağırlık kaybı 330-390 °C aralığında gözlenmiş olup bu aralıkta yapıdan % 44,55'lik ağırlık kaybı gerçekleşmiştir. 390-600 °C aralığında gözlenen bozunma sonucu 600 °C'de mikroküreler başlangıç ağırlıklarının %72,17'sini kaybetmiştir. Analizin sonlandığı 800 °C'de %74,02'lik ağırlık kaybı olup, termal analiz sonucu oluşan kalıntı yüzdesi 25,98'dir.



Şekil 10. P(CTP-ko-MMCA) (1:3) mikrokürelerine ait TGA eğrisi.

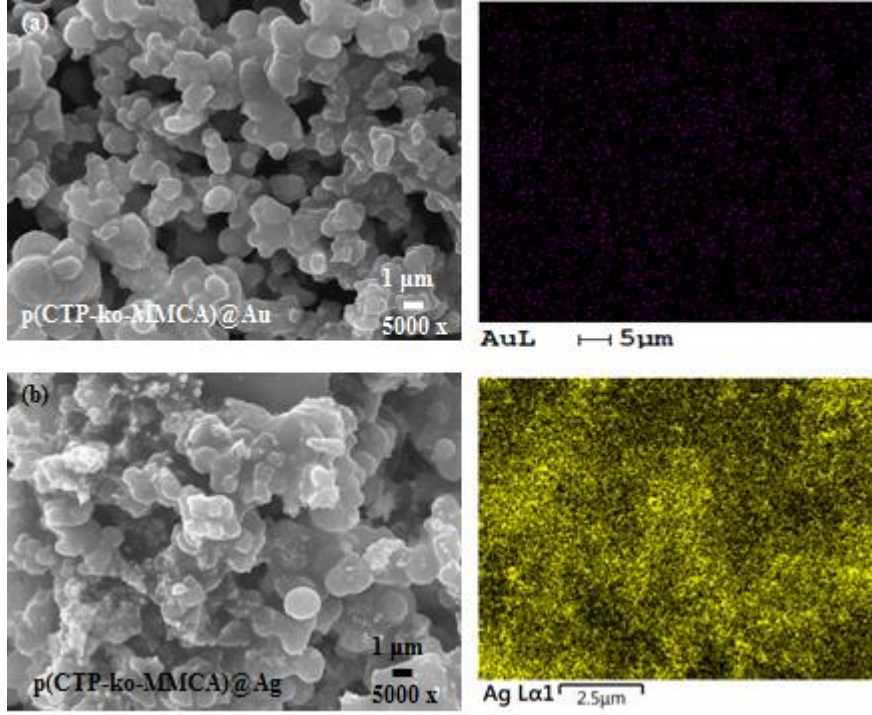
Sentez ve karakterizasyon işlemleri sonrası hem yüzey amin gruplarının farklı oluşu hemde içi boş küre formu nedeniyle tez çalışmasının uygulama adımı için p(CTP-ko-MMCA) (1:3) mikroküreleri seçildi. İlaç salım çalışmalarına geçilmeden, biyomedikal uygulamalarda eşsiz özellikleri nedeniyle sıklıkla tercih edilen metalik altın ve gümüş nanopartiküllerinin p(CTP-ko-MMCA) (1:3) mikrokürelerinin modifikasyonunda kullanımı gerçekleştirildi. Burada amaç ilaç salım çalışmalarında kullanılması hedeflenen mikro partiküllere antimikrobiyal aktivite gibi ekstra özellikler kazandırmaktı. Bu amaçla p(CTP-ko-MMCA) (1:3) mikrokürelerine öncelikle sulu ortamdan Au^{3+} ve Ag^+ iyonları adsorplatıldı. Sonraki adımda mikrokürelerin adsorpladığı metal iyonlarının indirgenmesi adımına geçildi. Bu noktada biyomedikal uygulamalar için kullanılması hedeflenen kompozit mikrokürelerin sentezi için, metal nanopartiküllerin sentezinde sıklıkla tercih edilen kimyasal hidrürler yerine yeşil bir yöntem tercih edildi. Bu amaçla yeşil indirgeyici ajan olarak her iki metal iyonu içinde ayrı ayrı TA ve AA kullanıldı.

TA kullanılarak elde edilen p(CTP-ko-MMCA)@Au ve p(CTP-ko-MMCA)@Ag kompozit mikrokürelerin yapısında metalik nanopartiküllerin varlığı öncelikle TEM analizi ile incelendi. Bu amaçla etil alkolde süspansiyon edilen kompozit partiküllerin karbon kaplı bakır ızgara üzerine damlatılan birkaç mikrolitrelik süspansiyonu kullanılarak gerçekleştirilen TEM analizi gerçekleştirildi. Analiz sonucu elde edilen TEM görüntüleri Şekil 11’de verildi. TEM görüntülerinde mikroküreler üzerinde desteklenmiş birkaç nanometrelik metalik nanopartiküllerin varlığı yeşil indirgeme işleminin gerçekleştiğini ve p(CTP-ko-MMCA)@Au ve p(CTP-ko-MMCA)@Ag kompozitlerinin başarıyla sentezlendiğini göstermektedir.



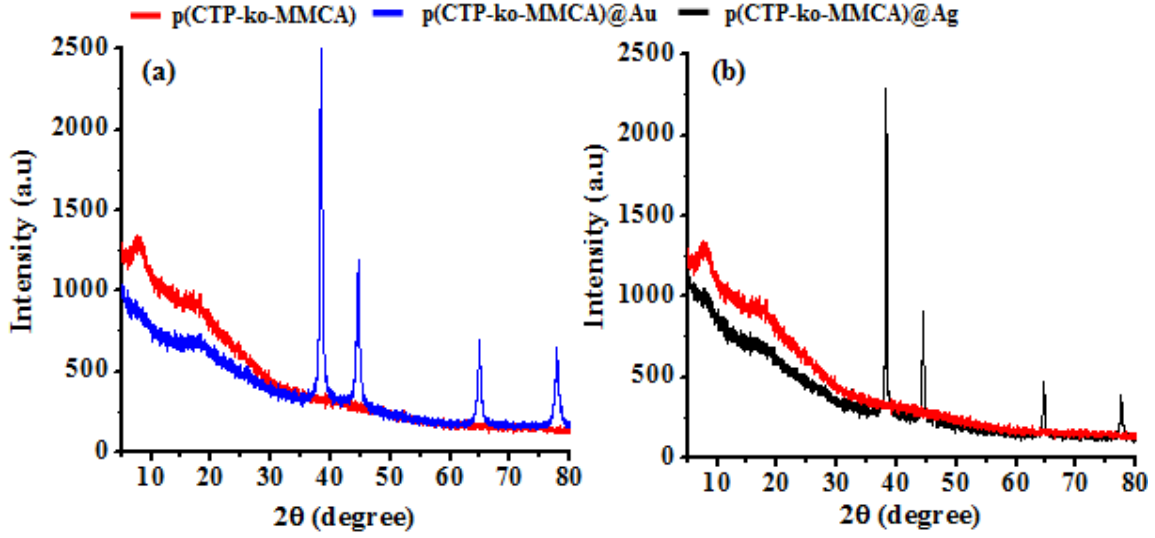
Şekil 11. p(CTP-ko-MMCA)@Au ve p(CTP-ko-MMCA)@Ag kompozit mikrokürelerine ait TEM görüntüleri.

p(CTP-ko-MMCA)@Au ve p(CTP-ko-MMCA)@Ag kompozit mikrokürelerinin yapısında Au⁰ ve Ag⁰ nanopartiküllerinin varlığı EDX ve elementel haritalama analizleri ile desteklenmiştir. Bu amaçla p(CTP-ko-MMCA)@Au mikrokürelerinin altınla kaplama işlemi yapılmadan ve p(CTP-ko-MMCA)@Ag mikrokürelerinin ise altınla kaplama işlemi yapıldıktan sonra SEM cihazında EDX ve elementel haritalama görüntüleri kaydedildi. Şekil 12a’da p(CTP-ko-MMCA)@Au kompozit mikrokürelerine ait SEM görüntüsü ve yapıdaki altın elementine ait elementel haritalama görüntüsü verildi. Benzer şekilde Şekil 12b’de p(CTP-ko-MMCA)@Ag kompozit mikrokürelerine ait SEM görüntüsü ve yapıdaki gümüş elementine ait elementel haritalama görüntüsü verildi. Her iki kompozit içinde elde edilen görüntüler yapıda metalik nanopartiküllerin varlığını göstermektedir.



Şekil 12. p(CTP-ko-MMCA)@Au ve p(CTP-ko-MMCA)@Ag kompozit mikrokürelere ait SEM ve elementel haritalama görüntüleri.

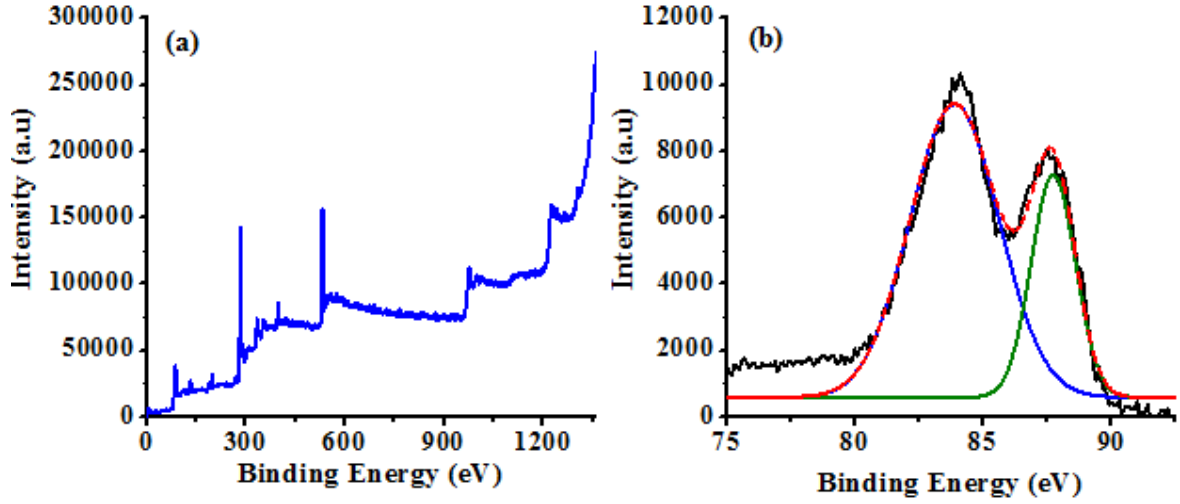
TEM görüntülerinden nm ölçekte olduğu görülen Au⁰ ve Ag⁰ partiküllerinin kristal özelliği göstermesi beklendiği için p(CTP-ko-MMCA) mikrokürelere, p(CTP-ko-MMCA)@Au ve p(CTP-ko-MMCA)@Ag kompozitlerinin XRD analizleri gerçekleştirildi. Şekil 13’de verilen XRD görüntülerinden görüleceği gibi p(CTP-ko-MMCA) mikrokürelere polimerik yapıdan kaynaklanan 7,42° ve 16,50° civarında geniş iki kırınım desenine sahiptir. p(CTP-ko-MMCA)@Au kompozitine ait XRD deseninde $2\theta=38,42^\circ$, $44,61^\circ$, $64,80^\circ$, $77,66^\circ$ ’de gözlenen pikler (111), (200), (220), (311), (222) Bragg yansımalarına karşılık gelir. Bu değerler yapıdaki altın nanopartiküllerin nanokristalin özellikte olduğunu ve yüzey merkezli kübik kafesten oluştuğunu işaret eder (Şekil 13a). p(CTP-ko-MMCA)@Au kompozitine ait XRD pik değerleri Das ve Biswas tarafından gerçekleştirilen yeşil yolla sentezlenen altın nanopartikülleri için elde edilen değerlerle uyumludur (Das ve Biswas, 2023). XRD analizleri TEM görüntülerinde gözlenen nanoboyutlu Au⁰ nanopartiküllerinin varlığını bir kez daha desteklemiştir.



Şekil 13. P(CTP-ko-MMCA) mikroküreleri, p(CTP-ko-MMCA)@Au ve p(CTP-ko-MMCA)@Ag kompozit mikrokürelerine ait XRD desenleri.

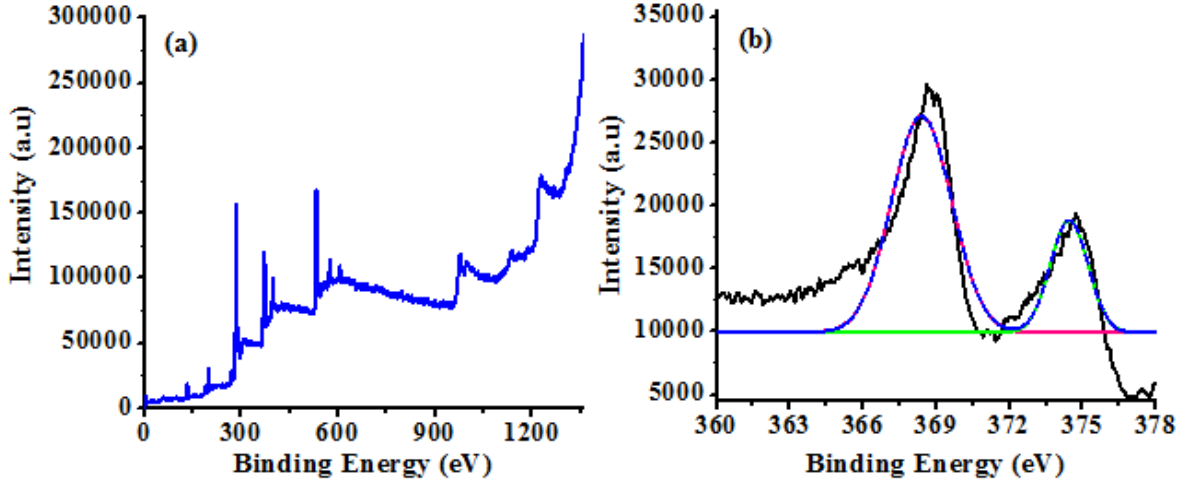
p(CTP-ko-MMCA)@Ag kompozit mikrokürelerine ait XRD deseni Şekil 13b'de p(CTP-ko-MMCA) mikrokürelerine ait XRD deseni ile çakışık olarak verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi p(CTP-ko-MMCA)@Ag mikroküreleri $2\theta=38,44^\circ$, $44,35^\circ$, $64,54^\circ$, $77,46^\circ$ 'da gözlenen pikler (111), (200), (220), (311), (222) Bragg yansımalarına karşılık gelir ve yapıda bulunan gümüşlerin nanokristalin özellikte ve yüzey merkezli kübik kafes yapıyı gösterir. Analiz sonucu elde edilen veriler literatürde yeşil yolla sentezlenen Ag^0 nanopartikülleri için rapor edilen değerler ile uyumludur (Sandulovici, vd., 2023).

Metalik nanopartiküllerin yapıdaki varlığının ve oksidasyon halinin incelenmesi amacıyla sıklıkla XPS analizleri kullanılır. Bu nedenle tez çalışması kapsamında p(CTP-ko-MMCA)@Au ve p(CTP-ko-MMCA)@Ag kompozit mikrokürelerinin XPS analizleri gerçekleştirildi. Şekil 14a p(CTP-ko-MMCA)@Au kompozit mikrokürelerine ait genel tarama XPS spektrumunu gösterirken, Şekil 14b yapıda bulunan Au^0 nanopartiküllerine ait 4f bağ enerji bölgesine ait yüksek çözünürlüklü XPS spektrumunu göstermektedir.



Şekil 14. (a) p(CTP-ko-MMCA)@Au kompozit mikrokürelerine ait genel tarama XPS spektrumu, (b) p(CTP-ko-MMCA)@Au'nun 4f bölgesine ait XPS spektrumu

Şekil 14a'da verilen genel tarama spektrumunda 284,0 eV, 398,0 eV ve 532,0 eV'deki pikler sırasıyla C 1s, N,1s ve O 1s bölgesine aittir. Bu pik değerlerine ilaveten 133,0 eV ve 191,0 eV değerlerinde gözlenen pikler sırasıyla yapıda bulunan bir diğer element olan P 2s ve P 2p bölgelerini işaret etmektedir (Onder ve Ozay, 2021). Genel tarama spektrumunda ayrıca 85 eV ve 88 eV değerlerinde gözlenen iki pik Au 4f bölgesini göstermektedir. Kompozit partikülün yapısında bulunan Au⁰ nanopartiküllerinin oksidasyon durumunun daha detaylı incelemesi için Au 4f bölgesine ait yüksek çözünürlüklü XPS spektrumu kaydedildi. Şekil 14 b'de verilen spektrumdan görüldüğü gibi Au 4f bölgesi için iki pik görüldü. Burada Au 4f_{7/2}'ye ait pik 84,10 eV bağ enerji değerinde gözlenirken 4f_{5/2}'ye ait pik 87,80 eV bağ enerji değerinde gözlenmiştir. Bu iki değer arasındaki 3,70 eV lik fark yapıdaki Au⁰ a ait spin-yörünge bölünmesine işaret etmektedir. Bunun yanında spektrumda yaklaşık 92 eV bağ enerji değerinde herhangi bir pikin gözlenmemesi p(CTP-ko-MMCA) mikroküreleri tarafından adsorplanan Au³⁺ iyonlarının tamamının TA ile başarılı şekilde Au⁰'a indirgenmiş olduğunu desteklemektedir (Maity, vd., 2023). XPS analizi sonucu elde edilen verilerden görüldüğü gibi p(CTP-ko-MMCA)@Au kompozit yapısı başarıyla sentezlenmiş olup yapıda bulunan altın bileşeninin tamamının oksidasyon durumunun Au⁰ şeklindedir.



Şekil 15. (a) p(CTP-ko-MMCA)@Ag kompozit mikrokürelerine ait genel tarama XPS spektrumu, (b) p(CTP-ko-MMCA)@Ag'ün 3d bölgesine ait XPS spektrumu.

p(CTP-ko-MMCA)@Ag kompozit mikrokürelerine ait genel tarama XPS spektrumunu Ag^0 nanopartiküllerine ait 3d bağ enerji bölgesine ait yüksek çözünürlüklü XPS spektrumunu Şekil 15'de verilmiştir. Şekil 15a'da verilen genel tarama spektrumunda 284,0 eV, 399,0 eV ve 533,0 eV'deki pikler sırasıyla C 1s, N,1s ve O 1s bölgesine aittir. Bu pik değerlerine ilaveten 133,0 eV ve 191,0 eV değerlerinde gözlenen pikler sırasıyla yapıda bulunan bir diğer element olan P 2s ve P 2p bölgelerini işaret etmektedir (Onder ve Ozay, 2021). Genel tarama spektrumunda ayrıca 369 eV ve 375 eV değerlerinde gözlenen iki pik Ag 3d bölgesini göstermektedir. Kompozit partikülün yapısında bulunan Ag^0 nanopartiküllerinin oksidasyon durumunun daha detaylı incelemesi için Ag 3d bölgesine ait yüksek çözünürlüklü XPS spektrumu kaydedildi. Şekil 13 b'de verilen spektrumdan görüldüğü gibi Ag 3d bölgesi için iki pik görüldü. Burada Ag $3d_{5/2}$ 'ye ait pik 368,80 eV bağ enerji değerinde gözlenirken $3d_{3/2}$ 'ye ait pik 374,80 eV bağ enerji değerinde gözlenmiştir. Bu iki değer arasındaki 6,00 eV lik fark yapıdaki Ag^0 'a ait spin-yörünge bölünmesine işaret etmektedir (Zeng, vd., 2023). XPS analizi sonucu elde edilen verilerden görüldüğü gibi p(CTP-ko-MMCA)@Ag kompozit yapısı başarıyla sentezlenmiş olup yapıda bulunan gümüş bileşeninin tamamının oksidasyon durumu Ag^0 şeklindedir.

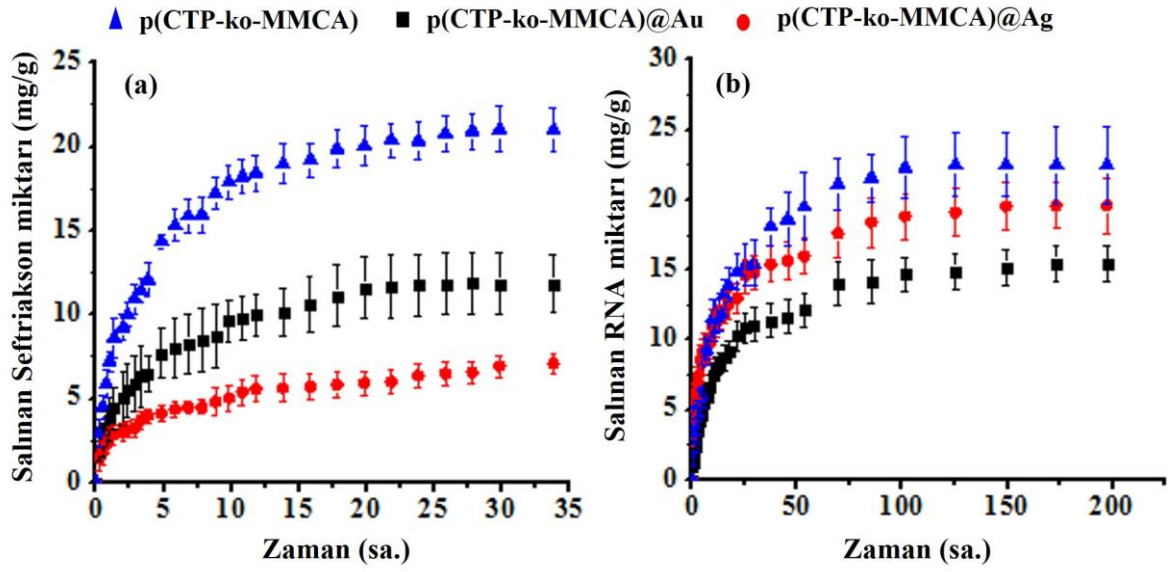
4.2. p(CTP-ko-MMCA), p(CTP-ko-MMCA)@Au, p(CTP-ko-MMCA)@Ag Mikrokürelerine İlaç Yükleme ve Salım Çalışması

p(CTP-ko-MMCA), p(CTP-ko-MMCA)@Au, p(CTP-ko-MMCA)@Ag mikrokürelerinin potansiyel ilaç salım sistemi olup olmayacağı araştırıldı. Bu amaçla model ilaç olarak seftriakson sodyum ve RNA kullanıldı. İlaç salım çalışmalarına ilk adımda model ilaç olan seftriakson sodyumun p(CTP-ko-MMCA), p(CTP-ko-MMCA)@Au ve p(CTP-ko-MMCA)@Ag mikrokürelere yüklenmesi işlemi ile başlandı. Seftriakson sodyum çözeltisi 250 mg/L konsantrasyonunda hazırlandı. 20'şer mg hazırlanan p(CTP-ko-MMCA), p(CTP-ko-MMCA)@Au, p(CTP-ko-MMCA)@Ag mikrokürelere homojen bir şekilde karıştırılmış 20 mL seftriakson çözeltisi ilave edildi. 24 saat manyetik karıştırıcıda 300 rpm hızda karıştırıldı. 24 saat sonunda mikroküreler 6000 rpm'de santrifüjlendi. Elde edilen sıvı kısmın UV-Vis spektrumunda $\lambda=241$ nm'deki absorpsiyon değeri kullanılarak ilaç için oluşturulan kalibrasyon grafiğine göre adsorplanan ilaç miktarı belirlendi. p(CTP-ko-MMCA) mikroküreler için tutulan maksimum ilaç miktarı 48.21 ± 5.34 mg/g, p(CTP-ko-MMCA)@Au mikroküreler için 49.36 ± 6.95 mg/g ve p(CTP-ko-MMCA)@Ag mikroküreler için 23.95 ± 6.45 mg/g olarak belirlendi.

Seftriakson sodyum yüklü p(CTP-ko-MMCA), p(CTP-ko-MMCA)@Au (TA) ve p(CTP-ko-MMCA)@Ag (TA) mikrokürelerinin salım çalışmaları PBS ortamında pH=7,4'de gerçekleştirildi. Şekil 16a'da seftriakson yüklü mikrokürelerin PBS ortamında zamana bağlı salım profilleri verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi ilk 1 saat içerisinde p(CTP-ko-MMCA) mikrokürelerinden seftriakson sodyumun ortamdaki salımı 7.25 mg/g iken, ilk 6 saatte salımı 15.89 mg/g'dır. 30 saat sonunda seftriakson sodyumun salınan miktarının 20.96 mg/g olduğu belirlendi. p(CTP-ko-MMCA)@Au mikrokürelerinin aynı ortamda seftriakson sodyum salımı 1, 6, 30 saat sonunda sırasıyla 3.72 mg/g, 8.29 mg/g, 11.83 mg/g olarak belirlendi. p(CTP-ko-MMCA)@Ag mikrokürelerinden aynı ortamda seftriakson sodyum salımı ilk 1 saatte 2.70 mg/g, altıncı saatte 4.45 mg/g, otuzuncu saatte 6.94 mg/g olduğu belirlendi. İlacın mikrokürelerden başarılı bir şekilde salındığı görüldü. Salım profillerine bakıldığında p(CTP-ko-MMCA) mikrokürelerinin yapısına Au⁰ veya Ag⁰ nanopartiküllerinin ilave edilmesiyle daha yavaş ilaç salım davranışının elde edilmesinin mümkün olduğu görüldü.

İkinci adımda p(CTP-ko-MMCA), p(CTP-ko-MMCA)@Au ve p(CTP-ko-MMCA)@Ag mikrokürelere RNA yükleme işlemi yapıldı. RNA çözeltisi 250 mg/L konsantrasyonunda hazırlandı. 20'şer mg hazırlanan p(CTP-ko-MMCA), p(CTP-ko-MMCA)@Au ve p(CTP-ko-MMCA)@Ag mikrokürelere homojen şekilde karıştırılmış 20 mL RNA çözeltisi eklendi. 24 saat 300 rpm hızda manyetik karıştırıcıda karıştırılan mikrokürelere, RNA yükleme işleminin tamamlanmasının ardından 6000 rpm'de santrifüjlenerek RNA çözeltisinden ayrıldı. Elde edilen sıvı kısmının UV-Vis spektrumunda $\lambda=260$ nm'deki absorpsiyon değeri kullanılarak RNA için oluşturulan kalibrasyon grafiğinden adsorplanan RNA miktarı belirlendi. p(CTP-ko-MMCA) mikrokürelere için tutulan maksimum RNA miktarı 79.15 ± 6.85 mg/g, p(CTP-ko-MMCA)@Au mikrokürelere için 47.49 ± 6.24 mg/g, p(CTP-ko-MMCA)@Ag mikrokürelere için 57.47 ± 9.48 mg/g olarak belirlendi.

RNA yüklü p(CTP-ko-MMCA), p(CTP-ko-MMCA)@Au, p(CTP-ko-MMCA)@Ag mikrokürelere RNA salımı PBS ortamında pH=7,4'de gerçekleştirildi. Şekil 16b'de RNA yüklü mikrokürelere PBS ortamında zamana bağlı salım profilleri verildi. Şekilde görüldüğü gibi p(CTP-ko-MMCA) mikrokürelere RNA salımının ilk 1 saatte 4.34 mg/g 6 saatte 9.29 mg/g iken, ellinci saatin sonunda bu değer 19.50 mg/g oldu. 100 saat sonunda salınan RNA miktarı 22.30 mg/g olarak belirlendi. p(CTP-ko-MMCA)@Au mikrokürelere RNA salımına bakıldığında ilk 1 saatte 2.38 mg/g, altıncı saatte 5.97 mg/g ve ellinci saatte 12.15 mg/g iken, yüzüncü saatin sonunda 14.65 mg/g RNA salındığı belirlendi. p(CTP-ko-MMCA)@Ag mikrokürelere RNA salımı 1, 6, 50 ve 100 saat sonunda sırasıyla 5.66 mg/g 9.43 mg/g, 15.95 mg/g, 18.80 mg/g olarak belirlendi. RNA'nın mikrokürelere salımının seftriakson sodyum'dan daha yavaş gerçekleştiği görüldü. Bu özelliğin, biyomedikal uygulamalarda özellikle uzun sürede kontrollü gen salımı işlemlerinde avantaj olacağını söylemek mümkündür.



Şekil 16. (a) p(CTP-ko-MMCA), p(CTP-ko-MMCA)@Au ve p(CTP-ko-MMCA)@Ag mikrokürelerinin zamana bağlı seftriakson salımı, (b) p(CTP-ko-MMCA), p(CTP-ko-MMCA)@Au ve p(CTP-ko-MMCA)@Ag mikrokürelerinin zamana bağlı RNA salımı

İlaç salım profilleri kullanılarak aynı zamanda hazırlanan her üç ilaç taşıyıcı sistem içinde ilaç salımına ait kinetik parametreleri belirlemek için Sıfırinci Derece (Zero order), Birinci Derece (First order), Higuchi ve Korsmeyer-Peppas modelleri uygulandı.

Sıfır derece modelde zamana karşı konsantrasyon grafiği çizilerek ilaç salım hız sabiti (K), regresyon sabiti (R^2) değerleri hesaplandı (Denklem 4.1). Denklemde, Q_t : t zamanında çözünen ilaç miktarı, Q_0 : Başlangıçtaki ilaç miktarı, K_0 : Sıfır derecede salınım katsayısıdır.

$$Q_t = Q_0 + K_0 t \quad (4.1)$$

Birinci derece modelde, kalan ilacın logaritmik fonksiyonuna bağlı olarak zamana karşı ilaç salım profilleri belirlendi (Denklem 4.2). Burada C_0 : Başlangıç ilaç konsantrasyonu, k: birinci derece hız sabiti, t: zaman olarak ifade edilir.

$$\log C = \log C_0 - Kt / 2.303 \quad (4.2)$$

Higuchi modelde, sistemde bulunan ilacın zamana bağlı salınımı ifade edildi (Denklem 4.3). Denklemde Q: t zamanında salınan ilaç miktarı, A:ilaç taşıyıcı yüzey alanı, D: İlaç difüzyon katsayısı, C_s: Matris içindeki ilaç çözünürlüğü, C:başlangıç ilaç konsantrasyonudur.

$$f_t = Q = A \sqrt{D(2C-C_s) C_s t} \quad (4.3)$$

Korsmeyer Peppas modelinde sistemde $\ln t$ 'ye karşı $\ln Q_t/Q_\infty$ grafiği çizilerek difüzyon üsteli (n), ilaç salım hız sabiti (K), regresyon sabiti (R^2) değerleri hesaplandı (Denklem 4.4)

$$\log (M_t/M_\infty) = \log K_p + n \log t \quad (4.4)$$

M_t : t anındaki madde miktarı, M_∞ : toplam etkin madde miktarı, k: Salım yapan sistemin sabiti, n: difüzyonal sabit

Tablo 2’de Mikrokürelere seftriakson sodyum salımı için hesaplanan değerler verildi. RNA salımı için de difüzyon verileri hesaplandı ve Tablo 3’de verildi (Dash, vd., 2010).

Tablo 2

Mikrokürelere ait seftriakson sodyum salımı için kinetik parametreler

| Mikrokürelere | Korsmeyer Peppas | | | Zero Order | | First Order | | Higuchi | |
|-------------------|------------------|----------------|-------|----------------|-------|----------------|-------|----------------|-------|
| | n | R ² | K | R ² | K | R ² | K | R ² | K |
| p(CTP-ko-MMCA) | 1,960 | 0,981 | 0,048 | 0,701 | 0,509 | 0,546 | 0,016 | 0,946 | 0,217 |
| p(CTP-ko-MMCA)@Au | 2,123 | 0,993 | 0,022 | 0,780 | 0,329 | 0,629 | 0,022 | 0,953 | 0,436 |
| p(CTP-ko-MMCA)@Ag | 2,837 | 0,974 | 0,070 | 0,780 | 0,134 | 0,684 | 0,011 | 0,963 | 0,859 |

Tablo 3

Mikrokürelere ait RNA salımı için kinetik parametreler

| Mikrokürelere | Korsmeyer Peppas | | | Zero Order | | First Order | | Higuchi | |
|-------------------|------------------|----------------|-------|----------------|-------|----------------|-------|----------------|-------|
| | n | R ² | K | R ² | K | R ² | K | R ² | K |
| p(CTP-ko-MMCA) | 2,189 | 0,939 | 0,011 | 0,722 | 0,146 | 0,531 | 0,005 | 0,916 | 0,462 |
| p(CTP-ko-MMCA)@Au | 1,789 | 0,994 | 0,014 | 0,684 | 0,072 | 0,445 | 0,004 | 0,888 | 0,004 |
| p(CTP-ko-MMCA)@Ag | 3,103 | 0,981 | 0,012 | 0,706 | 0,090 | 0,534 | 0,003 | 0,904 | 0,681 |

p(CTP-ko-MMCA) mikrokürelere ve metal kompozitlerinin çözünme hızı kinetiklerine uygunlukları araştırıldı. Tüm mikrokürelere hesaplanan değerlerine bakıldığında en yüksek korelasyon katsayıları (R²) Higuchi modelinde görülmüştür. Buna bağlı olarak mikrokürelere seftriakson ve RNA salımının Higuchi modeline uygun olduğu belirlendi. İlaç salımı, zamanın kareköküne bağlı olarak değişim göstermiştir. Matraste çözünürlüğün az olması nedeniyle higuchi modelinde uygunluk görüldüğü söylenebilir. Higuchi modeli, başlangıç konsantrasyonunun ilaç çözünürlüğünden yüksek olması ve ilaç difüzyonunun tek boyutta gerçekleşmesi hipotezine dayanır (Prasanth, vd., 2019).

Korsmeyer peppas modelinde deneysel verilerin % 60'ı kullanılarak hesaplama yapıldı. Bu modelde n=0,45 durumu fickian, 0,45 < n < 0,89 durumu fickian olmayan ve n >0,89 durumu süper aktarımı göstermektedir. p(CTP-ko-MMCA), p(CTP-ko-MMCA)@Au ve p(CTP-ko-MMCA)@Ag mikrokürelere için n değerlerine bakıldığında seftriakson ve RNA salımı için süper durum difüzyon gerçekleştiğini söylemek mümkündür (Ozay, vd., 2020).

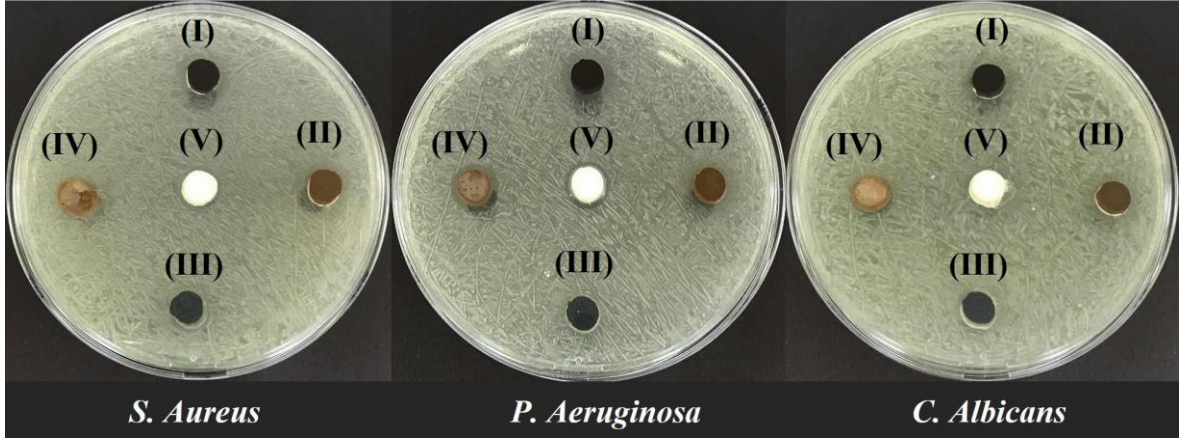
4.3. p(CTP-ko-MMCA), p(CTP-ko-MMCA)@Au, p(CTP-ko-MMCA)@Ag Mikrokürelerin Antibakteriyel ve Antifungal Etkilerinin Değerlendirilmesi

Altın ve gümüş nanopartiküller, çeşitli biyolojik fonksiyonlara sahiptir. Bu fonksiyonlardan en bilineni antibakteriyel özellikleridir. Metal partiküller, bakterilerin hücre zarına yapışır ve peptidoglikan yapısına etki ederek bakterileri ölümüne sebep olur. Antibakteriyel özellikleri, genellikle gram negatif bakteriler üzerine olmaktadır (Alfei ve Schito, 2020). Bu çalışmada, kuyucuk açma yöntemi kullanılarak p(CTP-ko-MMCA), p(CTP-ko-MMCA)@Au ve p(CTP-ko-MMCA)@Ag mikrokürelerin antibakteriyel özellikleri araştırıldı. Analiz sonuçları Şekil 17’de verildi.

Mikrokürelerin etkisi, *P.Aeruginosa* gram negatif bakteri, *S.Aureus* gram pozitif bakteri ve *C.Albicans* mantarları olarak üç tür üzerinde incelendi. p(CTP-ko-MMCA)@Au, p(CTP-ko-MMCA)@Ag mikrokürelerin gram negatif bakteriler üzerinde etkili olduğu görüldü. Modifiye işleminde metalik nanopartiküllerin iyonlarından hazırlanması adımı TA ve AA asit ile indirgeme yapılarak tüm metal kompozitlerde antibakteriyel çalışmalar yapılmıştır. Beklendiği gibi gram pozitif bakteriler üzerinde etki göstermediği sonucuna varıldı.

Yapılan tüm analizlere bakıldığında metal içermeyen mikroküreler, metal içeren mikrokürelere göre daha az etki göstermiştir. Mikrokürelerde metal içeriğinin olmaması halinde küçük bölge çapları görüldü. Elde edilen sonuçlara göre metal içeren mikrokürelerin antibakteriyel etkisinin daha fazla olduğu görüldü. Bunun sonucunda ilaç ve gen taşıyıcısı olan antibakteriyel özellik gösteren yeni bir ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmiştir.

p(CTP-ko-MMCA), p(CTP-ko-MMCA)@Au, p(CTP-ko-MMCA)@Ag mikrokürelerin antibakteriyel etkinliklerine ait dijital kamera görüntüleri Şekil 17’de verildi. Şekil 17’de mikrokürelerin *S.Aureus* bakterisine karşı etki göstermediği görülmektedir. Şekilde p(CTP-ko-MMCA), p(CTP-ko-MMCA)@Au (TA), p(CTP-ko-MMCA)@Ag (TA), p(CTP-ko-MMCA)@Au (AA), p(CTP-ko-MMCA)@Ag (AA) mikrokürelerinin *P. Aeruginosa* bakterisine karşı zon çapları sırasıyla 1,3 mm, 1,5 mm, 1 mm, 1,6 mm gözlemlendi. Şekilden görüldüğü gibi, *C. Albicans* üzerindeki etkilere bakıldığında yalnızca p(CTP-ko-MMCA)@Ag (AA) mikrokürelerde 1,2 mm zon çapı mevcuttu.



Şekil 17. p(CTP-ko-MMCA), p(CTP-ko-MMCA)@Au (TA), p(CTP-ko-MMCA)@Ag (TA), p(CTP-ko-MMCA)@Au (AA), p(CTP-ko-MMCA)@Ag (AA) mikrokürelerinin *S. Aureus*, *P. Aeruginosa* ve *C. Albicans*'a karşı antimikrobiyal etkilerine ait fotoğraf ((I) p(CTP-ko-MMCA)@Au (TA), (II) p(CTP-ko-MMCA)@Ag (TA), (III) p(CTP-ko-MMCA)@Au (AA), (IV) p(CTP-ko-MMCA)@Ag (AA), (V) p(CTP-ko-MMCA))

BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇ VE ÖNERİLER

Son yıllarda artan sağlık sorunları nedeniyle ilaç kullanımı artmıştır. İlaçlar organizmada absorpsiyon, dağılım, metabolizma gibi süreçlerden geçmektedir. Etkili bir tedavi sağlamak amacıyla nanoteknolojik uygulama alanı olan kontrollü ilaç salım sistemleri geliştirilmiştir. Kontrollü ilaç salım sistemlerinde belirlenen dozlarda, hedeflenen dokuya zamana bağlı olarak kontrollü ilaç salımı yapılmaktadır. Kontrollü ilaç salım sistemlerinin avantajları arasında sitotoksik olmaması, biyobozunurluk, biyouyumluluk ve antibakteriyel özellik göstermeleri sayılabilir.

Bu tez çalışmasında biyomedikal uygulamalarda yararlanılabilecek siklomatriks tipi yüzey amin gruplarına farklı bileşimlerde p(CTP-ko-MMCA) mikroküreleri sentezlendi. Yapısal ve morfolojik analizler sonucu başlangıç maddesi reaktifler olarak 1:3 oranında HCCP:MMCA kullanılarak sentezlenen p(CTP-ko-MMCA)'in içi boş mikroküre formunda olduğu belirlendi. Elde edilen içi boş p(CTP-ko-MMCA) mikroküreleri iki farklı indirgeyicinin kullanımıyla biyomedikal uygulamalar için cazip olan Au⁰ ve Ag⁰ nanopartikülleri ile modifiye edildi. Metal kompozit yapılar daha iyi antibakteriyel özellik gösterdi. Modifiye işlemi mikrokürelere sadece antibakteriyel özellik katmakla kalmadı, aynı zamanda yavaş bir ilaç alım davranışı da kazandırdı. Polimerik malzemeler model ilaç olarak seftriakson sodyumun ve RNA'nın salımında kullanıldı.

Seftriakson sodyum yüklü p(CTP-ko-MMCA), p(CTP-ko-MMCA)@Au (TA) ve p(CTP-ko-MMCA)@Ag (TA) mikrokürelere PBS ortamında pH= 7,4'de altıncı saat sonunda sırasıyla 15.89 mg/g, 8.29 mg/g, 4.45 mg/g seftriakson salımı gerçekleşti. RNA yüklü p(CTP-ko-MMCA), p(CTP-ko-MMCA)@Au (TA), p(CTP-ko-MMCA)@Ag (TA) mikrokürelere PBS ortamında pH=7,4'de ellinci saat sonunda sırasıyla 19.50 mg/g, 12.15 mg/g, 15.95 mg/g olarak belirlendi.

Mikrokürelerin etkisi, *P.Aeruginosa* gram negatif bakteri, *S.Aureus* gram pozitif bakteri ve *C.Albicans* mantarları olarak üç tür üzerinde incelendi. p(CTP-ko-MMCA)@Au, p(CTP-ko-MMCA)@Ag mikrokürelerin gram negatif bakteriler üzerinde etkili olduğu görüldü.

Tüm yönleriyle incelendiğinde bu çalışmada ilk olarak sentezlenen siklomatriks tipi polifosfazen p(CTP-ko-MMCA) kullanılarak antibakteriyel özellikli yeni tür ilaç ve gen taşıyıcı sistemlerin geliştirildiği söylenebilir.



KAYNAKÇA

- Alfei, S., ve Schito, A. (2020). "Positively Charged Polymers as Promising Devices against Multidrug Resistant Gram-Negative Bacteria: A Review". *Polymers*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/polim12051195>
- Allcock, H., ve Kugel, R. (1965). "Synthesis of High Polymeric Alkoxy- and Aryloxyphosphonitriles". *Journal of the American Chemical Society*, 87(18), 4216-4217. <https://doi.org/10.1021/ja01096a056>
- Allcock, H., ve Morozowich, N. (2012). "Bioerodible polyphosphazenes and their medical potential". *Polymer Chemistry*, 578-590. <https://doi.org/10.1039/c1py00468a>
- Andrianov, A., ve Chen, J. (2006). "Polyphosphazene microspheres: Preparation by ionic complexation of phosphazene polyacids with spermine". *Journal of Applied Polymer Science*, 414-419. <https://doi.org/10.1002/app.22402>
- Bi, Y., Yin, Y., Huang, R., ve Li, Y. (2010). "Synthesis, characterization, in vitro degradation and cytotoxicity of polyphosphazenes containing N-ethoxypyrrolidone side groups". *Polymer International*, 269-275. <https://doi.org/10.1002/pi.2720>
- Chanmundeewari, M., Jeslin, J., ve Verma, M. (2019). "Nanocarriers for drug delivery applications". *Environmental Chemistry Letters*, 849-865. <https://doi.org/10.1007/s10311-018-00841-1>
- Luckachan G. E., ve Pillai C. K. S. (2011). "Biodegradable Polymers-A Review on Recent Trends and Emerging Perspectives". *Journal of Polymers and The Environment*, 637-676. <https://doi.org/10.1007/s10924-011-0317-1>
- Coşkun, M., Baydemir, T., ve Coşkun, D. (2019). "Phosphazene Containing Polymer Synthesis and Dielectric by ATRP Method". *Afyon Kocatepe University Journal of Science and Engineering*, 19, 307-316. <https://doi.org/10.35414/akufemubid.559067>
- Das, U., ve Biswas, R. (2023). "Unravelling optical properties and morphology of plasmonic gold nanoparticles synthesized via a novel green route". *Chemical Papers*. <https://doi.org/10.1007/s11696-023-02716-4>
- Dash, S., Murthy, P., Nath, L., ve Chowdhury, P. (2010). "Kinetic Modeling on Drug Release From Controlled Drug Delivery Systems". *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 67(3), 217-223.
- Demircioğlu, Y., ve Örum, M. (2019). "One-pot synthesis and characterization of crosslinked polyphosphazene dopamine microspheres for controlled drug delivery applications". *Journal of Macromolecular Science Part A-Pure and Applied Chemistry*, 854-859. <https://doi.org/10.1080/10601325.2019.1615838>
- Fu, J., Wang, M., Zhang, C., Xu, Q., Huang, X., ve Tang, X. (2012). "Controlled fabrication of noble metal nanoparticles loaded on the surfaces of cyclotriphosphazene-

- containing polymer nanotubes". *Journal of Materials Science*, 1985-1991. <https://doi.org/10.1007/s10853-011-5994-6>
- Guimaraes, I., Costa, R., Madureira, S., Borges, S., Oliveira, A., Pintado, M., ve Baptista, S. (2023). "Tannic Acid Tailored-Made Microsystems for Wound Infection". *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms24054826>
- Han, A., Jadwisieniczak, W., ve Kordesch, M. (2006). "From Zn microspheres to hollow ZnO microspheres: A simple route to the growth of large scale metallic Zn microspheres and hollow ZnO microspheres". *Physica E-Low-Dimensional Systems Nanostructures*, 331-335. <https://doi.org/10.1016/j.physe.2006.03.159>
- Hou, S., Chan, S., Dong, Y., Gao, S., Zhu, B., ve Lu, Ç. (2018). "Biodegradable Cyclomatrix Polyphosphazene Nanoparticles: A Novel pH-Responsive Drug Self-Framed Delivery System". *Acs Applied Materials & Interfaces*, 25983-25993. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b06114>
- Hou, S.-L., Chen, S.-S., Huang, Z.-J., ve Lu, Q.-H. (2019). "Dual-responsive polyphosphazene as a common platform for highly efficient drug self-delivery". *Journal of Materials Chemistry*, 4319-4327.
- Ilayaperumal, P., Chelladurai, P., Vairan, K., Anilkumar, P., ve Balagurusamy, B. (2023). "Polyphosphazenes-A Promising Candidate for Drug Delivery, Bioimaging, and Tissue Engineering: A Review". *Macromolecular Materials and Engineering*, 308(4). <https://doi.org/10.1002/mame.202200553>
- Maity, A., Mondal, A., Kundu, S., Shome, G., Misra, R., Singh, A., . . . Maiti, N. (2023). "Naringenin-Functionalized Gold Nanoparticles and Their Role in α -Synuclein Stabilization". *Langmuir*, 39(21), 7231-7248. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.2c03259>
- Martina, M., ve Hutmacher, D. (2007). "Biodegradable polymers applied in tissue engineering research: a review". *Polymer International*, 145-157. <https://doi.org/10.1002/pi.2108>
- Mehmood, S., Uddin, M., Yu, H., Wang, L., Ul Amin, B., Hak, F., . . . Haroon, M. (2022). "Study on synthesis of cross-linked poly(cyclotriphosphazene-co-luteolin) nanospheres and their properties for controlled drug delivery". *Colloid and Polymer Science*, 861-871. <https://doi.org/10.1007/s00396-022-04992-0>
- Mehmood, S., Uddin, M., Yu, H., Wang, L., Ul Emin, B., Hak, F., . . . Harun, M. (2023). "Study on fully cross-linked poly(cyclotriphosphazene-co-epigallocatechin) nanospheres and their application as drug delivery carriers". *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. <https://doi.org/10.1080/00914037.2023.2175825>
- Mehmood, S., Wang, L., Yu, H., Hak, F., Bilal-ül Amin, Uddin, M., . . . Ni, Z. (2022). "Preparation of poly(cyclotriphosphazene-co-piperazine) nanospheres and their drug release behavior". *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 139-147. <https://doi.org/10.1080/00914037.2020.1809407>

- Mehmood, S., Wang, L., Yu, H., Hak, F., Bilal-ül Amin, Uddin, M., . . . Ni, Z. (2022). "Preparation of poly(cyclotriphosphazene-co-piperazine) nanospheres and their drug release behavior". *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 139-147. <https://doi.org/10.1080/00914037.2020.1809407>
- Meng, L., Xu, C., Liu, T., Li, H., Lu, Q., ve Uzun, J. (2015). "One-pot synthesis of highly cross-linked fluorescent polyphosphazene nanoparticles for cell imaging". *Polymer Chemistry*, 3155-3163. <https://doi.org/10.1039/c5py00196j>
- Metinoğlu Orum, S. (2022). "Intrinsically fluorescent and quercetin loaded highly crosslinked polyphosphazene nanospheres: synthesis, characterization and fluorescence properties". *Turkish Journal of Chemistry*, 1269. <https://doi.org/10.55730/1300-0527.3433>
- Miranda, R., Sampaio, I., ve Zucolotto, V. (2021). "Exploring silver nanoparticles for cancer therapy and diagnosis". *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 210. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112254>
- Nair, L., ve Laurencin, C. (2007). "Biodegradable polymers as biomaterials". *Progress in Polymer Science*, 762-798. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017>
- Ogueri, K., Allcock, H., ve Laurencin, C. (2020). "Polyphosphazene polymers: The next generation of biomaterials for regenerative engineering and therapeutic drug delivery". *Journal of Vacuum Science & Technology B*, 38(3). <https://doi.org/10.1116/6.0000055>
- Onder, A., ve Ozay, H. (2021). "Synthesis and characterization of biodegradable and antioxidant phosphazene-tannic acid nanospheres and their utilization as drug carrier material". *Materials Science and Engineering C-Materials for Biological Applications*, 120. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111723>
- Ozay, H., Ozay, O., Ilgın, P., ve Özyurt, C. (2020). "The single-step synthesis of thiol-functionalized phosphazene-based polymeric microspheres as drug carrier". *Polymer-Plastics Technology and Materials*, 1944-1955. <https://doi.org/10.1080/25740881.2020.1784212>
- Ozay, H., ve Ozay, O. (2014). "Synthesis and characterization of drug microspheres containing phosphazene for biomedical applications". *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*, 99-105. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.03.022>
- Özsoy, F., ve Ozay, Ö. (2023). "Phosphazene-based nanostructures modified with gold nanoparticles as drug and gene carrier materials with antibacterial and antifungal properties". *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*. <https://doi.org/10.1080/00914037.2022.2163642>
- Pan, T., Huang, X., Wei, H., ve Tang, X. (2012). "Controlled Fabrication of Uniform Hollow Bowl-Shaped Microspheres Based on Polyphosphazene Material". *Macromolecular Chemistry and Physics*, 2606-2610. <https://doi.org/10.1002/macp.201200441>

- Pillai, C. (2014). "Recent advances in biodegradable polymeric materials". *Materials Science and Technology*, 558-566. <https://doi.org/10.1179/1743284713Y.0000000472>
- Prasanth, A., Kumar, A., Shruthi, B., ve Subramanian, S. (2019). "Kinetic study and in vitro drug release studies of nitrendipine loaded arylamide grafted chitosan blend microspheres". *Materials Research Express*, 6(12). <https://doi.org/10.1088/2053-1591/ab5811>
- Qasim, M., Lim, D.-J., Park, H., ve Na, D. (2014). "Nanotechnology for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases". *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 7374-7387. <https://doi.org/10.1166/jnn.2014.9578>
- Qui, J., Wang, Y., Liu, Y., Zhang, M., Wu, Z., ve Liu, C. (2015). "A pH-Sensitive Drug Carrier Based on Maleic Acid-Substituted Cyclotriphosphazene". *Phosphorus Sulfur and Silicon and The Related Elements*, 1551-1561. <https://doi.org/10.1080/10426507.2014.999860>
- Sandulovici, R., Carmen Marinela, M., Grigoroiu, A., Moldovan, C., Savin, M., Ordeanu, V., . . . Galatanu, M. (2023). "The Physicochemical and Antimicrobial Properties of Silver/Gold Nanoparticles Obtained by "Green Synthesis" from Willow Bark and Their Formulations as Potential Innovative Pharmaceutical Substances". *Pharmaceuticals*. <https://doi.org/10.3390/ph16010048>
- Saverot, S.-E., Reese, L., Vikesland, P., Bickford, L., ve Cimini, D. (2015). "Characterization of Conventional One-Step Sodium Thiosulfate Facilitated Gold Nanoparticle Synthesis". *Nanoscale Research Letters*. <https://doi.org/10.1186/s11671-015-0940-1>
- Stewart, F., Luther, T., ve Harrup, M. (2001). "Reactions and polymerization of hexa-[3-tert-butyl-4-hydroxyphenoxy]cyclotriphosphazene: A new method for the preparation of soluble cyclomatrix phosphazene polymers". *Journal of Applied Polymer Science*, 242-251. [https://doi.org/10.1002/1097-4628\(20010411\)80:2<242::AID-APP1092>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1097-4628(20010411)80:2<242::AID-APP1092>3.0.CO;2-2)
- Stokes, H. (1895). "On the chloronitrides of phosphorus". *Journal of the American Chemical Society*, 17(275).
- Ulubay, M., Yurt, K., Kaplan, A., ve Atilla, M. (2018). "The use of diclofenac sodium in urological practice: A structural and neurochemical based review". *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 32-36. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2017.02.005>
- Wan, C., ve Huang, X. (2017). "Cyclomatrix polyphosphazenes frameworks (Cyclo-POPs) and the related nanomaterials: Synthesis, assembly and functionalisation". *Materials Today Communications*, 38-60.
- Wei, X., Zhang, G., Zhou, L., ve Li, J. (2017). "Synthesis and characterization of hydrophobic amino-based polyphosphazene microspheres with different morphologies via two strategies". *Applied Surface Science*, 744-757. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.04.236>

- Wisian-Neilson, P., ve Truong, H. (2020). "Poly(alkyl/arylphosphazene)-Metal Nanoparticle Composites". *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 259-267. <https://doi.org/10.1007/s10904-019-01330-w>
- Xue, L., Mao, L., Cai, Q., Yang, X., ve Jin, R. (2011). "Preparation of modified amino acid ester polyphosphazene microparticles by electrohydrodynamic atomization". *Polymers for Advanced Technologies*, 2009-2016.
- Yılmaz, B., ve Ozay, Ö. (2022). "Synthesis of antibiotic-modified silica nanoparticles and their use as a controlled drug release system with antibacterial properties". *Phosphorus Sulfur and Silicon and The Related Elements*, 964-972. <https://doi.org/10.1080/10426507.2022.2049267>
- Yurttaş Kırımlioğlu, G., Süzen Demircioğlu, Y., Berkman, M., Metinoğlu Örum, S., ve Altun, E. (2021). "Synthesis, spectroscopic, thermal properties, in vitro release, and stability studies of ibuprofen-loaded microspheres cross-linked with hexachlorocyclotriphosphazene/octachlorocyclotetraphosphazene". *Polymer Bulletin*, 6221-6250. <https://doi.org/10.1007/s00289-020-03422-x>
- Zeng, A., Yang, R., Tong, Y., ve Zhao, W. (2023). "Functional bacterial cellulose nanofibrils with silver nanoparticles and its antibacterial application". *International Journal of Biological Macromolecules*, 235. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123739>
- Zhang, P., Huang, X., Fu, H., Huang, Y., Zhu, Y., ve Tang, X. (2009). "A One-Pot Approach to Novel Cross-Linked Polyphosphazene Microspheres with Active Amino Groups". *Macromolecular Chemistry and Physics*, 792-798. <https://doi.org/10.1002/macp.200800597>
- Zhao, Z., Ji, J., ve Yu, F. (2014). "Synthesis and Mechanical Properties of Epoxy Composites Reinforced with Phosphazene Microspheres". *Asian Journal of Chemistry*, 2721-2724. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2014.16099>
- Zhu, Y., Fu, J., Zhu, L., Tang, X., ve Huang, X. (2008). "Preparation of novel hybrid inorganic-organic hollow microspheres via a self-template approach". *Polymer International*, 449-453. <https://doi.org/10.1002/pi.2366>

EK 1

TEZ KAPSAMINDA GERÇEKLEŞTİRİLEN BİLİMSEL BİLDİRİLER



International Marmara Sciences Congress
(Imascon Spring) 2023 Proceedings Book



INVESTIGATION OF DRUG RELEASE BEHAVIORS OF METAL NANOPARTICLE MODIFIED PHOSPHAZENE MICROSPHERES

Esra Dilek

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı

Hava Özay

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü

Abstract

Phosphazenes are compounds that contain repeating phosphorus-nitrogen double bonds in their structure. In biological applications of phosphazene compounds, cyclomatrix type polyphosphazenes provide quite advantages [1]. Hexachlorocyclotriphosphazene (HCCP) can replace -OH, -NH₂ groups thanks to the chlorine atoms attached to the phosphorus atoms in its structure. By taking advantage of this feature, spherical composites with many molecules can be synthesized [2]. The surfaces of the synthesized nanoparticles can be modified with metal nanoparticles to gain different functional properties. Gold and silver nanoparticles are suitable for applications such as controlled drug delivery, vaccine active ingredient delivery, and gene transfer [3]. In this study, the surfaces of p(CTP-co-MMCA) composite spheres were modified with gold and silver by natural reduction method. Microspheres were characterized by FT-IR, SEM, TEM, XRD, TGA and XPS methods. The usability of nanospheres as carrier material for drugs was investigated. Acknowledgment: This study was financially supported by Çanakkale Onsekiz Mart University Scientific Research Projects Coordination Unit with the project number FYL-2022-3907. This study includes a part of Esra Dilek's master's thesis. References [1.] Mehmood, S., Wang, L., Yu,H., Hak,F., Bilal-ül Amin, Uddin, M.,Ni, Z.(2022). Preparation of poly(cyclotriphosphazene-co-piperazine) nanospheres and their drug release behavior. International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, 139-147. [2.] Bi, Y., Yin, Y., Huang, R., Li, Y. (2010). Synthesis, characterization, in vitro degradation and cytotoxicity of polyphosphazenes containing N-ethoxypyrrolidone side groups. Polymer International. [3.] Wisian-Neilson, P., Truong, H. (2020). Poly(alkyl/arylphosphazene)-Metal Nanoparticle Composites. Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials, 259-267.

Keywords: Phosphazene, Gold nanoparticle, Gene carrier, Drug release

