

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KİTOSAN'IN AŞILANMASI VE BAZI BİYOLOJİK
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Arzu KARATEPE

Anabilim Dalı: Kimya
Programı: Fizikokimya

Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. M. Mürşit TEMÜZ

EYLÜL-2012

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİTOSAN'IN AŞILANMASI VE BAZI BİYOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Arzu KARATEPE

092117111

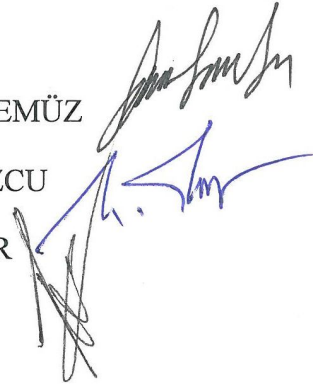
Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 07 Ağustos 2012

Tezin Savunulduğu Tarih : 04 Eylül 2012

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. M. Mürşit TEMÜZ

Diğer Jüri Üyeleri : Yrd.Doç.Dr. Mehmet TUZCU

Yrd.Doç.Dr. Zülfiye İLTER



EYLÜL-2012



ÖNSÖZ

Doğal bir biyopolimer olan kitosan, özellikle son 50 yıldır araştırmacılar için ilginç bir materyal olarak yerini korumaktadır. Kitine göre birçok avantaja sahip olan kitosan başta gıda, kozmetik, ziraat, tıp, kâğıt ve tekstil olmak üzere birçok endüstri dalında kullanım alanı bulmuştur.

Doğada bulunan kaynaklardan bol miktarda elde edilebilen bir biyopolimer olan kitosan, canlılara karşı toksik özelliğinin olmaması, biyolojik olarak parçalanabilirliği, biyouyumluluğu, kimyasal ve fiziksel özellikleri bakımından diğer biyopolimerlere göre üstün özellikler göstermesi nedeniyle birçok endüstri dalı için uygun bir maddedir.

Kitosanın bir çok petrokimyasal olan ve olmayan monomerlerle bileşikleri hazırlanmış ve biyolojik özellikleri incelenmiştir.

İlgili literatürlere dayanarak yaptığımız tez çalışmasında, kitosan ve bazı kitosan aşısı kopolimerlerin *in vitro* olarak antitümör ve antioksidan özellikleri araştırılmıştır.

İlgili bilgiler ışığında yapılan bu tezi hazırlamamda yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Yrd. Doç. Dr. M. Mürşit TEMÜZ'e teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Aşısı kopolimerlerin hazırlanması ve karakterize edilmesinde desteklerini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Nevin ÇANKAYA'ya, Arş. Gör. Dr. Zuhale KARAGÖZ ve Şeyma ACAR'a teşekkür ederim.

Ayrıca biyolojik aktivite çalışmalarımızdaki yardımlarından dolayı, Arş. Gör. Dr. Serhat KESER, Naci ALAYUNT ve Sibel SELÇUK'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmayı destekleyen Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Destekleme Birimi'ne (Füba. FF.11.37) teşekkür ederim.

Araştırmalarım sırasında bana her türlü desteği veren, çalışmalarım süresince göstermiş oldukları sabır ve desteklerden dolayı aileme ve arkadaşlarıma da teşekkürlerimi sunarım.

Arzu KARATEPE

ELAZIĞ-2012

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	II
İÇİNDEKİLER	IV
ÖZET	V
SUMMARY	VI
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	VII
TABLoların LİSTESİ	VIII
KISALTMALAR	IX
1. GİRİŞ	1
1.1. Aşı Kopolimerlerinin Tanımı ve Yapısı.....	1
1.2. Aşı Kopolimerlerinin Elde Edilmesi.....	2
1.2.1. Geleneksel Yöntemler.....	2
1.2.1. Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu (ATRP) Yöntemi	5
1.2.3. Doğal Karbohidrat Polimerler	9
1.2.3.1. Selüloz.....	9
1.2.3.2. Nişasta.....	10
1.2.3.3. Kitin	10
1.3. Kitosan	11
1.4. Kitosan ile ilgili literatür çalışmaları	14
2. MATERYAL VE METOT	15
2.1. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	15
2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	15
2.3. Aşı Kopolimerlerin Hazırlanması.....	16
2.4. Kristal Kitosanın ATRP Yoluyla Aşılması.....	16
2.4.1. Kitosanklorasetat Başlatıcısının Sentezi	16
2.4.2. Kitosan-g-metakrilamit (Kito-g-MAM) Aşı Kopolimerinin Sentezlenmesi.....	17
2.4.3. Kitosan-g-diasetonakrilamit (Kito-g-DAAM) Aşı Kopolimerinin Sentezlenmesi	18
2.4.4. Kitosan-g-4-nitrofenilakrilamit (Kito-g-NFAA) Aşı Kopolimerinin Sentezlenmesi	19
2.4.5. Kitosan-g-2-hidroksietilmetakrilat (Kito-g-HEMA) Aşı Kopolimerinin Sentezlenmesi	21
2.5. Uygulamalarda Kullanılan Hücreler	22
2.5.1. Kullanılacak Hücre Sayısı ve Madde Dozlarının Belirlenmesi.....	22
2.6. DPPH Radikal İndirgeme Metodu ile Ölçüm.....	23
2.7. Deoksiriboz degradasyonu ile hidroksil radikali yakalama aktivitesi	23
2.8. İstatistiksel Değerlendirme.....	23
3. BULGULAR	24
3.1. Aşı Kopolimerlerinin Karakterizasyonu ve Aşılamayla İlgili Veriler.....	24
3.1.1. IR spektrum değerlendirilmesi	24
3.1.2. Elementel Analiz Sonuçları.....	25
3.1.3. Termal Analiz Sonuçları	28
3.2. Biyolojik Aktivite	32
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	34
5. KAYNAKLAR	38
6. ÖZGEÇMİŞ	44

ÖZET

Bu çalışmada toz kitosan bazı vinil monomerleriyle atom transfer radikal polimerizasyonu yoluyla aşılandı.

Bu yöntemle, kitosanın primer OH grupları önce klorasetilklorürle reaksiyona sokuldu. Sonra klorasetil gruplu kitosan makrobaşılatıcı olarak kullanılıp CuBr/1,2-dipiperidinoetan katalizör sistemi yanında metakrilamit (MAM), diasetonakrilamit (DAAM), 4-nitrofenilakrilamit (NFAA), hidroksietilmetakrilamit (HEMA) ile aşılandı.

Aşı kopolimerleri element analizi ve IR teknikleriyle karakterize edildi.

Bütün kopolimerlerin termal kararlılıkları ve termal geçişleri termogravimetrik analiz (TGA) ile incelendi. Ayrıca kitosandan elde edilen aşı kopolimerlerin *in vitro* antioksidan ve antitümör özellikleri belirlendi ve sonuçlar tartışıldı.

Anahtar Kelimeler : Kitosan, Aşı Kopolimer, Atom Transfer Radikal Polimerizasyon

SUMMARY

Grafting and Studying of Some Biological Properties of Chitosan

In this study, powder chitosan was grafted by using atom transfer radical graft copolymerization, with some vinyl monomers.

In the former, primary OH groups of powder chitosan were first reacted with chloroacetyl chloride. Then by using chitosan with chloroacetyl group as macroinitiator, it was grafted with methacrylamide (MAM), diacetone acrylamide (DAAM), 4-nitrophenyl acrylamide (NFAA), hydroxyethyl methacrylamide (HEMA) in the presence of CuBr/1,2-dipiperidinoethane as catalyst system.

The graft copolymers were characterized by elemental analysis and IR techniques.

Thermal stabilities and thermal transition temperatures of all the graft copolymers were investigated by thermogravimetric analysis (TGA). In addition, *in vitro* antioxidants and antitumour properties of graft copolymers obtained from chitosan were determined, and the results were discussed.

Key Words : Chitosan, Graft Copolymer, Atom Transfer Radical Polymerization

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1.1.	Selüloz'un kimyasal yapısı.....	11
Şekil 1.2.	Kitinin kimyasal yapısı.....	11
Şekil 1.3.	Selüloz (a), kitosan (b) ve kitinin (c) kimyasal yapıları.....	11
Şekil 1.4.	Kitosan hidrojellerin yapısı (kovalent bağ, pozitif yüklü kitosan, kitosan ilave polimer, iyonik çapraz bağlayıcı, iyonik etkileşim)	13
Şekil 2.1.	Kitosan için ATRP başlatıcının hazırlanması ve vinil monomerle aşılması.	16
Şekil 3.1.	Kitosan, kitosan klorasetat ve aşı kopolimerlerinin IR spektrumları.....	24
Şekil 3.2.	Kitosan'a ait termal eğrisi	29
Şekil 3.3.	Kito-klorasetat'a ait termal eğrisi	28
Şekil 3.4.	Kito-g-MAM'a ait termal eğrisi.....	29
Şekil 3.5.	Kito-g-DAAM 'a ait termal eğrisi	30
Şekil 3.6.	Kito-g-NFAA'ya ait termal eğrisi.....	31
Şekil 3.7.	Kito-g-HEMA'ya ait termal eğrisi.....	31

TABLÖLARIN LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1. Kitosan, kito-klorasetat ve aşı kopolimerlerinin IR değerlendirilmesi.	25
Tablo 3.2. Kitosan, kito-klorasetat ile aşı kopolimerlerine ait elementel analiz sonuçları ve değerlendirilmesi	27
Tablo 3.3. DPPH radikal indirgeme metodu ile ölçüm sonuçları	32
Tablo 3.4. Deoksiriboz degradasyonu ile hidroksil radikali yakalama aktivitesi.....	33
Tablo 3.5. Maddelerle muamele edilmiş L 1210 hücrelerinin süreye ve doza göre % oranında canlılık durumları	33

KISALTMALAR

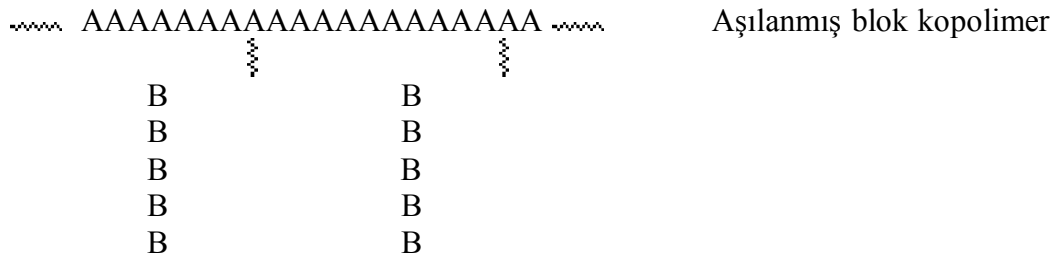
ATRP	Atom Transfer Radikal Polimerizasyon
IR	İnfrared Spektroskopisi
MAM	Metil Metakrilat
HEMA	Hidroksi Etil Metakrilat
DAAM	Diasetonakrilamit
NFAA	Nitrofenilakrilamit
TG	Termogravimetrik Analiz
DPPH	2-2 difenil-1-pikrilhidrazil radikali
DMF	Dimetil Formamid
MDA	Malondialdehit
DC5	Fetal Bovin serum, L-Glutamin, Penisilin, Streptomisin ve insülin karışımı

1. GİRİŞ

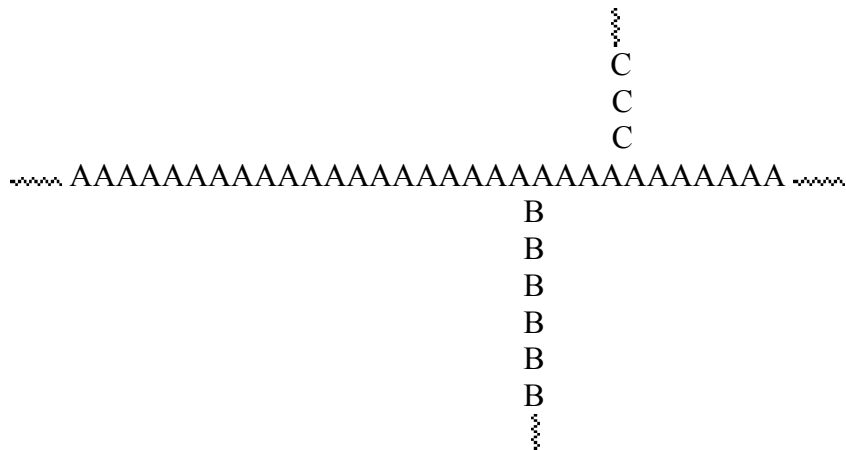
1.1. Aşı Kopolimerlerinin Tanımı ve Yapısı

Bir polimer ana zincirinin zincir sonları dışında belirli yerlerine başka tür monomer katılarak, buralarda yeni zincirler meydana getirmesiyle aşı (graft) kopolimerler elde edilir. Bunların elde edilmesi için değişik kimyasal tepkimeler kullanılır ve genellikle aşılacak monomerin özelliklerine göre bir tepkime çeşidi seçilir [1].

Ana zincirde ve yan zincirlerde yer alan monomer türlerinin sayısına bağlı olarak, çok değişik yapılarda aşı kopolimerler elde etmek mümkündür. Ana zincir birden fazla monomer çeşidi içerirken, yan dallar da değişik türde monomerler içerebilir.



Sonuçta hem ana zinciri hem de yan zincirleri değişik monomerlerden oluşan bir aşı kopolimer elde edilir. Ana polimer zincirinde ve yan zincirlerde yer alan monomer çeşidi arttıkça çok daha karmaşık yapıya sahip aşı kopolimerler oluşur.



Bir polimer zincirindeki dallanmalar, yan dalların cinsi, boyu ve bağlanma yerleri kontroledilebildiği takdirde, o polimere çok değişik ve yeni bir takım özellikler kazandırır [1].

1.2. Aşı Kopolimerlerinin Elde Edilmesi

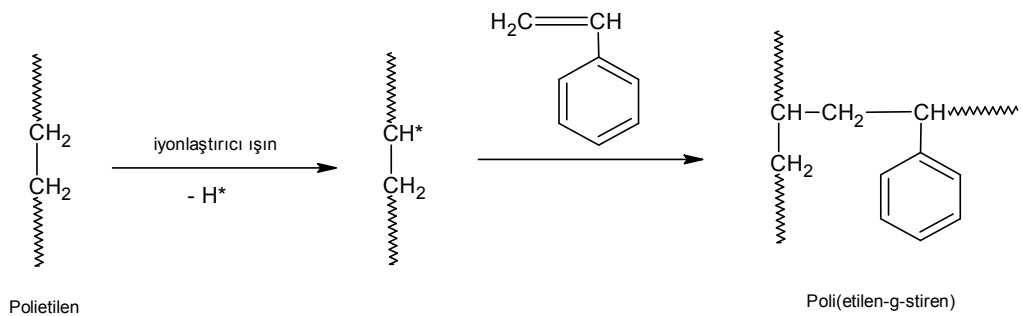
Aşı kopolimerlerinde bir polimerin ana zincirine farklı bir polimer zinciri, zincir sonları dışında bir yerden bağlanmıştır. İki ayrı tür polimer zincirinin, zincir sonlarından birleşmesi blok kopolimer yapısına yol açar. Aşı kopolimerleri bilinen birçok yöntemle (geleneksel yöntemler) ve son yıllarda polimer sentezinin en büyük yeniliği olan atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP) yöntemiyle elde edilebilir.

1.2.1. Geleneksel Yöntemler

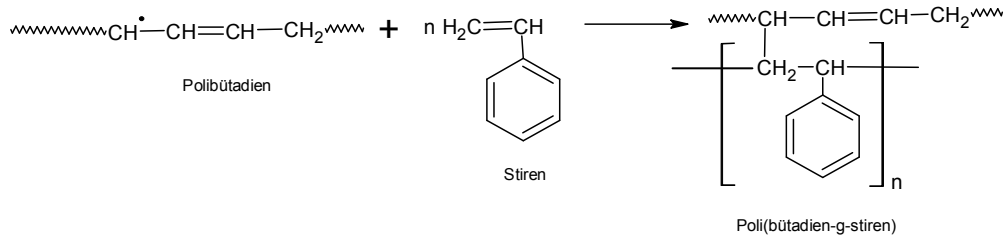
Aşı kopolimerler, bir polimer yanında başka tür bir monomerin polimerizasyonu ile elde edilebilir. Bu koşullarda polimerizasyon sonunda ortamda aşılınmamış polimer, aşı kopolimer ve aşılınan monomerin homopolimerinin bulunduğu bir karışım oluşacaktır. Karışım, homopolimerleri çözebilecek uygun çözücülerle yıkanarak aşı kopolimer ayrılır. Karışımın aşı kopolimerin çöktürülerek ayrılması bir başka yöntemdir.

Aşı kopolimerler bilinen çok değişik yollarla sentezlenebilir. Aşağıda bazı örnekler verilmiştir [2].

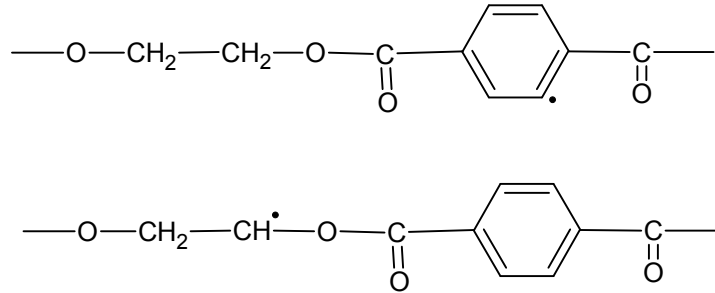
Çapraz bağ vermeye yatkın polimerlerin bir monomer yanında iyonlaştırıcı ışınlarla etkileştirilmesi aşı kopolimer verebilir. Polimerizasyon ortamında çoğu kez aşılınan monomerin homopolimeri de oluşur. Poli (etilen-g-stiren) kopolimerinin sentezi, bu yaklaşıma bir örnektir. Işın etkisiyle polietilen zincirinden hidrojenler homolitik kopar ve polietilen zincirleri üzerinde kalan radikallere ortamda bulunan stiren molekülleri yan dal halinde art arda katılır.



Herhangi bir monomerin radikalik katılma polimerizasyon ortamda bulunan başka tür bir polimer varlığında yapılırsa, polimere zincir transferi sonucu diğer polimer zincirleri üzerinde aktif merkezler oluşabilir. Örneğin, polibütadien yanında stiren polimerleştirilirken, aktif polistiren zincirleri polibütadien zincirlerinden hidrojen kopararak aşılama için uygun merkezler oluştururlar. Daha sonra bu aktif merkezlere stirenin katılması ile poli(bütadien-g-stiren) elde edilir.

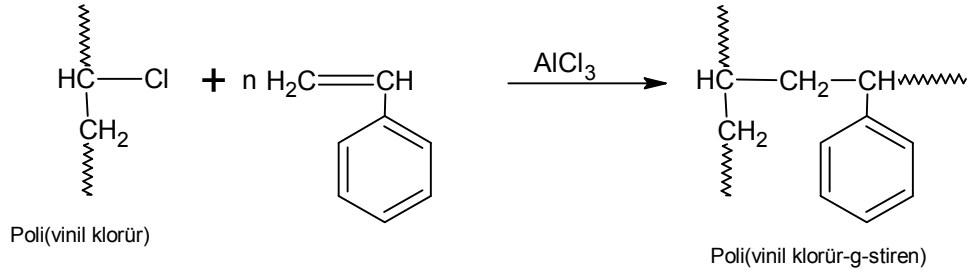


Zincir transfer tepkimeleri poli(etilenteraftalat) lifleri üzerine yapılan aşılamalarda da etkin olabilir. Poli(etilenteraftalat) üzerine yapılan elektron spin rezonans çalışmaları bu polimerin aşağıda yapıları verilen iki radikal türü verdiğini göstermiştir.

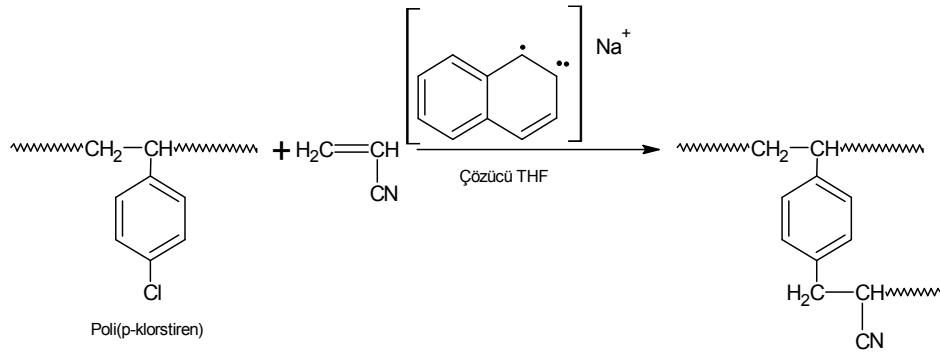


Poli(etilenteraftalat) liflerin bulunduğu bir ortamda akrilamit, akrilikasit, stiren gibi monomerlerin polimerizasyonu yapılırsa, zincir transferi tepkimeleriyle oluşacak yukarıdaki aşılama noktalarına monomerler katılır. Daha sonra lifler uygun bir çözücüyle yıkanarak aşılamanın monomerin homopolimeri uzaklaştırılır.

Katyonik polimerizasyon yöntemi de aşı kopolimer sentezinde kullanılabilir. Stiren, AlCl₃ yardımıyla poli(vinilklorür) üzerine aşağıda gösterildiği gibi katyonik mekanizma üzerinden aşılır.

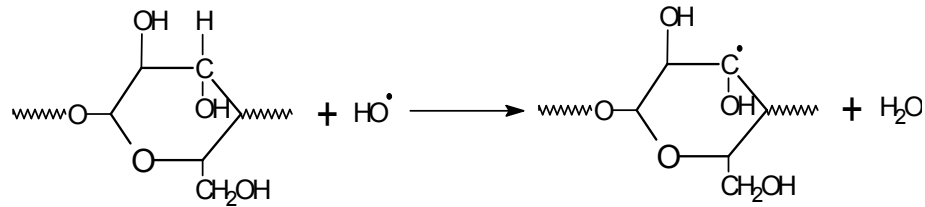


Akrilonitril'in, poli(p-klorstiren) üzerine anyonik polimerizasyon yöntemiyle aşılama poli(p-klorstiren-g-akrilonitril) kopolimeri verir. Anyonik başlatıcı sodyumnaftalin, çözücü tetrahidrofuran'dır.



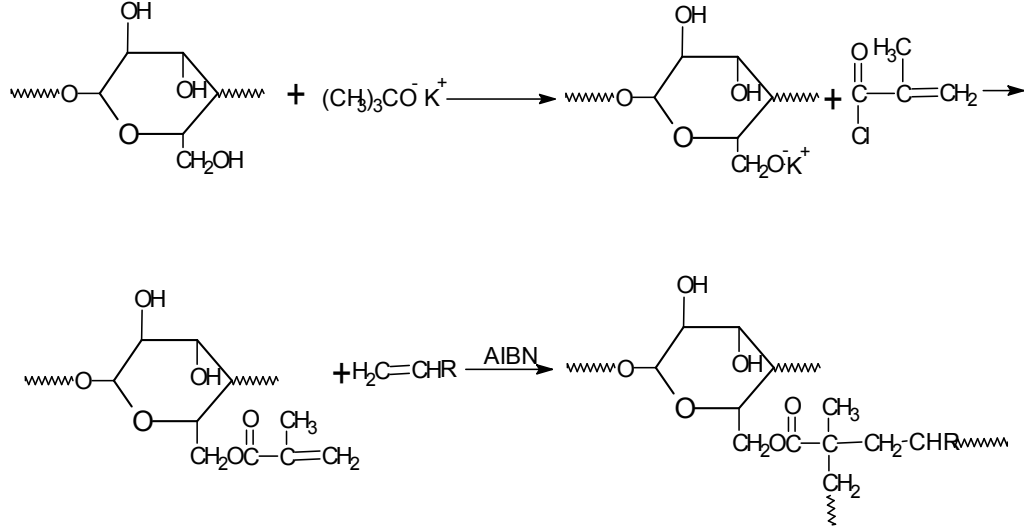
Pamuk, nişasta, jelatin, selüloz ve jüt gibi doğal polimerler üzerine de yoğun aşılama çalışmaları yapılmıştır. Araştırma sonuçları selüloz üzerindeki aşılama merkezlerinin zincir transferiyle değil, daha çok başlatıcıdan oluşan serbest radikallerin doğrudan selülozdan hidrojen koparmasıyla oluştuğunu göstermiştir.

$\text{H}_2\text{O}_2\text{-Fe}^{+2}$ redoks başlatıcı sisteminden oluşan $\text{OH}^\bullet$ radikalleri aşağıdaki tepkimeyle selülozun hidroksil gruplarıyla etkileşir ve selüloz zincirleri üzerinde aktif merkezler oluşturur. Ortamda ayrıca bir vinil monomeri bulunduğundan bu aktif merkezler üzerinden aşılama gerçekleşir.



Yeni bir vinil monomeri oluşumu için polimer zincirinde çeşitli modifikasyon işlemleri yapılarak zincir üzerine istenilen oranlarda polimerleşebilen monomer bağlanır. Polimer üzerinde oluşan monomer aşılama merkezleri durumundadır.

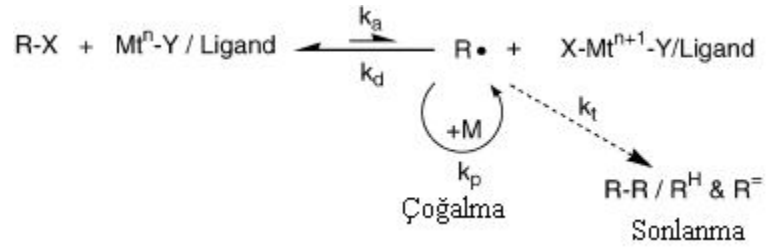
Polimerdeki vinil grubu, geleneksel serbest radikal polimerizasyonu ile AIBN gibi bir başlatıcı kullanılarak bu yöntemle polimerleşebilen herhangi bir monomerin polimerizasyonu ile aşı kopolimerler elde edilir.



1.2.2. Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu (ATRP) Yöntemi

Son zamanlarda bazı araştırmacılar çeşitli organometalik türevlerinin varlığında kontrollü radikal polimerizasyonuna (CRP) yönelik yeni gelişmeler sağladılar [3]. CRP metotlarının en iyi örneğini atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP) oluşturmaktadır [4]. “Atom Transfer Radikal Polimerizasyon” ilk kez 1995’de Matyjaszewski ve arkadaşları tarafından kullanılmış ve geçiş metali komplekslerinin varlığında polistirenin kontrollü sentezi ile tanımlanmıştır [5].

Atom transfer radikal polimerizasyonu, transfer edilebilir bir halojene sahip bir alkil halojenür ile başlatılan ve bir geçiş metali (Cu, Fe, Ni, Pd, Pt, Ru) ile uygun bir ligandın oluşturduğu komplekslerle katalizlenen, deaktif türler (RX) ile büyüyen zincir radikalleri ($\text{R}^\bullet$) arasında dinamik bir dengenin kurulduğu kontrollü ve yaşayan karakterli bir polimerizasyon tekniğidir [6]. ATRP yöntemi kullanılarak stiren, akrilat, metakrilat, akrilamit, metakrilamit ve akrilonitril gibi büyüyen radikalleri stabilize olabilen geniş bir monomer kitlesinin polimerleştirilmesinde [7] ve random kopolimer [8], blok kopolimer [9], graft kopolimer [10], star kopolimer [11] gibi fonksiyonel kopolimerlerin sentezlenmesinde ayrıca kullanılmaktadır. ATRP için genel bir mekanizma aşağıda gösterilmiştir.



Sentetik polimerlerin eldesinde radikal polimerizasyon en önemli yöntemlerden biridir. Radikal polimerizasyonun ticari başarısının birkaç temel sebebi vardır [12].

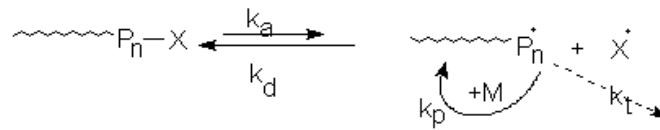
- 1- Çok sayıda monomer radikal yolla polimerleşebilir. Hemen bütün olefinik monomerler radikalik yolla homopolimerler veya kopolimerler oluşturabilirler. Çünkü, hidroksil, asit, amino vb. pek çok grup radikalik olarak büyüyen türleri pek etkilemezler.
- 2- Muhtelif monomerler arasında kolayca kopolimerizasyon olabilir. Özel şartlar pek gerektirmez, sıcaklık, çözücü ve ortamın şartları (sadece oksijeni uzaklaştırmak yeterlidir) kolayca ayarlanabilir.
- 3- Radikal polimerizasyon saf monomer içinde, sulu süspansiyonda, emülsiyonda, dispersiyonda ve başka ortamlarda yapılabilir.

Bununla beraber iyonik proseslerle karşılaştırıldığında radikal polimerizasyonu sınırlayan durumlar da vardır. Anyonik ve son zamanlarda katyonik polimerizasyon, önceden iyi tahmin edilmiş molekül ağırlıklı ve düşük heterojenlik indisli polimer ve kopolimerlerin sentezine imkan sağlar. İyonik polimerizasyonların temel avantajı blok ve aşırı gibi düzende kopolimerlerin sentezlenebilmesidir. Bunlar mikrofaza ayrılabilirler ve termoplastik elastomerler, iyonik olmayan yüzey aktif maddeler, dağıtıcılar, yağlayıcılar, viskozite ayarlayıcılar, özel katkıları vb olarak kullanılabilirler. Bu maddeler bağış olarak hızlı bir başlamadan sonra sadece zincir büyümesi ile yaşayan polimerizasyonla elde edilirler. Bunlarda transfer ve sonlanma tepkimeleri ihmal edilebilir. Ancak maalesef iyonik polimerizasyon çok az monomerle sınırlıdır. Ayrıca çok kuvvetli kurutma, çok düşük sıcaklık (örneğin -70°C) gibi etkin şartlar, iyi bir çözücü seçimi gereklidir. Diğer taraftan son zamanlara kadar iyi tanımlanmış polimer ve kopolimerleri radikal metotlarla hazırlamak mümkün değildi ve sadece iyonik yol kullanılabilirdi. Çünkü, radikal polimerizasyonda büyüyen radikaller arasındaki kaçınılmaz olarak sonlanmalar vardı. Geleneksel radikal sistemlerde sonlanmayı en aza

indirmek için, radikallerin peroksit ve diazo gibi uygun başlatıcıların termal veya foto parçalanmayla yavaş ve sürekli oluşumları sağlanır. Bu yaklaşım kısmen tanımlanmış yüksek molekül ağırlıklı polimerlerin sentezine yardım etmesine rağmen blok kopolimer sentezine yardım etmez. Son zamanlarda, iyonik reaksiyonlardan daha az özel şartlar gerektiren fakat iyi tanımlanan polimerler veren teknikler geliştirme yönünde önemli istekler ve çabalar vardı. Bu amaçla radikal polimerizasyon, kolay sağlanan reaksiyon şartları ve monomerlerin kolay polimerleşebilirliği açısından iyi bir seçimdir.

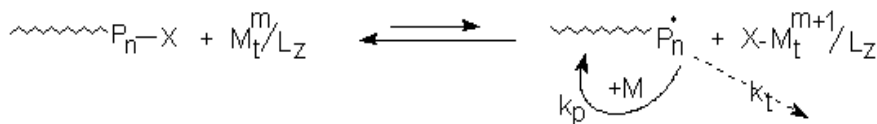
Radikal polimerizasyonu kontrol etmek ve nicel başlamayı sağlamakla beraber büyüyen zinciri durduran tepkimenin katkısını baskı altına almak için çeşitli yaklaşımlar vardır. Bunların hepsi büyüyen serbest radikaller (k_p serbest radikal büyüme hız sabiti) ve ölü türler (yani aktivasyon, k_a , ve deaktivasyonu, k_d , dengelenen türler) arasında dinamik bir denge kurar. Yaşayan polimerizasyon kavramıyla doğal olarak örtüşmeyen kaçınılmaz sonlanmanın varlığından dolayı yaşayan radikal polimerizasyonundan ziyade bu tepkimenin, kontrollü radikal polimerizasyonu olarak sınıflanması tercih edilir: Radikal polimerizasyonun kontrolü için üç yaklaşımın başarılı olduğu görülür:

1- İlk yaklaşım, büyüyen bir radikal ve daha az reaktif bir radikali (pesistent veya kararlı serbest radikal) tersinir olarak sağlayan zayıf bir kovalent bağın termal homolitik ayrışmasını sağlamadır. Persistent radikallere pek çok örnek vardır fakat, en başarılı olanlar nitroksitler, triazonil radikalleri, tritil gibi bazı hacimli organik radikaller ve organometalik türlerdir.



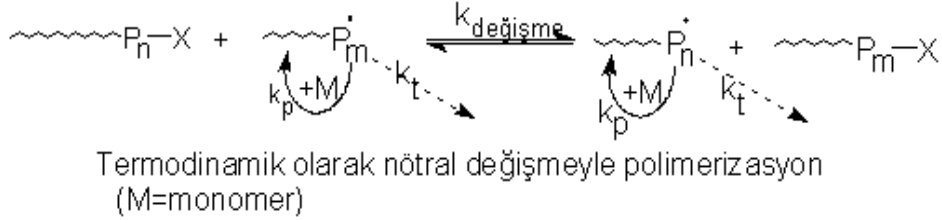
Persistent veya kararlı radikal polimerizasyonu
(M=monomer)

2- Diğer bir yaklaşım, bir redoks işlemi sırasında aktif olmayan türlerdeki kovalent bağın katalizlenmiş tersinir ayrışmasını esas alır. Polimerizasyonu kontrolde anahtar basamak, büyüyen zincir ve bir katalizör arasındaki atom (veya grup) transferidir. Bu nedenle atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP) adını alır.



Atom transfer radikal polimerizasyon(ATRP)(M=monomer)
(M_t =metal, m=metalın yükü, L=ligant, z=ligantın sayısı)

3- Üçüncü yaklaşım, çok düşük derişimlerde mevcut büyüyen radikaller ve aktif olmayan türler arasındaki termodinamik olarak nötral bir değişmeyi esas alır. Bu bozulmuş transfer olayını alkil iyodürler ve ayrıca doymamış metakrilat esterleri ve tiyoesterler yaparlar. Son ikisi katılma-ayrılma ile yürür.



Başarılı bir ATRP olayı çeşitli gerekleri yerine getirmelidir:

1) Polimerizasyonun başlarında başlatıcı tükenmelidir ve dönüşen monomer derişiminin ortama konan başlatıcı derişimine oranı ile önceden belirlenen polimerizasyon dereceli polimere yol açan büyüyen zincirleri üretmelidir ($DP = \Delta[M]/[I]_0$).

2) Düşük heterojenlik indisli polimerlerin sentezi için bir aktivasyon basamağı boyunca katılan monomer moleküllerinin sayısı küçük olmalıdır.

3) Son olarak, yüksek derecede uç fonksiyonlu polimerler elde etmek ve blok kopolimer sentezine imkan sağlamak için zincir büyümesini durduran (transfer ve sonlanma) tepkimelerin ihmal edilebilir düzeyde olması gerekir.

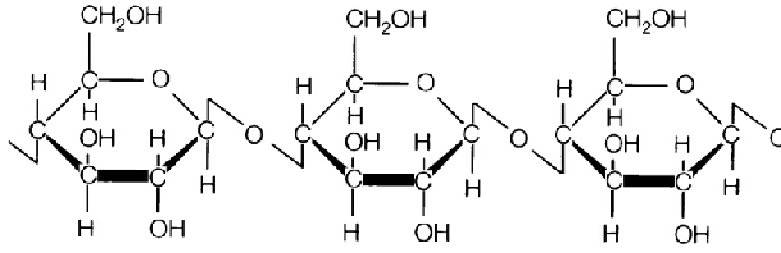
1.2.3.Doğal Karbonhidrat Polimerler

Doğal polimerler, doğada kendiliğinden oluşan polimerlerdir. Canlıların hareketlilik, yaşlanma, duyu gibi özelliklerinden sorumlu olan bu polimerlere “biyopolimerler” denilir.

Doğada en çok kullanılan ve bulunan biyopolimerler polisakkaritlerdir. Polisakkaritler zincir uzunluklarına, anomerik konfigürasyonlarına, monosakkarit birimlerine ve D- ya da L- konfigürasyonunda olmalarına göre sınıflandırılırlar. Polisakkaritlerin fizikokimyasal özelliklerini zincir konformasyonu ve moleküller arası birleşme etkilemektedir. Polisakkaritlerin yapısındaki atomların düzeni, molekül içi ve moleküller arası kuvvetlerden etkilenmektedir [13].

1.2.3.1. Selüloz

Selüloz molekülleri $(C_6H_{10}O_5)_n$ formülüne sahip anhidroglukoz birimlerinin uç uca eklenmesiyle oluşmuştur. Bu birimlerin sayısına “polimerizasyon derecesi” (DP) denir ve birbirlerine 1,4-β-glikozidik bağlarla bağlanmış olup, her iki birimden birisi diğerine göre 180 °C’lik bir dönüşle bağlanmıştır. Bunun sonucu olarak da gerilimsiz lineer bir yapı ortaya çıkmaktadır. Polimerler, tekrar eden monomerlerden oluşan zincir halindeki moleküllerdir. Moleküller bir arada bir takım çekim kuvvetleri sayesinde dururlar. Selüloz molekülündeki her glukoz birimi iki adet sekonder alkol grubundan ve bir adet primer alkol grubundan oluşan üç serbest hidroksil grubu taşır. Bu hidroksil grupları 2., 3. ve 6. Karbon atomlarına bağlıdır. Selüloz molekülündeki alkol grupları; alkolat oluşumu, ester oluşumu ve yükseltgenme gibi tipik alkol reaksiyonları verirler. Bu gruplar selülozun su emicilik özelliğinden sorumludurlar. Her yüz veya daha fazla glukoz biriminde yaklaşık bir adet karboksil grubu vardır. Bu gruplar selülozun iyonizasyon katsayısı yaklaşık 2×10^{-14} olan zayıf bir baz monobazik asit olarak hareket etmesine yetecek sayıda vardır. Selüloz birimlerinde reaksiyon verebilecek üç serbest hidroksil grubu vardır. Şekil 1.1.’de selülozdaki serbest hidroksil grupları gösterilmiştir [14].



Şekil 1.1. Selülozun kimyasal yapısı

1.2.3.2. Nişasta

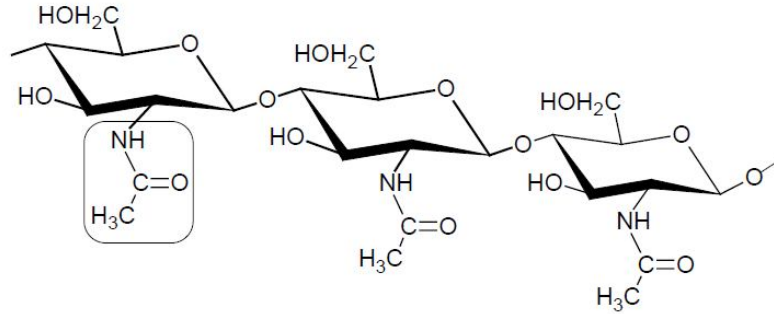
Nişasta, bitkiler tarafından sentezlenebilen ve doğada yaygın olarak bulunan bir maddedir. Başlıca kaynakları; buğday, patates, pirinç, mısır, tapiako, sago, kassava vb. bitkilerdir. Nişastanın endüstriyel olarak kağıt, yiyecek, tekstil, farmakoloji ve biyomateryal alanlarında çok geniş bir uygulama sahası vardır.

Nişastanın tanecik boyutları sentezlediği bitkisel kaynağa göre 0.5 ile 175 μm arasında değişmektedir. Ayrıca taneciklerin şekli de farklılık göstermektedir [15].

1.2.3.3. Kitin

Kitin kelimesi, Yunanca kökenli olup tırnak örtüsü anlamına gelen “chiton”dan türemiştir. Kitin suda ve karada yaşayan (yengeç, karides, solucan, eklembacaklılar) canlıların ve mantarların yapısında bulunan doğal bir polisakkarittir. Doğa’da selülozdan sonra en çok bulunan polisakkarit kitindir. Yapısal olarak kitin selülozun türevlenmiş haline benzer. Selülozun C2’deki hidroksil (OH) grubu yerine asetamid (NHCOCH_3) grubu gelmiştir. Kitinin kimyasal ismi poliasetilaminoglikoz’dur. Kimyasal formülü de $(\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_5)_n$ şeklindedir. Molekül ağırlığı birim başına 203 gr/mol’dür. Dünya’da yıllık kitin üretiminin yaklaşık 150000 ton civarında olduğu belirtilmektedir. Kitin üretiminde en fazla kullanılan deniz kabuklusu karides, yengeç ve ıstakoz kabuklarıdır. Kitin; konsantre HCl asit, H_2SO_4 asit ve çok soğuk CH_3COOH asit içerisinde çözünür. Ancak su, seyreltik asit, alkali ve organik çözücülerde çözünemez. Kitindeki amino gruplarının varlığı farklı biyolojik işlevsellikler sağlaması ve modifikasyon reaksiyonlarının yürütülmesi için oldukça yararlıdır. Bu yüzden kitinin birçok alanda selülozdan daha yüksek potansiyele sahip olacağı düşünülmektedir. Kitin;

biyolojik bozunabilirlik, biyolojik uyumluluk ve biyolojik aktiflik gibi özellikleri olan özel bir biyopolimerdir [16].

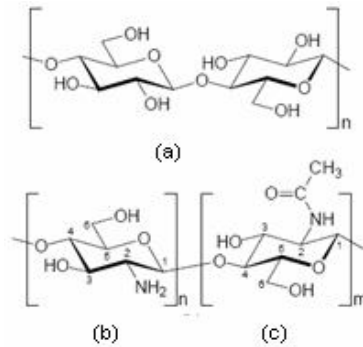


Şekil 1.2. Kitinin kimyasal yapısı

1.3. Kitosan

Doğal bir biyopolimer olan kitosan, özellikle son 50 yıldır araştırmacılar için ilginç bir materyal olarak yerini korumaktadır. Kitine göre birçok avantaja sahip olan kitosan başta gıda, kozmetik, ziraat, tıp, kâğıt ve tekstil olmak üzere birçok endüstri dalında kullanım alanı bulmuştur [17].

Doğada bulunan kaynaklardan bol miktarda elde edilebilen bir biyopolimer olan kitosan, canlılara karşı toksik özelliğinin olmaması, biyolojik olarak parçalanabilirliği, biyoyumluluğu, kimyasal ve fiziksel özellikleri bakımından diğer biyopolimerlere göre üstün özellikler göstermesi nedeniyle birçok endüstri dalı için uygun bir maddedir [18,19].



Şekil 1.3. Selüloz (a), kitosan (b) ve kitinin (c) kimyasal yapıları

Kitosan, her tekrarlayan birimdeki primer (C-6), ve sekonder (C-3) hidroksil grupları ile amin (C-2) grubu olmak üzere toplam üç tane reaktif gruba sahiptir. Bu reaktif gruplar kolayca kimyasal modifikasyona uğrayabilmekte ve kitosanın mekaniksel ve fiziksel özellikleri ile çözünürlüğünü değiştirmektedir [20].

Kitosanın özelliklerine etki eden parametreler; deasetilasyon derecesi, molekül ağırlığı, viskozite, çözünürlük ve renk şeklinde sıralanabilmektedir.

Kitosan, katyonik yapısı sayesinde pH<6 ortamında bazı çözeltilerde kolayca çözünebilmektedir. Diğer yandan, inorganik asitler içerisinde kitosanın çözünürlüğü oldukça düşüktür. Kitosanın çözünmesi amacıyla genellikle asetik asit, formik asit ve laktik asit gibi organik asitler kullanılmaktadır. Bunlar arasında en çok kullanılan çözügen asetik asittir. Kitosanın çözünürlüğünü etkileyen sıcaklık, çözügen konsantrasyonu ve partikül büyüklüğü gibi birçok parametre bulunmaktadır. Yapılan araştırmalar iyi bir çözünürlük için kitosanın en az % 75-80 deasetilasyon derecesine sahip olması gerektiğini göstermiştir [21].

Kitosanın çözünürlüğü, kimyasal modifikasyonları, film veya lif oluşumu gibi kullanımları açısından da oldukça önemli bir parametredir.

Kitosan günümüzde tıptan gıdaya, ziraattan kozmetiğe, eczacılıktan atık su arıtımına ve tekstil sektörüne kadar sayısız alanda kullanılabilmektedir.

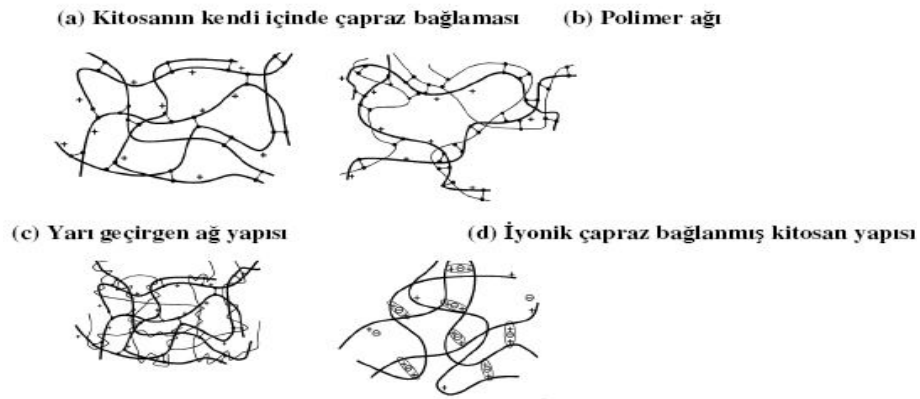
Kitosan, biyolojik aktivitesinin çokluğundan dolayı birçok araştırma ve uygulamaya konu olmuştur. Özellikle yara tedavisinde doku sağlanması için kitosan oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca, medikal yapay deri, cerrahi dikiş iplikleri, yapay kan damarları, kontrollü ilaç salımı, kontakt lens yapımı, yara bandı, sargı bezi, kolesterol kontrolü (yağ bağlayıcı), tümör inhibitörü, antifungal, antibakteriyal ve hemostatik etki göstermesi vb. şeklinde sıralanabilmektedir [22].

In vivo testler, kitosanın insan vücuduna herhangi bir yan etkisi bulunmadığını göstermiştir. Kitosan, tablet olarak kullanılması halinde tükürük veya midede bulunan lipaz enzimi tarafından parçalanabilmektedir. Parçalanma sonucunda amin şekerleri gibi toksik özellikte olmayan ürünler açığa çıkmaktadır.

Kitosan diğer yandan kolesterol düşürücü etkiye de sahiptir. Polikasyonik yapısı nedeniyle negatif yüklü lipidler ile etkileşime girerek kolesterolü düşürmektedir [23].

Berger J. ve diğ. [23], biyomedikal uygulamalarda kitosan hidrojellerinin kullanılabilirliğini araştırmışlardır. Hidrojel yapımında en fazla kullanılan çapraz bağlayıcılar, glioksal ve glutaraldehitir.

Glutaraldehit, kitosanın amin gruplarına imin grubu üzerinden bağlanmaktadır. Bu tip dialdehitler herhangi bir aditif olmadan doğrudan reaksiyon gerçekleştirebilme özelliğine sahiptir. Ayrıca, çapraz bağlayıcı olarak; dietil squarat, oksalik asit veya genipin de kullanılabildiği ifade edilmektedir. Kovalent bağlı hidrojeller, implantlar veya bandaj yapımında kullanılabilirken, iyonik bağlı hidrojeller özellikle ilaç salınım sistemlerinde uygun kullanım alanı bulmuştur. Kitosan, toksik özellikte olmaması, çevreye zarar vermeden biyolojik olarak parçalanabilir özellikte olması ve vücut içerisinde, tamamen zararsız ürünlere (amino şekeri) parçalanmasından ötürü herhangi bir yan etkisi de bulunmamaktadır [23].



Şekil 1.4. Kitosan hidrojellerin yapısı (kovalent bağ, pozitif yüklü kitosan, kitosan ilave polimer, iyonik çapraz bağlayıcı, iyonik etkileşim)

Film oluşturabilme özelliği nedeniyle kitosan, yapay böbrek zarı yapımında da kullanım alanı bulmuştur. Bu amaçla, aşı polimerizasyonu ile ve suda çözünebilen polimerler ile modifiye edilmektedir [21].

İlaçların kontrollü salımı, son derece önem taşımaktadır. Biyolojik açıdan uyum gösteren kitosan, çeşitli ilaç formülasyonlarında uygun bir matris olarak karşımıza çıkmaktadır. Çeşitli ilaçlar, kitosan matrisi içerisine (film, mikrokapsül, kaplanmış tablet vb.) yerleştirilmektedir. Farklı şekillerde kitosan içerisine hapsedilmiş ilaçlar da bulunmaktadır. Kitosanın serbest amin grubu katyonik özellik kazandırması nedeniyle negatif yüklü ilaçlar, polimerler ve biyoaktif moleküllerle etkileşimini sağlamaktadır. Jel oluşturabilmesi, kopolimer gibi çok çeşitli formlarda bulunması ilaç salınım

sistemlerinde büyük avantaj sağlamaktadır. Midede tahrişi engelleyen antasit ve antiülser aktivitelere sahip olması da ideal materyal haline getirmektedir [24, 25].

1.4. Kitosan ile ilgili literatür çalışmaları

Kitosanın birçok petrokimyasal olan ve olmayan monomerlerle bileşikleri hazırlanmış ve biyolojik özellikleri incelenmiştir. Xiao ve diğ. [26], kitosan ile arginin belli süstitüsyon derecelerindeki bileşiklerini sentezlemiş ve antimikrobiyal aktivitesini incelemişlerdir.

Wang ve diğ. [27], kitosan ile poly-D,L-lactide-poly(ethylene glycol) nanopartiküllerini hazırlamışlar ve *in vitro* antitümör aktivitesini incelemişlerdir.

Yine aynı şekilde kitosanın piridin [28], stiren [29], poliakrilik [30], polifenol [31], vinil imidazol [32] gibi çok çeşitli maddelerle çeşitli mekanizmalar ile yeni bileşikleri hazırlanmış ve biyolojik ve fiziksel özellikleri incelenmiştir.

Özetle kitosan, yukarıda bahsedilen özelliklerinin yanı sıra biyoyumluluğu, antimikrobiyal aktivitesi, diğer materyallerle kompozit oluşturabilmesi, hücresel tutunmaya ve çoğalmaya olanak sağlaması gibi özellikleri sayesinde kullanım alanı bulmuştur [24].

Lu ve diğ.[33], kitosan temelli oligoamin polimerlerin bir serisini incelemişler ve polimerlerin poietileniminden daha az toksik etki gösterdiğini belirlemişlerdir.

Pasaphan ve diğ, [34], yaptıkları çalışmada kitosanın gallik asitle yeni türevlerini hazırlamışlar ve oluşan yeni bileşiğin etkili bir *in vitro* antioksidan aktivite gösterdiğini bulmuşlardır.

Hu ve diğ, [35], kitosan ile hidroksi bütirik asit türevlerini hazırlamışlar ve antibakteriyel aktivitesini incelemişlerdir.

Liang ve diğ, [36], kitosan ile çay polifenollerinden oluşturdukları nanopartiküllerin antitümör aktivitesini incelemiş ve yüksek bir aktivite belirlemişlerdir.

Kitosan, kullanılacağı yere/dokuya göre mekanik özellikleri güçlendirilebilmektedir [24, 37].

2. MATERYAL ve METOT

2.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

- Cam malzeme olarak; çeşitli hacimlerde üç veya dört ağızlı rodajlı reaksiyon balonları, normal ve vakum destilasyon düzeneği, geri soğutucu, damlatma hunisi, termometre, havan, mezür, huni, erlen, beher, deney tüpü, baget, pipet.
- Polimerizasyon için; termostatlý yağ banyosu, özel tüp ve balonlar.
- IR spektrumları için; MATTSON 1000 FT-IR Spektrometre (Fırat Üniversitesi, Elazığ) kullanıldı.
- Element analizleri için; LECO-932 Microelemental Analiz Cihazı (Fırat Üniversitesi, Elazığ) kullanıldı.
- Tartımlar için Elektronik Terazi: Chyo J.L. 180 model.
- Termal analizler için; SHIMADZU marka DSC 50 (Fırat Üniversitesi, Elazığ).
- Kurutma işlemi için; Elektro-Mag M 50 model Etüv kullanıldı.
- Karıştırma için (Jubbo ET 401) marka magnetik karıştırıcı kullanıldı.
- Çözücülerini uzaklaştırmak için evaporatör.

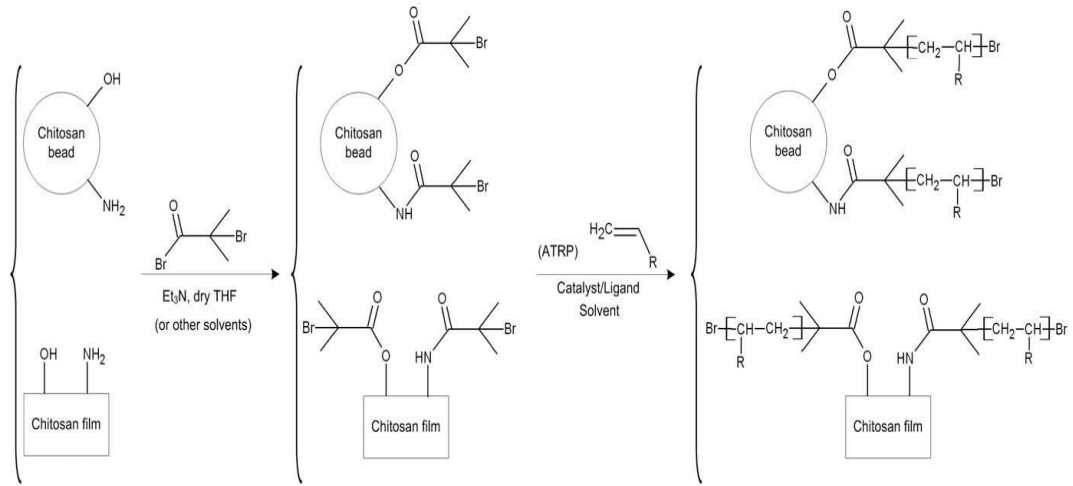
2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- **Reaktifler**
- Kristal kitosan sırasıyla; seyreltik NaOH, su, seyreltik CH₃COOH, su, deiyonize su, metanol ve asetonda yıkanarak kurutuldu. Potasyumtersiyerbütoksit, klorasetilklorür, 2,2'-bipiridin olduğu gibi kullanıldı.
- **Polimerizasyonda Kullanılan Monomerler**
- Metakrilamit, Diasetonakrilamit, 4-nitrofenilakrilamit, 2-hidroksietilmetakrilat olduğu gibi kullanıldı.
- **Çözücüler**
- Çöktürme ve yıkama işleminde kullanılan asetonitril, N,N-dimetilformamit (DMF), kloroform, su + etanol + HCl karışımı, deiyonize su, aseton ve dietileter çözücülerini olduğu gibi kullanıldı.
- deoksiriboz, hidrojen peroksit, sodyum askorbat ve FeSO₄.7H₂O, KH₂PO₄, tryphan blue,

- IR çekiminde tüm katı maddeler için KBr olduğu gibi kullanıldı. Kullanılan tüm kimyasal maddeler Merck, Aldrich veya Fluka markadır.

2.3. Aşı Kopolimerlerin Hazırlanması

Çalışmanın tamamı Kimya bölümü fizikokimya ve biyokimya laboratuvarlarında ve Tıp Fakültesi hücre kültür laboratuvarında gerçekleştirildi. Literatür bilgileri dikkate alınarak kitosanın yeni bir türevi fizikokimya laboratuvarlarında sentezlendi [32].



Şekil 2.1. Kitosan için ATRP başlatıcının hazırlanması ve vinil monomerle aşılması.

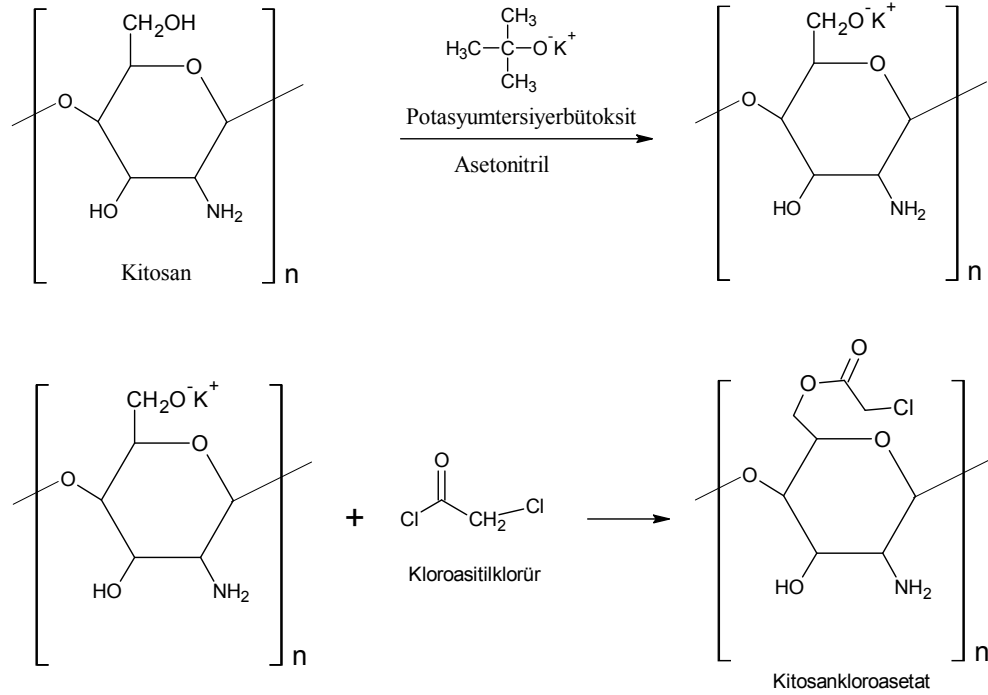
Kontrollü radikalik polimerizasyon çeşitlerinden olan atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP) için başlatıcı haline getirilecek kitosan, adı geçen polimerizasyon şartlarında uygun vinil monomerleri ile aşıl原因 kitosan'ın aşırı kopolimerleri elde edildi. Elde edilen aşırı kopolimerleri karakterize edebilmek için FTIR, Elemental ve Termal Analiz aletleri kullanıldı.

2.4. Kristal Kitosanın Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu (ATRP) Yoluyla Aşılması

2.4.1. Kitosanklorasetat Başlatıcısının Sentezi

4,06 gr kristal kitosan alınarak reaksiyon balonuna konuldu. Üzerine 50 ml asetonitril eklenerek bir gece reaksiyon balonunda bekletildi. Şişen kitosan üzerine 50 ml asetonitril'de çözünmüş 0,07 mol potasyumtersiyerbütoksit ilave edildi. Reaksiyon

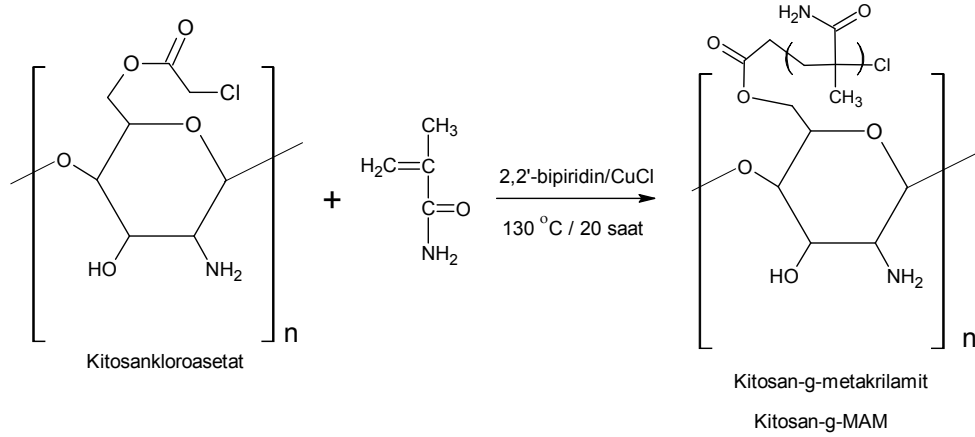
sürekli karıştırılarak oda sıcaklığında 4 saat sürdürüldü. Sonra damlatma hunisinde, 50 ml asetonitril’de çözülmüş 0,20 mol klorasetilklorür oda sıcaklığında sürekli karıştırılan reaksiyon ortamına damla damla ilave edildi. Reaksiyon, 12 saat geri soğutucu altında kaynatılarak tamamlandı. Karışım soğutulup süzüldü ve ayrılan çökelek sırasıyla; su, etanol, aseton ve dietileter’de yıkandı ve etüvde kurutuldu.



2.4.2. Kitosan-g-metakrilamit (Kito-g-MAM) Aşı Kopolimerinin Sentezlenmesi

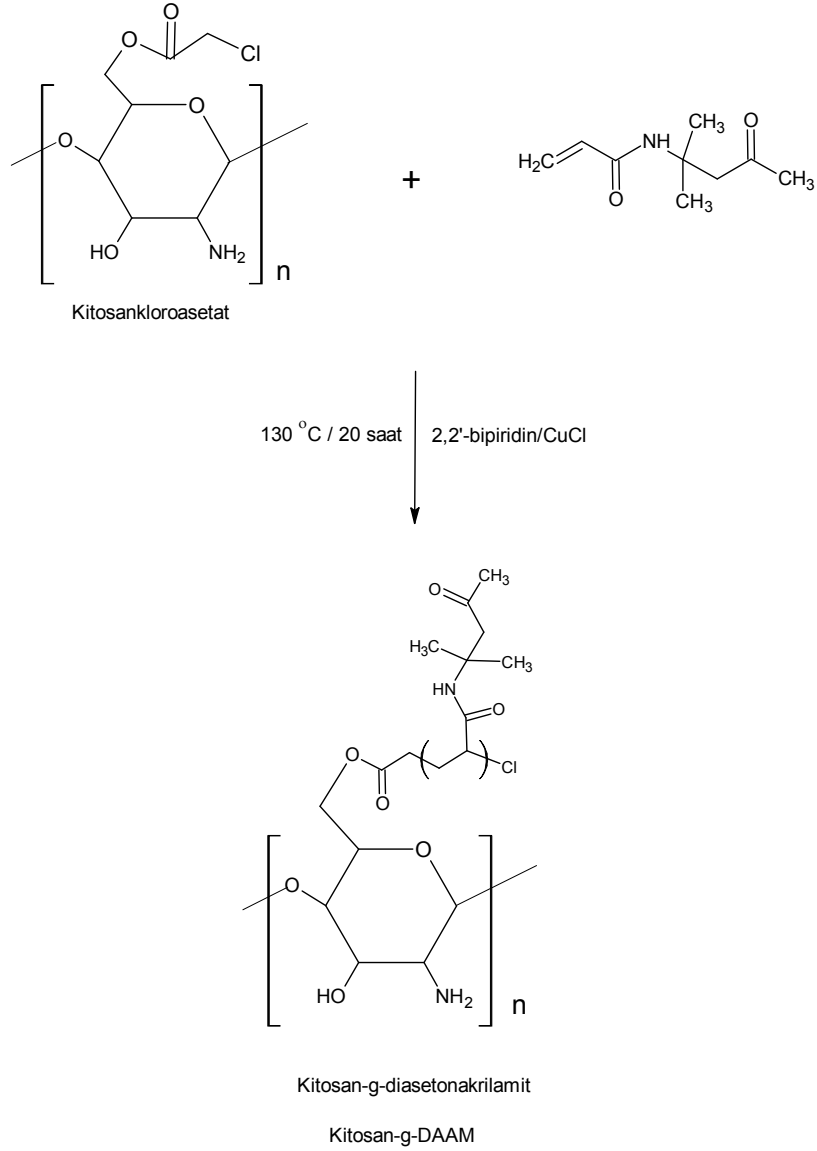
Polimer tüpüne önce 0,30 gr CuCl ardından 1,40 gr 2,2'-bipiridin konuldu. Bunların üzerine 15 ml N,N-dimetilformamit (DMF) eklenerek kompleks oluşturuldu ve bu kompleks argon gazı altında (degaz) yaklaşık 2-3 dakika karıştırıldı. Daha sonra polimer tüpüne 1,01 gr kitosankloroasetat ve 10 ml DMF eklenerek tekrar bir süre argon gazı altında karıştırıldı. Son olarak 10 ml DMF’de çözülen 15,30 gr metakrilamit polimer tüpüne ilave edildi ve son kez argon gazı altında yaklaşık 5 dakika karıştırıldı. Degaz işleminden hemen sonra polimer tüpünün kapağı yağlanarak kapatıldı, çevresindeki çıkıntılar lastik ya da teflon bant ile sarılarak sıcaklığı daha önceden termometre ile 130°C’ye ayarlanmış yağ banyosuna spor vasıtasıyla daldırıldı ve 20 saat sürekli karıştırılarak aşılama işlemi tamamlandı. Aşı polimerizasyonundaki madde

miktarları; kitosanklorasetat (mol olarak Cl içeriği esas alındı), CuCl, 2,2'-bipiridin ve monomer için mol oranları sırasıyla 1:1:3:60 olacak şekilde alındı. Karışım soğutulup süzöldükten sonra çökelek sırasıyla; DMF, asetonitril, kloroform, su + etanol + HCl karışımı, su, aseton ve dietileter'de yıkanıp etüvde kurutuldu.



2.4.3. Kitosan-g-diasetonakrilamit (Kito-g-DAAM) Aşı Kopolimerinin Sentezlenmesi

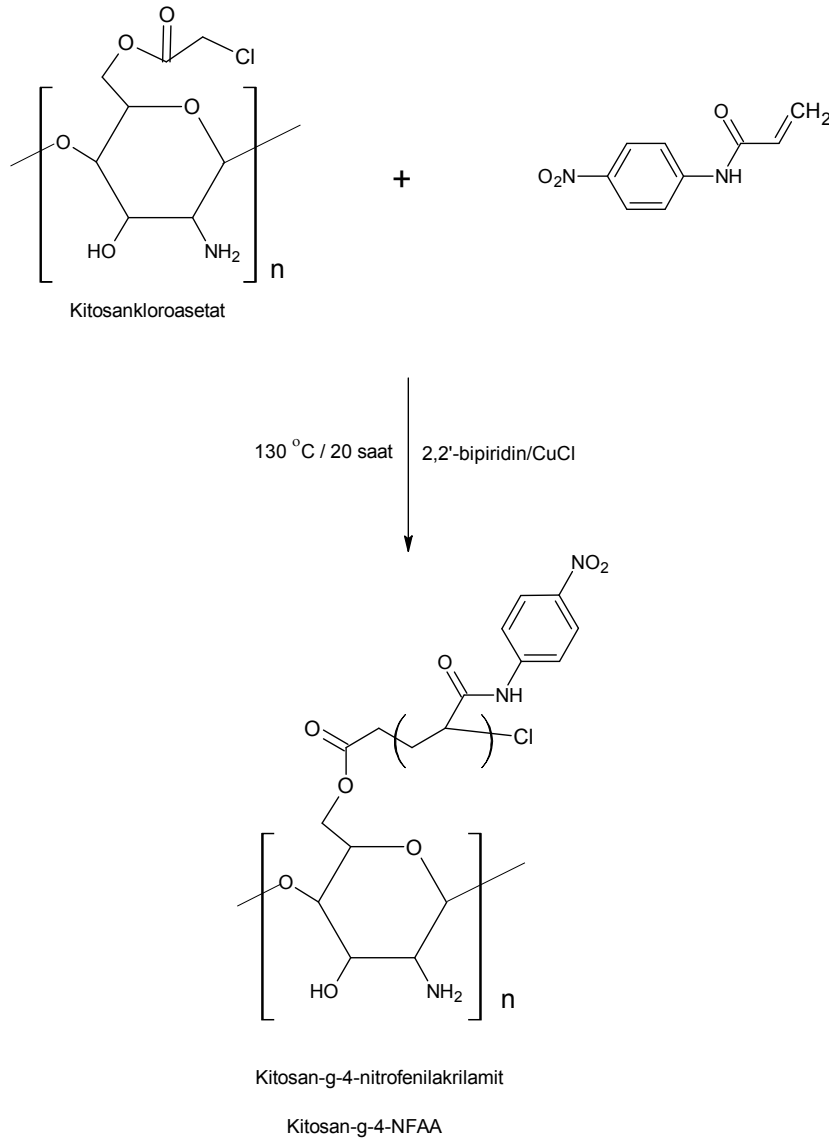
Polimer tüpüne önce 0,30 gr CuCl ardından 1,40 gr 2,2'-bipiridin konuldu. Bunların üzerine 15 ml N,N-dimetilformamit (DMF) eklenerek kompleks oluşturuldu ve bu kompleks argon gazı altında (degaz) yaklaşık 2-3 dakika karıştırıldı. Daha sonra polimer tüpüne 1,00 gr kitosanklorasetat ve 10 ml DMF eklenerek tekrar bir süre argon gazı altında karıştırıldı. Son olarak 10 ml DMF'de çözölen 30,42 gr diasetonakrilamit polimer tüpüne ilave edildi ve son kez argon gazı altında yaklaşık 5 dakika karıştırıldı. Degaz işleminden hemen sonra polimer tüpünün kapağı yağlanarak kapatıldı, çevresindeki çıkıntılar lastik ya da teflon bant ile sarılarak sıcaklığı daha önceden termometre ile 130°C'ye ayarlanmış yağ banyosuna spor vasıtasıyla daldırıldı ve 20 saat sürekli karıştırılarak aşılama işlemi tamamlandı. Aşı polimerizasyonundaki madde miktarları; kitosanklorasetat (mol olarak Cl içeriği esas alındı), CuCl, 2,2'-bipiridin ve monomer için mol oranları sırasıyla 1:1:3:60 olacak şekilde alındı. Karışım soğutulup süzöldükten sonra çökelek sırasıyla; DMF, asetonitril, kloroform, su + etanol + HCl karışımı, su, aseton ve dietileter'de yıkanıp etüvde kurutuldu.



2.4.4. Kitosan-g-4-nitrofenilakrilamit (Kito-g-NFAA) Aşı Kopolimerinin Sentezlenmesi

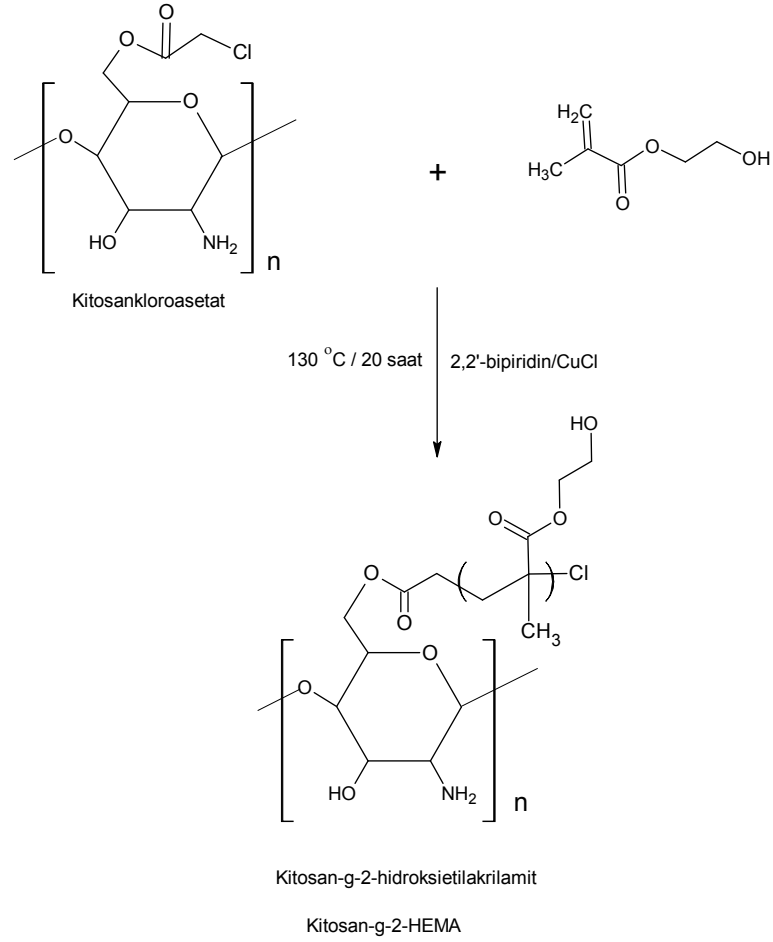
Polimer tüpüne önce 0,06 gr CuCl ardından 0,30 gr 2,2'-bipiridin konuldu. Bunların üzerine 15 ml N,N-dimetilformamit (DMF) eklenerek kompleks oluşturuldu ve bu kompleks argon gazı altında (degaz) yaklaşık 2-3 dakika karıştırıldı. Daha sonra polimer tüpüne 0,60 gr kitosankloroasetat ve 10 ml DMF eklenerek tekrar bir süre argon gazı altında karıştırıldı. Son olarak 10 ml DMF'de çözülen 7,44 gr 4-nitrofenilakrilamit polimer tüpüne ilave edildi ve son kez argon gazı altında yaklaşık 5 dakika karıştırıldı. Degaz işleminden hemen sonra polimer tüpünün kapağı yağlanarak kapatıldı,

çevresindeki çıkıntılar lastik ya da teflon bant ile sarılarak sıcaklığı daha önceden termometre ile 130°C'ye ayarlanmış yağ banyosuna spor vasıtasıyla daldırıldı ve 20 saat sürekli karıştırılarak aşılama işlemi tamamlandı. Aşı polimerizasyonundaki madde miktarları; kitosanklorasetat (mol olarak Cl içeriği esas alındı), CuCl, 2,2'-bipiridin ve monomer için mol oranları sırasıyla 1:1:3:60 olacak şekilde alındı. Karışım soğutulup süzöldükten sonra çökelek sırasıyla; DMF, asetonitril, kloroform, su + etanol + HCl karışımı, su, aseton ve dietileter'de yıkanıp etüvde kurutuldu.



2.4.5. Kitosan-g-2-hidroksietilmetakrilat (Kito-g-HEMA) Aşı Kopolimerinin Sentezlenmesi

Polimer tüpüne önce 0,07 gr CuCl ardından 0,35 gr 2,2'-bipiridin konuldu. Bunların  zerine 15 ml N,N-dimetilformamit (DMF) eklenerek kompleks oluşturuldu ve bu kompleks argon gazı altında (degaz) yaklaşık 2-3 dakika karıştırıldı. Daha sonra polimer tüpüne 0.70 gr kitosanklorasetat ve 10 ml DMF eklenerek tekrar bir süre argon gazı altında karıştırıldı. Son olarak 10 ml DMF'de üzülen 5,86 ml 2-hidroksietilmetakrilat polimer tüpüne ilave edildi ve son kez argon gazı altında yaklaşık 5 dakika karıştırıldı. Degaz işleminden hemen sonra polimer tüpünün kapağı yağlanarak kapatıldı, çevresindeki çıkıntılar lastik ya da teflon bant ile sarılarak sıcaklığı daha önceden termometre ile 130  C'ye ayarlanmış yağ banyosuna spor vasıtasıyla daldırıldı ve 20 saat sürekli karıştırılarak aşılama işlemi tamamlandı. Aşı polimerizasyonundaki madde miktarları; kitosanklorasetat (mol olarak Cl içeriği esas alındı), CuCl, 2,2'-bipiridin ve monomer için mol oranları sırasıyla 1:1:3:60 olacak şekilde alındı. Karışım soğutulup s z ld kten sonra çökelek sırasıyla; DMF, asetonitril, kloroform, su + etanol + HCl karışımı, su, aseton ve dietileter'de yıkanıp etüvde kurutuldu.



2.5. Uygulamalarda Kullanılan Hücreler

Antitümör aktivitenin belirlenmesi için L 1210 HÜCRE KÜLTÜRÜ (kemirgen lösemi hücresi) hücreleri kullanıldı.

2.5.1. Kullanılacak Hücre Sayısı ve Madde Dozlarının Belirlenmesi

L 1210 lösemi hücre süspansiyonu 2000 rpm devirde 5 dakika santrifüj edildi. Hemositometre kullanılarak hücreler sayıldı ve hücre sayısı L 1210 hücre deneyleri için 1×10^5 /ml, hücreye ayarlandı. Dozların belirlenmesinde ön denemeler yapıldı ve aşağı yukarı yöntemi kullanıldı [38].

Hücre süspansiyonundan birer ml deney tüplerine aktarıldı ve üzerine test edilecek ajanlar 2,5 ve 5 mg olacak şekilde ilave edildi ve kontrol tüpleri ile birlikte inkübatöre yerleştirildi. 24 saat sonra tüpler inkübatörden çıkarılarak tritürasyon

(hücrelerin yapıştığı yerden sökülmesi) yapıldı ve hücre süspansiyonu % 0,4 tryphan blue ile 1:1 (v/v) oranında rastgele seçilen 100 adet hücre hemositometrede (kan sayım preparatı) sayıldı. Hücre canlılığı yüzde olarak ifade edildi. Aynı işlem 48 saat sonra tekrar edildi ve deney sonlandırıldı [38].

2.6. DPPH Radikal İndirgeme Metodu ile Ölçüm

Antioksidan aktivitenin belirlenmesi için DPPH (2,2- difenil-1-pikrilhidrazil radikali) radikal indirgeme metodu kullanıldı [39]. Etanolde 25 mg/L DPPH olacak şekilde hazırlanan çözeltiden 4 ml alınarak her madde için ayrı ayrı tüplere kondu. Test maddelerinden her bir grup için 2,5 ve 5 mg'lık tartımlar reaksiyon ortamına ilave edildi. Reaksiyonun oluşması için bu karışım oda sıcaklığında karanlık ortamda, ara sıra karıştırılarak 30 dk. bekletildi. Renk açılımına bakılarak 517 nm'de spektrofotometrede okutulup okutulmayacağına karar verildi. Renk açılımı olduğundan spektrofotometrede okutma yapıldı.

2.7. Deoksiriboz degradasyonu ile hidroksil radikali yakalama aktivitesi

Bu yöntemde enzimatik olmayan, Deoksiriboz degradasyonu ile oluşan Hidroksil radikallerinin yakalanması esasına dayalı olan metod kullanıldı [40]. Deoksiriboz, hidrojen peroksit, sodyum askorbat ve $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 tamponu (pH: 7.4) karışımına ilave edilen 2,5 ve 5 mg'lık test maddelerinin etkisi, oluşan MDA miktarının spektrofotometrik ölçümü ile yapıldı.

2.8. İstatistiksel Değerlendirme

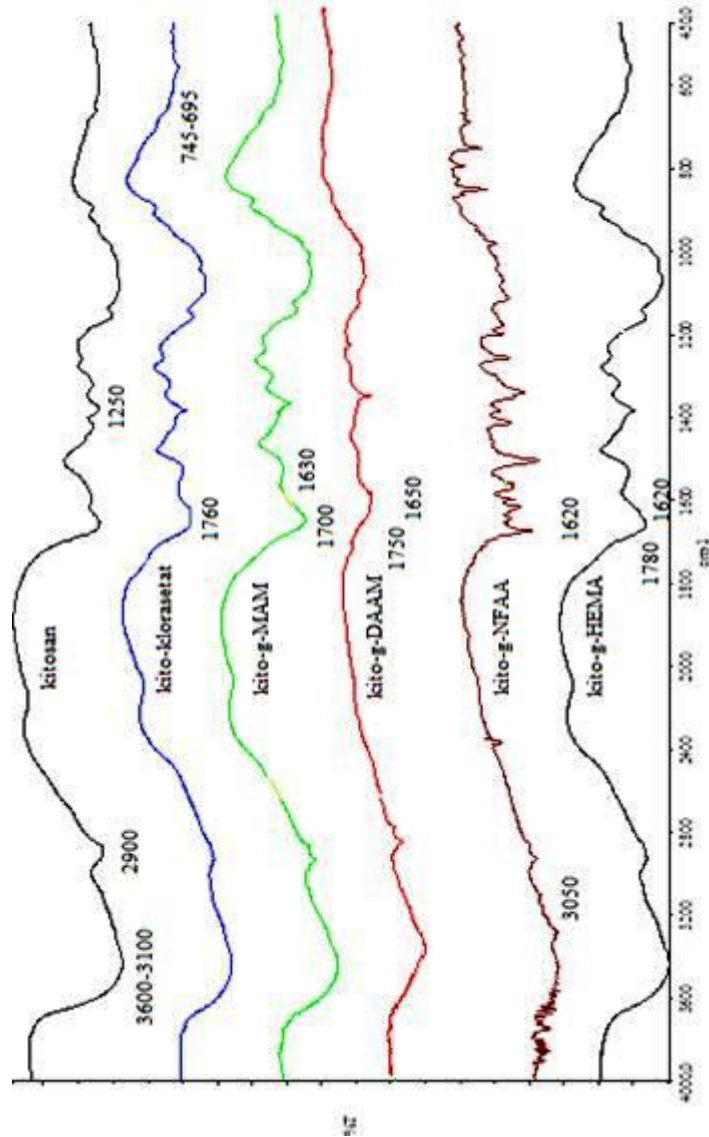
Bu çalışmadaki bütün istatistiksel analizler; SPSS/PC paket programı kullanılarak yapılmıştır. Aktiviteler arasındaki istatistiksel farklılıkları ortaya koymak için sonuçlara varyasyon analizi uygulandı ve 0.05'ten küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Deneysel çalışmalar sonunda elde edilen veriler, antitümör özellik için One- way Anova analizi, Tukey testi ve MDA için ise LSD testi yapılarak değerlendirildi.

3. BULGULAR

3.1. Aşı Kopolimerlerinin Karakterizasyonu ve Aşılama İlgili Veriler

3.1.1. IR spektrum değerlendirilmesi

Kitosan (Kito-OH), Kito-klorasetat ve aşı kopolimerlerinin IR spektrumları Şekil 3.1’de ve değerlendirmeleri Tablo 3.3’de görülmektedir.



Şekil 3.1. Kitosan, kitosan klorasetat ve aşı kopolimerlerinin IR spektrumları.

Tablo 3.1. Kito-OH, kito-klorasetat ve aşı kopolimerlerinin IR değeriendirilmesi.

Dalga Sayısı (cm ⁻¹)	Titreşim Türü
Kitosan 3600-3100 2900-2915 1250	O-H gerilmesi, NH ₂ gerilmesi Alifatik C-H gerilmesi C-O-C gerilmesi
Kito-klorasetat 1760 745-695	C=O ester gerilmesi C-Cl gerilmesi
Kito-g-MAM 1700 1630	C=O ester gerilmesi C=O amit gerilmesi
Kito-g-DAAM 1650 1750	C=O amit gerilmesi Keton karbonili
Kito-g-NFAA 3050 1620	Aromatik C=C gerilmesi C=O amit gerilmesi
Kito-g-HEMA 1780	Ester C=O gerilmesi

3.1.2. Elementel Analiz Sonuçları

Tablo 3.2’de verilen polimerlerin elementel analiz sonuçlarına göre aşağıdaki formüller yardımıyla, kitosandaki -CH₂OH gruplarının klor asetil klorür ile süstitüsüyonu yani kitosanın mol olarak yüzde süstitüsüyonu (y), kitosanın her bir aşı

kopolimerindeki monomerlerinin, ağırlık fraksiyonu (x) ile kito-klorasetat birimine oranı (n) hesaplandı.

$$Y = \frac{A - B}{C - D} \times 100$$

Y = Kitosanın ağırlıkça yüzde süstitüsüyonu

A = Kitosan klorasetatın deneysel karbon yüzdesi

B = Kitosanın deneysel karbon yüzdesi

C = % 100 süstitüsyon gerçekleştiğinde Kitosan klorasetatın teorik karbon yüzdesi

D = Kitosandaki teorik karbon yüzdesi

Kitosanın ağırlıkça yüzde süstitüsüyonu 46.67 olarak hesaplandıktan sonra molca yüzde süstitüsyona (y) geçmek için;

$$y = \frac{Y / 237,5}{Y / 237,5 + (100 - Y) / 161} \times 100$$

161 = Kitosanda tekrar eden birim ağırlığı

237,5 = % 100 süstitüsyon gerçekleştiğinde Kitosan klorasetatın birim ağırlığı
formülü kullanılarak Kitosanın mol olarak yüzde süstitüsüyonu 41,30 bulundu.

Aşlanmış Kitosanın herbirindeki monomerlerinin ağırlık fraksiyonu (x);

$$E = (1 - x) A + F \cdot x$$

E = Aşı kopolimerlerinin deneysel karbon yüzdesi

F = Monomerlerinin teorik karbon yüzdesi

Aşı kopolimerlerinde monomer biriminin kito-aşı kopolimer birimine oranı (n)
ise;

$$n = \frac{x / M_m}{(1 - x) / M_{ort}} / y$$

$$M_{ort} = y 238 + (1 - y) \cdot 145$$

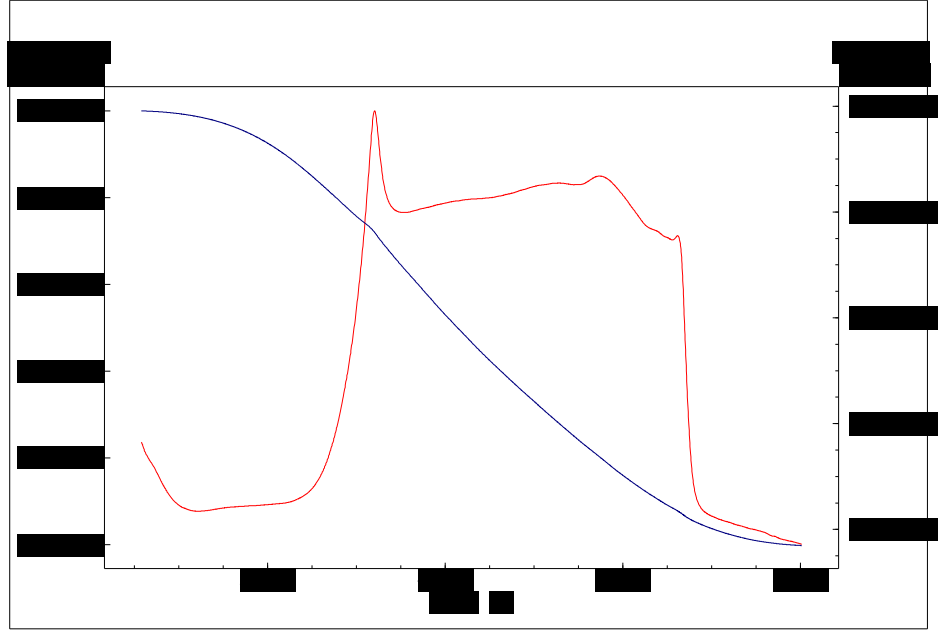
M_m = Monomerinin molekül ağırlığı

formülleri yardımıyla hesaplandı.

Tablo 3.2. Kito-OH, kito-klorasetat ile aşı kopolimerlerine ait elementel analiz sonuçları ve değerlendirilmesi

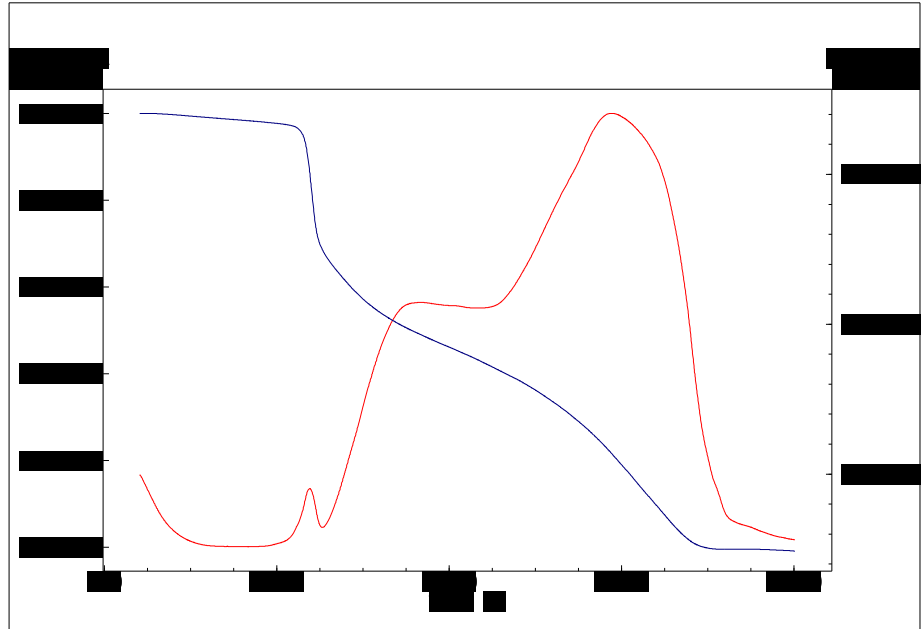
Polimer	Elementel Analiz			Monomerlerin Ağırlık Fraksiyonu (x)	Monomer Birimi / kito-klorasetat birimi (n)
	% C	% H	% N		
Kitosan	41,62	7,049	7,225	-	-
Kito- klorasetat	37,27	6,548	5,661	-	-
Kito-g-MAM	36,32	6,478	6,279	0,047	0,046
Kito-g-DAAM	36,15	6,439	5,990	0,06	0,03
kitosan g-NFAA	36,51	6,467	6,060	0,037	0,016
Kito-g-HEMA	36,43	5,396	3,641	0,04	0,026

3.1.3. Termal Analiz Sonuçları



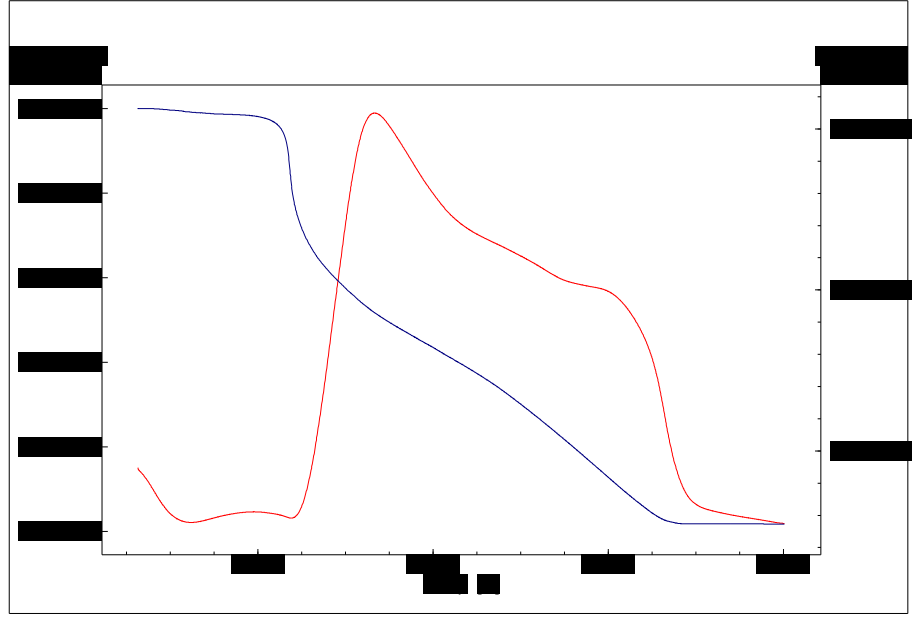
Şekil 3.2. Kitosan'a ait termal eğrisi

Kitosan yıkanmış numunesinin TGA eğrisi incelendiğinde 110.04°C'ye kadar kararlı kalmıştır. Tek basamakta bozunma gerçekleşmiştir. 426.24°C'de numunenin %50'si bozunmuştur. Yaklaşık 770.17°C'de numunenin tamamı bozunmuştur.



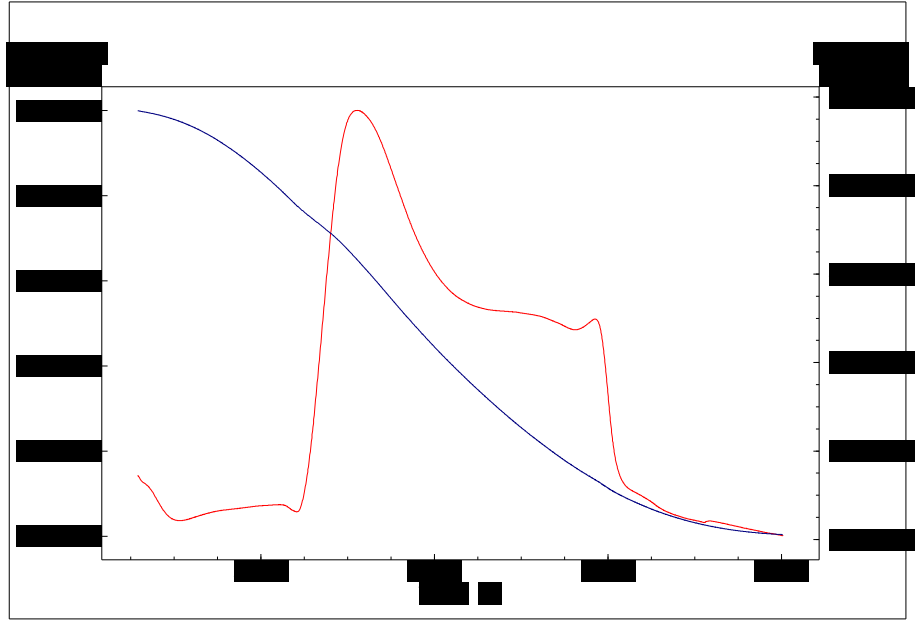
Şekil 3.3. Kito-klorasetat'a ait termal eğrisi

Kitosan başlatıcı incelendiğinde, 220.47°C'ye kadar termal olarak kararlı kalmıştır. Numune toplam üç basamakta bozunmuştur. 370.17°C'de numunenin % 50'si bozunmuştur. Bu sıcaklıkta devam eden bozunma 693.45°C'de tamamlanmıştır. Bu sıcaklıkta numunenin tamamı bozunmuştur.



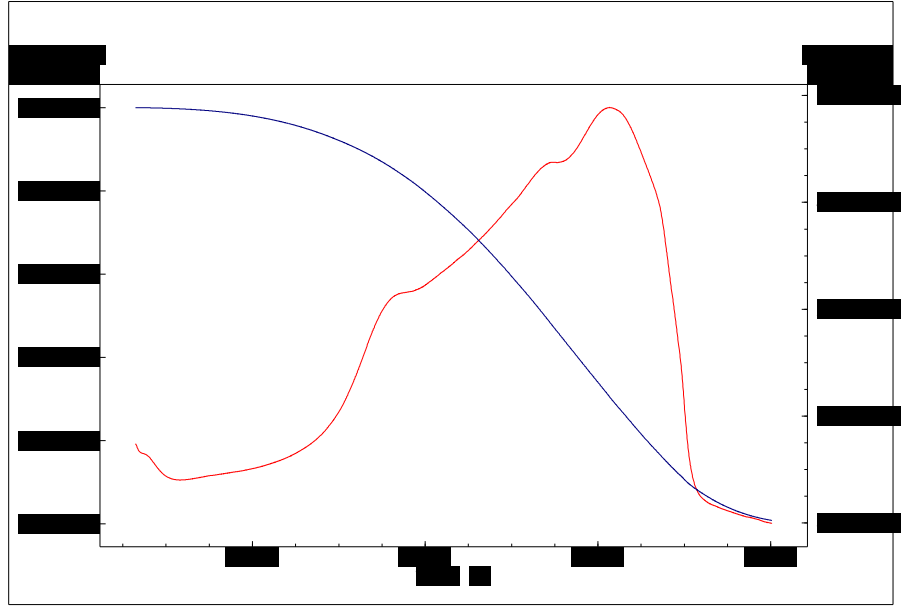
Şekil 3.4. Kito-g-MAM' ait termal eğrisi

Kito-g-MAM bileşiğinin TGA diyagramı incelendiğinde maddenin 201,62°C'ye kadar kararlı kaldığı gözlemlenmiştir. Numune'de iki basamaklı bir bozunma gerçekleşmiştir. 367°C sıcaklığa kadar maddenin yaklaşık % 50'si bozunmuştur. Numune 800°C'ye kadar ısıtılmasına rağmen 681°C'de numunenin tamamı bozunmuştur.



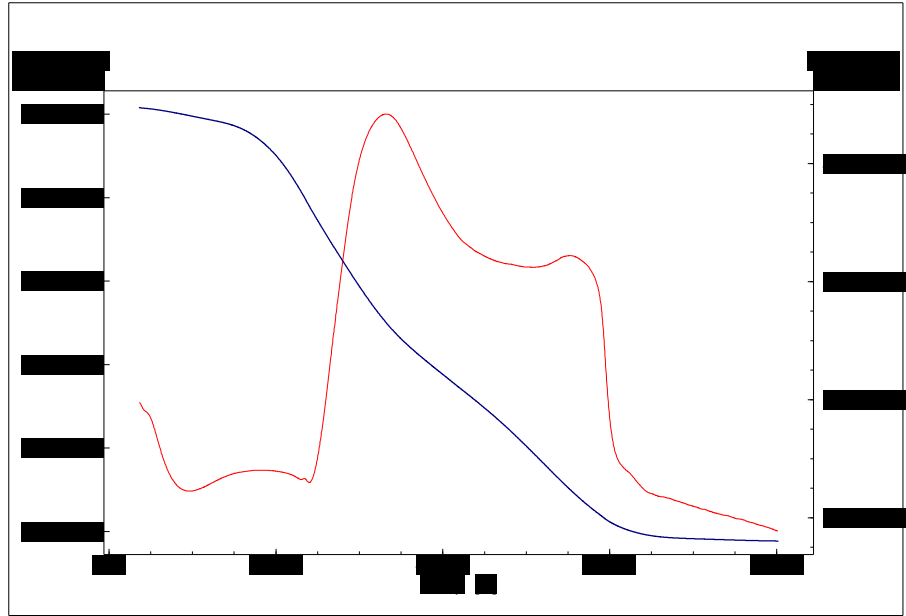
Şekil 3.5. Kito-g-4- DAAM ‘a ait termal eğrisi

Kito–g-diaseton akrilamit termal eğrisi incelendiğinde 57.06°C’ye kadar kararlı kalmıştır. Numunede bu kadar düşük sıcaklıkta meydana gelen ağırlık kaybı muhtemelen nemden kaynaklanmaktadır. Numune çok yüksek sıcaklığa kadar ısıtılmasına rağmen nemin uzaklaşmamış olması suyun yapıda hapsedildiğini göstermektedir. Nemin uzaklaşması 145.97°C’de tamamlanmıştır. 373.81°C’de maddenin % 50’si ortamdan uzaklaşmıştır. Numunenin 800°C’de tamamı bozunmuştur.



Şekil 3.6. Kito-g-4-NFAA' ait termal eğrisi

Kito-g-4-nitrofenilakrilamit TGA eğrisi incelendiğinde maddenin 158.02°C'ye kadar kararlı kaldığı belirlenmiştir. Madde 800°C'ye kadar ısıtma işlemine tabi tutulmuştur. 545.88°C sıcaklığında maddenin % 50'si bozunmuştur ve bozunma hala devam etmektedir. Maddenin 800°C'de tamamı tükenmiştir.



Şekil 3.7. Kito-g-HEMA'a ait termal eğrisi

Kito-g-HEMA, 60.06°C'ye kadar kararlı kalmıştır. Numunede bu kadar düşük sıcaklıkta meydana gelen ağırlık kaybı muhtemelen nemden kaynaklanmaktadır. Numune çok yüksek sıcaklığa kadar ısıtılmasına rağmen nemin uzaklaşmamış olması suyun yapıda hapsedildiğini göstermektedir. Nemin uzaklaşması 162.63°C'de tamamlanmıştır. 329.74°C'de maddenin % 50'si ortamdan uzaklaşmıştır. Numunenin 649.25°C'de tamamı bozunmuştur.

3.2. Biyolojik Aktivite

Elde edilen bulgular parametrelerin her birinde uygulama boyunca grupların kontrol grubu ile kıyaslarını gösterecek tablolar halinde verildi. Maddelerle muamele edilmiş DPPH radikal indirgeme metodu ile ölçüm sonuçları Tablo 3.3'de, Deoksiriboz degradasyonu ile hidroksil radikali yakalama aktivitesi Tablo 3.4'de ve L 1210 hücrelerine ait canlı hücre sonuçları Tablo 3.5'de verilmiştir.

Tablo 3.3. DPPH radikal indirgeme metodu ile ölçüm sonuçları

Örnekler (5 mg)	DPPH. Yok Etme Aktivitesi (%)
Kontrol	0,00
Kitosan	1,00
Kito-klorasetat	3,57
Kito-MAM	8,96
Kito-DAAM	18,45
Kito-NFAA	13,89
Kito-HEMA	16,55
Gallik asit	85,24

Tablo 3.4. Deoksiriboz degradasyonu ile hidroksil radikali yakalama aktivitesi

MDA	(2.5 mg)	(5 mg)
Kontrol	2,79 ±0,025	2,79 ±0,025
Kitosan	3,384 ± 0,052 ^b	3,227 ± 0,014 ^a
Kito-klorasetat	3,261 ± 0,050 ^b	3,129 ± 0,021 ^a
Kito-MAM	3,608 ± 0,005 ^c	3,715 ± 0,002 ^c
Kito-DAAM	3,763 ± 0,155 ^c	2,998 ± 0,038
Kito-NFAA	2,821 ± 0,186	2,813 ± 0,000
Kito-HEMA	3,425 ± 0,012 ^b	2,420 ± 0,263 ^a

a: P<0,05 b: P<0,01 c :P<0,001

Tablo 3.5. Maddelerle muamele edilmiş L 1210 hücrelerinin süreye ve doza göre % oranında canlılık durumları

Gruplar (n=4)	24 s 2,5 mg	24 s 5 mg	48 s 2,5 mg	48 s 5 mg
Kontrol	88.00±0.71	87.00±0.41	83.75±0.48	82.25±0.63
Kitosan	27.75±0.85 ^c	19.25±0.63 ^c	18.75±1.31 ^c	8.00±1.29 ^c
Kito-korasetat	24.50±1.26 ^c	14.75±1.11 ^c	15.00±1.29 ^c	3.50±0.50 ^c
Kito-MAM	25.25±1.38 ^c	15.75±0.63 ^c	10.25±0.48 ^c	1.25±0.75 ^c
Kito-DAAM	19.00±0.41 ^c	13.50±1.04 ^c	7.75±0.85 ^c	0.00±0.00 ^c
Kito-NFAA	21.75±0.48 ^c	16.25±0.63 ^c	1.25±0.75 ^c	0.00±0.00 ^c
Kito-HEMA	21.50±1.04 ^c	15.00±1.41 ^c	8.25±1.43 ^c	0.50±0.50 ^c

a: P<0,05 b: P<0,01 c :P<0,001

4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Toz kitosanın aşılmasında ATRP yöntemi kullanıldı. ATRP yöntemi için gerekli, Kito-klorasetat başlatıcısı sentezlendi.

Kito-klorasetat'ın IR spektrumunda Kitosan'ın IR spektrumundan farklı olarak 1760 cm^{-1} 'de ester C=O gerilme, $745\text{-}695\text{ cm}^{-1}$ 'de C-Cl gerilme titreşimlerine ait pikler ile elementel analizde karbon yüzdesine dayalı hesaplamalar sonucu bulunan 0.35 mol olarak yüzde süstitüsyon derecesine sahip kito-ClAc başlatıcısının sentezlendiği görüldü [41, 42].

Kito-MAM'ın IR spektrumunda toz kitosana göre $3500\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ 'deki O-H gerilme titreşiminin biraz da olsa azalması, 1700 cm^{-1} 'de ester C=O ve 1630 cm^{-1} 'de ise amit C=O gerilme titreşim piklerinin görülmesi yapının oluştuğuna işaret eder. Süstitüsyon derecesinin bulunması için literatüre uygun olarak elementel analizde karbon yüzdesi esas alındı [23, 24]. Kito-O-K⁺ tuzunun klorasetil klorür ile reaksiyonu sonucu elde edilen Kito-klorasetat mol olarak yüzde süstitüsyonu 46.67 olarak bulundu.

Yine kito-klorasetat başlatıcısının ATRP yöntemiyle aynı şartlarda bazı vinil monomerlerle aşılması sonucu elde edilen aşı kopolimerlerin IR spektrumlarında; 1630 cm^{-1} 'deki amit C=O gerilme pikleri kito-g-MAM'i karakterize etmektedir. 1650 cm^{-1} 'deki amit C=O gerilme piki kito-g-DAAM için, 3050 cm^{-1} 'deki aromatik C=C gerilme piki ise kito-g-NFAA için karakteristik piklerdir. Kito-g-HEMA'nın IR spektrumunda 1780 cm^{-1} 'deki ester C=O piki aşılarmaya delil olarak gösterilebilir [43].

Elementel analiz sonuçlarına göre aşı kopolimerlerinde monomerlerin ağırlık fonksiyonları (x) ve başlatıcı birimi başına düşen monomer birimi (n) hesaplandı [41, 42]. Kito-g-MAM aşı kopolimerinde diğerlerine göre en yüksek olması MAM'ın diğer monomerlerden daha etkin olduğu düşüncesine götürebilir.

Ayrıca termal analiz sonuçlarında yapıların oluşumunu desteklemektedir. Her madde birbirinden farklı olarak kararlılık ve bozunma sıcaklığı değerlerine sahiptir. Termal analiz sonuçlarında modifiye kitosan ve aşılarmış kitosanın termal kararlılığı kitosana göre artmıştır.

Biyolojik Aktivite

Serbest radikaller son yıllarda üzerinde en çok durulan ve araştırılmaların yoğunlaştığı bir konudur. Serbest radikallerin hücrel kaynakları, rol oynadıkları reaksiyonlar ve serbest radikallere karşı hücrel savunma mekanizmalarının açıklığa kavuşması ile bu moleküllerin kanser, şeker, kalp hastalıkları gibi bir çok hastalıkla ilişkisi aydınlatılmaya çalışılmıştır [44].

Biyolojik sistemlerde hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak hem de yabancı maddelerin etkisiyle meydana gelen serbest radikaller hücre membranlarına zarar verirler ve değişik hastalıklarda etkilerini gösterirler. Organizmadaki bu bileşiklerin zararlı etkilerine karşı küçük molekül ağırlıklı radikal tutucuları ve enzimlerden oluşan savunma sistemleri bulunmaktadır. Serbest radikallerin reaktif yapıları ve çok kısa ömürlü olmaları doğrudan tayinlerini güçleştirmektedir. Bu nedenle serbest radikal reaksiyonlarının ürünleri ve savunma sistemlerinin incelenmesi pek çok araştırmacı tarafından tercih edilmektedir [45].

Serbest radikal oluşumundaki artış MDA düzeyi ve GSH-Px enzim aktivitesinde artmaya, E vitamini düzeyinde ise azalmaya neden olur [46,47,48].

Jeon ve diğ. [49], antioksidan özellik gösteren maddeleri (naringin ve probukol) diyet ile tavşanlara verdiklerinde bu maddelerin plazma MDA ve A vitamini düzeyini etkilemediğini, E vitamini düzeyini ise, kullanımını azaltarak yükselttiğini gözlemişlerdir.

Koryagin ve diğ., (2006), ratları kitosan ile oral yolla beslemişler ve serbest radikal plazma ürünlerinin miktarında azalma tespit etmişlerdir [50].

Chein ve diğ., (2007), yaptıkları araştırmada, kitosanın elma suyunun antioksidan aktivitesini artırdığını göstermişlerdir [51].

Sun ve diğ., (2007), kitosanın çeşitli oligomerlerini hazırlamışlar ve bu bileşiklerin antioksidan özelliklerini incelemişlerdir [52].

Bu araştırma da, kitosan ve kitosan aşısı kopolimerlerin DPPH indirgeme metoduyla serbest radikal temizleme özelliği incelendi. Antioksidan maddelerin antioksidan özelliklerinden bir tanesi de, ortamda oluşan radikalleri süpürmeleridir. Birçok antioksidan aynı zamanda anti-radikaldir. Bu antioksidanlar radikallerin eşleşmemiş elektronlarını eşleyerek onları etkisiz hale getirirler. Bileşiklerimizin anti-radikal özelliklerinin olup olmadığını anlamak için, 517 nm’de maksimum absorbans

veren DPPH radikali kullanılmıştır. DPPH konsantrasyonu azaldıkça absorbans da azalmaktadır. Bu sebeple antioksidan maddeler, 517 nm’de DPPH absorbansında azalmaya sebep olurlar. Tablo 3.3’de görüldüğü gibi, bu deneyler sonucunda bileşikler radikal temizleme özelliği göstermediğinden antioksidan aktiviteye sahip olmadıkları söylenebilir.

Kitosan ve kitosan aşı kopolimerlerin Deoksiriboz degradasyonu ile oluşan Hidroksil radikallerinin yakalanması esasına dayalı olarak ortamda oluşan MDA düzeylerinin ölçülmesi ile belirlenen aktivite için, kontrol grubu ile karşılaştırılmalarında belirli bir etkiye sahip oldukları görülmüştür. Kontrol grubu ile bileşiklerinin kıyaslamalarında MDA düzeylerinde istatistiksel farklılıklar gözlemlendi. Tablo 3.4’e bakıldığında bileşiklerin MDA düzeylerinin kontrolden yüksek çıktığı görülmektedir. Bu sonuç kullanılmış olan test maddelerinin lipid peroksidasyonunu artırarak hasar oluşumuna sebep olduğunun göstergesi olabilir.

Yapılan bir çok araştırmada çeşitli molekül ağırlıklı kitosan ve yine kitosanın çeşitli bileşiklerinin antitümör özellikleri incelenmiş ve bazılarının oldukça etkili antitümör aktivite sergilediği gözlemlenmiştir [53,54,55,56].

Bu araştırmada aynı zamanda, L1210 uygulaması yapılan kitosan ve kitosan aşı kopolimerlerin süre ve doza bağımlı antitümör aktivitesinin ve antioksidan parametrelerin düzeyleri üzerinde olan etkilerinin kontrol grubu ile karşılaştırılmalarında bazı etkilere sahip oldukları görüldü. Bulgularımız bu çalışmalar ile uyum halindedir.

Tablo 3.5’e bakıldığında çalışmada kullanılan bütün maddelerin L 1210 hücre tipinde etkili bir antitümör aktiviteye sahip olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda 2,5 ve 5 mg’lık miktarlardaki test maddelerinin 24 ve 48 saatlik değerlerine bakıldığında kontrol grubu ve diğer gruplar arasında önemli ölçüde istatistiksel fark gözlemlendiği görülmektedir. İstatistiksel farklar göz önüne alındığında çalışmada kullanılan bütün maddelerin antitümör aktiviteye sahip olduğu söylenebilir.

Ayrıca sahip oldukları antitümör aktivite ve antioksidan testlere bakıldığında, maddelerin hücrelerin canlılık durumuna etkisi ile MDA düzeyleri arasında bir ilişki kurulabilir.

Sonuçlar toplu olarak değerlendirildiğinde tüm verilerin birbirini destekleyecek şekilde olduğu görülmektedir

Bileşiklerin, DPPH deneyinde radikal temizleme özelliğine sahip olmayışı ve deoksiriboz degradasyonu ile oluşan Hidroksil radikallerinin yakalanması esasına dayalı olarak ortamda oluşan MDA düzeylerinin artışı, maddelerin antitümör aktivitesinin oksidatif hasar oluşturan bir mekanizma ile sitotoksik etki sonucu olabileceği düşüncesine götürebilir.

Sonuç olarak; kitosan ve kitosan aşılı kopolimerlerin araştırılan özellikleri sayesinde literatür bilgisine katkıda bulunacağı kanısındayız.

5. KAYNAKLAR

- [1]. Keleş, H., 2000. Jelatin Üzerine Metil Metakrilatın KMnO_4 ve FeCl_3 Başlatıcılarıyla Aşı Kopolimerizasyonu, *Doktora Tezi*, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Ankara.
- [2]. Saçak, M., 2002, Polimer Kimyası, Gazi Kitapevi, Ankara.
- [3]. Matyjaszewski K., 1998. "Controlled radical polymerization", Ed., American Chemical Society: Washington.
- [4]. Percec V., Asgarzadeh FJ., 2001. "Metal-catalyzed living radical graft copolymerization of olefins initiated from the structural defects of poly(vinyl chloride)", *Polym. Sci. Part A: Polym. Chem*, **39**, 1120-1135.
- [5]. Wang, J.S., Matyjaszewski, K., J., 1995. Controlled/"living" radical polymerization. atom transfer radical polymerization in the presence of transition-metal complexes, *Am. Chem. Soc.*, **117**, 5614.
- [6]. Mardare D., Matyjaszewski, K., 1994. "Living radical polymerization of vinyl-acetate", *Macromolecules*, **27**, 645-649.
- [7]. Matyjaszewski K., Wei M., Xia J., Gaynor S.,G., 1998. "Atom transfer radical polymerization of styrene catalyzed by copper carboxylate complexes", *Macromol. Chem. Phys.*, **199**, 2289-2292.
- [8]. Kotani Y., Kamigaito M., Sawamoto M., 1998. "Living random copolymerization of styrene and methyl methacrylate with a Ru(II) complex and synthesis of ABC-Type "Block-Random" copolymers", *Macromolecules*, **31**, 5582- 5587.
- [9]. Wang X.,S., Luo N., Ying S.,K., 2000. "The synthesis of ABA block copolymers by means of 'living'/controlled radical polymerization using hydroxy-terminated oligomers as precursor", *Eur. Polym. J.*, **36**, 149-156.
- [10]. Wang X.,S., Luo N., Ying SK., 1999. "Controlled radical polymerization of methacrylates at ambient temperature and the synthesis of block copolymers containing methacrylates", *Polymer*, **40**, 4157-4161.
- [11]. Angot S., Murthy K.,S., Taton D., Ginanou Y., 1998. "Atom transfer radical polymerization of styrene using a novel octafunctional initiator:

Synthesis of well-defined polystyrene stars”, *Macromolecules*, **31**, 7218-7225.

- [12]. **Matyjaszewski, K.**, 1999, Transition Metal Catalysis in Controlled Radical Polymerization: Atom Transfer Radical Polymerization *Chem. Eur. J.*, **5** (11), 3095-3102.
- [13]. **Kirk O.**, 1967, Pectic Substances, *Encyclopedia of Chemical Technology*, **14**, 636 – 651.
- [14]. **French, D.**, 1984. Organization of starch granules, In starch: Chemistry and Technology, Whistler, R.L. ; Bemiller, J.N. ; Paschall, E.F. ; Eds. ; Academic Press: London, 183 – 247.
- [15]. **Zobel, H.F.**, 1988, “Molecules to granules: a comprehensive starch review, *Starch/Starke*, **40** (2), 44 – 50.
- [16]. **Kumar, M.,N.,V.,R.**, 2000, “A review of chitin and chitosan applications, *React. Funct. Polym.*, **46** : 1 – 27.
- [17]. **Guang, W.Y.**, 2002, The Effect of Chitosan and Its Derivatives on the Dyeability of Silk, Ph.D. Thesis, Hong Kong Polytechnic University.
- [18]. **Sugimoto, M., Morimoto, M., Sashiwa, H., Saimoto H., Shigemasa Y.**, 1998. Preparation and characterization of water-soluble chitin and chitosan derivatives, *Carbohydrate Polymers*, **36**(1), 49-59.
- [19]. **Muzzarelli, R.,A.,A.**, 1997. Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. *Cell Molecular and Life Science*, **53**(1),131–140.
- [20]. **Xie, W., Xu, P.,X., Liu, Q., Xue, J.**, 2002. Graft-copolymerization of methylacrylic acid onto hydroxypropyl chitosan. *Polymer Bulletin*, **49**(1), 47–54.
- [21]. **Demir A., Seventekin N.**, 2009. Kitin, Kitosan ve Genel Kullanım Alanları, *Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi*, **3**(2), (92-103)
- [22]. **Montazer, M., Afjeh, G.**, 2007. Simultaneous X-Linking and Antimicrobial Finishing of Cotton Fabric, *Journal of Applied Polymer Science*, **103**, 178-185.
- [23]. **Berger, J., Reist, M., Mayer, J.M., Fel, O., Peppas, N.A., Gurny, R.**, 2004, Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked

- chitosan hydrogels for biomedical applications, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **57**, 19–34
- [24]. **Queen, H.,A.**, 2006. Electrospinning Chitosan-based Nanofibers for Biomedical Applications, M.Sc. Thesis, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA
- [25]. **Sahin, U.,K., Gürsoy N.,Ç.**, 2005, Tekstil endüstrisinde kitin ve kitosan uygulamaları, *Tekstil Teknik*, **Ağustos**, 176, 245
- [26]. **Xiao, B., Wan, Y., Zhao, M., Liu, Y., Zhang, S.**, 2011. Preparation and characterization of antimicrobial chitosan-N-arginine with different degrees of substitution, *Carbohydrate Polymers*, **83**, 144–150.
- [27]. **Wanga, W., Luo, C., Shao, S., Zhou, S.**, 2010. Chitosan hollow nanospheres fabricated from biodegradable poly-D,L-lactide-poly(ethylene glycol) nanoparticle templates, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **76**, 376–383.
- [28]. **Sajomsang, W.**, 2010. Synthetic methods and applications of chitosan containing pyridylmethyl moiety and its quaternized derivatives: A review *Carbohydrate Polymers*, **80**, 631–647
- [29]. **Liu, P., Su, Z.**, 2006. Surface-initiated atom transfer radical polymerization (SI-ATRP) of styrene from chitosan particles, *Materials Letters*, **60**, 1137–1139.
- [30]. **Hua, Y., Jianga, X., Dinga, Y., Gea, H., Yuan, Y., Yanga, C.**, 2002. Synthesis and characterization of chitosan–poly(acrylic acid), *Nanoparticles Biomaterials*, **23**, 3193–3201.
- [31]. **Liang, J., Li, F., Fanga, Y., Yanga, W., Ana, X., Zhaoa, L., Xina, Z., Caoa, L., Hub, Q.**, 2011. Synthesis, characterization and cytotoxicity studies of chitosan-coated tea polyphenols nanoparticles, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **82**, 297–301
- [32]. **Magdy, W.,S., Nadia, A.,M., Riham, R.,M., Neveen, M.,K., Soliman, M.,A.**, 2010. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of poly (N-vinyl imidazole) grafted carboxymethyl chitosan, *Carbohydrate Polymers*, **79**, 998–1005

- [33]. **Lu, B., Wang, C.,F., Wu, D.,Q., Li, C., Zhang, X.,Z., Zhuo, R.,X.,** 2009. Chitosan based oligoamine polymers: Synthesis, characterization, and gene delivery, *Journal of Controlled Release*, **137**, 54–62.
- [34]. **Pasanphan, W., Chirachanchai, S.,** 2008. Conjugation of gallic acid onto chitosan: An approach for green and water-based antioxidant, *Carbohydrate Polymers*, **72**, 169–177.
- [35]. **Hu, S.,G., Jou, C.,H., Yang, M.,C.,** 2004. Biocompatibility and antibacterial activity of chitosan and collagen immobilized poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid, *Carbohydrate Polymers*, **58**. 173–179.
- [36]. **Liang, J., Li, F., Fanga, Y., Yanga, W., Ana, X., Zhaoa, L., Xina, Z., Caoa, L., Hub Q.,** 2011.Synthesis, characterization and cytotoxicity studies of chitosan-coated tea polyphenols nanoparticles, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **82**, 297–301.
- [37]. **Ilgaz, S., Duran, D., Mecit, D., Basal, G., Gülümser, T., Tarakçıoğlu, I.,** 2007, Medikal Tekstiller, *Tekstil Teknik Dergisi*, **Şubat**, 138-162.
- [38]. **Kumamoto, T., Toyooka, K., Nishida, M., Kuwahara, H., Yashimura, Y., Kawada, J., Kubota, S.,** 1990. Effect of 2,4-Dihydro-3H-1,2,4-Triazole-3 –Thiones and Thiosemicarbazones on Iodide Uptake by The Mouse Thyroid , The Relationship Between Their Structure and Antithyroid Activity, *Chem. Pharm. Bull.*, **38(9)**, 2595-2596
- [39]. **Liyana-Pathirana, C., Shahidi,F.,** 2005. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry*, **93**, 47-56.
- [40]. **Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C.,** 1987. The Deoxyribose Method: a Sample Test Tube Assay for Determination of Rate Constant for Reaction of Hydroxyl Radicals, *Anal. Biochem.*, **165**, 215-219.
- [41]. **Akelah, A., Sherrington, D.C.,** 1981, Synthesis of some vinyl derivatives of cellulose and their grafting copolymerization with styrene, *Journal of Applied Polymer Science*, **26**, 3377-3384.
- [42]. **Bojanic, V., Jovanovic, S., Tabakovic, R., and Tabakovic, I.,** 1996, Synthesis and electrochemistry of grafted copolymers of cellulose with 4-

- vinylpyridine, 1-vinylimidazole, 1-vinyl-2-pyrrolidinone, and 9-vinylcarbazole, *Journal of Applied Polymer Science*, **60**, 1719-1725.
- [43]. **Coşkun, M., Temüz, M.M.**, 2005. Graft copolymerization of poly(styrene-co-p-chloromethylstyrene) with methyl methacrylate and acryloylmorpholine by atom transfer radical polymerization: Graft copolymer characterization and monomer reactivity ratios, *Journal of Polymer Science, Part A : Polymer Chemistry*, **43**, 3771-3777.
- [44]. **Sudha, K., Ashalatha, V.R., Anjali, R.**, 2001. Oxidative Stress antioxidants in Epilepsy, *Clinica Chimica Acta.*, **303**;19-24.
- [45]. **Matez, J.M., Gomez, P.C., Casto, N.I.**, 1999. Antioxidant Enzymes and Human Diseases, *Clinical Biochemistry.*, **32**, 595-603.
- [46]. **Diplock, A.T.**, 1991. Antioxidant Nutrients and Disease Prevention: An Overview, *Am. J. Chim Nutr.*, **53**, 1895-1935.
- [47]. **Bott, A.B., Green, M.A.**, 1991. Effect of Glutathione Depletion on The Biodistribution of Cu (PTSM) in Rats, *Int. J. Rad. Appl. Inst. B.*, **18**, 865-9.
- [48]. **Novelli, E.L., Silva, A.M., Monteiro, J.P., Sacomani, L.B., Novelli, J.L.**, 1997. Free Radical Production by Azomethine H : Effects on Pancreatic and Hepatic Tissues, *Free Radic. Res.*, **26 (4)**, 319-324.
- [49]. **Jeon, S.M., Bok, S.H., Jang, M.K., Kim, Y.H., Nam, K.T., Jeong, T.S., Park, Y.B., Choi, M.S.**, 2002. Comparison of Antioxidant Effects of Naringin and Probucol in Cholesterol-Fed Rabbits, *Clin. Chimica Acta*, **317**. 181-190.
- [50]. **Koyyagin, A.S., Erofeeva, E.A., Yakimovich, N.O., Aleksandrova, E.A., Smirnova, L.A., Mal'kov, A.V.**, 2006. Analysis of Antioxidant Properties of Chitosan and Its Oligomers, *Pharmacology and Toxicology*, **142(4)**, 461.
- [51]. **Chien, P.J., Sheu, F., Huang, W.T., Su, M.S.**, 2007. Effect of molecular weight of chitosans on their antioxidative activities in apple juice, *Food Chemistry*, **102**, 1192-1198.
- [52]. **Sun, T., Zhou, D., Xie, J., Mao, F.**, 2007. Preparation of chitosan oligomers and their antioxidant activity, *Eur Food Res Techno*, **225**, 451-456.

- [53]. **Maeda, Y., Kimura, Y.,** 2004. Antitumor Effects of Various Low-Molecular-Weight Chitosans Are Due to Increased Natural Killer Activity of Intestinal Intraepithelial Lymphocytes in Sarcoma 180-Bearing Mice. *American Society for Nutritional Sciences.* **945.** 945–950
- [54]. **Liu, R., X., Zhou S., ve diğ.,** 2010. Antitumor activity of N-trimethyl chitosan-encapsulated camptothecin in a mouse melanoma model, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research,* **29,** 76
- [55]. **Wang, R.,M.,, He, N.,P.,, Song, P.,F.,, He, Y.,F., Ding, L., Lei Z.,** 2009. Preparation of low-molecular-weight chitosan derivative zinc complexes and their effect on the growth of liver cancer cells in vitro, *Pure Appl. Chem.,* **81** (12), 2397–2405.
- [56]. **Qin, C., Dua, Y., Xiao, L.,, Li, Z., Gao, X.,** 2002. Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity, *International Journal of Biological Macromolecules,* **31,** 111-117.

ÖZGEÇMİŞ

1982 Elazığ doğumluyum. İlk, orta ve lise öğrenimini Elazığ'da tamamladım. 1999 yılında başladığım Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü 2003 yılında bitirdim. 2009 yılında Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fizikokimya Anabilim Dalında Tezli Yüksek Lisans öğrenimine başladım ve halen bu öğrenimime devam etmekteyim.