



# **Ultrason Kontrast Ajanlarının Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu**

**Proje No: 109M494**

Yard.Doç.Dr. Sevgi KILIÇ ÖZDEMİR  
Doç.Dr. Ekrem ÖZDEMİR  
Prof. Dr. Salih OKUR

ARALIK 2012  
İZMİR

## Önsöz

Ultrason kontrast ajanlarının hastalık teşhis ve tedavisinde kullanımına yönelik çalışmaların sayısı literatürde günden güne artmaktadır. Bu, büyük bir pazar potansiyelinin olduğunu göstermektedir. Ülkemizde ultrason kontrast ajanları, bilgimiz dahilinde, ne laboratuvar ortamında, ne de ticari olarak henüz üretilmemektedir. Türkiye’de ultrason kontrast ajanları ile yapılmış yok denecek kadar az sayıda klinik çalışmaya rastlamaktayız. Yapılan çalışmalarda ise daha çok, Avrupa’da geliştirilen Levovist®, Echovist® gibi mikroköpükçükler kullanılmıştır. Oysa, özellikle ABD’de olmak üzere ve çoğunlukla da hedeflendirilmiş görüntülemeye yönelik, sayısız klinik çalışma bulunmaktadır. Bunun sebebi, üretici firmaların daha çok ABD ve Avrupa ülkelerinde bulunması ve ticari olarak kullanımlarından önce ilgili Gıda ve İlaç Dairesince onay almak için üretici firmaların mikroköpükçüklerin *in-vivo* davranışları ve farmakokinetik testler için pek çok sayıdaki klinik merkezlere ve hastanelere başvurmasıdır. Ancak bu testler yapılırken ürünün formülasyonu firma tarafından gizli tutulmaktadır. Türkiye’de üretimi olmadığı ve çok pahalı olduklarından (örneğin Definity®- \$100-150 civarındadır) tıpta klinik araştırmalarda da kullanılamamaktadır.

Türkiye Bilimsel Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenen bu proje ile, ultrason kontrast ajanlarının monotabaka yapısı analiz edilmiş, daha kararlı yapıda ve fiyatı düşürülmüş mikroköpükçükler üretilmiştir.

Bu projenin gerçekleşmesinde mali destek veren TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU (TUBİTAK)’a, deneylerin gerçekleştirildiği İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ’ne, projenin gerçekleştirilmesinde emeği geçen Yüksek Lisans öğrencileri, Elif Şeniz BÖLÜKÇÜ, Emine Aysu SAĞDİÇ, ve Derya KÖSE’ye teşekkür ederiz.

## İçindekiler

Önsöz .....	i
Tablo Listesi.....	iv
Şekil Listesi.....	v
Özet .....	xvii
Abstract.....	xviii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Ultrason Kontrast Ajanları: Mikroköpükçükler.....	5
2.2. Ultrason Kontrast Ajanları ile İlgili Mevcut Durum.....	7
2.3. Langmuir-Blodgett Monotabakası .....	12
2.4. LB Filmlerinin Katı Yüzeyle Aktarılması.....	15
2.5. LB Monotabakalarının Brewster Açılı Mikroskobu (BAM) ile Karakterizasyonu: ..	16
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER .....	18
3.1. Malzemeler .....	18
3.2. Monotabakanın Moleküler Seviyede Tasarımı ve Karakterizasyonu:.....	18
3.3. Langmuir-Blodgett İzotermelinin Analizi .....	21
3.4. Mikroköpükçüklerin Hazırlanışı ve Karakterizasyonu .....	22
3.5. Mikroköpükçüklerin Statik Stabilitelerinin İncelenmesi .....	23
3.6. Mikroköpükçüklerin Dinamik Stabilitelerinin İncelenmesi .....	23
3.7. Mikroköpükçüklerin Bozunma Davranışının İncelenmesi .....	24
3.8. Hedeflenebilir Mikroköpükçüklerin Hazırlanması ve İn-Vitro Deneyler .....	25
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	27
4.1. Monotabakanın Moleküler Düzeyde Tasarımı ve 2D Karakterizasyonu .....	27
4.1.1. DSPC:PEG40St Karışımları: .....	27
4.1.2. Artan Hidrofobik Etkileşimler: DSPC/Lipopolimer Karışımları: .....	55

4.1.3.	DSPC:PEG40St ve Hidrojen Bağı Yapabilen Lipid Karışımları:.....	86
4.1.4.	DSPC:PEG40St ve İyonik Bağ Yapabilen Lipid Karışımları:.....	157
4.2.	Mikroköpükçüklerin Üretimi ve Karakterizasyonu .....	183
4.2.1.	Sıcaklığın Mikroköpükçük Stabilitesine Olan Etkisi:.....	184
4.2.2.	PEG40St Miktarının Mikroköpükçük Stabilitesine Olan Etkisi:.....	186
4.2.3.	Saklama Çözeltisinin Mikroköpükçük Stabilitesine Olan Etkisi: .....	194
4.2.4.	Emülsifier Türünün Mikroköpükçük Stabilitesine Olan Etkisi: .....	198
4.2.5.	İlave Bir Fosfolipidin Mikroköpükçük Stabilitesine Olan Etkisi: .....	202
4.2.5.1.	Hidrojen Bağı Yapabilen Fosfolipid Etkisi: .....	202
4.2.5.2.	İyonik Bağ Yapabilen Fosfolipidlerin Mikroköpükçük Stabilitesine Etkisi .....	214
4.2.6.	Farklı Gaz Kullanımının Mikroköpükçük Stabilitesine Olan Etkisi:.....	222
4.2.7.	Mikroköpükçüklerin Dinamik Stabilitesi .....	225
4.2.8.	Mikroköpükçükler'in Çözünme Davranışının İncelenmesi .....	238
4.3.	Hedeflendirilebilir Mikroköpükçüklerin Üretilmesi ve Karakterizasyonu.....	244
5.	SONUÇLAR.....	258
	KAYNAKLAR.....	261

## Tablo Listesi

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
<b>Tablo 1.</b> Mikroköpükçük üretiminde kullanılan bazı gazların fiziksel özellikleri (Riess ve ark., 2003).....	7
<b>Tablo 2.</b> Bu Çalışmada Kullanılan Bazı Malzemelerin Kimyasal Yapıları .....	19
<b>Tablo 3.</b> Kullanılan hacimsel debilerde elde edilen kayma gerilimi değerleri (D=1.5 mm için ).....	227

## Şekil Listesi

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1. Hava-Su arayüzeyinde monotabaka oluşumu .....	12
Şekil 2. Langmuir-Blodgett teknesi .....	13
Şekil 3. Farklı faz davranışlarını gösteren $\pi$ -A izotermi.....	14
Şekil 4. A) Monotabakanın katı yüzeye kaplanması B) Farklı tiplerde kaplanan LB filmleri.....	16
Şekil 5. Hava-su arayüzeyindeki yansımanın ince film varlığında değişimi .....	16
Şekil 6. Brewster Açısı Mikroskobu (BAM) .....	17
Şekil 7. Mikroköpükçüklerin kayma gerilimi altında dinamik stabilite test edilmesi için tasarlanan deney düzeneği. (1) Sabit sıcaklık su banyosu, (2) peristaltik pompa, (3) şeffaf polietilen boru.....	24
Şekil 8. Mikroköpükçüklerin boyutlarının sabit sıcaklıkta optik mikroskop altında izlenmesi için tasarlanan deney düzeneği.....	25
Şekil 9. Hedeflendirilmiş mikroköpükçüklerin ligand ile spesifik olarak bağlandığının testi için kullanılan akış kanalı .....	26
Şekil 10. DSPC:PEG40St karışımlarının Yüzey Basıncı-Ortalama Moleküler Alan ( $\pi$ -A) izotermi .....	28
Şekil 11. Farklı mol oranlarında PEG40St içeren DSPC:PEG40St karışımlarının ortalama moleküler alan değerleri ( $A_{12}$ ).....	30
Şekil 12. Farklı basınçlarda DSPC:PEG40St karışımların artan Gibbs enerjileri .....	31
Şekil 13. DSPC:PEG40St karışımların yüzey basıncına karşı $C_s^{-1}$ (mN/m) değerleri .....	32
Şekil 14. Saf DSPC ve PEG40St'nin sıkıştırma-genişletme döngü izotermi .....	33
Şekil 15. DSPC:PEG40St karışımların sıkıştırma-genişletme döngü izotermi .....	35
Şekil 16. 9:1 DSPC:PEG40St karışımının 30 mN/m'ye kadar yapılan sıkıştırma-genişletme döngülerinin BAM görüntüleri .....	36
Şekil 17. 5:5 DSPC:PEG40St karışımının 30 mN/m'ye kadar yapılan sıkıştırma-genişletme döngülerinin BAM görüntüleri .....	37
Şekil 18. 9:1 DSPC:PEG40St karışımının 50 mN/m'ye kadar yapılan sıkıştırma-genişletme döngülerinin BAM görüntüleri .....	37
Şekil 19. 5:5 DSPC:PEG40St karışımının 50 mN/m'ye kadar yapılan sıkıştırma-genişletme döngülerinin BAM görüntüleri .....	38
Şekil 20. Saf DSPC'nin Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri .....	38
Şekil 21. Saf PEG40St'nin Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri .....	39
Şekil 22. 9:1 DSPC:PEG40St karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri .....	42
Şekil 23. 8:2 DSPC:PEG40St karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri .....	43
Şekil 24. 7:3 DSPC:PEG40St karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri .....	44

<b>Şekil 25.</b> 6:4 DSPC:PEG40St karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri .....	45
<b>Şekil 26.</b> 5:5 DSPC:PEG40St karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri .....	46
<b>Şekil 27.</b> DSPC'nin 30 mN/m yüzey basıncında kaplanmış filminin AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili.....	49
<b>Şekil 28.</b> DSPC'nin 40 mN/m yüzey basıncında kaplanmış filminin AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili.....	49
<b>Şekil 29.</b> PEG40St'nin 30 mN/m yüzey basıncında kaplanmış filminin AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili.....	50
<b>Şekil 30.</b> 9:1 DSPC:PEG40St karışımının 30 mN/m yüzey basıncında kaplanmış filminin AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili.....	50
<b>Şekil 31.</b> 9:1 DSPC:PEG40St karışımının 40 mN/m yüzey basıncında kaplanmış filminin AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili.....	51
<b>Şekil 32.</b> 8:2 DSPC:PEG40St karışımının 30 mN/m yüzey basıncında kaplanmış filminin AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili.....	51
<b>Şekil 33.</b> 8:2 DSPC:PEG40St karışımının 40 mN/m yüzey basıncında kaplanmış filminin AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili.....	52
<b>Şekil 34.</b> 7:3 DSPC:PEG40St karışımının 30 mN/m yüzey basıncında kaplanmış filminin AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili.....	52
<b>Şekil 35.</b> 7:3 DSPC:PEG40St karışımının 40 mN/m yüzey basıncında kaplanmış filminin AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili.....	53
<b>Şekil 36.</b> 6:4 DSPC:PEG40St karışımının 30 mN/m yüzey basıncında kaplanmış filminin AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili.....	53
<b>Şekil 37.</b> 6:4 DSPC:PEG40St karışımının 40 mN/m yüzey basıncında kaplanmış filminin AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili.....	54
<b>Şekil 38.</b> 5:5 DSPC:PEG40St karışımının 30 mN/m yüzey basıncında kaplanmış filminin AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili.....	54
<b>Şekil 39.</b> 5:5 DSPC:PEG40St karışımının 40 mN/m yüzey basıncında kaplanmış filminin AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili.....	55
<b>Şekil 40.</b> DSPC:DSPE-PEG2000 karışımlarının Yüzey Basıncı-Ortalama moleküler alan ( $\pi$ - A) izotermi.....	58
<b>Şekil 41.</b> Farklı mol oranlarında DSPE-PEG2000 içeren DSPC:DSPE-PEG2000 karışımlarının ortalama moleküler alan değerleri ( $A_{12}$ ).....	59
<b>Şekil 42.</b> Farklı basınçlarda DSPC:DSPE-PEG2000 karışımlarının artan Gibbs enerjileri .....	59
<b>Şekil 43.</b> DSPC:DSPE-PEG2000 karışımlarının yüzey basıncına karşı $C_s^{-1}$ (mN/m) değerleri .....	60
<b>Şekil 44.</b> Saf bileşenlerin ve DSPC:DSPE-PEG2000 karışımlarının sıkıştırma-genişletme döngü izotermi .....	61
<b>Şekil 45.</b> 9:1 DSPC:DSPE-PEG2000 karışımının sıkıştırma-genişletme döngülerinin BAM görüntüleri .....	62
<b>Şekil 46.</b> 5:5 DSPC:DSPE-PEG2000 karışımının sıkıştırma-genişletme döngülerinin BAM görüntüleri .....	62

<b>Şekil 47.</b> Saf DSPE-PEG2000'nin Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri .....	64
<b>Şekil 48.</b> 9:1 DSPC:DSPE-PEG2000 karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri .....	65
<b>Şekil 49.</b> 5:5 DSPC:DSPE-PEG2000 karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri .....	66
<b>Şekil 50.</b> DSPC:DSPE-PEG1000 karışımlarının Yüzey Basıncı-Ortalama moleküler alan ( $\pi$ -A) izotermi.....	67
<b>Şekil 51.</b> Farklı mol oranlarında DSPE-PEG1000 içeren DSPC:DSPE-PEG2000 karışımlarının ortalama moleküler alan değerleri ( $A_{12}$ ).....	68
<b>Şekil 52.</b> Farklı basınçlarda DSPC:DSPE-PEG1000 karışımların artan Gibbs enerjileri .....	69
<b>Şekil 53.</b> DSPC:DSPE-PEG1000 karışımların yüzey basıncına karşı $C_s^{-1}$ (mN/m) değerleri .....	70
<b>Şekil 54.</b> Saf bileşenlerin ve DSPC:DSPE-PEG1000 karışımlarının sıkıştırma-genişletme döngü izotermi .....	71
<b>Şekil 55.</b> 9:1 DSPC:DSPE-PEG1000 karışımının sıkıştırma-genişletme döngülerinin BAM görüntüleri .....	71
<b>Şekil 56.</b> 5:5 DSPC:DSPE-PEG1000 karışımının sıkıştırma-genişletme döngülerinin BAM görüntüleri .....	72
<b>Şekil 57.</b> Saf DSPE-PEG1000'nin Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri .....	73
<b>Şekil 58.</b> 9:1 DSPC:DSPE-PEG1000 karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri .....	74
<b>Şekil 59.</b> 5:5 DSPC:DSPE-PEG1000 karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri .....	75
<b>Şekil 60.</b> DSPC:DSPE-PEG350 karışımlarının Yüzey Basıncı-Ortalama moleküler alan ( $\pi$ -A) izotermi .....	77
<b>Şekil 61.</b> Farklı mol oranlarında DSPE-PEG2000 içeren DSPC:DSPE-PEG350 karışımlarının ortalama moleküler alan değerleri ( $A_{12}$ ).....	77
<b>Şekil 62.</b> Farklı basınçlarda DSPC/ DSPE-PEG350 karışımların artan Gibbs enerjileri .....	78
<b>Şekil 63.</b> DSPC/ DSPE-PEG350 karışımların yüzey basıncına karşı $C_s^{-1}$ (mN/m) değerleri .....	78
<b>Şekil 64.</b> Saf bileşenlerin ve DSPC/ DSPE-PEG350 karışımlarının sıkıştırma-genişletme döngü izotermi .....	79
<b>Şekil 65.</b> 9:1 DSPC:DSPE-PEG350 karışımının sıkıştırma-genişletme döngülerinin BAM görüntüleri .....	80
<b>Şekil 66.</b> 5:5 DSPC:DSPE-PEG350 karışımının sıkıştırma-genişletme döngülerinin BAM görüntüleri .....	80
<b>Şekil 67.</b> Saf DSPE-PEG350'nin Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri .....	83
<b>Şekil 68.</b> 9:1 DSPC:DSPE-PEG350 karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri .....	84
<b>Şekil 69.</b> 5:5 DSPC:DSPE-PEG350 karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri .....	85
<b>Şekil 70.</b> 7:2:1, 7:1,5:1,5, 7:1:2 DSPC:PEG40St:DSPG karışımlarının Yüzey Basıncı-Ortalama moleküler alan ( $\pi$ -A) izotermi .....	88



<b>Şekil 71.</b> Farklı basınçlarda 7:2:1, 7:1,5:1,5, 7:1:2 DSPC:PEG40St:DSPG karışımların artan Gibbs enerjileri.....	89
<b>Şekil 72.</b> 7:2:1, 7:1,5:1,5, 7:1:2 DSPC:PEG40St:DSPG karışımların yüzey basıncına karşı $C_s^-$ <sup>1</sup> (mN/m) değerleri.....	90
<b>Şekil 73.</b> Saf DSPG'nin Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri.....	91
<b>Şekil 74.</b> 7:2:1 DSPC:PEG40St:DSPG karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri.....	92
<b>Şekil 75.</b> 7:1,5:1,5 DSPC:PEG40St:DSPG karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri.....	93
<b>Şekil 76.</b> 7:1:2 DSPC:PEG40St:DSPG karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri.....	94
<b>Şekil 77.</b> DSPG'nin 30 mN/m'deki AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili.....	95
<b>Şekil 78.</b> DSPG'nin 40 mN/m'deki AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili.....	96
<b>Şekil 79.</b> 7:2:1 DSPC:PEG40St:DSPG karışımının 30 mN/m'deki AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili.....	96
<b>Şekil 80.</b> 7:2:1 DSPC:PEG40St:DSPG karışımının 40 mN/m'deki AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili.....	97
<b>Şekil 81.</b> 7:1,5:1,5 DSPC:PEG40St:DSPG karışımının 30 mN/m'deki AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili.....	97
<b>Şekil 82.</b> 7:1,5:1,5 DSPC:PEG40St:DSPG karışımının 40 mN/m'deki AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili.....	98
<b>Şekil 83.</b> 7:1:2 DSPC:PEG40St:DSPG karışımının 30 mN/m'deki AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili.....	98
<b>Şekil 84.</b> 7:1:2 DSPC:PEG40St:DSPG karışımının 40 mN/m'deki AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili.....	99
<b>Şekil 85.</b> 4:5:1, 2:5:3, 0:5:5 DSPC:PEG40St:DSPG karışımlarının Yüzey Basıncı-Ortalama moleküler alan ( $\pi$ -A) izotermleri.....	100
<b>Şekil 86.</b> Farklı basınçlarda 4:5:1, 2:5:3, 0:5:5 DSPC:PEG40St:DSPG karışımların artan Gibbs enerjileri.....	100
<b>Şekil 87.</b> 4:5:1, 2:5:3, 0:5:5 DSPC:PEG40St:DSPG karışımların yüzey basıncına karşı $C_s^-$ <sup>1</sup> (mN/m) değerleri.....	102
<b>Şekil 88.</b> 4:5:1 DSPC:PEG40St:DSPG karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri.....	103
<b>Şekil 89.</b> 2:5:3 DSPC:PEG40St:DSPG karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri.....	104
<b>Şekil 90.</b> 0:5:5 DSPC:PEG40St:DSPG karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri.....	105
<b>Şekil 91.</b> 7:2:1, 7:1,5:1,5, 7:1:2 DSPC:PEG40St:DSPE karışımlarının Yüzey Basıncı-Ortalama moleküler alan ( $\pi$ -A) izotermleri.....	107

<b>Şekil 92.</b> Farklı basınçlarda 7:2:1, 7:1,5:1,5, 7:1:2 DSPC:PEG40St:DSPE karışımların artan Gibbs enerjileri.....	108
<b>Şekil 93.</b> 7:2:1, 7:1,5:1,5, 7:1:2 DSPC:PEG40St:DSPE karışımların yüzey basıncına karşı $C_s^{-1}$ (mN/m) değerleri .....	109
<b>Şekil 94.</b> Saf DSPE'nin Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri .....	110
<b>Şekil 95.</b> 7:2:1 DSPC:PEG40St:DSPE karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri .....	111
<b>Şekil 96.</b> 7:1,5:1,5 DSPC:PEG40St:DSPE karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri .....	112
<b>Şekil 97.</b> 7:1:2 DSPC:PEG40St:DSPE karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri .....	113
<b>Şekil 98.</b> 4:5:1, 2:5:3, 0:5:5 DSPC:PEG40St:DSPE karışımlarının Yüzey Basıncı-Ortalama moleküler alan ( $\pi$ -A) izotermi .....	115
<b>Şekil 99.</b> Farklı basınçlarda 4:5:1, 2:5:3, 0:5:5 DSPC:PEG40St:DSPE karışımların artan Gibbs enerjileri.....	116
<b>Şekil 100.</b> 4:5:1, 2:5:3, 0:5:5 DSPC:PEG40St:DSPE karışımların yüzey basıncına karşı $C_s^{-1}$ (mN/m) değerleri.....	116
<b>Şekil 101.</b> 4:5:1 DSPC:PEG40St:DSPE karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri .....	117
<b>Şekil 102.</b> 2:5:3 DSPC:PEG40St:DSPE karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri .....	118
<b>Şekil 103.</b> 0:5:5 DSPC:PEG40St:DSPE karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri .....	119
<b>Şekil 104.</b> 7:2:1, 7:1,5:1,5, 7:1:2 DSPC:PEG40St:DSPA karışımlarının Yüzey Basıncı-Ortalama moleküler alan ( $\pi$ -A) izotermi .....	121
<b>Şekil 105.</b> Farklı basınçlarda 7:2:1, 7:1,5:1,5, 7:1:2 DSPC:PEG40St:DSPA karışımların artan Gibbs enerjileri.....	123
<b>Şekil 106.</b> 7:2:1, 7:1,5:1,5, 7:1:2 DSPC:PEG40St:DSPA karışımların yüzey basıncına karşı $C_s^{-1}$ (mN/m) değerleri .....	123
<b>Şekil 107.</b> Saf DSPA'nın Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri .....	124
<b>Şekil 108.</b> 7:2:1 DSPC:PEG40St:DSPA karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri .....	125
<b>Şekil 109.</b> 7:1,5:1,5 DSPC:PEG40St:DSPA karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri .....	126
<b>Şekil 110.</b> 7:1:2 DSPC:PEG40St:DSPA karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri .....	127
<b>Şekil 111.</b> 4:5:1, 2:5:3, 0:5:5 DSPC:PEG40St:DSPA karışımlarının Yüzey Basıncı-Ortalama moleküler alan ( $\pi$ -A) izotermi .....	128
<b>Şekil 112.</b> Farklı basınçlarda 4:5:1, 2:5:3, 0:5:5 DSPC:PEG40St:DSPA karışımların artan Gibbs enerjileri.....	130

<b>Şekil 113.</b> 4:5:1, 2:5:3, 0:5:5 DSPC:PEG40St:DSPA karışımlarının yüzey basıncına karşı $C_s^-$ <sup>1</sup> (mN/m) değerleri.....	130
<b>Şekil 114.</b> 4:5:1 DSPC:PEG40St:DSPA karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri .....	131
<b>Şekil 115.</b> 2:5:3 DSPC:PEG40St:DSPA karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri .....	132
<b>Şekil 116.</b> 0:5:5 DSPC:PEG40St:DSPA karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri .....	133
<b>Şekil 117.</b> Saf bileşenlerin ve 4:5:1, 2:5:3 ve 0:5:5 molar oranlarında DSPC:PEG40St:StGly karışımlarının yüzey basıncına karşılık ortalama moleküler alan izotermi.....	135
<b>Şekil 118.</b> Farklı yüzey basınçlarında DSPC:PEG40St:StGly karışımlarının artan Gibbs serbest enerjilerinin karşılaştırılması .....	136
<b>Şekil 119.</b> DSPC:PEG40St:StGly karışımlarının sıkıştırılabilirlik değerlerinin yüzey basıncıyla değişimi .....	138
<b>Şekil 120.</b> Stearil-gliserol molekülünün hava – su ara yüzeyindeki BAM görüntüleri .....	139
<b>Şekil 121.</b> 0:5:5 DSPC:PEG40St:StGly karışımının çevrim deneyi.....	140
<b>Şekil 122.</b> 0:5:5 DSPC:PEG40St:StGly Karışımının çevrim deneyinin BAM görüntüleri .....	141
<b>Şekil 123.</b> 2:5:3 DSPC:PEG40St:StGly karışımının hava- su ara yüzeyindeki BAM görüntüleri .....	142
<b>Şekil 124.</b> 4:5:1 DSPC:PEG40St:StGly karışımının hava – su ara yüzeyindeki BAM görüntüleri .....	143
<b>Şekil 125.</b> Saf bileşenlerin ve 5:4:1, 5:3:2 ve 5:2:3 molar oranlarında DSPC:PEG40St:StGly karışımlarının yüzey basıncına karşılık ortalama moleküler alan izotermi.....	144
<b>Şekil 126.</b> Farklı yüzey basınçlarında DSPC:PEG40St:StGly karışımlarının artan Gibbs serbest enerjilerinin karşılaştırılması .....	145
<b>Şekil 127.</b> DSPC:PEG40St:StGly karışımlarının sıkıştırılabilirlik değerlerinin yüzey basıncıyla değişimi .....	146
<b>Şekil 128.</b> 5:4:1 DSPC:PEG40St:StGly karışımının hava – su ara yüzeyindeki BAM görüntüleri .....	147
<b>Şekil 129.</b> 5:3:2 DSPC:PEG40St:StGly karışımının hava – su ara yüzeyindeki BAM görüntüleri .....	148
<b>Şekil 130.</b> DSPC:PEG40St:StGly 5:2:3 karışımının hava – su ara yüzeyindeki BAM görüntüleri .....	149
<b>Şekil 131.</b> Saf bileşenlerin ve 7:2:1, 7:1.5:1.5 ve 7:1:2 molar oranlarında DSPC:PEG40St:StGly karışımlarının yüzey basıncına karşılık ortalama moleküler alan izotermi .....	150
<b>Şekil 132.</b> Farklı yüzey basınçlarında DSPC:PEG40St:StGly karışımlarının artan Gibbs serbest enerjilerinin kıyaslanması .....	151
<b>Şekil 133.</b> DSPC:PEG40St:StGly karışımlarının sıkıştırılabilirlik değerlerinin yüzey basıncıyla değişimi .....	152

<b>Şekil 134.</b> 30 mN/m yüzey basıncında kaplanan saf StGly molekülünün 30x30 mikronluk alanda (a) topografi, (b)faz, (c) yükseklik profili ve 5x5 mikronluk alanda (d) topografi, (e)faz, (f) yükseklik profili .....	153
<b>Şekil 135.</b> 30 mN/m yüzey basıncında kaplanan DSPC:PEG40St:StGly'nin 7:2:1 karışımının 30x30 mikronluk alanda (a) topografi, (b)faz, (c) yükseklik profili ve 5x5 mikronluk alanda (d) topografi, (e)faz, (f) yükseklik profili .....	154
<b>Şekil 136.</b> 30mN/m yüzey basıncında kaplanan DSPC:PEG40St:StGly'nin 7:1.5:1.5 karışımının 30x30 mikronluk alanda (a) topografi, (b)faz, (c) yükseklik profili ve 5x5 mikronluk alanda (d) topografi, (e)faz, (f) yükseklik profili .....	155
<b>Şekil 137.</b> 30mN/m yüzey basıncında kaplanan DSPC:PEG40St:StGly'nin 7:1:2 karışımının 30x30 mikronluk alanda (a) topografi, (b)faz, (c) yükseklik profili ve 5x5 mikronluk alanda (d) topografi, (e)faz, (f) yükseklik profili .....	156
<b>Şekil 138.</b> Saf StNH <sub>2</sub> , DSPC, PEG40St ve DSPC:PEG40St:StNH <sub>2</sub> 'nin 7:2:1, 6:2:2, 5:2:3 ve 4:2:4 molar oranlarda karışımlarının yüzey basıncı–ortalama moleküler alan izotermi .....	158
<b>Şekil 139.</b> Farklı yüzey basınçlarında DSPC:PEG40St:StNH <sub>2</sub> karışımlarının artan Gibbs serbest enerjilerinin karşılaştırılması .....	159
<b>Şekil 140.</b> DSPC:PEG40St:StNH <sub>2</sub> karışımlarının sıkıştırılmazlık değerlerinin yüzey basıncıyla değişimi .....	160
<b>Şekil 141.</b> Saf StNH <sub>2</sub> molekülünün BAM görüntüleri .....	161
<b>Şekil 142.</b> DSPC:PEG40St:StNH <sub>2</sub> 7:2:1 karışımının BAM görüntüleri .....	162
<b>Şekil 143.</b> DSPC:PEG40St:StNH <sub>2</sub> 'nin 6:2:2 molar oranında karışımın BAM görüntüleri .....	163
<b>Şekil 144.</b> DSPC:PEG40St:StNH <sub>2</sub> 'nin 5:2:3 molar oranında karışımının BAM görüntüleri .....	164
<b>Şekil 145.</b> DSPC:PEG40St:StNH <sub>2</sub> 'nin 4:2:4 molar oranında karışımının BAM görüntüleri .....	165
<b>Şekil 146.</b> Saf bileşenlerin ve 0:5:5, 2:5:3 ve 4:5:1 molar oranlarında DSPC:PEG40St:DSPS karışımlarının yüzey basıncına karşılık ortalama moleküler alan izotermi .....	167
<b>Şekil 147.</b> Farklı yüzey basınçlarında DSPC:PEG40St:DSPS karışımlarının artan Gibbs serbest enerjilerinin karşılaştırılması .....	168
<b>Şekil 148.</b> DSPC:PEG40St:DSPS karışımlarının sıkıştırılmazlık değerlerinin yüzey basıncıyla değişimi .....	169
<b>Şekil 149.</b> Saf DSPTS molekülünün hava – su ara yüzeyindeki BAM görüntüleri.....	171
<b>Şekil 150.</b> DSPC:PEG40St:DSPTS 0:5:5 karışımının hava – su ara yüzeyindeki BAM görüntüleri.....	172
<b>Şekil 151.</b> 2:5:3 DSPC:PEG40St:DSPTS karışımının hava-su ara yüzeyindeki BAM görüntüleri .....	173
<b>Şekil 152.</b> 4:5:1 DSPC:PEG40St:DSPTS karışımının hava-su ara yüzeyindeki BAM görüntüleri .....	174
<b>Şekil 153.</b> DSPC:PEG40St:DSTAP 'ın saf ve 0:5:5, 2:5:3 ve 4:5:1 molar oranlarında karışımlarının yüzey basıncına karşılık ortalama moleküler alan izotermi .....	176
<b>Şekil 154.</b> Farklı yüzey basınçlarında DSPC:PEG40St:DSTAP karışımlarının artan Gibbs serbest enerjilerinin karşılaştırılması .....	177

<b>Şekil 155.</b> DSPC:PEG40St:DSTAP karışımlarının sıkıştırılamazlık değerlerinin yüzey basıncıyla değişimi .....	178
<b>Şekil 156.</b> Saf DSTAP molekülünün hava-su ara yüzeyindeki BAM görüntüleri .....	179
<b>Şekil 157.</b> 0:5:5 DSPC:PEG40St:DSTAP karışımının hava-su ara yüzeyindeki BAM görüntüleri .....	180
<b>Şekil 158.</b> 2:5:3 DSPC:PEG40St:DSTAP karışımının hava-su ara yüzeyindeki BAM görüntüleri .....	181
<b>Şekil 159.</b> 4:5:1 DSPC:PEG40St:DSTAP karışımının hava-su ara yüzeyindeki BAM görüntüleri .....	182
<b>Şekil 160.</b> Üretilen mikroköpükçüklerin (a) optik mikroskop ve (b) konfokal mikroskop görüntüleri .....	183
<b>Şekil 161.</b> Mikroköpükçüklerin (a) optik mikroskop görüntüleri ve (b) ImageJ yazılımı ile analizi .....	184
<b>Şekil 162.</b> Molar oranı 9:1 olan DSPC:PEG40St karışımları ile üretilmiş mikroköpükçüklerin farklı sıcaklıklardaki zamanla sayılarındaki değişimleri .....	185
<b>Şekil 163.</b> Molar oranı 9:1 olan DSPC:PEG40St karışımları ile üretilmiş mikroköpükçüklerin farklı sıcaklıklardaki zamanla boyutlarındaki değişimler .....	185
<b>Şekil 164.</b> Fosfolipidler arasındaki uzaklığın sıcaklık ile artışını gösteren şematik çizim .....	186
<b>Şekil 165.</b> Emülsifiyer (PEG40St) miktarına bağlı olarak mikroköpükçük konsantrasyonundaki değişim .....	187
<b>Şekil 166.</b> Farklı molar oranlarındaki DSPC ve PEG40St karışımları ile üretilen mikroköpükçüklerin boyut dağılımları .....	188
<b>Şekil 167.</b> DSPC:PEG40St karışımları ile üretilmiş mikroköpükçüklerin 38°C'deki zamanla sayılarındaki değişimler .....	189
<b>Şekil 168.</b> Farklı molar oranlarındaki DSPC ve PEG40St karışımları ile üretilen mikroköpükçüklerin (A) sayısının sabit kaldığı süreler ve (B) yarı ömürleri .....	189
<b>Şekil 169.</b> Mikroköpükçük zar yapısında PEG <sub>40</sub> St miktarı (a) az olduğu (b) yeterli olduğu ve (c) fazla olduğu durumlar .....	190
<b>Şekil 170.</b> (A) 9:1 ve (B) 5:5 DSPC:PEG40St karışımları ile üretilmiş mikroköpükçüklerin 38°C'deki zamanla büyüklüklerinin kümülatif yüzde değişimleri .....	191
<b>Şekil 171.</b> (A) 9:1 ve (B) 5:5 DSPC:PEG40St karışımları ile üretilmiş mikroköpükçüklerin mikroskop görüntüleri .....	191
<b>Şekil 172.</b> 1:9 molar oranlarındaki DSPC:PEG40St karışımları ile üretilmiş mikroköpükçüklerin 38°C'deki zamanla büyüklüklerinin kümülatif yüzde değişimleri .....	192
<b>Şekil 173.</b> (A) 9:1, (B) 8:2, (C) 7:3, (D) 6:4 ve (E) 5:5 DSPC:PEG40St mikroköpükçüklerinin konfokal mikroskop görüntüleri .....	193
<b>Şekil 174.</b> 6:4 DSPC:PEG40St karışımları ile üretilen mikroköpükçüklerin (A) başlangıç ve (B) 15 dakika sonunda konfokal mikroskop görüntüleri .....	194
<b>Şekil 175.</b> 8:2 DSPC:PEG40St mikroköpükçüklerinin farklı hacim oranlarında karıştırılmış PBS:PG çözeltisi içerisinde 38 °C'deki zamanla sayılarındaki değişimleri .....	195

<b>Şekil 176.</b> 8:2 DSPC:PEG40St mikroköpükçüklerinin farklı hacim oranlarında karıştırılmış PBS:PG çözeltisi içerisinde 38 °C'de zamanla boyutlarındaki değişimleri.....	196
<b>Şekil 177.</b> 8:2 DSPC:PEG40St mikroköpükçüklerinin farklı molaritelerdeki sükröz çözeltisi içerisinde 38°C'de zamanla sayılarındaki değişimleri. ....	196
<b>Şekil 178.</b> 8:2 DSPC:PEG40St mikroköpükçüklerinin farklı molaritelerdeki sükröz çözeltisi içerisinde 38°C'de zamanla boyutlarındaki değişimleri. ....	197
<b>Şekil 179.</b> 8:2 DSPC:PEG40St mikroköpükçüklerinin farklı solusyonlarda 38°C'deki zamanla sayılarındaki değişimleri. ....	197
<b>Şekil 180.</b> (A) DSPC:PEG8St ve (B) DSPC:DSPE-PEG350 karışımlarının ürettikleri viskoz süspansiyon.....	199
<b>Şekil 181.</b> DSPC:DSPE-PEGn mikroköpükçüklerinin 38°C'deki zamanla sayılarındaki değişimleri.....	200
<b>Şekil 182.</b> Değişik molar oranlarda hazırlanan DSPC:PEG40St ve DSPC:DSPE-PEGn mikroköpükçüklerinin boyut dağılımları. ....	200
<b>Şekil 183.</b> (A) DSPE-PEG <sub>2000</sub> ve (B) PEG40St komponentlerinin şematik gösterimleri. ....	201
<b>Şekil 184.</b> Farklı molar oranlarındaki DSPG ve PEG40St karışımları ile üretilen mikroköpükçük sayısının sabit kaldığı süreler ve bu mikroköpükçüklerin yarı ömürleri. ....	203
<b>Şekil 185.</b> DSPC ve DSPG ile üretilen mikroköpükçüklerin boyut dağılımlarının karşılaştırmalı grafiği .....	203
<b>Şekil 186.</b> DSPC:PEG40St ve DSPG:PEG40St karışımları ile üretilmiş mikroköpükçüklerin 38°C'de zamanla sayılarındaki değişimleri.....	204
<b>Şekil 187.</b> DSPC:PEG40St:DSPG mikroköpükçüklerinin DSPG miktarına bağlı olarak bozulma başlama zamanları ve yarı ömürleri.....	205
<b>Şekil 188.</b> Mikroköpükçüklerin karşılaştırmalı boyut dağılımları.....	205
<b>Şekil 189.</b> Değişik oranlardaki DSPC:PEG40St:DSPA mikroköpükçüklerinin 38°C'de (A) zamanla sayılarındaki değişimleri, (B) DSPA miktarının mikroköpükçük ömrüne etkisi.....	206
<b>Şekil 190.</b> 5:5:0 ve 4:5:1 DSPC:PEG40St:DSPA mikroköpükçüklerinin karşılaştırmalı boyut dağılımı. ....	207
<b>Şekil 191.</b> Değişik oranlardaki DSPC:PEG40St:DSPA mikroköpükçüklerinin zamanla boyutlarındaki değişimleri. ....	208
<b>Şekil 192.</b> Değişik oranlardaki DSPC:PEG40St:DSPE mikroköpükçüklerinin 38°C'de (A) zamanla sayılarındaki değişimleri (B) DSPE miktarının mikroköpükçük ömrüne etkisi.....	209
<b>Şekil 193.</b> Değişik oranlardaki DSPC:PEG40St:DSPE mikroköpükçüklerinin zamanla boyutlarındaki değişimleri. ....	210
<b>Şekil 194.</b> 5:5 DSPC:PEG40St ve 2:5:3 DSPC:PEG40St:DSPE mikroköpükçüklerinin karşılaştırmalı boyut dağılımı.....	211

<b>Şekil 195.</b> 2:5:3 DSPC:PEG40St:DSPE mikroköpüklerinin (A) stabilite ve (B) boyut dağılımı karşılaştırması. ....	212
<b>Şekil 196.</b> Değişik oranlarda DSPC:PEG40St:StGly mikroköküklerinin 38°C'deki (A) zamanla sayılarındaki değişimler (B) boyutlarındaki değişimler.....	213
<b>Şekil 197.</b> Stearol Gliserol'ün zar yapısına tahmin edilen konfigürasyonu.....	213
<b>Şekil 198.</b> Değişik oranlarda DSPC:PEG40St:DSPS mikroköpüklerinin 38°C'de (A) zamanla sayılarındaki değişimleri (B) DSPS miktarının mikroköpük ömrüne etkisi.....	215
<b>Şekil 199.</b> 5:5:0 ve 5:4:1 DSPC:PEG40St:DSPS mikroköpüklerinin karşılaştırmalı boyut dağılımı. ....	216
<b>Şekil 200.</b> DSPC:PEG40St:DSPS karışımları ile üretilmiş mikroköpüklerin zamanla boyutlarındaki değişimleri. ....	216
<b>Şekil 201.</b> Değişik oranlarda DSPC:PEG40St:DSTAP mikroköpüklerinin 38°C'de (A) zamanla sayılarındaki değişimleri (B) DSTAP miktarının mikroköpük ömrüne etkisi.....	217
<b>Şekil 202.</b> DSPC:PEG40St:DSTAP karışımları ile üretilmiş mikroköpüklerin zamanla boyutlarındaki değişimleri. ....	218
<b>Şekil 203.</b> (A) 5:5:0 ve 4:5:1 DSPC:PEG40St:DSTAP (B) 5:5:0 ve 2:5:3 DSPC:PEG40St:DSTAP mikroköpüklerin boyut dağılımları (C) farklı miktarlarda DSTAP içeren mikroköpüklerin boyut dağılımlarının karşılaştırılması.....	219
<b>Şekil 204.</b> DSPC:PEG40St:StNH <sub>2</sub> karışımları ile üretilmiş mikroköpüklerin 38°C'deki (A) sayılarındaki değişimler (B) zamanla büyüklüklerinin kümülatif yüzde değişimleri .....	220
<b>Şekil 205.</b> DSPC:PEG40St:Kolesterol karışımları ile üretilmiş mikroköpüklerin 38°C'de zamanla sayılarındaki değişimleri.....	222
<b>Şekil 206.</b> Kolesterol içeren ve içermeyen mikroköpüklerin karşılaştırmalı boyut dağılımı. ....	222
<b>Şekil 207.</b> Hava ve florlanmış gaz dolu olan farklı mikroköpüklerin 38°C'de bozulma başlama zamanları .....	224
<b>Şekil 208.</b> Florlanmış gaz ve hava içeren mikroköpüklerin karşılaştırmalı boyut dağılımı.....	225
<b>Şekil 209.</b> Kayma gerilimine sebebiyet veren boru içerisindeki akış ile oluşan hız profili .....	226
<b>Şekil 210.</b> Kayma gerilimi ile birlikte 15, 30 ve 45 dakikalık sirkülasyon sonrası polysitiren küreciklerinin konsantrasyon değişimi.....	228
<b>Şekil 211.</b> 15 dakika sirkülasyon sonrası DSPC:PEG40St mikroköpüklerinin sayıca yüzde ve kümülatif yüzde dağılımları .....	230
<b>Şekil 212.</b> DSPC:PEG40St mikroköpüklerinin farklı kayma gerilmelerine karşılık 15 ve 30 dakikalık sirkülasyon sonucu konsantrasyon değişimi .....	231
<b>Şekil 213.</b> DSPC:PEG40St mikroköpüklerinin kayma gerilimine karşılık konsantrasyon değişimlerinin karşılaştırılması .....	232

<b>Şekil 214.</b> 5:5 molar kompozisyonundaki DSPC:PEG40St, DSPC:DSPE-PEG1000, ve DSPC:DSPE-PEG2000 mikro köpükçüklerinin 25 °C'de kayma sonrası konsantrasyon değişiminin kıyaslanması .....	233
<b>Şekil 215.</b> DSPC:PEG40St 5:5 mikroköpükçüklerinin farklı sıcaklık ve farklı kayma gerilmeleri sonrası zamana karşılık konsantrasyon değişimlerinin kıyaslanması .....	235
<b>Şekil 216.</b> (a) 0.028 Pa, (b) 0.28 Pa, (c) 0.42 Pa'da 4 °C, 25 °C ve 38 °C'de 15 dakika kayma gerilmeleri sonrası mikroköpükçük konsantrasyon değişiminin kıyaslanması .....	236
<b>Şekil 217.</b> T=38 °C'de DSPC:PEG40St ve DSPC:PEG40St:DSPG PFC mikroköpükçüklerinin kayma gerilimi sonrası konsantrasyon düşüşlerinin karşılaştırılması.....	238
<b>Şekil 218.</b> 2:5:3 DSPC:PEG40St:DSPG hava ve PFC mikroköpükçüklerinin 38 °C'de kayma gerilimi sonrası stabilitelerinin kıyaslanması.....	238
<b>Şekil 219.</b> Bir 9:1 DSPC:PEG40St mikroköpükçüğün optik mikroskop altında çözünmesinin izlenmesi.....	240
<b>Şekil 220.</b> 8 µm çapındaki 9:1 ve 5:5 DSPC:PEG40St mikroköpükçüklerinin f=0.3, f=0.7 ve f=1.0 oksijen doygunluğunda boyutlarındaki değişme .....	241
<b>Şekil 221.</b> Oksijen doygunluğu %70 (f=0.7) ve %30 (f=0.3) olduğunda 9:1 ve 5:5 DSPC:PEG40St mikroköpükçüklerinin zar dirençlerinin zamanla değişimi .....	243
<b>Şekil 222.</b> Hedeflenebilir mikroköpükçüğün ligand yardımı ile tümör hücresine bağlanması.....	244
<b>Şekil 223.</b> Çeşitli yoğunluklardaki streptavidin-PE taşıyan mikroköpükçüklerin (DSPC:PEG40St 5:5) akış sitometri sonuçları. ....	245
<b>Şekil 224.</b> Çeşitli yoğunluklardaki streptavidin-PE taşıyan mikroköpükçüklerin (5:5 DSPC:PEG40St) akış sitometri sonuçları.....	246
<b>Şekil 225.</b> (A) Hücrelerin yapışma deneyindeki önceki ilk görüntüleri ve (B) 9:1 DSPC:PEG40St formülasyonu ile üretilen mikroköpükçüklerin farklı akış hızlarında hücre yüzeyine bağlanma görüntüleri.....	247
<b>Şekil 226.</b> (A) Hücrelerin yapışma deneyindeki önceki ilk görüntüleri ve (B) 5:5 DSPC:PEG40St formülasyonu ile üretilen mikroköpükçüklerin farklı akış hızlarında hücre yüzeyine bağlanma görüntüleri.....	248
<b>Şekil 227.</b> (A) Hücrelerin yapışma deneyindeki önceki ilk görüntüleri ve (B) 2:5:3 DSPC:PEG40St:DSPG formülasyonu ile üretilen mikroköpükçüklerin farklı akış hızlarında hücre yüzeyine bağlanma görüntüleri.....	249
<b>Şekil 228.</b> (A) Hücrelerin yapışma deneyindeki önceki ilk görüntüleri ve (B) DSPC:PEG40St 9:1 formülasyonu ile üretilen BSA içeren mikroköpükçüklerin farklı akış hızlarında hücre yüzeyine bağlanma görüntüleri.....	250
<b>Şekil 229.</b> (A) Hücrelerin yapışma deneyindeki önceki ilk görüntüleri ve (B) 5:5 DSPC:PEG40St formülasyonu ile üretilen BSA içeren mikroköpükçüklerin farklı akış hızlarında hücre yüzeyine bağlanma görüntüleri .....	251
<b>Şekil 230.</b> (A) Hücrelerin yapışma deneyindeki önceki ilk görüntüleri ve (B) 2:5:3 DSPC:PEG40St:DSPG formülasyonu ile üretilen BSA içeren mikroköpükçüklerin farklı akış hızlarında hücre yüzeyine bağlanma görüntüleri .....	252



<b>Şekil 231.</b> Farklı mikroköpükçüklerin farklı akış hızlarındaki hücrelere bağlanma oranları.....	253
<b>Şekil 232.</b> (A) Hücrelerin yapışma deneyindeki önceki ilk görüntüleri ve (B) 9:1 DSPC:PEG40St formülasyonu ile üretilen EGF içeren mikroköpükçüklerin farklı akış hızlarında hücre yüzeyine bağlanma görüntüleri .....	254
<b>Şekil 233.</b> (A) Hücrelerin yapışma deneyindeki önceki ilk görüntüleri ve (B) 5:5 DSPC:PEG40St formülasyonu ile üretilen EGF içeren mikroköpükçüklerin farklı akış hızlarında hücre yüzeyine bağlanma görüntüleri .....	255
<b>Şekil 234.</b> (A) Hücrelerin yapışma deneyindeki önceki ilk görüntüleri ve (B) 2:5:3 DSPC:PEG40St:DSPG formülasyonu ile üretilen EGF içeren mikroköpükçüklerin farklı akış hızlarında hücre yüzeyine bağlanma görüntüleri .....	256
<b>Şekil 235.</b> 9:1 ve 5:5 DSPC:PEG40St ile 2:5:3 DSPC:PEG40St:DSPG mikroköpükçüklerinin $153 \text{ s}^{-1}$ sürekli kayma gerilimi altında hücrelere yapışma süreleri .....	257

## Özet

Ultrasonografi, başta koroner kalp damar hastalıkları (ekokardiografi) olmak üzere, çeşitli hastalıkların teşhisinde kullanılan ve maliyet etkinliği olan bir diagnostik görüntüleme yöntemidir. Ultrasonda görüntü, transdüserden gönderilen ses dalgalarının geriye yansımaları sonucu oluşmaktadır. Ancak, bazı durumlarda çevreleyen dokulardan gelen arka plan sinyaller yöntemin hassasiyetini azaltmakta, doğru teşhis için yeterince net bir görüntü elde edilememektedir. Görüntü kalitesinin artırılması için kontrast ajanı olarak adlandırılan mikroköpükçükler kullanılmaktadır. Ayrıca, mikroköpükçükler ilaç, gen, ve DNA taşımakta ve kontrollü salımlarda da kullanılmaktadır. Mikroköpükçüklerin bu ve daha nitelikli alanlarda kullanılabilmesi için, yapılarının güçlendirilmesi ve stabiliteilerinin artırılmaları gerekmektedir.

Bu çalışmada, moleküler görüntüleme için kullanılacak ultrason kontrast ajanlarının monotabaka yapısının yeniden tasarımı, mikroköpükçük sentezi, ve karakterizasyonları yapılmıştır. Çalışmada, optimum büyüklükte, yüksek stabilitede mikroköpükçükler elde edebilmek için özellikle hidrojen bağı, iyonik etkileşimler, elektrostatik etkileşimler, van der Waals etkileşimleri, hidrofobik-hidrofobik etkileşimler gibi ikincil kuvvetlerin etkin olduğu zar yapısı oluşturulmaya çalışılmıştır. Bu kapsamda, aynı hidrokarbon zincir uzunluğuna sahip fakat farklı polar gruplar içeren fosfolipidler kullanılmıştır. Seçilen fosfolipidler, hidrojen bağı yapma kapasitesi olan DSPG, DSPA, Stearil-gliserol, DSPE; iyonik etkileşim yapma kapasitesi olan, DSPS, DSTAP, Stearil amine; ve hidrofilik-hidrofobik etkileşimleri olan farklı zincir uzunluklarında emülsifier, DSPE-PEG<sub>n</sub>, molekülleridir. Ayrıca, Kolesterol'ün, kullanılan gaz tipinin ve alt-faz (sub-phase) saklama çözeltisinin mikroköpükçükler üzerine etkileri incelenmiştir. Mikroköpükçüklerin dinamik stabiliteileri farklı kayma gerilimlerinde test edilmiştir. Mikroköpükçükler üzerine meme kanserine özgü biyolojik moleküller takılarak hedeflenebilir mikroköpükçükler üretilmiştir. Farklı akış hızlarında insan meme kanseri hücrelerine tutunma ve bağlanma (yapışma) davranışları incelenmiştir. Sonuçta, mevcut formülasyonlarda kullanılan 9:1 mol oranında DSPC:PEG<sub>40</sub>St yerine, 5:5 mol oranında DSPC:PEG<sub>40</sub>St formülasyonları önerilmiştir. Bu, pahalı olan ultrason kontrast ajanlarının aynı zamanda fiyatını da düşürmüştür. Mikroköpükçük yapısına eklenen ve hidrojen bağları yapabilen DSPG molekülleri, bu ajanları daha da kararlı ve dar bir boyut dağılımlı hale getirdiği görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Ultrason, kontrast ajanı, mikroköpükçük, fosfolipid, monotabaka, Langmuir-Blodgett, LB, Brewster açısı mikroskopu, BAM, moleküler görüntüleme.

## Abstract

Ultrasonography has been widely used in diagnosis of various diseases, especially coronary heart diseases (echocardiography), and is a cost-effective diagnostic imaging technique. An ultrasound image is generated from the scattered sound waves transmitted through a transducer. However, the background signals from the surrounding tissues sometimes reduce the accuracy of the measurement, resulting in a poor image for the diagnosis. In order to improve the image quality, ultrasound contrast agents so called microbubbles have been used. Besides, microbubbles have also been used in drug, gene, and DNA delivery, and their controlled release. In order to employ microbubbles in these and further applications, their shell structures need to be engineered and their stability increased.

In this study, the monolayer shell structure of ultrasound contrast agents used in molecular imaging were redesigned and characterized. Shell structures under the influence of secondary forces, such as hydrogen bonding, ionic interactions, electrostatic interactions, van der Waals interactions, and hydrophilic-hydrophobic interaction, were aimed to be composed for the optimum size and enhanced stability. In this regard, phospholipids having the same hydrocarbon chain length but different head groups were used. Selected phospholipids and fatty acids were the molecules of DSPG, DSPA, Stearyl glycerol, and DSPE for hydrogen bonding; DSPS, DSTAP, and Stearyl amine for ionic interactions; and DSPE-PEG lipopolymers with different PEG chain lengths for hydrophilic-hydrophobic interactions. In addition to these molecules, effects of cholesterol, gas type, and sub-phase storage solution on the microbubble stability were investigated. Dynamic stability of the microbubbles were tested under different shear rates. Targeted microbubbles were produced by conjugating the microbubbles with a biomolecule specific to breast cancer cell line. Their binding and adhesion to the human breast cancer cells were investigated under different shear rates. As a result, 5:5 mol ratio of DSPC:PEG40St were suggested instead of 9:1 mol ratio used in the traditional formulations. The suggested formulation thus reduced the cost of the expensive ultrasound contrast agents. It was found that the addition of DSPG, capable of hydrogen bonding, to the microbubble formulations made these agents even more stable with a controlled size distribution.

**Keywords:** Ultrasound, contrast agents, microbubble, phospholipid, monolayer, Langmuir Blodgett, LB, Brewster angle microscopy, BAM, molecular imaging.

## 1. GİRİŞ

Ultrason, tanısal görüntüleme yöntemi olarak dünyada en çok kullanılan medikal görüntüleme tekniğidir (Klibanov, 1999; Riess ve ark., 2003). Örneğin, Amerika Birleşik Devletleri'nde sadece 7000 adet tomografi cihazı ve 5000 adet magnetik rezonans görüntüleme cihazı aktif olarak kullanılırken, 75000 adet ultrason cihazı kullanılmaktadır. Ultrasonografi tıpta, özellikle koroner kalp damar hastalıklarının görüntülenmesinde yaygın olarak kullanılan bir radyolojik tanı yöntemidir. 1970 yıllarda kliniğe girmeye başlayan ultrasonun, vücut organlarının görüntülenmesi ve hastalık tanısının konmasındaki kullanımı giderek artmaktadır. Ayrıca, hiç bir bilinen yan etkisi ve pahalı bir yöntem olmadığı için, girişimsel radyolojide bilgisayarlı tomografi (BT), manyetik rezonans (MR) ve anjiyografi gibi diğer radyolojik görüntüleme yöntemlerine kıyasla ultrason daha sık tercih edilmektedir. Yaklaşık olarak yılda 100 milyon kalp, dolaşım sistemi, ve karın bölgesine ait ultrason görüntüsü alınmaktadır (Riess ve ark., 2003). Ultrason ile görüntüleme düşük riskli, düşük maliyetli ve anında görüntü verebilen bir tekniktir. Aynı zamanda bu yöntem ile görüntüleme hasta zararlı radyasyon ışınlarına maruz kalmamaktadır. Medikal ultrason ile görüntüleme tekniği sinyal-yankı prensibine bağlıdır. Bu tekniğin çalışma prensibine göre ultrasonik güç çevirici (transducer) cildin üzerine yerleştirilir ve vücuda ultrason sinyali gönderir. Bu sinyallerden bazıları vücuttaki doku ve yapı farklılıklarından dolayı geri yansır. Bu geri yansıyan ultrason dalgaları güç çevirici tarafından yakalanır ve elektriksel sinyallere dönüştürülerek görüntüleme sistemi tarafından dijitalleştirilir (Hernot ve Klibanov, 2008). Sağlıklı ve hastalıklı dokular arasındaki farklılıkları gözlemleyebilmek için vücutta dolaşan kanı görüntülemek çok önemlidir. Ancak, kanın sıvı fazda olmasından dolayı sıkıştırılabilirliği düşüktür ve ultrason dalgalarını güçlü bir şekilde geri yansıtamaz. Ayrıca, sağlıklı dalak, karaciğer ve böbrek, bazı tümörlerle aynı akustik özelliklere sahiptir. Bu kısıtlamalardan dolayı normal ve hastalıklı dokular arasındaki farklılıklar net şekilde görüntülenememektedir (Hernot ve Klibanov, 2008; Riess ve ark., 2003; Wang ve ark., 1996).

Ultrason ile görüntüleme yönteminde, görüntü kalitesinin zayıf olması ile ilgili bu kısıtlamalar, vücuda enjekte edilebilen ve ultrason dalgalarını kuvvetli bir şekilde yansıtabilen kontrast ajanları kullanılarak giderilebilir. Ultrason kontrast ajanları biyo-uyumlu

malzemelerden elde edilen kolloidal yapılardır. Gaz-sıvı emülsiyonları (mikroköpükçükler), sıvı-sıvı emülsiyonları (nanodamlalar), ve lipozomlar ultrason kontrast ajanı olarak kullanılmaktadır. Fakat katı ve sıvı nanoparçacıklar, gaz mikroköpükçüklere göre ultrason sinyallerini daha az yansıtırlar (Borden ve ark., 2010; Sirsi ve Borden, 2009). İçi gaz dolu, 1-8 µm boyutlarındaki mikroköpükçükler ise ultrason görüntüleme daha yaygın olarak tercih edilmektedirler (Hernot ve Klibanov, 2008).

Mikroköpükçüklerin gaz çekirdeği, düşük yoğunluklu ve yüksek sıkıştırılabilirliğine sahiptir. Gaz çekirdeğinin bu özelliğinden dolayı, mikroköpükçükler ultrason akustik dalga altında büzülüp genişleyebilirler ve kuvvetli yankı (echo) oluştururlar. Son yıllarda, bu gaz çekirdeğinin etrafı ince bir zar (shell) ile kaplı mikroköpükçükler tercih edilmektedir; çünkü, bu mikroköpükçükler damar sisteminde rahatlıkla ilerleyebilmektedir ve ultrason ile görüntüleme metodunun tanı koyma kapasitesini artırmaktadır. Bu mikroköpükçükler ultrasonik alana maruz kaldıklarında ultrasonik basınç dalgalarına güçlü bir şekilde tepki vermektedir ve bu dalgaları etkili bir şekilde yansıtmaktadır. Malzemeler kendilerine özgü sesin malzeme içindeki hızı ve fiziksel yoğunluğunun ürünü olan akustik empedansa sahiptirler. İki komşu malzeme arayüzeyindeki yansımanın şiddeti ve ses dalgasının yoğunluğu bu iki malzenin akustik empedansları arasındaki farklılığa bağlıdır. Gazın akustik empedansı suyun, yumuşak dokuların ve kemiğin akustik empedansına göre oldukça düşüktür. Akustik empedanslar arasındaki bu yüksek farklılık güçlü yansıyan ses dalgalarının oluşmasını sağlar. Bu yüzden, mikroköpükçükler vücutta güçlü sinyaller oluştururlar, iyi bir kontrast ortamı yaratırlar ve böylece görüntüleme kalitesini artırmaktadırlar (Albrecht ve Hohmann, 2004; Hernot ve Klibanov, 2008). Ultrasonda, patolojik ve normal dokular arasında kontrast oluşturarak doğru bilgiler elde edilmesini sağlarlar (Hernot ve Klibanov, 2008; Klibanov, 1999).

Mikroköpükçükler, ultrasonun kullanıldığı ilaç ve gen taşınım sistemleri olarak da yüksek potansiyele sahiptirler (Dijkmans ve ark., 2004; Lentacker ve ark., 2009; Sirsi ve Borden, 2009; Unger ve ark., 2004). Bu amaçla, kullanılacak mikroköpükçüklerin ekojenik olmalarının yanısıra, vücut içinde daha uzun süre stabil kalabilmeleri ve embolizm riski yaratmamaları gerekir (Liu ve ark., 2006; Wang ve ark., 1996). Bunlara ilaveten, mikroköpükçüklerin boyutları kritik bir parametredir. Büyük mikroköpükçükler ses

dalgalarını daha kuvvetli bir şekilde yansıtmasına rağmen, mikroköpükçüklerin kılcal damarlardan geçebilmeleri için boyutları 8 µm'yi geçmemelidir (Schutt ve ark., 2003).

Kontrast ajanlarını kullanarak yapılması düşünülen ultrason uygulamaları için, mikroköpükçüklerin birkaç dakikadan daha fazla süre stabil kalması gerekmektedir. Bu durumda mikroköpükçüklerin hem saklama süresince hem de *in vivo* uygulamalar sırasında stabilitesi büyük önem taşımaktadır (Klibanov, 1999). Mikroköpükçüklerin bir zar yapısı ile kapsüllenmesi stabilitenin artmasını sağlayarak mikroköpükçüklerin ömrünü uzatabilmektedir. Bu zar yapı mikroköpükçüklerin daha standart büyüklük dağılımına sahip olmasını da sağlamaktadır. Fakat, seçilen zarın elastik yapıda olması gerekir; zira, elastik zarın mikroköpükçüklerin akustik özelliğini arttırdığı savunulmaktadır (De Jong ve ark., 1992; Hernot ve Klibanov, 2008). Ayrıca, mikroköpükçüklerin ultrasonik basınç altındaki sağlamlığı ve direnci zar yapısı özellikleri ile belirlenmektedir. Mikroköpükçüklerde bu zar yapı protein, polimer, fosfolipid gibi bio-uyumlu malzemelerden oluşmaktadır. Ancak, daha önce yapılan çalışmalar göstermiştir ki, polimerden oluşan zar yapılarında çatlaklar oluşmuş ve bu çatlaklara bağlı olarak gaz kayıpları olmuş, dolayısıyla stabilite problemleri yaşanmıştır. Ayrıca, protein kaplı mikroköpükçüklerin de damarlara yapışma eğiliminde olduğu gözlemlenmiştir (Borden ve ark., 2005; Hernot ve Klibanov, 2008). Bu davranışların aksine fosfolipid kaplı mikroköpükçüklerde bu tarz olumsuzluklara rastlanmamıştır. Bu yüzden fosfolipidler zar yapı malzemesi olarak en sık tercih edilen malzemelerdir (Kim ve ark., 2004; Lozano ve Longo, 2009; Tinkov ve ark., 2009). Mikroköpükçüklerin zar yapısında fosfolipidlerin temel malzeme olarak seçilmesinin diğer bir nedeni ise, fosfolipidlerin hücre membranlarının da yapı taşı olmaları, dolayısıyla biyo-uyumlu olmalarıdır.

Literatürde genellikle DSPC ve PEG40St bileşenleri 9:1 mol oranlarında karıştırılarak mikroköpükçükler hazırlanmaktadır (Borden ve Longo, 2002; Sirsi ve ark., 2010; Swanson ve ark., 2010; Talu ve ark., 2006). Fakat, yapılan çalışmalar bu oranda hazırlanan mikroköpükçüklerin vücut sıcaklığında stabil kalmadığını göstermektedir. Bu sebeple daha stabil mikroköpükçükler elde edebilmek için farklı formülasyonlarda mikroköpükçüklerin hazırlanması gerekmektedir. Mikroköpükçüklerin stabiliteyi bugünkü ultrason uygulamaları ve gelecekte gerçekleşmesi planlanan uygulamalar için oldukça önemli olmasına rağmen, zar yapı bileşimi ve bu bileşimi oluşturan malzemelerin stabilite üzerine etkisini inceleyen çok az

sayıda çalışma bulunmaktadır. Daha stabil mikroköpükçükler elde edebilmek için zar yapısının yeniden tasarlanması ve karakterize edilmesi gerekmektedir. Zar yapısının stabilitesi, bu yapıyı oluşturan malzemeler arasındaki etkileşime bağlıdır (Xing ve ark., 2010). Bu çalışmada, zar stabilitesi hakkında bilgi elde edinebilmek için mikroköpükçüklerin zar yapısını oluşturan moleküller arasındaki etkileşimlerin incelenmesi ve elde edilen bulgular ışığında zar yapısının yeniden tasarımı ve mikroköpükçüklerin karakterizasyonları amaçlanmaktadır.

Mikroköpükçüklerin gaz-sıvı yüzeyine oldukça benzerlik gösteren gaz-sıvı arayüzeyindeki monotabakanın faz davranışları-Langmuir-Blodgett (LB) metodu ile incelenebilmektedir (Moghaddam ve ark., 2011). Bu sebeple, çalışmada zar yapıyı oluşturan malzemeler arasındaki etkileşimler ve faz davranışları Langmuir-Blodgett (LB) metodu kullanılarak incelenmiştir (Shen ve ark., 2008; Wang ve ark., 1996; Xing ve ark., 2010). Bu metoda ilaveten Brewster Açısı Mikroskobu (BAM) ve Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) tamamlayıcı teknikler olarak kullanılmıştır. Brewster Açısı prensibine göre çalışan BAM, Floresan Mikroskobunda olduğu gibi ilave bir bileşen gerektirmeyen bir metod olup, monotabakanın morfolojik özelliklerinin ve faz davranışlarının mikro seviyede incelenmesinde kullanılmaktadır (Arnold ve ark., 2005; Brandal ve ark., 2007; Kubo ve ark., 2001; Lucero ve ark., 2008; Risovic ve ark., 2011). Diğer yandan AFM metodunda, moleküllerin nano seviyedeki organizasyonu hakkında bilgi edinilmektedir (Connell ve Smith, 2006; Deleu ve ark., 2001; Takamoto ve ark., 2001). İki-boyutta (2D) elde edilen bu bulgular ışığında yeni mikroköpükçükler sentezlenmiş ve karakterizasyonları yapılmıştır.

Çalışmada, optimum büyüklükte, yüksek stabilitede mikroköpükçükler elde edebilmek için özellikle hidrojen bağı, iyonik etkileşimler, elektrostatik etkileşimler, van der Waals etkileşimleri, hidrofobik-hidrofobik etkileşimler gibi ikincil kuvvetlerin etkin olduğu zar yapısı oluşturulmaya çalışılmıştır. Bu kapsamda, aynı hidrokarbon zincir uzunluğuna sahip fakat farklı polar gruplar içeren fosfolipidler kullanılmıştır. Seçilen fosfolipidler, hidrojen bağı yapma kapasitesi olan DSPG, DSPA, Stearil-gliserol (StGly), ve DSPE; iyonik etkileşim yapma kapasitesi olan, DSPS, DSTAP, ve Stearil-amin (StNH<sub>2</sub>); ve hidrofilik-hidrofobik etkileşimleri olan farklı PEG zincir uzunluklarında emülsifier, DSPE-PEG<sub>n</sub>, molekülleridir. Ayrıca Kolesterol'ün ve kullanılan gaz tipinin mikroköpükçükler üzerine etkileri farklı sıcaklıklarda ve vücut sıcaklığında incelenmiştir. Mikroköpükçüklerin dinamik stabiliteleri

farklı kayma gerilimlerinde test edilmiştir. Bunlara ilave olarak sıcaklığın ve alt fazın (sub-phase) mikroköpükçüklerin stabilitelerine etkileri çalışılmıştır. Ayrıca, mikroköpükçükler üzerine meme kanserine özgü biyolojik moleküller takılarak hedeflenebilir mikroköpükçükler üretilmiş ve farklı akış hızlarında insan meme kanseri hücrelerine tutunma ve bağlanma (yapışma) davranışları incelenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Ultrason Kontrast Ajanları: Mikroköpükçükler

Ultrasonda görüntü, transduserden gönderilen ses dalgalarının geriye yansımaları sonucu oluşur. Ancak, bazı durumlarda çevre dokulardan gelen arka plan sinyaller ile akustik dirençleri birbirine yakın dokulardan gelen sinyaller yöntemin hassasiyetini azaltmakta, doğru teşhis için yeterince net bir görüntü elde edilememektedir (Klibanov, 2002). Bu da tanının konmasını geciktirmekte ve/veya yanlış teşhislerin konmasına sebebiyet vermektedir. Doğru teşhis için görüntü kalitesinin iyileştirilmesi yönünde, yeni ve kullanışlı yöntemler geliştirilmesi önem arz etmektedir. İçeri gaz dolu küresel bir monotabakadan oluşan mikroköpükçüklerin görüntüleme kullanılması bu yöntemlerden bir tanesi olabilir. Görüntüleme esnasında sistemik dolaşıma enjekte edilen ve “kan havuzu ajanları (blood pool agents)” olarak bilinen ultrason kontrast ajanları (mikroköpükçükler), ekojenik olup çevre dokulardan gelen akustik sinyallerden daha farklı frekanslarda ultrason dalgaları yayarak kontrast yaratmakta; dolayısıyla, elde edilen görüntünün netliğini, kalitesini ve çözünürlüğünü artırmaktadırlar. Böylece, olabildiğince çok hastalığa daha erken ve net bir tanı konulması mümkün olabilir (Moriyasu ve Itoh, 2009). İlave olarak, ultrason kontrast ajanları sayesinde, konvensiyonel ultrason yöntemi ile mümkün olmayan, miyokardiyumdaki kan akış anormalliklerinin ve koroner kalp damar hastalıklarının saptanması ve görüntülenmesi, kalp fonksiyonu bozukluklarının izlenebilmesi mümkün olabilmektedir (Lindner, 2009; Porter, 2009; Su ve ark., 2009; Villanueva ve ark., 2007). Ayrıca, bu ajanların belirli bir intravasküler hastalık reseptörüne özgü antikor veya ligandlarla hedeflendirilmeleri durumunda, incelenecek hastalıklı doku etrafında mikroköpükçüklerin tutunması sonucu gerçek zamanlı hedeflendirilmiş görüntüleme (real-time targeted imaging) yapılabilir



(Villanueva ve ark., 2007). Bunların yanında, hedeflendirilmiş ajanlar terapötik amaçlı olarak, (ilaç veya genlerle yüklenerek), lokal madde transferinde kullanılabilirler (Wang ve ark., 2009). Üstelik, ultrason, hücre duvarında geçici gözenekler oluşturarak (sonoporasyon) ilaç, gen, DNA gibi biyolojik moleküllerin hücre içine alınmasını daha da kolaylaştırmaktadır (Kaneko ve Willmann, 2012).

Ultrason kontrast ajanları, mikron boyutunda küresel bir zar tabakası içerisine hapsedilmiş gazlardan oluşmaktadır. Yapılan çalışmalar, gaz-katı arayüzeyinde elde edilen görüntü netliğinin maximum olduğunu göstermiştir. Moleküler teşhis ve görüntüleme ve hatta ilaç ve gen transferinde etkin bir şekilde kullanılabilmesi için, kontrast ajanlarının kararlı (stabil), dayanıklı (robast), ve maksimum akustik sinyal için elastik olmaları gerekmektedir (Klibanov, 2002). Ajanların kana enjekte edildikten sonra yok olmasına sebep olan mekanizmanın tam olarak ne olduğu henüz bilinmemektedir. Stabil, robast mikroköpükçüklerin tasarımı konusunda akla ilk gelen iki yaklaşımdan biri düşük çözünürlüklü gazlar kullanmak, diğeri ise gazı geçirmeyen kohesif bir tabakanın yeniden tasarlanmasıdır. Mikroköpükçük üretiminde yaygın olarak kullanılan gazların bazı fiziksel özellikleri Tablo 1’de verilmektedir. Tablo’da çözünürlük değerlerinden görüleceği üzere, azot, oksijen, ve hava’nın sudaki çözünürlüğü perflorokarbon gazlarına kıyasla daha yüksektir. Dolayısı ile perflorokarbon gazları ile elde edilen mikroköpükçüklerin daha uzun süreli olarak kan dolaşımında kalabilmeleri beklenebilir. Nitekim, DSPC:PEG<sub>40</sub>-St oranı 9:1 olan mikroköpükçükler ile yapılan deneysel çalışmalarda da bu gözlenmiştir (Klibanov, 2002). Ancak, çok düşük buhar basıncına sahip gazlar kullanıldığında gaz, sıvı formuna dönüşmekte ve kontrast özelliğini yitirmektedir (Klibanov ve ark., 1998). Ayrıca, perflorokarbon gazları mikroköpükçüklerin maliyetini artıran da bir unsur olmaktadır. Mikroköpükçüklerde daha çok hava kullanılması, perflorokarbon gazı ihtiva eden mikroköpükçüklere kıyasla daha stabil kontrast ajanları geliştirilmesi, maliyetlerin düşürülmesi, önem arz etmektedir. Mikroköpükçüklerin stabilitesi, mikroköpükçükleri oluşturan komponentlerin gaz-sıvı arayüzeyinde dizilişleri, lipid tabakasının homojen ve çekiçi kuvvetler etkisinde (kohezif) bir yapıda olması, tabakadaki moleküller arası etkileşimin derecesi, ve tabakanın esnekliği ile ilgilidir. Dolayısı ile, gaz etrafındaki moleküller arası etkileşimin artırılması, daha robast, kararlı ajanların tasarımı için gerekmektedir.

**Tablo 1.** Mikroköpükçük üretiminde kullanılan bazı gazların fiziksel özellikleri (Riess ve ark., 2003)

Gaz	Kaynama Noktası (°C)	Suda Çözünürlük (mol/m <sup>3</sup> , 25 °C)	Gaz ile Sıvı Arasındaki Dağılım Katsayısı (x10 <sup>6</sup> )	Doygun Buhar Basıncı (kPa, 37 °C)
N <sub>2</sub>	-196	0.63	14480	
O <sub>2</sub>	-183	1.32	27730	
SF <sub>6</sub>	-64	0.27		2530
n-C <sub>3</sub> F <sub>8</sub>	-37	0.19	530	1160
n-C <sub>4</sub> F <sub>10</sub>	-2	0.021	202	380
n-C <sub>5</sub> F <sub>12</sub>	29	0.004	117	130
n-C <sub>6</sub> F <sub>14</sub>	57	0.00027	23	48

Gerek literatürde gerekse ticari olarak ultrason kontrast ajanları üzerine yapılan çalışmaların sayısı giderek artmaktadır. Çok yakın zamanda, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (America Food and Drug Administration (FDA)) tarafından oluşturulan bir danışma kurulunca yapılan bir çalışmada, kontrast ajanlarının hiç bir yan etkisi olmadığı, konvensiyonel ultrason çok yaygın bir şekilde kullanılmasına rağmen, bazı durumlarda manyetik rezonans veya bilgisayarlı tomografi gibi daha pahalı ve daha riskli tekniklerin de beraberinde kullanılması gerektiği, ancak kontrast ajanı kullanımı ile bunlara ihtiyaç kalmayarak tanı koyma maliyetin düşürülebileceği vurgulanmıştır. Yaptıkları maliyet analizlerinde, acilden servise kabul edilen hastaların sayısında %22 oranında bir düşme gözleneceği ve böylece yatan hasta sayısında düşme olacağı, ve gerçekten gerekli olmayan testlerin yapılmamasıyla, hasta başına yaklaşık \$900'lık bir tasarruf elde edileceği ileri sürülmektedir (Asch ve Weissman, 2009). Bu demektir ki, kontrast ajanlı ultrason, ABD'de pek yakında kullanılan rutin testler arasına girebilecektir. Şu anda, FDA onaylı lipid bazlı tek bir mikroköpükçük mevcuttur: (Definity®), ve rakip de olmadığı için ampül başına maliyeti yaklaşık \$100-150 civarındadır. Lipid esaslı mikroköpükçükler, tanı sonrasında patlatılarak, gaz akciğerlerden dışarı çıkarken, lipidler böbrek ve dalakta metabolize edilmektedir. Bu sebeple, mikroköpükçüklerin ultrasonla kullanımı hasta açısından da herhangi bir yan etki ihtiva etmemektedir.

## 2.2. Ultrason Kontrast Ajanları ile İlgili Mevcut Durum

Mikroköpükçüklerin ultrason görüntüleme kullanılışının hikayesi ilginçtir: Bundan yaklaşık 30-40 yıl önce, bir tesadüf eseri fizyolojik olarak kabul edilebilir bir maddenin

sudaki çözeltilisinin iyice çalkalanıp vücuda enjekte edilmesiyle elde edilen serbest hava kabarcıklarıyla görüntü kalitesinde elde edilen iyileşme, gaz/hava kabarcıklarının ultrasonda kontrast yaratmak ve dolayısı ile görüntünün çözünürlüğünü artırması, bu alanda atılan adımların ilki olmuştur (Gramiak ve Shah, 1968). Fakat oluşan gaz kabarcıkları vücutta yeteri kadar stabil olarak kalamadıkları için çok kesin bir çözüm olamamıştır. Gaz kabarcıklarının amfifilik lipidler, polimerler, veya denature edilmiş protein bazlı bir monotabaka (shell) içerisine hapsedilmek suretiyle vücuda enjekte edilmesi ultrason kontrast ajanlarının etkin bir şekilde kullanımı için bir çözüm olarak önerilmiştir (Klibanov, 2002). Epstein-Plesset teorisine göre (Plesset ve Sadhal, 1982), bu monotabaka hem gaz-sıvı yüzey gerilimini düşürmekte ve hem de gazın sıvı içine difüzyonuna karşı direnç oluşturmaktadır. O zamandan bu yana değişik gaz veya gaz karışımları (hava, nitrojen, oksijen, SF<sub>6</sub>, florlanmış hidrokarbon gazları (C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>, C<sub>4</sub>F<sub>10</sub>, C<sub>5</sub>F<sub>12</sub> gibi), ve monotabaka bileşenlerinden oluşan kontrast ajanları tasarlanmış, bunlarla *in-vivo* ve *in-vitro* testler yapılmıştır. Ancak, yapılan çalışmalarda denature olmuş protein ve polimerden oluşan mikroköpükçüklerde, elastik olmamalarından dolayı gazı çevreleyen zar tabakada sonik etki ile yarılmalar olmuş, ve dolayısıyla, gazın hızlı bir şekilde difüzyonuyla mikroköpükçüklerin bozunduğu gözlemlenmiştir (Bloch ve ark., 2004; Chomas ve ark., 2001; Leong-Poi ve ark., 2002). Ayrıca, polimer ve proteinler yeterince elastik olmadıkları için polimer ve proteinlerden oluşan mikroköpükçüklerin daha az ekojenik oldukları görülmüştür (Ferrara ve ark., 2007). Halbuki, lipid molekülleri gaz etrafında elastik bir tabaka oluşturarak gazın ultrason altında kolaylıkla rezonans edebilmesine olanak sağlamaktadır; dolayısıyla, lipid bazlı mikroköpükçükler oldukça ekojeniktir. Üstelik, lipid bazlı mikroköpükçükler endotel hücrelere yapışmadan kanda serbestçe akabildiğinden *in-vivo* uygulamalarda tercih edilmektedir. Lipid bazlı mikroköpükçüklerin diğer bir avantajı ise, hedeflendirilmiş ilaç, gen, ve DNA transferinde kullanılmak üzere belli bir hastalık receptörüne spesifik ligand veya antikolarla modifiye edilmesi daha kolaydır (Borden ve ark., 2010). Sonuçta, burada özetlenen çalışmalar daha çok lipid bazlı mikroköpükçükleri kapsamaktadır.

Lipid bazlı mikroköpükçükler, gaz-sıvı arayüzeyinde lipid moleküllerinin (amfifilik malzeme) hidrofilik ve hidrofobik olarak yönlenebilmesi ve bir monotabaka oluşturması ile oluşur. Yapılan araştırmalar, fosfolipitlerin silindirik bir yapıda olduklarını ve lipozomlarda ve hücre duvarlarında olduğu gibi tek başlarına iki katmanlı bir yapı (bilayer) oluşturduklarını ortaya koymaktadır. Bir başka çalışmada ise, yine amfifilik karakterde olmak koşulu ile, tek

veya çift hidrokarbon zincirli polietilen glikol (PEG) içeren konik şeklinde (wedge shape) bir emülsiyonlaştırıcının lipidlere eklenmesi ile iki katmanlı yapının monotabakalı bir yapıya dönüştürebileceği vurgulanmaktadır (Hristova ve ark., 1995; Hristova ve Needham, 1994). Ancak, emülsiyonlaştırıcının miktarı oldukça önemlidir. Yapılan bir başka çalışmada ise, disterolfosfatilamin (DSPE) ve kovalent bağlı PEG içeren disterolfosfatilamin (DSPE-PEG<sub>2000</sub>)'den oluşan monotabakada, artan DSPE-PEG<sub>2000</sub> konsantrasyonu ile monotabakanın daha düzensiz bir yapıya geçtiği ve moleküllerin sıkıştırabilme kapasitesinin (packing density) azaldığı, bunun da hidrofilik PEG'den kaynaklanan saçaklardan dolayı olabileceği ileri sürülmektedir (Majewski ve ark., 1998). PEG molekülleri, biyoyumlu moleküller olduklarından, aynı zamanda, mikroköpükçük etrafında sterik bir bariyer oluşturarak, mikroköpükçüklerin kanda makrofajlar tarafından yok edilmemeleri, yani *in-vivo* ömrünü artırma, ve mikroköpükçükler arası koagülasyonu önleme gibi çok önemli fonksiyonları da yerine getirmektedir.

Böylece, lipid bazlı mikroköpükçüklerin hazırlanmasındaki temel iki komponentden biri, doğal hücre membranlarının yapı taşı olan uzun açil hidrokarbon zincirli fosfolipid, diğeri ise genellikle polietilen glikol (PEG) içeren bir emülsiyonlaştırıcı olmaktadır. PEG molekülü gaz etrafındaki monotabakanın yüzey gerilimini büyük oranda düşürdüğü ve gazın çözünmesini engellediği belirtilmektedir (Duncan ve Needham, 2004). Yakın zamana kadar, mikroköpükçükleri oluşturan tabakanın monomoleküler bir yapıda olduğu, tüm komponentlerin homojen bir şekilde ve teorik kompozisyonlarda birbiri ile karıştığı kabul edilmekte idi (Klibanov ve ark., 2010; Unger ve ark., 2004). Fakat, ilk defa Borden ve ark. (Borden ve ark., 2006; Borden ve ark., 2004) tarafından değişik hidrokarbon uzunluklarına sahip fosfolipit ve emülsiyonlaştırıcıdan (tek veya çift hidrokarbon zinciri içeren emülsiyonlaştırıcı) oluşan hava esaslı mikroköpükçüklerle floresan mikroskopu kullanarak yaptıkları çalışmalar, bu genel görüşü destekler nitelikte değildir. Yapılan bu çalışmalar gaz etrafındaki tabakanın polikristal bir yapıda olduğunu (Kim ve ark., 2003), fosfolipitler ve emülsiyonlaştırıcı olmak üzere iki ayrı kristal fazın oluştuğu (Borden ve ark., 2006; Borden ve ark., 2004) ve bunun da mikroköpükçüklerin mekanik özelliklerini etkilediğini ortaya koymaktadır (Borden ve ark., 2004; Kim ve ark., 2003). Halbuki, gazın stabilizasyonu için gaz-sıvı arayüzeyinde moleküllerin sıkı (kondens) bir monotabaka oluşturabilmeleri; kanla akışa, fagositoza, ve plazma proteinleri tarafından adsorplanmaya karşı direnç gösterebilmeleri, yani, yeterince uzun *in-vivo* ömürlü olabilmeleri; mikroköpükçükler arası

koagülasyonun minimize edilmesi, monotabakanın istenen bir yapıda olması, ve bunun için monotabakanın yeniden tasarımı ile mümkün olabilecektir.

Genel olarak, fosfolipidin hidrokarbon zincir uzunluğunun artması ile birlikte hidrofobik etkileşimlerin artacağı ve dolayısıyla mikroköpükçüklerin stabilitesinin artacağı savunulmaktadır (Borden ve Longo, 2002; Kim ve ark., 2003). Nitekim, yapılan bir çalışmada değişik formülasyonlardaki mikroköpükçüklerin akustik davranışları floresans mikroskobu ile incelenmiş ve fosfolipidin hidrokarbon zincirinin uzunluğunun artması ile birlikte ultrason altında daha stabil oldukları görülmüştür (Borden ve Longo, 2002; Kim ve ark., 2003). Benzer bir çalışmada, çift (lipopolimer) ve tek hidrokarbon zincirli emülsiyonlaştırıcı kullanarak elde edilen mikroköpükçüklerde, beklenenin tam tersine, tek hidrokarbon zincirli emülsiyonlaştırıcı içeren mikroköpükçüklerin daha kohesif bir yapıya sahip olduğu gözlemlenmiştir (Borden ve ark., 2005). Buradan, gaz etrafında kohesif bir tabaka oluşumunda kavislenme (curvature), dolayısıyla moleküllerin şekli, büyüklükleri, ve moleküler etkileşimlerin önemli olduğu ortaya çıkmaktadır.

Öte yandan, mikroköpükçüklerin büyüklüklerinin ultrason altında difüzyonla (acoustic dissolution) olan ilişkisini incelemek üzere yapılan çalışmalarda çelişkili sonuçlar ortaya konmaktadır. Chomas ve ark., mikroköpükçüklerin büyüklüklerinin azalması ile birlikte difüzyon hızının arttığını ileri sürerken (Chomas ve ark., 2000; Chomas ve ark., 2001), Borden ve ark. stabil bir büyüklüğün olduğunu ve onun altında kayda değer bir difüzyonun olmadığını savunmaktadır (Borden ve ark., 2005).

Monomoleküler tabakanın gaz geçirgenliğinin, dolayısıyla stabilitenin, ajanların yüzey mikroyapısı ile ilişkili olduğu varsayımından hareketle, son yıllarda Borden ve ark. tarafından gerçekleştirilen bir seri çalışmada, tek hidrokarbon zincirli emülsiyonlaştırıcı ve değişik hidrokarbon uzunluklarına sahip fosfolipidlerden ( $DinPC$ ,  $n = 12-24$ ) oluşan mikroköpükçüklerin faz davranışı, morfolojisi, ve yüzey gerilimini azaltma kapasitesi Langmuir-Blodgett tekniği ve floresans mikroskobu ile incelenmiştir (Borden ve ark., 2004; Borden ve ark., 2010; Pu ve ark., 2006). Kısa hidrokarbon zincirli ( $n < 16$ ) fosfolipidlerin emülsiyonlaştırıcı ile karışabilir olduğu, ancak elde edilen mikroköpükçüklerin 24 saatten daha kısa bir sürede bozdukları gözlenmiştir (Borden ve ark., 2006). Langmuir-Blodgett izotermeleri her ne kadar fosfolipidin çift hidrokarbon zincirli emülsiyonlaştırıcı ile karışabilir olduğunu göstere (Chou ve Chu, 2002; Chou ve Chu, 2003), floresan mikroskop

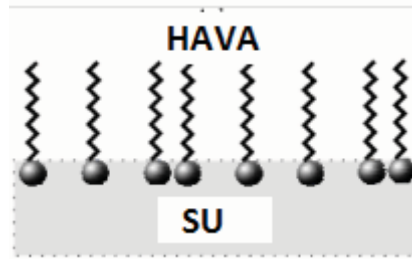
görüntülerinde uzun hidrokarbon zincirli ( $n \geq 16-24$ ) fosfolipidlerle faz ayrımı gözlenmiştir (Borden ve ark., 2006; Borden ve ark., 2004; Pu ve ark., 2006). Dolayısıyla, LB izotermi ve floresan mikroskop görüntüleri birbirini destekler nitelikte değildir. Burada, floresan mikroskobu altında görüntü elde edebilmek için mikroköpükçük bileşimine ilave edilen floresan moleküllerinin de etkisi olabileceği göz ardı edilmemelidir (Nakamura ve ark., 2007). Pu ve ark. tarafından yapılan floresan mikroskobu ve mikroelektrot tekniği kullanarak yapılan çalışmada, mikroköpükçüklerin mikroyapısının ve mikroyapıdaki kusurların (defeklerin) gaz geçirgenliğini önemli ölçüde etkilediği açıkça ortaya konmaktadır (Pu ve ark., 2005). Görüldüğü üzere, homojen bir tabakanın gaz yüzeyinde adsorblanmış olması, mikroköpükçüklerin hem gaz difuzyonuna direnç gösterebilmesi hem de *in-vivo* ortamlarda fagositoz edilmeden kanda dolaşımı ve özellikle hedeflendirilmiş görüntüleme ve terapötik uygulamalardaki performansı açısından oldukça önemlidir.

Mikroköpükçüklerin gerçek anlamda uygulama bulabilmesi için büyüklükleri ve büyüklük dağılımı son derece önemlidir. Açıkça ortaya koymak gerekir ki, literatürde çalışılan mikroköpükçükler hemen hepsinin merkezinde gaz olarak hava kullanılmıştır ve büyüklük olarak istenilen düzeyde değildirler. Bazı çalışmalarda 20  $\mu\text{m}$  ve üzeri büyüklüklerden bahsedilmektedir (Borden ve ark., 2004; Talu ve ark., 2006). Vücuda enjekte edildiklerinde arteriyel ve kapiler damarlarda serbestçe dolaşabilmesi için mikroköpükçüklerin büyüklük olarak kırmızı kan hücrelerinden (8  $\mu\text{m}$ ) küçük olması gerekir (tercihen 3-5  $\mu\text{m}$ ). Dolayısıyla yapılan çalışmalardaki mikroköpükçükler gerçek ajanları temsil etmemektedir. Yine altını çizmek gerekir ki, yapılan tüm bu çalışmalarda mikroköpükçükler hemen hazırlandıktan sonra analizlerde kullanılmış, zaman içerisindeki mikroköpükçüklerin yapısındaki değişimler (raf ömrü) incelenmemiştir. Yaptığımız literatür taramaları sonucunda şu ana kadar yalnızca tek bir çalışmada mikroköpükçüklerin raf ömürlerine ilişkin veriler bulunmaktadır. Talu ve ark. fosfolipid (DSPC), emülsiyonlaştırıcı PEG<sub>40</sub>-stearat, gaz olarak hava, ve viskosite artırıcı ajanlar kullanarak farklı bir teknikle (mikroakışkanlı akış-odaklı sistem), birkaç aya kadar koagüle olmadan ve bozunmadan kalabilen monodispers mikroköpükçükleri üretmeyi başardıklarını belirtmektedir (Talu ve ark., 2006). Ancak, üretilen mikroköpükçüklerin büyüklüğü ortalama 51  $\mu\text{m}$  civarında olup, arteriyel ve kapiler damarlardan geçemeyecek kadar büyüktür. Müteakkip bir çalışmada, Hettiarachchi ve ark. mikroakışkanlı akış-odaklı sistem tekniğini kullanarak değişik monotabaka komponentlerinden oluşan ve merkezinde azot ve/veya okta-florasiklobutan (bir

perflorakarbon gazı) içeren büyüklükleri 5 µm'in altında kısmen monodispers mikroköpükçükler üretmeyi başarmışlardır (Hettiarachchi ve ark., 2007). Ancak, üretilen mikroköpükçükler sadece saatler mertebesinde stabil olarak kalabilmişlerdir.

### 2.3. Langmuir-Blodgett Monotabakası

Fosfolipidler, hücrelerde, membranlarının yapı taşı olup, yüzey aktif maddelerdir. Yüzey aktif maddeler, karakteristik olarak, hidrofobik (su sevmeyen) kuyruk ve hidrofilik (su seven) baş gruplarından oluşur. Sahip oldukları bu yapı sayesinde hava-su arayüzeyinde adsorplanarak yüzey gerilimini düşürme eğilimi gösterirler. Yüzey geriliminin düşmesi, moleküllerin hava-su arayüzeyinde oluşturdukları monotabakada paketlenmeleri, ve moleküller arası etkileşim ile yakından alakalıdır. Şekil 1'de görüldüğü üzere, yüzey aktif maddenin hidrofilik tarafı su fazına, hidrofobik zincir ise hava tarafına doğru yönelir. Bu moleküllerin çözelti içindeki ve arayüzeydeki davranışları hidrofilik ve hidrofobik grupların fiziksel ve kimyasal özellikleri ile belirlenir. Bu açıdan hidrokarbon kısmının şekli, büyüklüğü, ve aynı şekilde hidrofilik grubun büyüklüğü, şekli, ve taşıdıkları elektriksel yükleri önemlidir (Chatterji ve Rajdev, 2008). Ayrıca ara yüzeyde çözünmeyen monotabaka oluşturabilmek için malzemenin hidrokarbon zincir uzunluğunun yeteri kadar uzun olması gerekir. Eğer zincir 12 hidrokarbondan kısa ise, bu malzeme suda çözünebilir durumdadır ve arayüzeyde monotabaka oluşumu mümkün değildir. Diğer yandan, çok uzun hidrokarbon zincir yapısında su yüzeyinde kristallenme oluşumuna neden olur (Gaines, 1966).



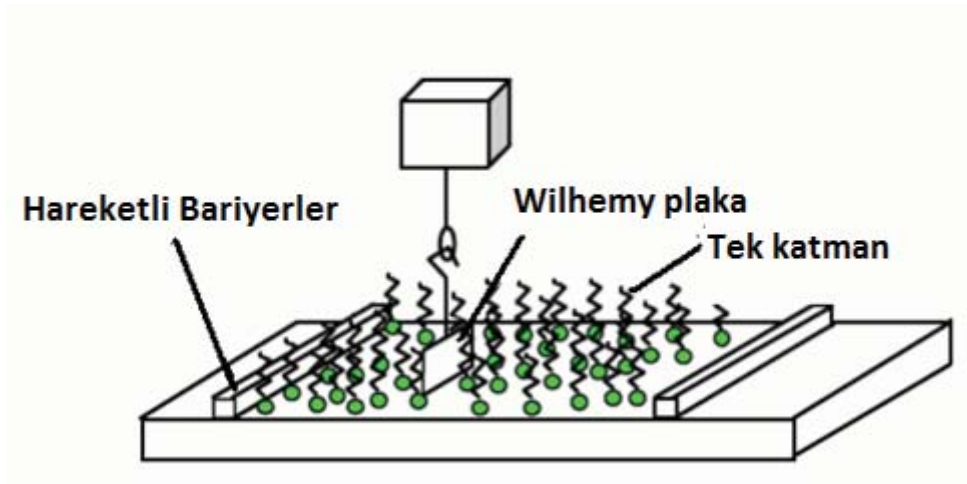
Şekil 1.Hava-Su arayüzeyinde monotabaka oluşumu

Şekil 2'de görüldüğü gibi Langmuir-Blodgett (LB) monotabakaları, LB teknesi üzerinde oluşturulur. LB cihazı, alt faz çözeltinin doldurulduğu bir tekne, yüzey gerilimi veya basıncının ölçüldüğü Wilhelmy plaka ve iki hareketli bariyerden oluşur (Moghaddam ve ark.,

2011). Uygun çözücü ile çözülmüş olan yüzey aktif madde, mikroşırınga yardımıyla LB tekensindeki sıvı yüzeyine dağıtılır. Çözücü buharlaştıktan sonra yüzeyde monotabaka yapısı oluşur. Hava-su arayüzeyindeki monotabakanın davranışı ve yönelimi hareketli bariyerlerin pozisyonları değiştirilerek kontrol edilebilir. Monotabaka bariyerler yardımıyla sıkıştırılarak molekül başına düşen alan küçülür (Chatterji ve Rajdev, 2008; Fuller, 2003; Moghaddam ve ark., 2011). Bu durum, saf yüzey ve monotabaka ilave edildikten sonraki yüzey arasında farklı yüzey gerilimi oluşmasına neden olur. Hava-su arayüzeyinde, monotabakanın varlığındaki yüzey gerilimi suyun yüzey geriliminden çıkarılarak yüzey basıncı hesaplanır:

$$\pi = \gamma - \gamma_o \quad (1)$$

Burada,  $\pi$  yüzey basıncını (mN/m),  $\gamma$  suyun yüzey gerilimini ve  $\gamma_o$  'de yüzeyde monotabaka varken ölçülen yüzey gerilimini temsil etmektedir (Moghaddam ve ark., 2011).

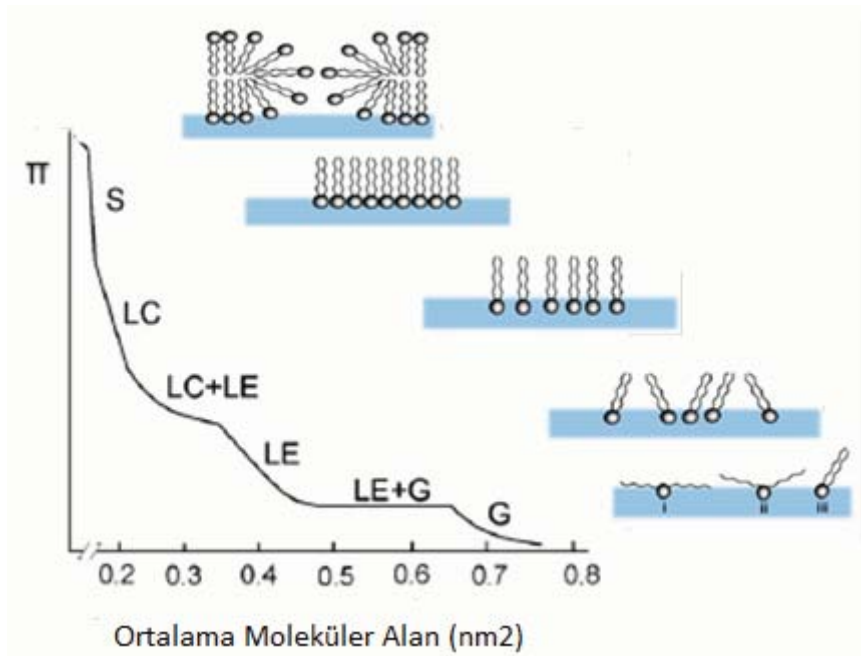


Şekil 2. Langmuir-Blodgett teknesi

Malzeme yüzeye yayılmadan önce Wilhelmy plakası altfaza batırılır ve bu plaka monotabakanın sıkıştırılması boyunca sistemin yüzey basıncını ölçer. Bu ölçüm LB monotabakalarının karakterizasyonu açısından oldukça önemlidir. Monotabaka üzerine farklı kuvvetler etki yapmaktadır. Aşağı doğru yer çekimi ve yüzey gerilimi, yukarı doğru ise kaldırma kuvvetleri etkilidir. Genellikle, hassas bir şekilde ölçülen bu kuvvetler, plakanın boyutlarından yararlanılarak yüzey gerilimine çevrilir. Sıkıştırma boyunca ölçülen yüzey basınçları, ortalama molekül başına düşen alan ile ilişkilendirilerek yüzey basıncına karşı moleküler alan izotermi elde edilir (Chatterji ve Rajdev, 2008; Moghaddam ve ark., 2011).



LB monotabakadaki moleküller arası etkileşimler, bu moleküllerin ara yüzeydeki yönelimleri ile ilgili çeşitli bilgiler, LB tekniği kullanılarak elde edilen yüzey basıncı ( $\pi$ )-ortalama moleküler alan (A) izoterminden elde edilebilir (Chatterji ve Rajdev, 2008; Moghaddam ve ark., 2011).  $\pi$ -A izotermi moleküllerin iki boyuttaki düzenleri ve yine iki boyuttaki moleküller arası etkileşimleri hakkında bilgi verdiği için iki boyutlu model sistemleri için oldukça kullanışlı bir tekniktir (Degen ve ark., 2005). Monotabakanın sabit hızla bariyerler yardımıyla sıkıştırılması sırasında devamlı olarak yüzey basıncı kaydedilirken,  $\pi$ -A izotermi de ortaya çıkmaktadır. Şekil 3’de tipik bir LB izotermi ve sıkıştırma boyunca elde edilen fazlar ve moleküler oryantasyonları görülmektedir.



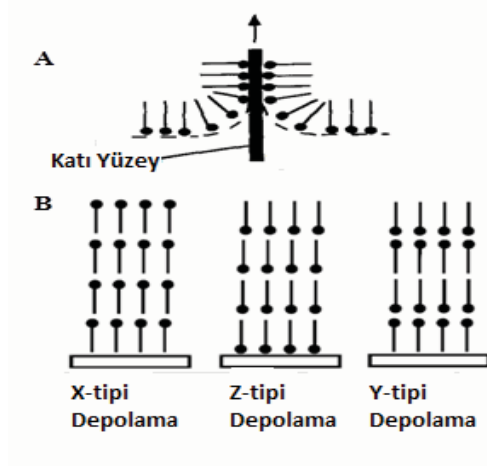
**Şekil 3.** Farklı faz davranışlarını gösteren  $\pi$ -A izotermi

İzoterm üzerinde gösterilen gaz fazında (G), yüzeyde moleküller birbirinde oldukça uzakta olup, moleküller birbiri ile etkileşim kuramamaktadır, bu sebepten dolayı yüzey basıncı yaklaşık olarak sıfırdır. Yüzeydeki gaz fazın sıkıştırılmasıyla birlikte, yüzey basıncının sabit olduğu bölge göze çarpmaktadır. Bu bölgedeki filmde, gaz ve genişletilmiş-sıvı (liquid expanded) fazları bir arada bulunmaktadır. Genellikle, bu faz değişimi birinci derece termodinamik geçiş olarak düşünülür. Daha fazla sıkıştırma ile birlikte, moleküller daha fazla birbirine yaklaşmaya ve etkileşmeye başlarlar. Bu geçiş, genişletilmiş-sıvı (liquid expanded) (LE) fazı temsil eder. Moleküler alanın kademeli olarak küçültülmesiyle, moleküller daha düzenli hale geçmeye başlarlar ve sıkışık-sıvı faz (condensed) (LC)

görülmeye başlar. Yüzey basıncının sabit olduğu, LE ve LC fazın bir arada olduğu ikinci geçiş bölgesinden sonra sıkıştırılmaya devam edilmesiyle birlikte moleküller daha çok birbirine yaklaşarak sıkışık-sıvı fazı meydana getirirler. Daha fazla sıkıştırma ile de moleküller daha düzenli bir yapı olan katı (solid) faza geçerler. Bu fazda moleküller arası etkileşimler oldukça fazladır. Katı faza ulaştıktan sonra sıkıştırma işlemine devam edilmesi durumunda monotabaka yapısı bozulur. Bu durum çöküş (collapse) olarak adlandırılır. Bu durumda moleküller daha fazla sıkıştırılmadığı için iki boyutlu yapının bozulması söz konusu olur (C.PETTY, 1996; Chatterji ve Rajdev, 2008; Moghaddam ve ark., 2011).

#### **2.4. LB Filmlerinin Katı Yüzeyle Aktarılması**

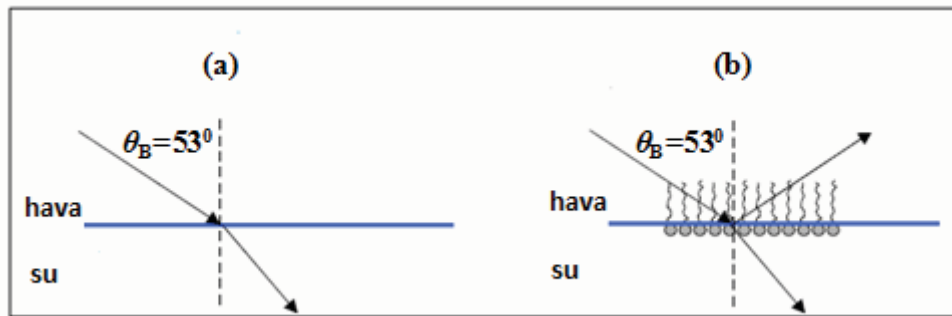
Hava-sıvı arayüzeyindeki monotabakanın katı bir yüzeye aktarılması Langmuir-Blodgett tekniği kullanarak yapılabilmektedir. Bu yöntemde, bilgisayarlı geri bildirim sistemi yardımıyla bariyerlerin hareketleri ayarlanarak sabit yüzey basıncında katı tabakanın monotabaka doğru aşağı ya da yukarı batırılmasıyla transfer işlemi gerçekleşir. Bu yöntemle kaplanan filmler Langmuir-Blodgett (LB) filmleri olarak adlandırılır. Bu depolama yönteminde, numune yüzeye yayılmadan önce katı plaka alt faza yerleştirilir. Daha sonra numune yüzeye yayılır ve kaplamanın yapılacağı yüzey basıncına kadar sıkıştırılır ve Şekil 4 A'da görüldüğü gibi hidrofilik plakanın ara yüzeyden yukarı çekilmesiyle kaplama işlemi tamamlanır. Ayrıca, bu yöntem kullanılarak çok katmanlı LB filmleri de elde etmek mümkündür. Bu tarz filmler için transfer işlemi, Şekil 4-B'de gösterildiği gibi, katı yüzeyin hidrofilik ve hidrofobik olmasına bağlı olarak, sadece aşağı doğru (X-tipi depolama) yapılabilir, sadece yukarı doğru (Z-tipi depolama) yapılabilir ya da hem aşağı hemde yukarı doğru hareketle (Y-tipi depolama) yapılabilir (C.PETTY, 1996; Chatterji ve Rajdev, 2008). Kaplanan bu filmleri nanometre seviyesinde incelemek için genellikle yüksek çözünürlüklü Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) kullanılır (Zasadzinski ve ark., 1994).



Şekil 4. A) Monotabakanın katı yüzeye kaplanması B) Farklı tiplerde kaplanan LB filmleri

## 2.5. LB Monotabakalarının Brewster Açısı Mikroskobu (BAM) ile Karakterizasyonu:

Monotabakaların analizi için oldukça aydınlatıcı bir yöntem olan Brewster açısı mikroskobu (BAM) monotabakaların moleküler düzeyde morfolojilerini incelemek amacıyla kullanılmaktadır (Degen ve ark., 2005). Monotabakaları incelemeye floresan mikroskobu oldukça popüler olmasına rağmen, floresan probunun monotabakanın moleküler düzenini etkileyebileceği düşünülmektedir. Bu yüzden, son yıllarda Brewster açısı mikroskobu (BAM) daha çok tercih edilen bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır (Kubo ve ark., 2001; Meunier, 2000).



Şekil 5. Hava-su arayüzündeki yansımanın ince film varlığında değişimi

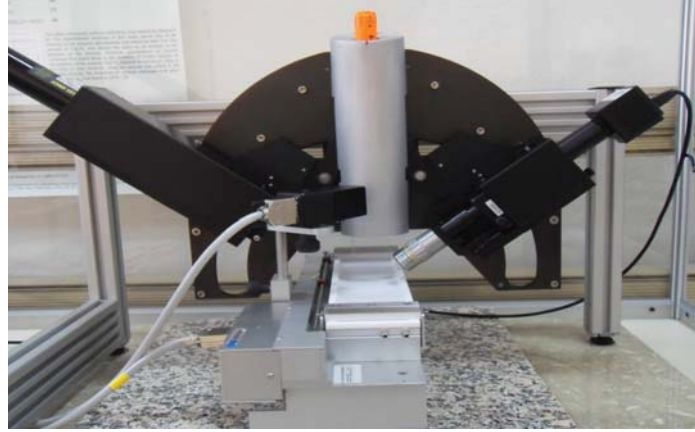
Brewster açısı mikroskobu, Langmuir-Blodgett teknesi üzerine monte edilir. Böylece, hava-sıvı arayüzündeki monotabakanın faz davranışı, morfolojisi ve homojenliği hakkında bilgi edinebilmek mümkündür. Monotabakaların BAM ile incelenmesi tekniği Brewster Açısı prensibine dayanmaktadır. Normal koşullarda farklı fazların oluşturduğu arayüzeye ışın

geldiğinde, bu ışının bir kısmı yansır. Ancak Şekil 5a'da görüldüğü gibi p-polarize olmuş ışın arayüze Brewster açısında gelirse, bu ışık arayüzeyden yansımaz.

Gelen ışının Brewster Açısı aşağıdaki denkleme göre hesaplanır:

$$\theta_B = \arctan\left(\frac{n_2}{n_1}\right) \quad (2)$$

Burada  $n_2, n_1$  farklı fazların refraktif indeksidir ve  $\theta_B$  ise bu ortamlar için hesaplanan Brewster açısıdır. Örneğin su-hava arayüzeyi için refraktif indeks 1.333'tür ve Brewster Açısı da  $53^0$ 'dir.



**Şekil 6.** Brewster Açısı Mikroskobu (BAM)

Şekil 6'de, bir HeNe lazer, iki polarizör ve bir CCD kameradan oluşan Brewster Açısı Mikroskobu (BAM) gösterilmektedir. Gelen lazer ışını ilk polarizör tarafından polarize edilir. Yüzeyden yansıyan ışın ise ikinci polarizörden geçerek CCD kameraya ulaşır. Monotabakanın görüntüsü çekilmeden önce siyah cam plaka suya geçen gelen ışını absorplaması için Langmuir teknesine yerleştirilir. Daha sonra kanal su ile doldurulur ve yüzeyden herhangi bir yansıma olmaması için gelen ışının açısı suyun Brewster Açısında ( $53^0$ ) olacak şekilde mikroskobun ayarları yapılır. Yüzeğe numune dağıtıldığında da yüzeyden yansıyan ışınlar CCD kamera tarafından kaydedilir. Bariyerle sıkıştırma devam ederken monotabakanın farklı yüzey basınçlarındaki görüntüleri çekilir ve dijital olarak kaydedilir. Brewster Açısı Mikroskobu kullanılarak, monotabakadaki değişimler LB ölçümüne eş zamanlı olarak gözlemlenebilir (BAM300, 2005; Hernández, 2010).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

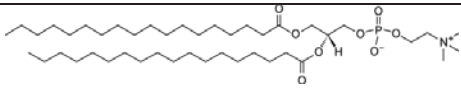
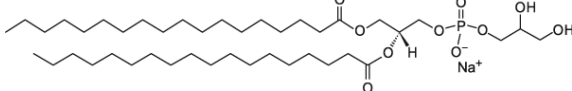
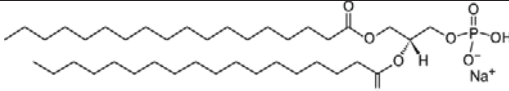
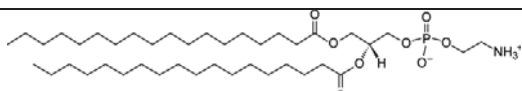
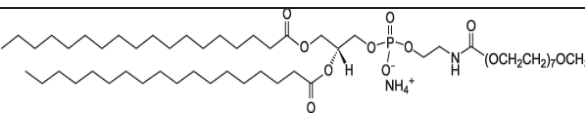
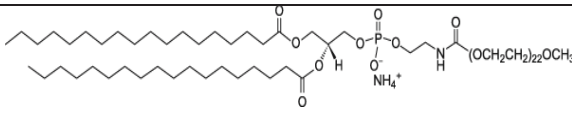
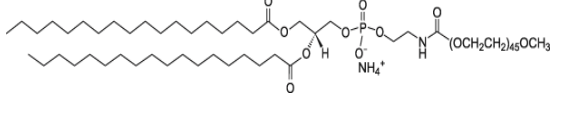
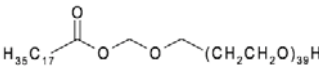
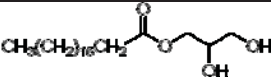
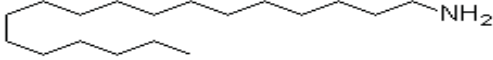
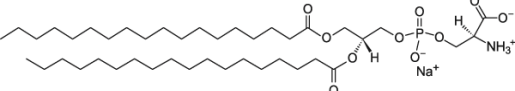
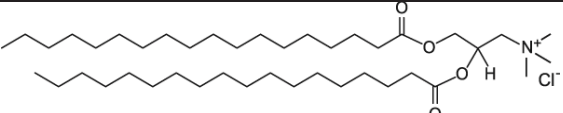
#### 3.1. Malzemeler

Bu çalışmada kullanılan malzemelerden distearol glisero fosfokolin (DSPC, %99), distearol glisero fosfat (DSPA, %99), distearol glisero fosfoethanol amin (DSPE), Polietilen glikol-40-stearat (PEG40St), kolesterol stearat, stearyl amine (St-Amin), stearyl gliserol (St-Gly), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)'dan, distearol glisero fosfogliserol (DSPG, %99) ve farklı PEG zincir uzunluğuna sahip lipopolimerler (DSPE-PEG<sub>n</sub>, n=350, 1000, 2000), biyotinlenmiş distearol glisero fosfoethanolamine-Polietilen glikol, distearol glisero fosfoserin (DSPS), DOTAP, Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) firmasından temin edildi. Bu malzemelerin kimyasal yapıları Tablo 2'de gösterilmiştir. Ayrıca çözücü olarak kullanılan kloroform Sigma Aldrich (St. Louis, MO) firmasından, metanol ise Merck firmasından satın alındı. Epidermal büyüme faktörü (EGF-Biotin) Ebioscience (San Diego, CA)'dan; Floresan DHPE, streptavidin, streptavidin-fitoeritrin Invitrogen'den; Biotinlenmiş BSA Thermo Scientific (Rockford, IL)'den temin edildi.

#### 3.2. Monotabakanın Moleküler Seviyede Tasarımı ve Karakterizasyonu:

Monotabakanın moleküler seviyede karakterizasyon çalışmaları için başlıca Langmuir-Blodgett Film tekniği (LB), Brewster Açısı mikroskobu (BAM) ve Atomik Kuvvet Mikroskobundan (AFM) faydalanıldı. LB tekniği kullanılarak hazırlanan karışımların yüzey basıncı-ortalama moleküler alan izotermeleri elde edildi. Bu amaçla, saf fosfolipid, saf lipopolimerler ve saf PEG40St çözeltileri uygun miktarda kloroform içinde çözüldü ve ultrasonik banyo yardımıyla homojen çözeltiler elde edildi. Benzer şekilde, ikili ve üçlü karışımlar için fosfolipidler ve emülsifier belli oranlarda karıştırılarak uygun çözücülerde çözüldü ve ultrasonik banyo yardımıyla homojen çözeltiler elde edildi. Hazırlanan bu karışımlar -20 °C'de saklandı ve karışımlar kullanılmadan önce ultrasonik banyoda bir süre bekletildikten sonra kullanıldı. Böylece çözeltilerde meydana gelebilecek çökelmeler giderilmiş oldu.

**Tablo 2.** Bu Çalışmada Kullanılan Bazı Malzemelerin Kimyasal Yapıları

Kimyasallar	Kimyasal Yapı
Distearol glisero fosfokolin (DSPC)	
Distearol glisero fosfogliserol (DSPG)	
Distearol glisero fosfat (DSPA)	
Distearol glisero fosfoetanol amine (DSPE)	
Distearol glisero fosfoethanol amine-Polietilen glikol 350 (DSPE-PEG350)	
Distearol glisero fosfoethanol amine-Polietilen glikol 1000 (DSPE-PEG1000)	
Distearol glisero fosfoethanol amine-Polietilen glikol 2000 (DSPE-PEG2000)	
Polietilen glikol stearat (PEG40St)	
Stearil Gliserol (St-Gly)	
Stearil amine	
Distearol glisero fosfoserine (DSPS)	
(DSTAP)	

Hazırlanan karışımların ve saf bileşenlerin Langmuir-Blodgett izotermi, yüzey kirliliğini önlemek amacıyla bir kabinle kapatılmış Langmuir miniteknesi (KSV Instruments Ltd., Helsinki, Finland) kullanılarak elde edildi. Langmuir miniteknesi teflon malzemedendir yapılmış olup üzerinde sıkıştırma gerçeğini gerçekleştirmek üzere iki adet bariyer bulundurmaktadır. Ölçüme başlamadan önce minitekne saf su ile dolduruldu ve bariyerlerin sıkıştırılmasıyla suyun temizlik kontrolü yapıldı. Daha sonra önceden hazırlanan çözeltiler Hamilton mikro şırınga kullanılarak su yüzeyine monotabaka oluşturacak şekilde dağıtıldı ve sıkıştırmaya başlamadan önce çözücünün uçması için 20 dakika bekletildi. Beklemenin sonunda 5 mm/dk hızla ilerleyen bariyerler yardımıyla oluşan monotabaka sıkıştırıldı. Bu sıkıştırma işlemi iki boyutlu monotabaka yapısının bozulduğu yüzey basıncına (kollaps basıncı) kadar devam ettirildi. Sıkıştırma süresince yüzey basıncı filtre kağıttan yapılmış boyutları belli bir levhası vasıtasıyla ölçüldü. İzoterm ölçümlerinin tekrarlanabilirliğini kontrol etmek amacıyla ölçümler en az üç kere tekrar edildi. İzotermi sıkıştırma-genişletme (açma-kapama) deneyleri periyodik olarak bariyerleri açıp tekrar sıkıştırarak yapıldı. Bu deneylerde, monotabaka hedeflenen yüzey basıncına kadar sıkıştırıldı ve genişletme (bariyerleri açma) yapılmadan önce moleküllerin düzenlenmesi için 20 dakika bekletildi. Her bir sıkıştırma genişletme için bu bekleme süresine uyuldu.

Langmuir teknesi üstüne Brewster Açısı Mikroskobu (KSV Optrel BAM300) monte edildi. Brewster Açısı Mikroskobu, hava-su arayüzünde oluşan monotabakanın yüzey morfolojisini incelemek amacıyla kullanıldı. Bu cihaz 10mW HeNe lazer, iki polarizör ve CCD kameradan oluşmaktadır. İlk polarizör tarafından polarize edilmiş yüzeye gelen lazer ışını yüzeyden yansdıktan sonra ikinci polarizörden geçerek CCD kameraya ulaşır. Monotabakalarının görüntüleri çekilmeden önce, yüzeyden herhangi bir yansıma olmaması için gelen ışının açısı suyun Brewster açısına ( $53^\circ$ ) eşit gelecek şekilde mikroskopta ayarlamalar yapıldı. Daha sonra örnek yüzeye yayıldığında, yüzeyden yansıyan ışın CCD kamera tarafından kaydedildi ve sıkıştırma boyunca farklı yüzey basınçlarındaki BAM görüntüleri çekildi, çekilen görüntüler dijital olarak saklandı.

Monotabakaların yüzey morfolojisini ve faz davranışlarını daha detaylı incelemek amacıyla Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) kullanıldı. AFM deneyleri için KSV miniteknesi kullanılarak Langmuir-Blodgett filmleri hazırlandı. Film kaplamaları yapılmadan önce mika yüzeyleri temizlendi. İlk olarak minitekne saf su ile dolduruldu. Numune yüzeye

şırınga ile yayıldıktan sonra istenilen yüzey basıncına ulaşınca kadar bariyerler sıkıştırıldı. Film kaplaması yapılmadan önce monotabakanın dengeye ulaşması için 20 dakika bekletildi. Dikey daldırma yöntemi kullanılarak 1 mm/dk daldırma hızıyla monotabaka mika yüzeyine transfer edildi ve kaplanan filmlerin AFM kullanılarak topografik ve faz görüntüleri çekildi. Tüm deneyler dolaşım su sistemi ile kontrol edilerek  $20 \pm 2^{\circ} \text{C}$ 'de yapıldı.

### 3.3. Langmuir-Blodgett İzotermelerinin Analizi

Langmuir-Blodgett izotermelerindeki değerler kullanılarak hesaplanan parametrelerden yararlanarak karışımlardaki moleküllerin karışabilirliğini ve bu moleküller arasındaki etkileşimler incelenebilmektedir (Wydro ve Witkowska, 2009). Aşağıdaki denklemde,

$$A_{ideal} = x_1 \cdot A_1 + x_2 \cdot A_2 \quad (3)$$

$A_{ideal}$  ideal karışımın ortalama moleküler alanını,  $x_1$ ,  $x_2$  karışımındaki bileşenlerin mol oranlarını,  $A_1$  ve  $A_2$  saf bileşenlerin incelenen yüzey basıncındaki ortalama moleküler alanlarını temsil etmektedir. Bu çalışmada, incelenen karışımlar için  $A_{ideal}$  değerleri ile hesaplanmış ve idealden sapmalar incelenmiştir. Ayrıca moleküller arasındaki etkileşimi daha iyi inceleyebilmek için karışımların artan alan değerleri ( $A_{artan}$ ) ve artan Gibbs enerji değerleri ( $\Delta G_{artan}$ ) aşağıda verilen formüller kullanılarak hesaplanmıştır (Chou ve Chu, 2003; Wydro ve Witkowska, 2009).

$$A_{artan} = A_{12} - (x_1 \cdot A_1 + x_2 \cdot A_2) \quad (4)$$

Burada,  $A_{12}$  karışımın ölçülen yani gerçek izotermdeki ortalama moleküler alan değeridir.  $A_{artan}=0$  olduğu durum bileşenlerin ideal olduğu yani bileşenlerin birbiri ile karışmadığını gösterir.  $A_{artan} \neq 0$  olduğu durum ise karışımın ideal olmadığını, bileşenlerin karışabilir olduğunu gösterir (Chou ve Chu, 2003).

$$\Delta G_{artan} = \int_0^{\pi} A_{12} - (x_1 \cdot A_1 + x_2 \cdot A_2) d\pi \quad (5)$$

Yukarıdaki denklemde ise  $N$  Avogadro sayısını,  $\pi$  ise yüzey basıncını göstermektedir (Chou ve Chu, 2003; Deleu ve ark., 1999; Gaines, 1966; Wydro ve ark., 2011; Wydro ve Witkowska, 2009).  $\Delta G_{artan} < 0$  olduğu durum karışımı oluşturan moleküller arası çekici



kuvvetlerin güçlü olduğunu,  $\Delta G_{artan} > 0$  olduğu durum ise moleküller arası itici kuvvetlerin etkili olduğunu gösterir (Chou ve Chu, 2003).

Ayrıca sıkıştırılabilirlik modülü ( $C_s^{-1}$ ) hesaplanarak monotabakanın faz davranışları, akışkanlıkları incelenebilir (Pavinatto ve ark., 2007; Wydro ve Witkowska, 2009). Monotabakadaki moleküllerin moleküler düzenini incelemek için izotermlerdeki verilerden yararlanarak sıkıştırılabilirlik ( $C_s^{-1}$ ) değerleri Denklem (6) kullanılarak hesaplanmıştır (Wydro ve ark., 2011; Wydro ve Witkowska, 2009).

$$C_s^{-1} = -A(d\pi/dA) \quad (6)$$

A: Ortalama moleküler alan ,  $\pi$ =Yüzey basıncına karşılık gelmektedir.

### 3.4. Mikroköpükçüklerin Hazırlanışı ve Karakterizasyonu

Farklı molar oranlarındaki lipid/emülsifier karışımları kloroformda çözüldü. Ortamdaki kloroform azot gazı ile uçurularak lipid/emülsifier filmi elde edildi. Oluşturulan film fosfat tamponu (PBS) ve propilen glikol (PG) karışımından oluşan (hacim oranı 4:1) çözelti ile 55°C'deki su banyosunda 2 saat hidrasyona tabi tutuldu. Su banyosundan çıkarılan örnekler problu sonikatör yardımı ile mikroköpükçük haline getirildi. Ortamda köpükçük sentezine katılmamış lipidlerin, misellerin ve istenmeyen büyüklükteki köpükçüklerin uzaklaştırılması için 2000 rpm'de 4 dakika santrifüj yapıldı ve istenmeyen parçacıklar bir şiringa yardımı ile atıldı. Yukarıda asıltı halinde bulunan mikroköpükçükler pH'ı 7.2 olan PBS tamponu ile yıkanıp tekrar santrifüj yapıldı. Yıkama sonucu, dipteki şeffaf sıvı şiringa vasıtası ile çekilerek atıldı. Üstte kalan mikroköpükçükler PBS ile ikinci bir yıkamaya tabi tutuldu. İkinci yıkamanın sonunda PBS:PG çözeltisinden 1 mL eklenerek 2 mL hacimli tüp içerisinde saklandı. Mikroköpükçük içeren tüpler 4 °C'de buzdolabında saklandı. Mikroköpükçüklerin karakterizasyonları bir gün sonra 4 °C'de stabilize edildikten sonra yapıldı. Mikroköpükçüklerin yüzey morfolojisini incelemek üzere, mikroköpükçük karışımına floresan molekülü olarak %1 oranında FITC bağlı bir lipid ilave edildi ve mikroköpükçükler benzer şekilde hazırlandı. Üretilen floresanlı mikroköpükçükler, floresan ve konfokal mikroskobu altında incelenerek fotoğrafları çekildi.

### 3.5. Mikroköpükçüklerin Statik Stabiliteilerinin İncelenmesi

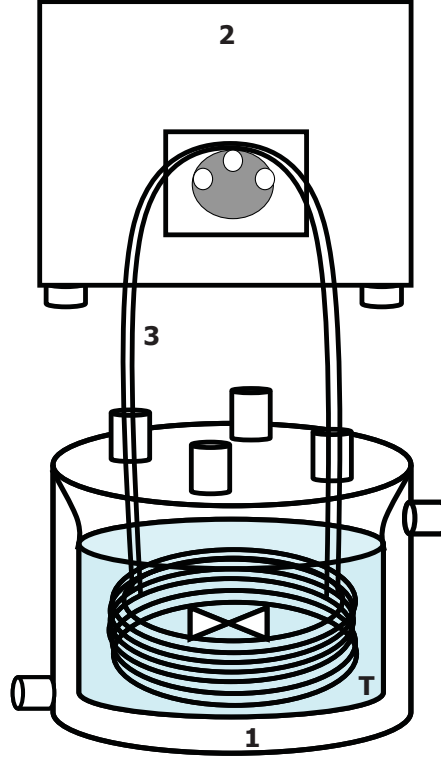
Mikroköpükçüklerin konsantrasyonu ve büyüklük dağılımları laboratuvarında optimizasyonu yapılan optik yöntemle tayin edildi. Bu amaçla, optik mikroskoba bağlı dijital bir kamera kullanıldı. Daha önce hazırlanan mikroköpükçük süspansiyonları farklı oranlarda pH'ı 7.2 olan fosfat tamponu (PBS) ile seyreltildi. Oluşturulan solusyondan 10 µL alınarak Thoma lamına damlatıldı ve optik mikroskopta 10X büyütmede incelendi. Daha sonra testi yapılacak olan mikroköpükçük süspansiyonları, sıcaklığı önceden set edilmiş termostatlı sıcak su banyosuna konuldu. Süspansiyonların konsantrasyonları sayılamayacak kadar azalana kadar saatte bir mikroskop altındaki görüntüleri alındı. Her bir örnek için belirli bir bölgeden fotoğraflar çekildi ve bu çekilen fotoğraflar ImageJ (NIH) programı ile analiz edilerek mikroköpükçüklerin büyüklük dağılımları saptandı. Thoma lamında lam ile lamel arasındaki boşluğun kalınlığı 1/10 mm'dir. Mikroskopta bakılan alanın kenar uzunlukları saptanarak bakılan bölgenin hacmi mm<sup>3</sup> cinsinden hesaplandı. mm<sup>3</sup>'ten mL'ye geçmek için bulunan sonuç 10<sup>3</sup> ile çarpıldı. (formülde 10<sup>6</sup> ile çarpılmasının nedeni, bakılan alanın kenar uzunluklarının mm'ye çevrilmesidir). Bakılan alandaki mikroköpükçükler ImageJ programı ile sayıldı ve aşağıda belirtilen formül ile mL'deki mikroköpükçük konsantrasyonu hesaplandı.

$$\text{Mikroköpükçük konsantrasyonu} = \text{alandaki toplam partikül sayısı} \times \text{dilüsyon faktörü} \times \text{alanın bir kenar uzunluğu} \times \text{alanın diğer kenar uzunluğu} \times (10^6 \text{ mm}^3/\text{ml})$$

### 3.6. Mikroköpükçüklerin Dinamik Stabiliteilerinin İncelenmesi

Üretilen mikroköpükçüklerin dinamik stabiliteileri farklı kayma gerilimi değerlerinde test edildi. Bu amaçla, Şekil 7'de gösterilen sabit sıcaklıkta 1.5 mm çapında şeffaf bir polietilen borudan, kapalı sistemde peristaltik pompa yardımı ile farklı hacimsel akış hızlarında fosfat tampon çözeltisi (PBS) geçirilerek farklı kayma gerilimi değerleri elde edildi. Sistemde ilk olarak, yaklaşık 3 µm boyutlarında polisitiren kürecikleri (Sigma Aldrich, MO) geçirildi. 15 ve 30 dakika sirkülasyon sonucunda sistemden alınarak boyut dağılımı ve

sayıca konsantrasyonları belirlendi. Tekrarlanabilir sonuçlar alındıktan sonra, mikroköpükçük deneylerine geçildi.

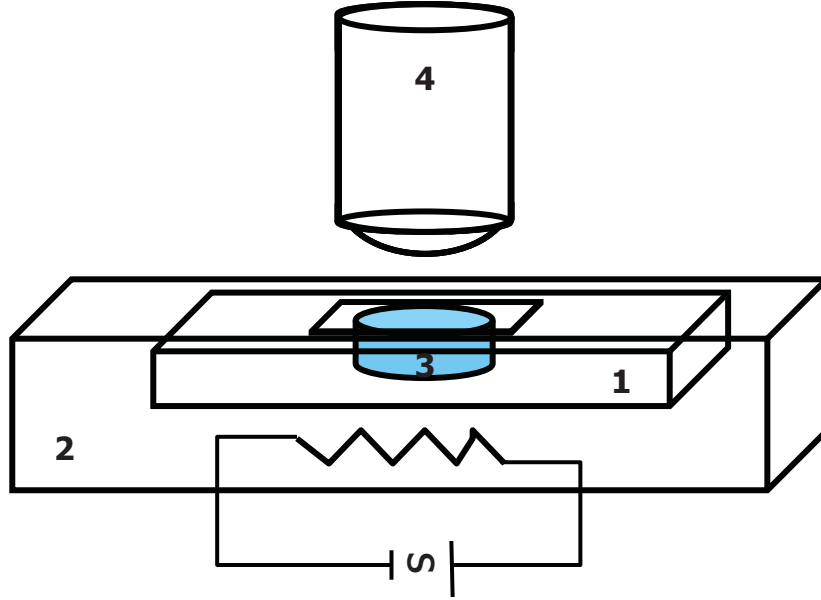


**Şekil 7.** Mikroköpükçüklerin kayma gerilimi altında dinamik stabilitelerin test edilmesi için tasarlanan deney düzeneği. (1) Sabit sıcaklık su banyosu, (2) peristaltik pompa, (3) şeffaf polietilen boru.

### 3.7. Mikroköpükçüklerin Bozunma Davranışının İncelenmesi

Mikroköpükçükler farklı oksijen doygunluk değerlerinde bozunmaları incelendi ve matematiksel modeli yapıldı. Bu amaçla, Şekil 8’de gösterilen deney düzeneği tasarlandı. Önce PBS (pH 7.2) çözeltisi vakum altında belli sürelerde, sonik banyo içerisinde tutularak çözülmüş olan oksijenin belli bir kısmının desorbe olması sağlandı. Bu işlem sonucunda, çözeltinin hava doygunluğu bir oksijen probu ile ölçüldü (Orion, Thermoscientific). Daha sonra bir mikroskop lamının oyularak bir başka mikroskop lamı üzerine yapıştırılmasıyla oluşturulan 300 µl hacmindeki dairesel kuyucuğa, hava doygunluğu belirlenmiş olan çözeltiden 270 µl konuldu. Üzerine 5 µl mikroköpükçük enjekte edildi ve sistem tam olarak kapatıldı. Mikrokiyucuk, sabit sıcaklık için sabit sıcaklık hücresinin içerisine yerleştirildi.

Mikroköpükçüklerin çözünmeleri, hava doygunluğu bilinen çözelti içerisinde, 38 °C sabit sıcaklıkta, optik mikroskop altında 100X objektif ile izlendi. Bu işlem, oksijen doygunluğu  $f=0.3$ ,  $f=0.7$  ve  $f=1$  olan çözeltiler için tekrarlandı.



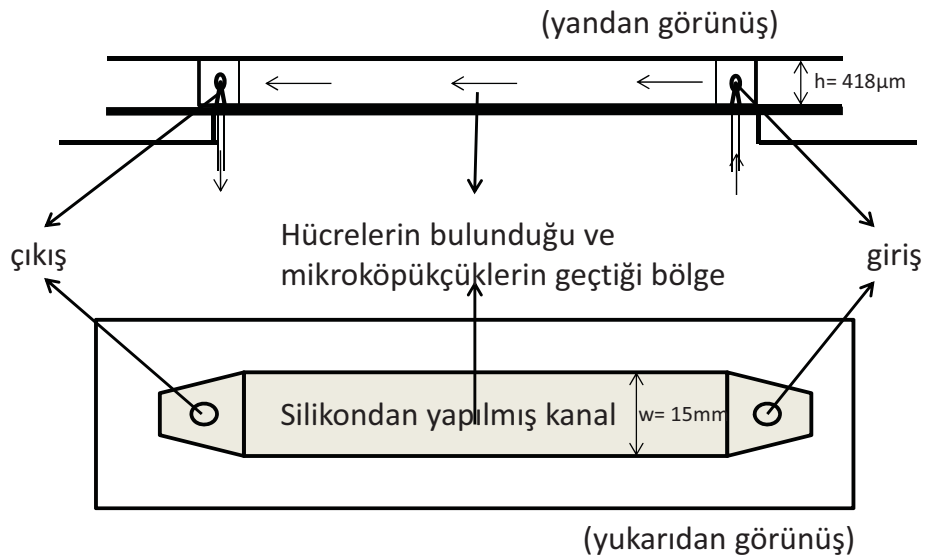
**Şekil 8.** Mikroköpükçüklerin boyutlarının sabit sıcaklıkta optik mikroskop altında izlnmesi için tasarlanan deney düzeneği

### 3.8. Hedeflenebilir Mikroköpükçüklerin Hazırlanması ve İn-Vitro Deneyler

Mikroköpükçük karışımına %8 oranında biotinlenmiş lipid katılarak mikroköpükçükler benzer şekilde hazırlandı. Mikroköpükçük zarına ne kadar ligand bağlanacağı tespiti fitoeritrin ile bağlı streptavidin ile belirlendi. Hazırlanan mikroköpükçük süspansiyonları PBS ile seyreltilerek konsantrasyonları  $10^9$ 'dan  $10^7$ 'ye düşürüldü. Daha sonra bu süspansiyona farklı yüzdelerde streptavidin-PE (%0, %10, %25, %50, %75, %100, %200) eklendi ve 30 dakika çalkalamalı inkübatörde bekletildi. Fitoeritrinin ışıktan zarar görmemesi için gerekli önlemler alındı. Süspansiyonların olduğu tüpler ise alüminyum folyo ile sarıldı. Hazırlanan örneklerin floresan yoğunluğu akış sitometri ile tespit edildi. Floresan yoğunluğunun değişmediği yüzde değerinde doygunluğa ulaşıldığı varsayılarak, maksimum biyotin yoğunluğu belirlendi. Buradan, hedeflendirilmiş mikroköpükçük üretimi için gerekli streptavidin ve ligand oranları hesaplandı. Daha sonra üzerine belirlenen (% 200) oranda streptavidin eklendi ve çalkalamalı inkübatörde 30 dakika bekletildi. Son olarak bu karışımın

içerisine belirlenen (%200) oranda EGF (ligand, epidermal büyüme faktörü) eklenerek yine aynı inkübatörde 30 dakika bekletildi ve daha sonra kullanılmak üzere 4°C'ye alındı.

Hedeflendirilmiş mikroköpükçüklerin in vitro karakterizasyonu meme kanseri hücre hattı olan MDA-MB-231 ile yapıldı. Bu amaçla, Şekil 9'de verilen paralel akış düzeneği kuruldu. Düzenekte, sıvının akışı için belli boyutlarda silikondan yapılmış bir kanal kullanıldı. Hücrelerin üzerinde yetiştirildiği cam bir plaka bu kanalın üzerine kapatıldı. Akış için boru bağlantıları yapıldı. Cihazın giriş kısmına bir şırınga pompası bağlandı. Diğer çıkış kısmı ise akan sıvının dökülmesini engellemek için bir beherin içine alındı. İçi HEPES tamponu dolu olan bir şırınga pompaya bağlandı. Şırınga ile cihazı bağlayan iki boru üç yollu vana ile bağlandı. Şırınga pompası çalıştırılarak ilk olarak borunun ve cihazın tampon çözeltisi ile dolması sağlandı. Daha sonra üç yollu vanadan mikroköpükçük solusyonundan 2 mL boruya verildi. Akış sırasında üç farklı akış hızı kullanıldı (76, 152 ve 229 s<sup>-1</sup>). Akış 3 dakika boyunca devam ettirildikten sonra borudan aynı akış hızlarında 3 dakika boyunca HEPES tamponu geçirilerek yıkama yapıldı. Daha sonra 5 farklı bölgeden görüntüler kaydedildi. Son olarak görüntü analiz yöntemi ile farklı akış hızlarında hangi mikroköpükçüklerin hücrelere bağlanma oranları tespit edildi. Kontrol olarak ise, ligand yerine bovin serum albumin (BSA, protein) içeren mikroköpükçükler ve henüz işaretlenmemiş mikroköpükçükler kullanıldı.



**Şekil 9.** Hedeflendirilmiş mikroköpükçüklerin ligand ile spesifik olarak bağlandığının testi için kullanılan akış kanalı

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Monotabakanın Moleküler Düzeyde Tasarımı ve 2D Karakterizasyonu

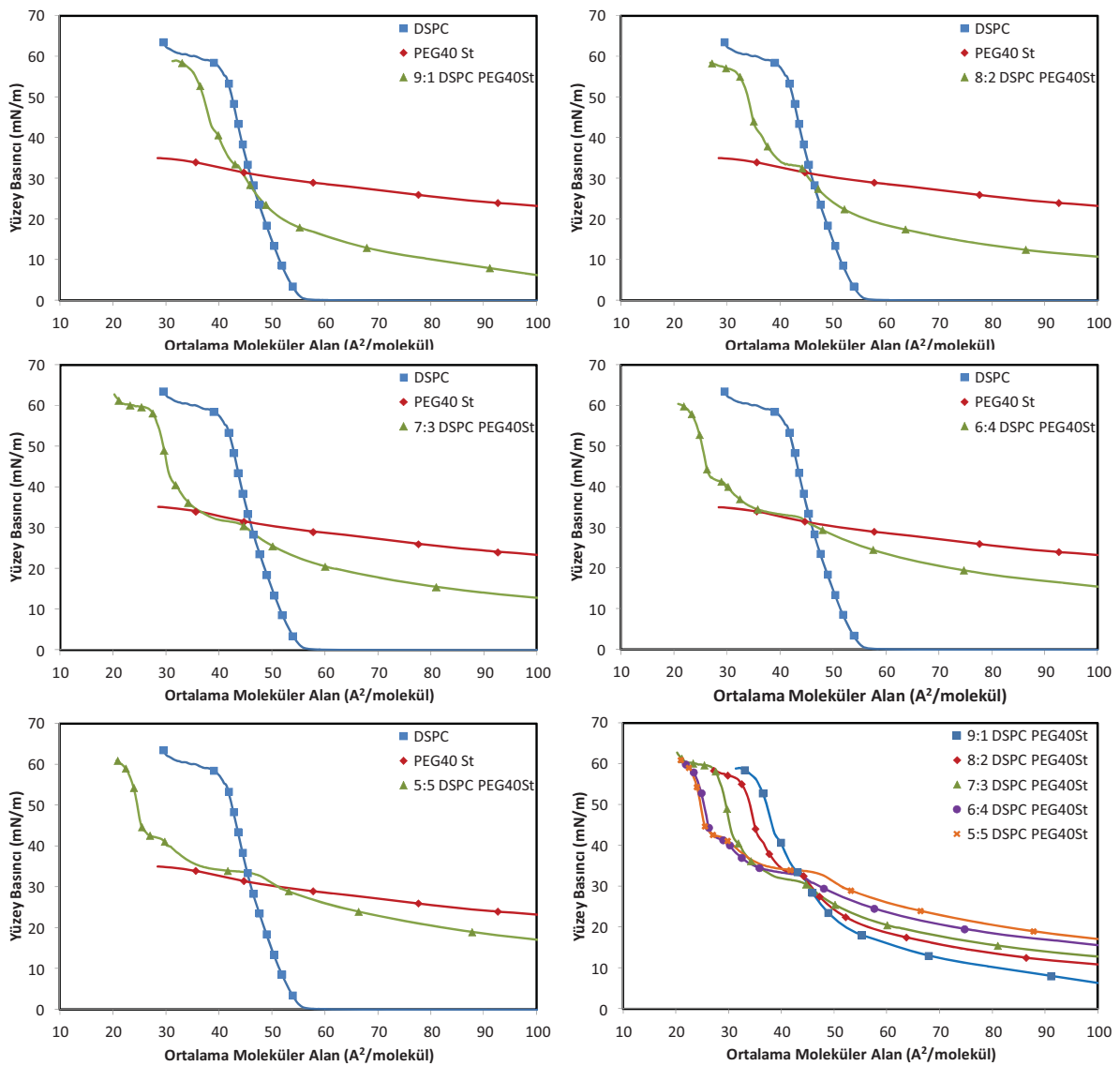
#### 4.1.1. DSPC:PEG40St Karışımları:

Doymuş fosfokolin (PC) ve polietilen glikol stearat (PEG40St) molekülü karışımları mikroköpükçük yapımında sıkça kullanılan malzemelerdendir. Bu moleküllerin birbiri ile etkileşimleri, karışabilirlikleri mikroköpükçüklerin kararlılığı ve dayanıklılığı açısından oldukça önem taşımaktadır. Literatürde 9:1 mol oranında PC ve PEG40St kullanılarak hazırlanan mikroköpükçükler üzerine yapılmış bazı çalışmalar mevcuttur (Kwan ve Borden, 2010; Talu ve ark., 2006). Bu çalışmada ise farklı mol oranlarında hazırlanan DSPC/PEG40 karışımları Langmuir–Blodgett (LB) metodu, Brewster Açısı mikroskobu (BAM) ve Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) kullanılarak moleküller arası etkileşimleri incelenmiştir. Langmuir-Blodgett metod ile elde edilen yüzey basıncı–ortalama moleküler alan izotermelerinden ( $\pi$ -A) yararlanarak bu moleküllerin birbiri ile ilişkisi araştırılmış, izotermelerdeki veriler kullanılarak bileşenlerin karışılabilirlikleri ve karışımların kararlılıkları hakkında yorum yapılmıştır. BAM ve AFM ile çekilen görüntülerde de karışımların mikro ve nano seviyede morfolojik özellikleri incelenmiştir.

*DSPC:PEG40St İkili Karışımlarının Yüzey Basıncı-Moleküler Alan İzotermeleri, BAM ve AFM Görüntüleri:*

Farklı mol oranlarında hazırlanan DSPC:PEG40St ikili karışımlarının yüzey basıncı ( $\pi$ ) - ortalama moleküler alan (A) izotermeleri her bir kombinasyon için oda sıcaklığında en az üç tekrar yapılarak elde edildi. Şekil 10'da saf DSPC ve saf PEG40St moleküllerinin monotabakalarının  $\pi$ -A izotermeleri gösterilmiştir. Hava-su ara yüzeyindeki DSPC monotabakası sıkışık (condens) faz özelliği göstermiştir. Bu bileşen için ölçülen monotabaka yapının bozulduğu yüzey basıncı (kollaps basıncı) yaklaşık 63 mN/m olarak ölçülmüştür. DSPC molekülü için bulunan bu izotermin literatürdeki diğer çalışmalar ile uyum olduğu görülmektedir (Borden ve ark., 2004; Chou ve Chu, 2003; Hollinshead ve ark., 2009; Kubo ve ark., 2001). DSPC monotabakasında 18 karbon içeren alifatik zincirler arasında kohesif etkileşimler kuvvetli olduğu için hava-su ara yüzeyinde bu monotabaka sıkışık (kondens) film

özelliği gösterir (Kubo ve ark., 2001; Tanwir ve Tsoukanova, 2008; Wydro ve ark., 2011). DSPC'nin tam tersi olarak hava-su arayüzeyinde genişletilmiş (expanded) film davranışı sergileyen PEG40St monotabakanın, iki boyutlu yapısının bozulduğu yüzey basıncı 35 mN/m civarında ölçülmüştür. Literatürde PEG40St monotabakasını inceleyen çalışmalarda bulunan izotermle Şekil 10'de gösterilen izoterm uyum içerisinde olduğu görülmektedir (Borden ve ark., 2004; Xing ve ark., 2010). PEG40St molekülünün yapısında bulunan geniş hidrofilik PEG zincirleri arasındaki sterik itici kuvvetler (steric repulsive forces) sıkıştırma boyunca PEG40St monotabakasının genişletilmiş fazda kalmasına neden olduğu düşünülmektedir (Shen ve ark., 2008).

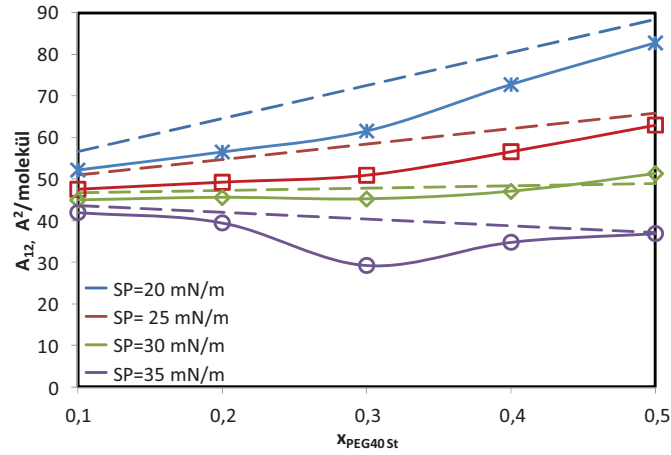


**Şekil 10.** DSPC:PEG40St karışımlarının Yüzey Basıncı-Ortalama Moleküler Alan ( $\pi$ -A) izotermi

Şekil 10'den görülebileceği gibi 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5 mol oranlarında hazırlanan DSPC:PEG40St karışımlarının izotermeleri saf DSPC'ye göre daha genişletilmiş bir film davranışı göstermektedir ve bu izotermeler 35 mN/m yüzey basıncına kadar DSPC'in ve PEG40St'nin izotermeleri arasında yer almaktadır. Karışımların başlangıçtaki ortalama moleküler alanları, karışımındaki PEG40St miktarının artırılmasıyla PEG zincirinin genişletici etkisinden dolayı artmıştır. Ayrıca karışımların izotermelerinde yaklaşık 35 mN/m yüzey basıncında bir plato gözlemlenmiştir. İzotermelerdeki bu plato bölgesi *Borden ve ark.* tarafından PEG40St molekülünün lipid/PEG40St karışımının monotabakasından ayrılışı olarak yorumlanmıştır (Borden ve ark., 2004). Karışımlardaki PEG40St miktarının artmasıyla bu platonun uzunluğunun arttığı görülmektedir. Ayrıca izotermelerde yaklaşık 42 mN/m civarlarında ikinci küçük bir plato da göze çarpmaktadır. 35 mN/m civarındaki plato bölgesinde olduğu gibi bu platonun uzunluğu da karışımındaki PEG40St miktarının artmasıyla uzamıştır. Bu sonuca benzer olarak, *Xing ve ark.*'nin çalışmalarında Span60 ve PEG40St içeren farklı mol oranlarında hazırlanan karışımların izotermelerinde de artan PEG40St miktarıyla bu plato bölgelerin uzadığı görülmüştür. Ayrıca 35 mN/m'den sonra ortaya çıkan ikinci küçük plato bölgesi de bu yazarlar tarafından PEG40St molekülünün monotabakadan kademeli ayrılışı olarak yorumlanmıştır (Xing ve ark., 2010).

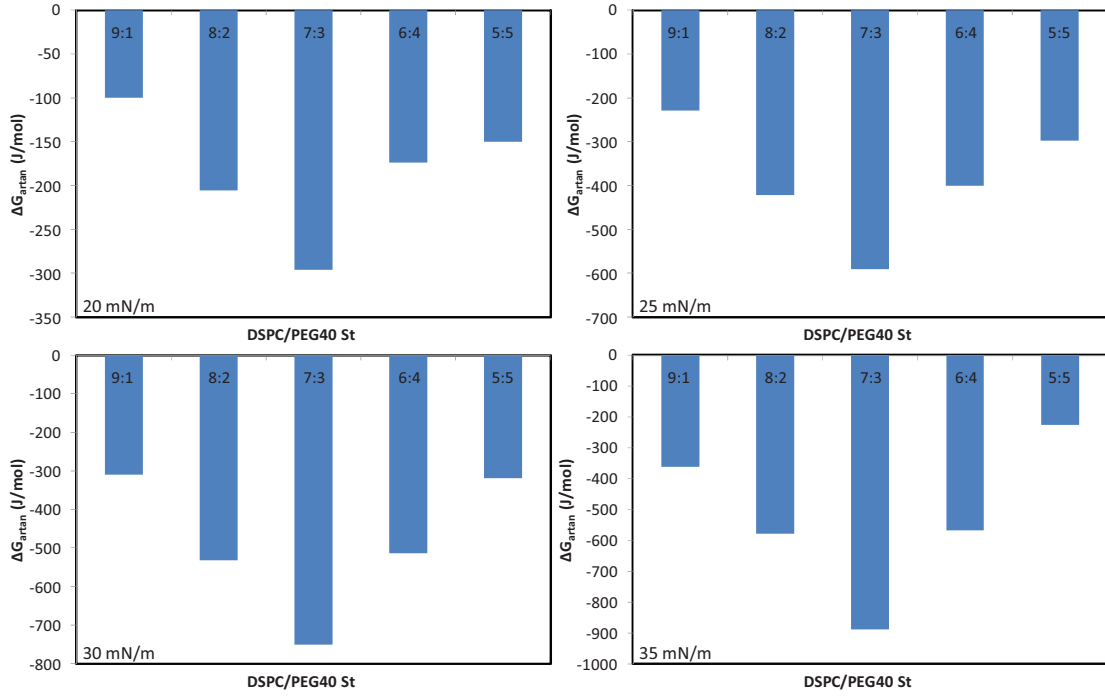
Bu karışımların  $A_{ideal}$  ve  $A_{artan}$  değerleri sırasıyla denklem (3) ve denklem (4) kullanılarak hesaplandı. Bilindiği üzere  $A_{artan}$  değerinin sıfıra eşit olması, karışımındaki bileşenlerin birbiri ile karışmadığı ve ideal bir karışım oluşturduğu anlamına gelmektedir. Diğer yandan ideallikten sapma ise karışımı oluşturan bileşenlerin birbiri ile karışabildiğini belirtir (Chou ve Chu, 2003; Tanwir ve Tsoukanova, 2008; Wydro ve Witkowska, 2009). İdeallikten negatif sapmalar bileşenler arasında çekici kuvvetlerin etkili olduğunu işaret ederken, pozitif sapmalar itici kuvvetlerin baskın olduğunu işaret eder (Wydro ve Witkowska, 2009). Bizim karışımlarımız için hesaplanan  $A_{artan}$  değerleri sıfırdan farklı olduğu için hazırlanan karışımların ideal olmadığını ve bileşenlerin birbiri ile karışabilir olduğunu ortaya koymuştur. Şekil 11 gerçek ortalama moleküler alan değerlerinin ( $A_{12}$ ) ideallikten farklı basınçlardaki sapmaları göstermektedir.  $A_{12}$  değerleri PEG40St'in mol oranının fonksiyonu olarak grafiğe aktarılmışken, hesaplanan  $A_{ideal}$  değerleri de kesik çizgilerle gösterilmiştir. Şekil 11'den görülebileceği gibi ideallikten negatif sapmalar dikkat çekmektedir. Yani karışımındaki moleküller arasındaki çekici kuvvetler baskın durumdadır. Ayrıca en fazla saptmaya 7:3 mol oranına sahip DSPC:PEG40St karışımında rastlanmıştır.





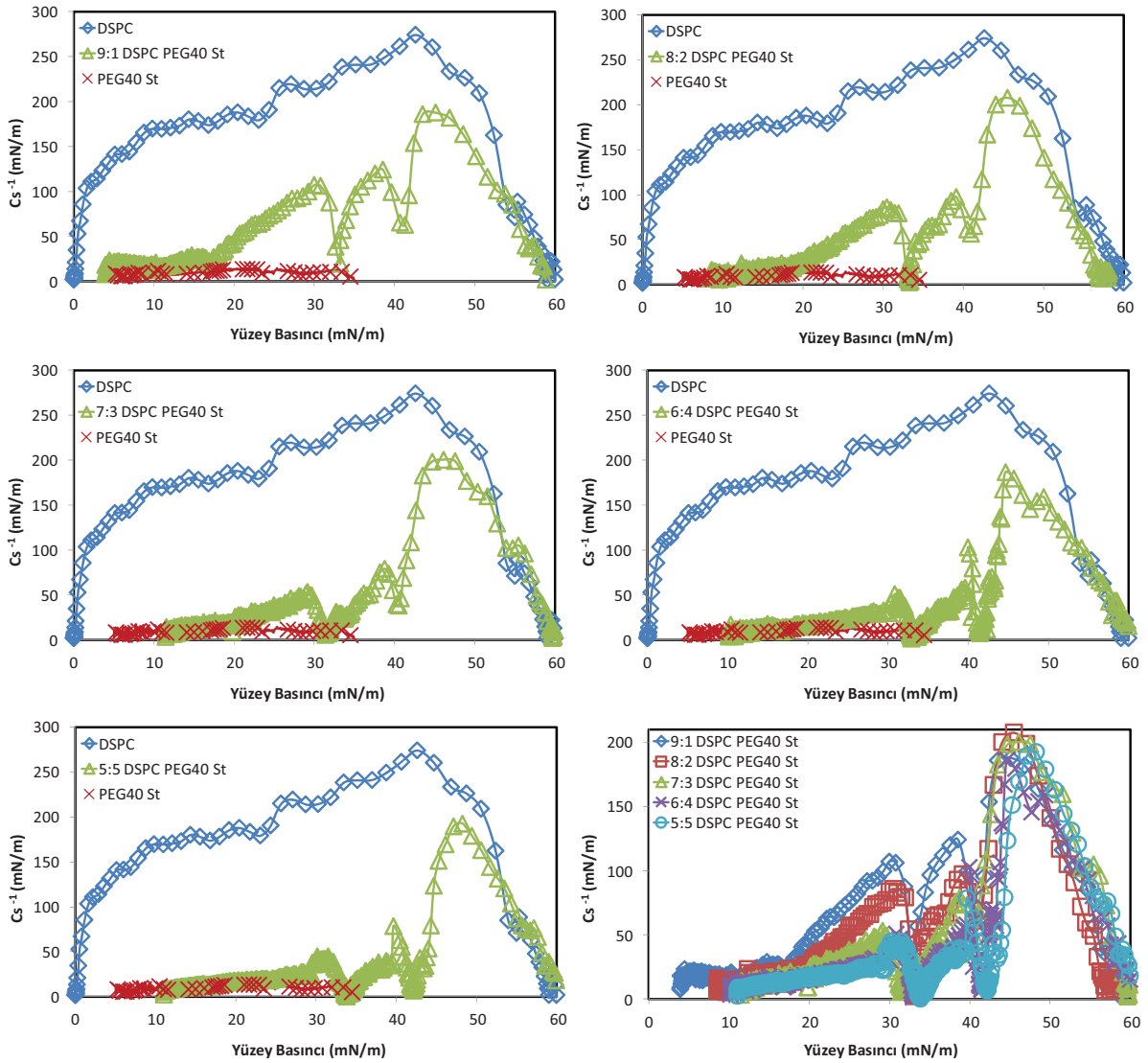
**Şekil 11.** Farklı mol oranlarında PEG40St içeren DSPC:PEG40St karışımlarının ortalama moleküler alan değerleri ( $A_{12}$ )

Karışımlardaki bileşenler arasındaki etkileşimler hakkında daha fazla bilgi sahibi olmak için karışımların artan serbest enerji ( $\Delta G_{\text{artan}}$ ) değerleri denklem (5) kullanılarak hesaplanmıştır.  $\Delta G_{\text{artan}}$  değerinin negatif olması incelenen moleküller arasında çekici kuvvetlerin baskın olduğunu gösterirken, pozitif olması ise itici kuvvetlerin baskın olduğunu göstermektedir (Chou ve Chu, 2003; Deleu ve ark., 1999; Gaines, 1966; Nakamura ve ark., 2007; Wydro ve ark., 2011; Wydro ve Witkowska, 2009). Şekil 12’de karışımlar için hesaplanan  $\Delta G_{\text{artan}}$  değerleri farklı basınçlarda grafiksel olarak verilmiştir. Tüm karışımlar için  $\Delta G_{\text{artan}}$  değerleri negatif bulunmuştur. Bu durumda karışımlardaki moleküller arasındaki etkili kuvvetler çekici kuvvetlerdir. Ayrıca karışımındaki PEG40St’nin mol oranı % 30’a ulaşıncaya kadar karışımındaki PEG40St miktarının arttırılmasıyla  $\Delta G_{\text{artan}}$  değerlerinin daha da negatifleştiği gözlemlenirken bu orandan sonra bu trendin bozulduğu fark edilmiştir. Bu sonuca göre  $x_{\text{PEG40St}}=0.3$  olduğu karışımında moleküller arası etkileşim diğer karışımlara göre daha kuvvetlidir. Benzer şekilde literatürde daha önce yapılan DSPC/Kolesterol karışımlarının incelendiği bir çalışmada, minimum  $\Delta G_{\text{artan}}$  değeri, kolesterol oranı %30 ( $x_{\text{Kolesterol}}=0.3$ ) olduğunda gözlemlenmiştir (Wydro ve ark., 2011).



Şekil 12. Farklı basınçlarda DSPC:PEG40St karışımların artan Gibbs enerjileri

Monotabakaların faz özellikleri ve faz değişimleri sıkıştırılabilirlik modülü ( $C_s^{-1}$ ) grafiklerinden yararlanılarak incelenebilir. Grafiklerde ortaya çıkan minimum noktaların faz geçiş noktaları olarak yorumlanabildiğine işaret eden çalışmalar mevcuttur (Keller, 2003; Risovic ve ark., 2011). Bu çalışmada saf bileşenler ve karışımlar için hesaplanan  $C_s^{-1}$  değerleri yüzey basıncına karşı grafiğe geçirilerek Şekil 13'de verilmektedir. Şekil 13'de gözlemlendiği gibi saf DSPC monotabakasının  $C_s^{-1}$  değerleri yüksektir ve iki boyutlu yapının bozulduğu yüzey basıncına (collapse pressure) ulaşıncaya kadar artan basınçla birlikte bu değerler de artmıştır. Çünkü DSPC molekülleri arasındaki etkileşimlerin çok düzenli olması yüzey basıncı-moleküler alan izotermelerinde sıkışık faz gösterimlerine ve yüksek ( $C_s^{-1}$ ) değerlerine sahip olmalarını sağlamıştır. Ayrıca yüksek ( $C_s^{-1}$ ) değerlerine sahip olmalarından dolayı sıkıştırma boyunca herhangi bir faz değişimine rastlanmamıştır (Hollinshead ve ark., 2009). DPPC ve DSPC molekülleri farklı hidrokarbon zincir uzunluklarına sahip olmalarına rağmen daha önce yapılan bir çalışmada DPPC için bulunan  $C_s^{-1}$  değerleri, DSPC'ye benzer şekilde iki boyutlu yapının bozulduğu yüzey basıncına ulaşıncaya kadar artmıştır (Lucero ve ark., 2008).

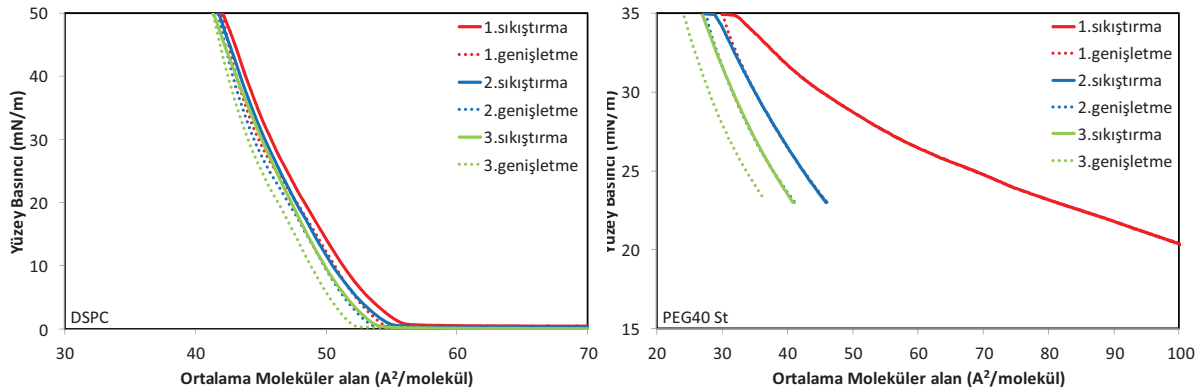


**Şekil 13.** DSPC:PEG40St karışımların yüzev basıncına karşı  $C_s^{-1}$  (mN/m) değerleri

PEG40St monotabakası için bulunan  $C_s^{-1}$  değerleri ise PEG zincirinin genişletici etkisinden dolayı düşüktür. Karışımların  $C_s^{-1}$  grafikleri ise saf bileşenlerinkinin arasında yer almıştır. Saf DSPC'ye kıyasla karışımların monotabakalarında sıkıştırılabilirlik değerleri düşmüştür. Düşük yüzev basınçlarında karışımdaki PEG40St miktarının artmasıyla  $C_s^{-1}$  değerleri azalmıştır ve yaklaşık 35 mN/m civarında minimum noktalar ortaya çıkmıştır. Bu minimum noktalar PEG40St molekülünün monotabakadan ayrılışını temsil edebileceği gibi moleküler düzendeki bir değişimi de temsil edebilir. Düşük yüzev basınçlarındaki bu davranışın aksine 35 mN/m'den sonraki basınçlarda  $C_s^{-1}$  değerleri artma eğilimi göstermişlerdir. Ancak 45mN/m civarlarında ikinci minimum noktalar ortaya çıkmıştır. Bu durum PEG40St molekülünün hava-su arayüzeyinden kademeli olarak ayrılışına işaret

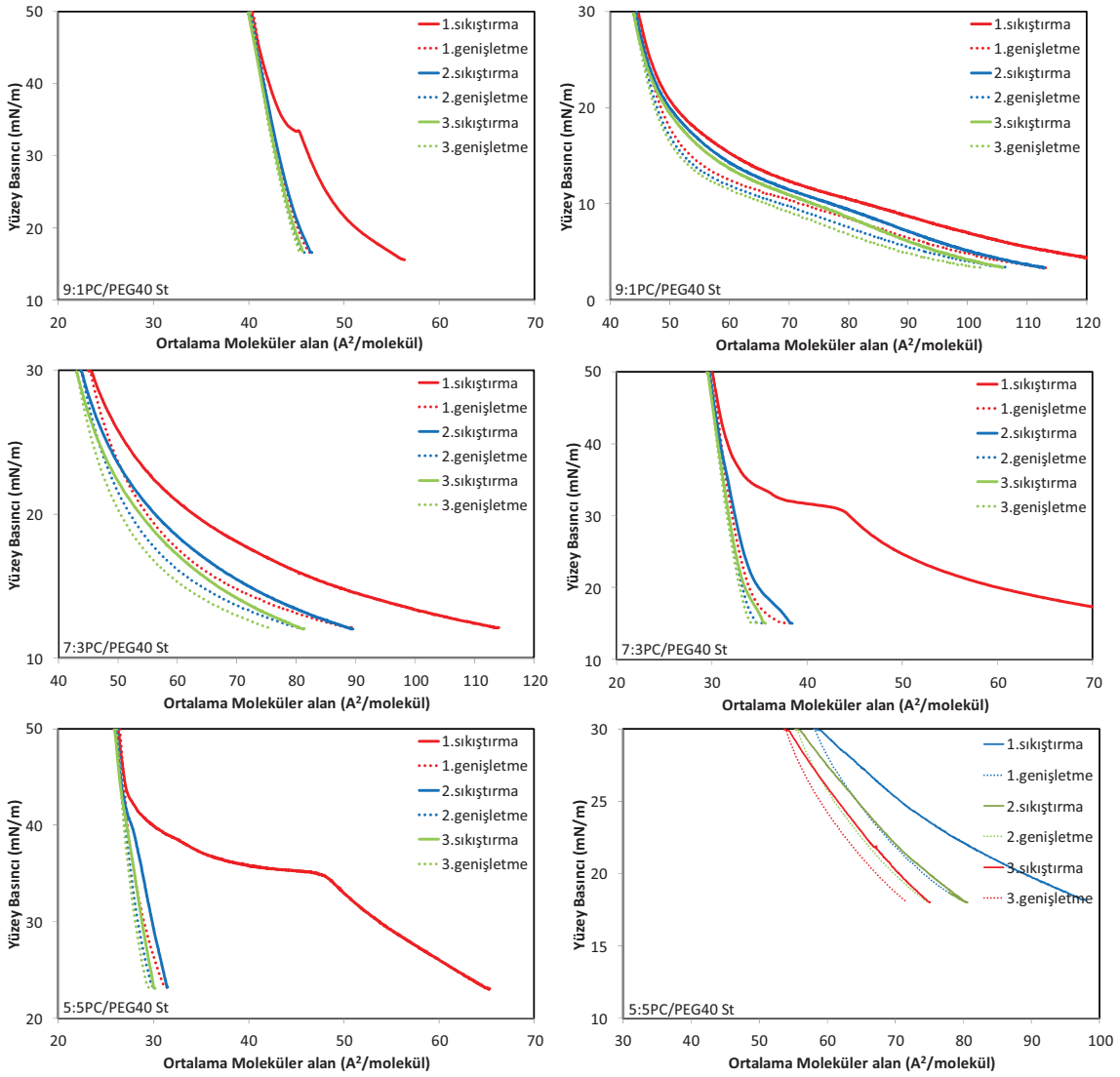
edebileceği gibi moleküllerin daha sıkışık film yapısına geçişine de işaret edebilir. Ayrıca 8:2 ve 7:3 karışımların  $C_s^{-1}$  değerlerinin 45mN/m'dan sonraki ulaştıkları maksimum noktalar diğer karışımlarinkinden daha yüksektir. PEG40St bileşeninin DSPC monota-bakasına eklenmesi sıkıştırılabilirliği etkilemiştir ve DSPC:DSPE-PEG2000 karışımlarında olduğu gibi film esnekliğini arttırmıştır (Chou ve Chu, 2003).

Sıkıştırma-genişletme (açma-kapama) döngüsü sırasında elde edilen Langmuir izotermi emülsifier molekülünün monota-baka yüzeyinden ayrılışından sonraki davranışını ve moleküllerin tekrar monota-baka düzenine geçip geçemediklerini incelenmek için kullanılabilir (Borden ve ark., 2004; Xing ve ark., 2010). Literatüre göre bu döngüler sırasında sıkıştırma izoterminin sola kayışı monota-bakadan molekül kaybını temsil eder. Eğer ilk sıkıştırma esnasında izotermde bir plato görülürse ve bu plato bölgesi diğer sıkıştırmalar sırasında da varlığını koruyorsa bu durum ise monota-baka yapısında geridönüşüme (reversibility) işaret eder (Lipp ve ark., 1998; Saad ve ark., 2009; Takamoto ve ark., 2001). Bu çalışmada, karışımların sıkıştırma-genişletme döngü deneyleri PEG40St molekülünün iki boyutlu yapısının bozulduğu yüzey basıncının (kollaps basıncı) altında 30 mN/m'de ve üstünde 50 mN/m'de gerçekleştirilmiştir. Şekil 14, saf DSPC ve PEG40St monota-bakalarının sıkıştırma-genişletme döngü izotermelerini göstermektedir. DSPC'nin ikinci ve üçüncü sıkıştırma izotermelerinin ilk izoterm göre çok az miktarda sola doğru kaydığı gözlemlenirken, saf PEG40St izotermelerinde sola doğru daha fazla kayma olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum PEG40St molekülünün yüzeyden kademeli olarak ayrılışını temsil edebileceği gibi PEG zincirinin paketlenme sonucu konfigürasyonundaki bir değişimi de temsil edebilir.



Şekil 14. Saf DSPC ve PEG40St'nin sıkıştırma-genişletme döngü izotermeleri

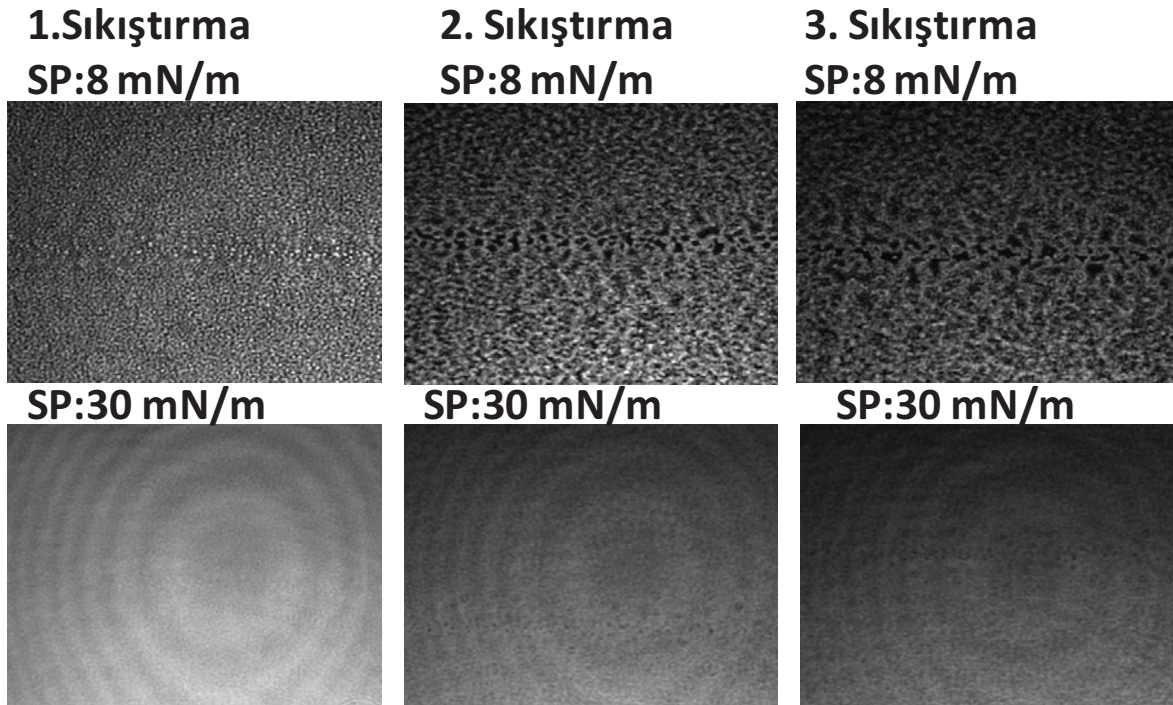
Saf bileşenlere ek olarak Şekil 15’de gösterildiği gibi DSPC:PEG40St karışımlarının sıkıştırma-genişletme döngüleri de incelenmiştir. 50 mN/m’ye kadar sıkıştırılıp açılan deneylerdeki sıkıştırma izotermelerinin sola kayma eğilimi, 30 mN/m’ye kadar sıkıştırılanlara göre daha fazla olmuştur. Bu durum yüzeyden daha çok molekül kaybını belirtebilir. Ayrıca ikinci ve üçüncü sıkıştırma izotermelerindeki kayma karışımındaki PEG40St miktarının artmasıyla artmıştır. Buna ilaveten karışımların ilk sıkıştırma izotermelerinde ortaya çıkan plato bölgesi diğer sıkıştırmalar sırasında moleküler tersinmezlik nedeniyle görülmemiştir. 50 mN/m’ye kadar yapılan sıkıştırmaların bitiş noktaları aynı yerde kesişmiştir. Yani bitiş noktalarında ortalama moleküler alan değerleri aynıdır. Literatürde yapılan bir çalışmada böyle bir durum ilk sıkıştırma sırasında yüzeyde herhangi bir molekül kaybı olmadığı şeklinde yorumlanmıştır (Baekmark ve ark., 1995). 30 mN/m’ye kadar yapılan döngülerde de sıkıştırma izotermelerinin bitiş noktaları her sıkıştırma ile daha küçük alanlara kaydığı görülmüştür. Bu sonucun nedeni, her bir sıkıştırma-genişletme sırasında gerçekleşen moleküler düzeyde konfigürasyon değişikliği olabilir.



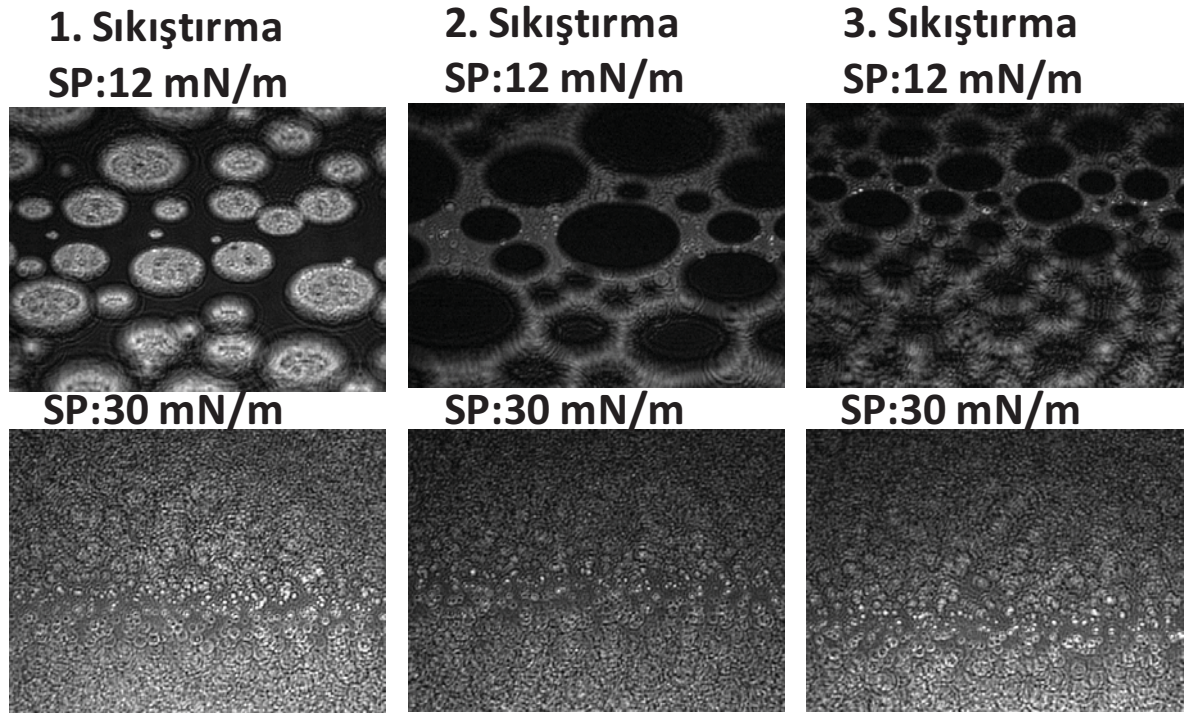
**Şekil 15.** DSPC:PEG40St karışımların sıkıştırma-genişletme döngü izotermeleri

Sırasıyla 30 mN/m ve 50 mN/m'ye kadar yapılan sıkıştırma-genişletme deneyleri boyunca 9:1 ve 5:5 karışımların Brewster Açısı Mikroskop (BAM) görüntüleri bu döngüler sırasında morfolojide meydana gelen değişiklikleri incelemek üzere elde edilmiştir. Şekil 15' de görülebildiği gibi 30 mN/m'ye kadar yapılan sıkıştırmalarda izotermelerde herhangi bir plato bölgesi görülmemiştir. Ancak Şekil 16 ve Şekil 17'de gösterildiği gibi düşük yüzey basınçlarında ikinci ve üçüncü sıkıştırmalar sırasında çekilen BAM görüntülerinde morfolojide değişiklikler göze çarpmaktadır. Lipopolimerlerde PEG zincir yapısında meydana gelen “bazlama (pancake)” yapısından “mantar (mashroom)” yapıya geçiş olarak bilinen yapısal değişimin (Jebrail ve ark., 2008; Naumann ve ark., 1999) BAM görüntülerindeki bu değişime neden olmuş olabileceği düşünülmektedir. Büyük olasılıkla bu değişimden dolayı

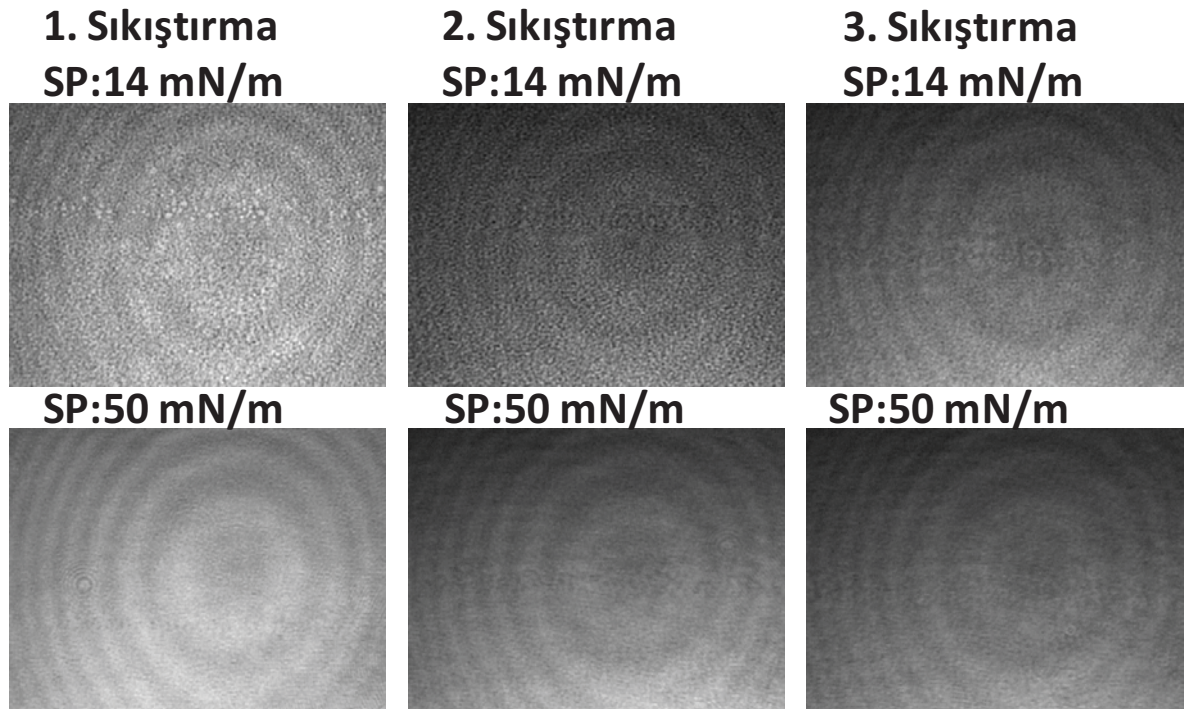
ilk sıkıştırma sonrasında PEG40St önceki konfigürasyona geri dönememiş, bunun sonucunda sıkıştırmalar sırasında görüntülerde farklılıklar ortaya çıkmıştır. Şekil 18 ve Şekil 19’da görüldüğü gibi yüzeyde çok az farklılıklar olmasına rağmen sıkıştırmalar boyunca çekilen görüntüler birbirine oldukça benzemesine rağmen bu görüntüler saf DSPC’nin BAM görüntülerinden farklıdır (Şekil 20). İzotermlerde sıkıştırma sırasında plato bölgesinin kaybolması bir miktar PEG40St molekülünün yüzeyden ayrılışı olarak yorumlanabileceği gibi döngüler sırasında çekilen bu görüntülerin saf DSPC’ye benzememesi yüzeyde PEG40St molekülünün varlığına ispat olabilir.



**Şekil 16.** 9:1 DSPC:PEG40St karışımının 30 mN/m’ye kadar yapılan sıkıştırma-genişletme döngülerinin BAM görüntüleri

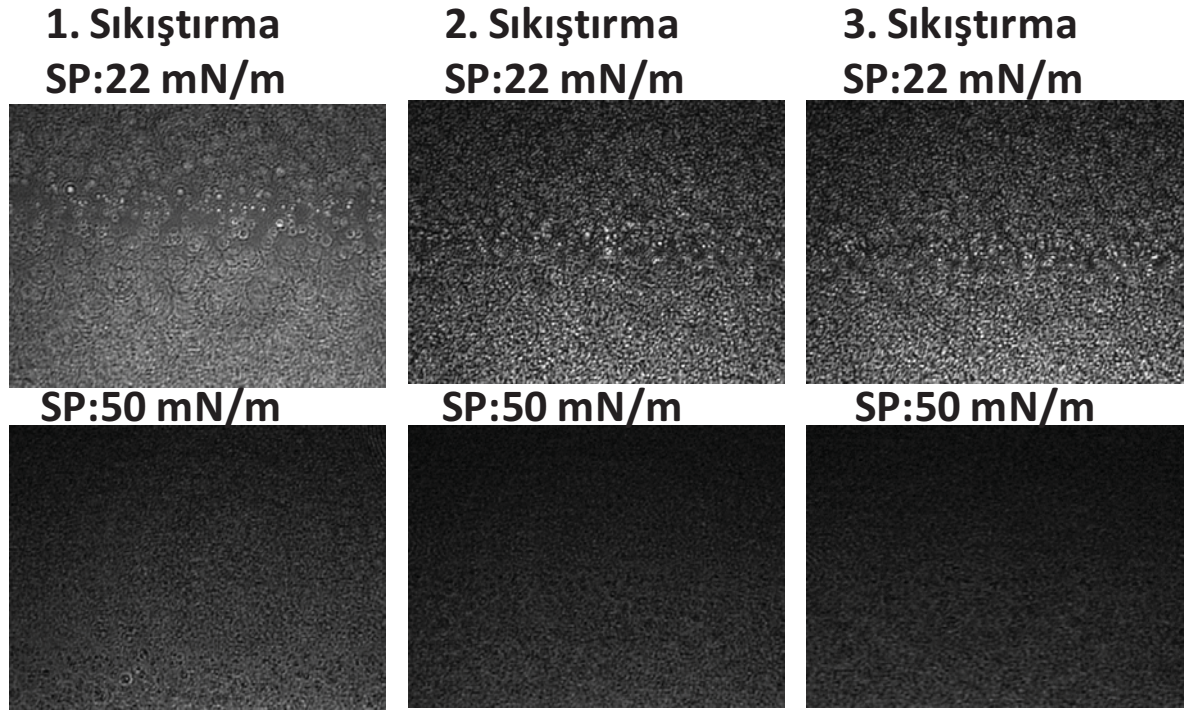


**Şekil 17.** 5:5 DSPC:PEG40St karışımının 30 mN/m'ye kadar yapılan sıkıştırma-genişletme döngülerinin BAM görüntüleri

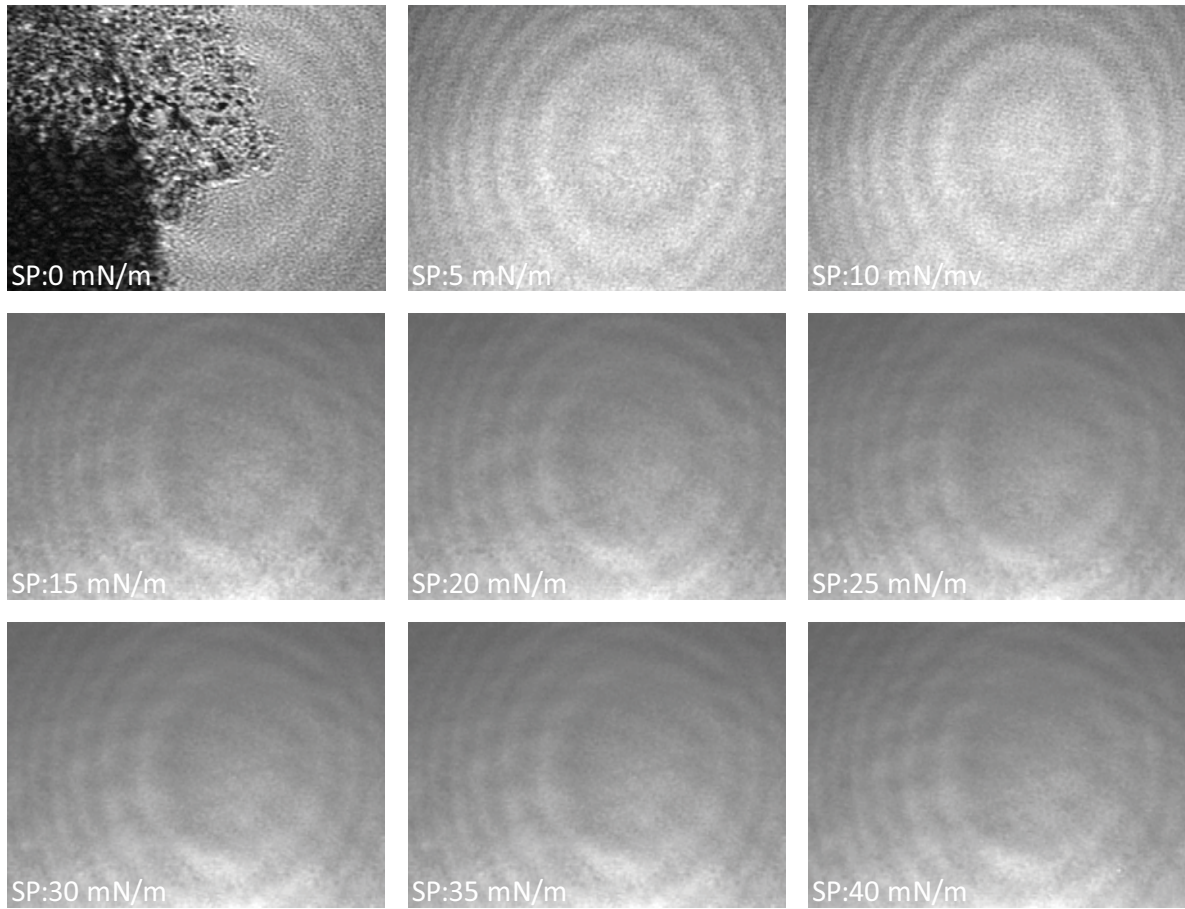


**Şekil 18.** 9:1 DSPC:PEG40St karışımının 50 mN/m'ye kadar yapılan sıkıştırma-genişletme döngülerinin BAM görüntüleri

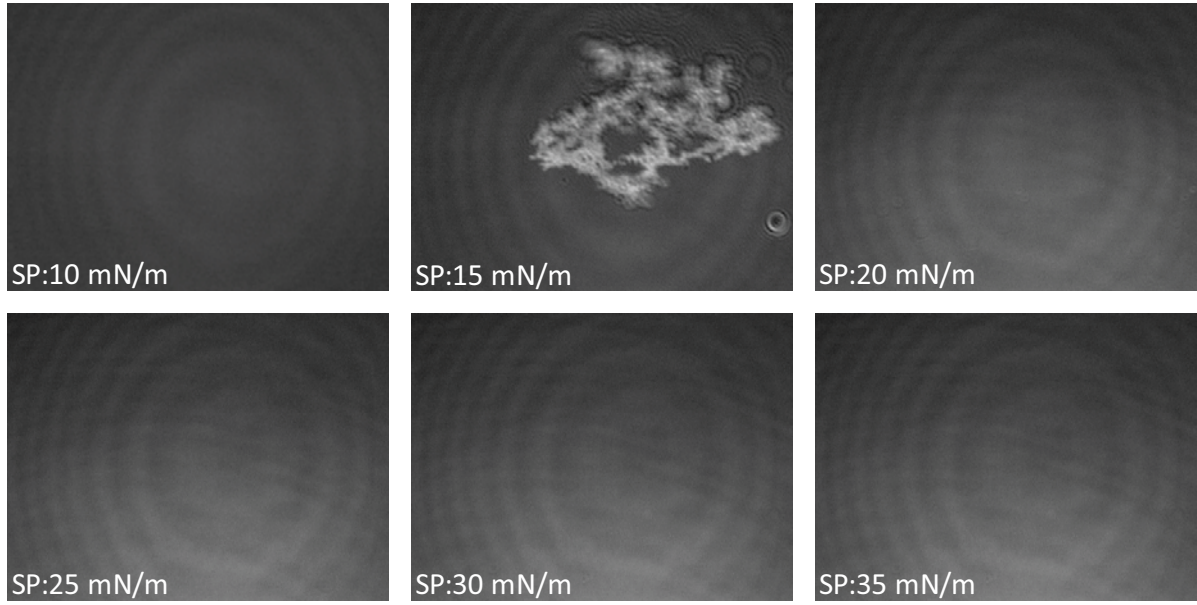




**Şekil 19.** 5:5 DSPC:PEG40St karışımının 50 mN/m'ye kadar yapılan sıkıştırma-genişletme döngülerinin BAM görüntüleri



**Şekil 20.** Saf DSPC'nin Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri



**Şekil 21.** Saf PEG40St'nin Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri

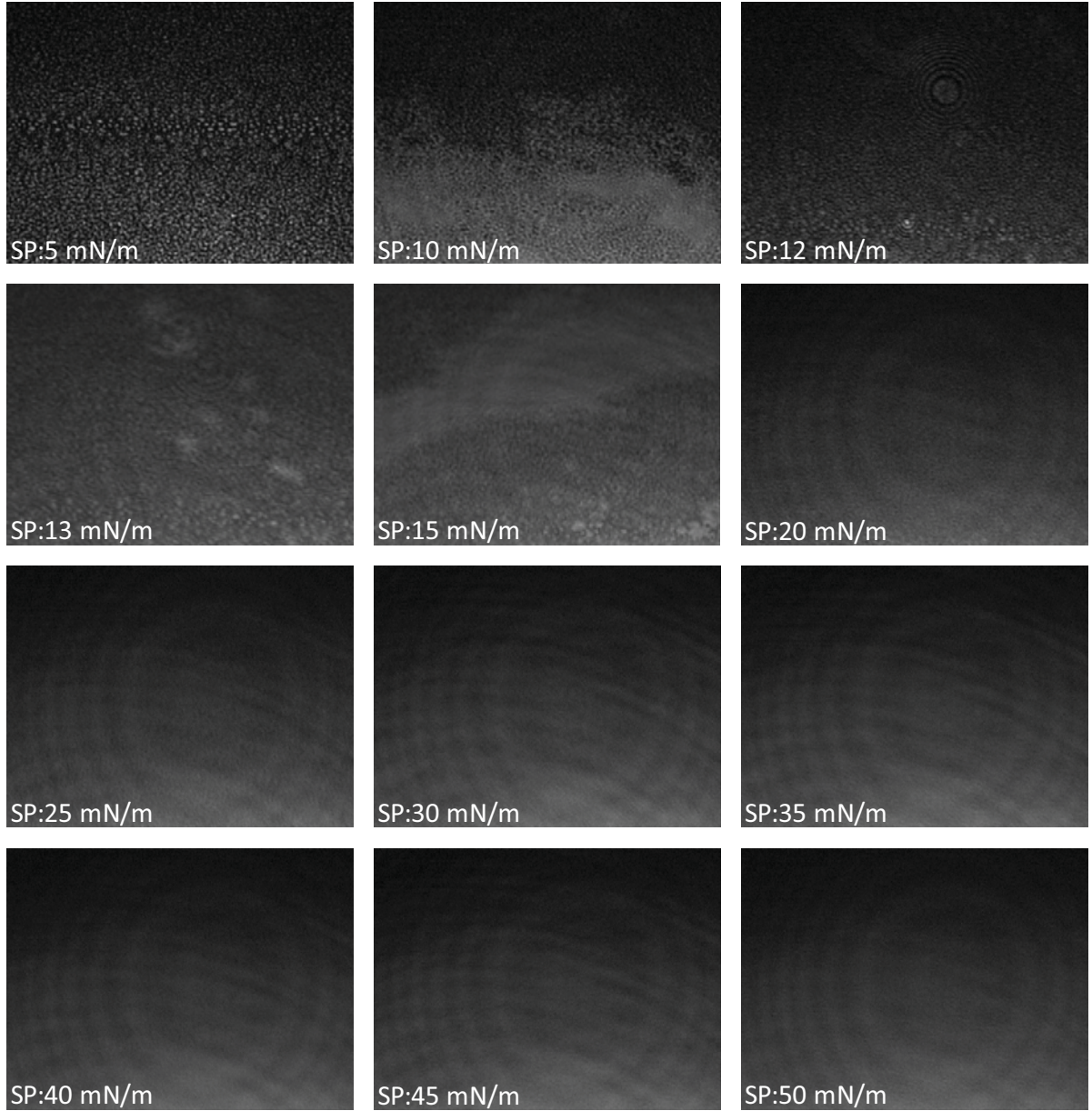
Mikroköpükçük zar yapısının faz özellikleri moleküler seviyede Brewster Açısı Mikroskobu (BAM) ve nanometre seviyesinde Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) kullanılarak incelenmiştir. Şekil 20'de verildiği gibi saf DSPC'nin görüntülerinde literatürde daha önce yapılan çalışmalarda da olduğu gibi düşük yüzey basınçlarında sıkışık (kondens) parçalar yüzeyde birbirinden ayrı yüzerken sıkıştırma ile birlikte bu parçalar biraraya gelerek yüzeyi tamamen kaplamışlardır (Hollinshead ve ark., 2009; Kubo ve ark., 2001; Sanchez ve Badia, 2008; Stepniewski ve ark., 2011; Tanwir ve Tsoukanova, 2008; Wydro ve ark., 2011). Oluşan bu homojen görüntü, yüzeyde tek faz olarak sıkışık (kondens) fazın olduğunu işaret etmektedir (Kubo ve ark., 2001; Tanwir ve Tsoukanova, 2008; Wydro ve ark., 2011). PEG40St moleküllerinde ise moleküller arası mesafe oldukça geniş olmakla birlikte moleküller yüzeye adsorbe olmuş durumdadır ve DSPC monotabakasından farklı olarak yüzeyde genişletilmiş (expanded) film özelliği göstermiştir. Bu sebeplerden dolayı Şekil 21'da görüldüğü gibi PEG40St monotabakasının BAM görüntüleri karanlıktır ve bazı bölgelerde bu moleküller birbiriyle agrege olmuş durumdadırlar.

Şekil 22 ise 9:1 mol oranında hazırlanan DSPC:PEG40St karışımının BAM görüntülerini göstermektedir. Düşük yüzey basınçlarında küçük parçacıklar ve faz ayrılıkları dikkat çekmiştir. Bilindiği üzere BAM görüntülerindeki koyu bölgeler genişletilmiş (expanded) faz özelliğini temsil ederken, parlak bölgeler ise daha sıkışık (kondens) faz

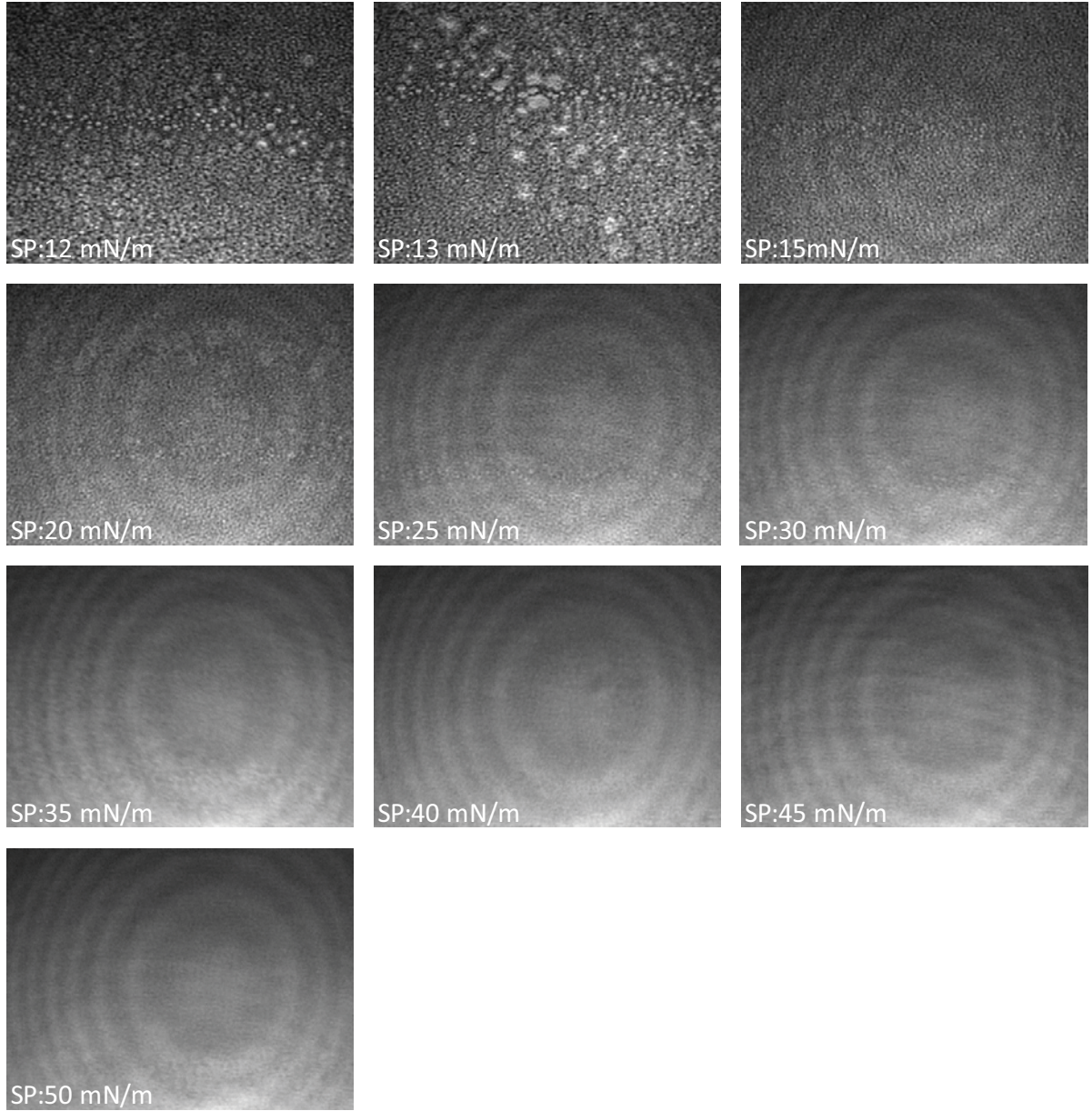
özelliğini temsil etmektedir (Minones ve ark., 2002; Nakahara ve ark., 2011; Nakamura ve ark., 2007). PEG40St molekülünün DSPC monotabakasına ilave edilmesiyle DSPC/DMPC karışımlarının BAM görüntülerinde olduğu gibi sıkışık DSPC parçalarının boyutları küçülmüştür (Kubo ve ark., 2001). Yüzey basıncı 15 mN/m'ye ulaştıktan sonra da sıkıştırma ile birlikte yüzey homojenleşmiştir. Şekil 23'de verildiği gibi 8:2 mol oranıyla hazırlanan DSPC:PEG40St karışımının görüntülerinde 9:1'e göre daha büyük sıkışık faz parçalarına rastlanırken, yine benzer şekilde 15 mN/m'dan sonra homojen bir yüzey meydana gelmiştir. Şekil 24'de görülebileceği gibi aynı şekilde sıkışık parçacıkların boyutlarında büyüme dikkate değerdir. Ayrıca 35 mN/m civarlarında iki boyutlu yapının bozulmasına (kollaps) ya da karışımındaki moleküllerin yapısındaki değişikliğe işaret edebilecek küçük parlak noktacıklar ortaya çıkmıştır. Şekil 25'de verilen 6:4 DSPC:PEG40St karışımının BAM görüntüleri incelendiğinde karışımındaki moleküllerin birbirinden uzak olduğu ve sıkışık faz özellikli parçaların boyutlarının biraz daha büyüdüğü gözlemlenmiştir. Daha fazla sıkıştırma ile  $\pi=20$  mN/m'de bu parçacıklar birbiri içine geçerek daha büyük bir parça oluşturmuştur. Ayrıca 7:3 karışıma benzer şekilde sırasıyla izotermlerdeki plato bölgelerine karşılık gelen 35 mN/m ve 42 mN/m yüzey basınçlarında yüzeyde parlamalar görülmüştür. Şekil 26'de gösterilen 5:5 mol oranıyla hazırlanan DSPC:PEG40St karışımının BAM görüntülerinde daha büyük yuvarlak sıkışık faz parçaları dikkat çekerken, karışımında PEG40St miktarının fazla olmasına bağlı olarak PEG zincirleri arasındaki sterik kuvvetlerden dolayı moleküller arası mesafe diğer karışımlara göre daha da artmıştır. Yüzey basıncının artmasıyla birlikte bu parçalar biraraya gelmesine rağmen diğer karışımlara kıyasla yüzey tamamen homojenleşmemiştir. Bu durum yüksek yüzey basınçlarında da faz ayrılıkları olduğuna işaret edebilir. Ayrıca 6:4 karışımında olduğu gibi 35mN/m ve 42mN/m civarlarında parlamalar dikkat çekmiştir.

Saf DSPC monotabakasının BAM görüntülerinde, tüm sıkıştırma sadece parlak sıkışık faz özelliği dikkat çekerken, karışımlarda monotabaka morfolojisinde değişiklikler ortaya çıkmıştır. BAM görüntülerindeki bu değişiklikler karışım monotabakalarında PEG40St molekülünün varlığına işaret etmektedir. Karışımların BAM görüntülerinden anlaşılacağı gibi karışımlarda PEG40St miktarının artırılmasıyla sıkışık faz parçacıklarının boyutlarının büyüdüğü ve faz ayrımının arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca PEG40St mol oranının 0.2'den fazla olduğu karışımlarda 35 mN/m ve 42 mN/m civarlarında küçük parlak noktacıklar ortaya çıkmıştır. Bu sonuçlara PEG40St ve DSPC molekülleri yüzey basıncının 35 mN/m'den küçük

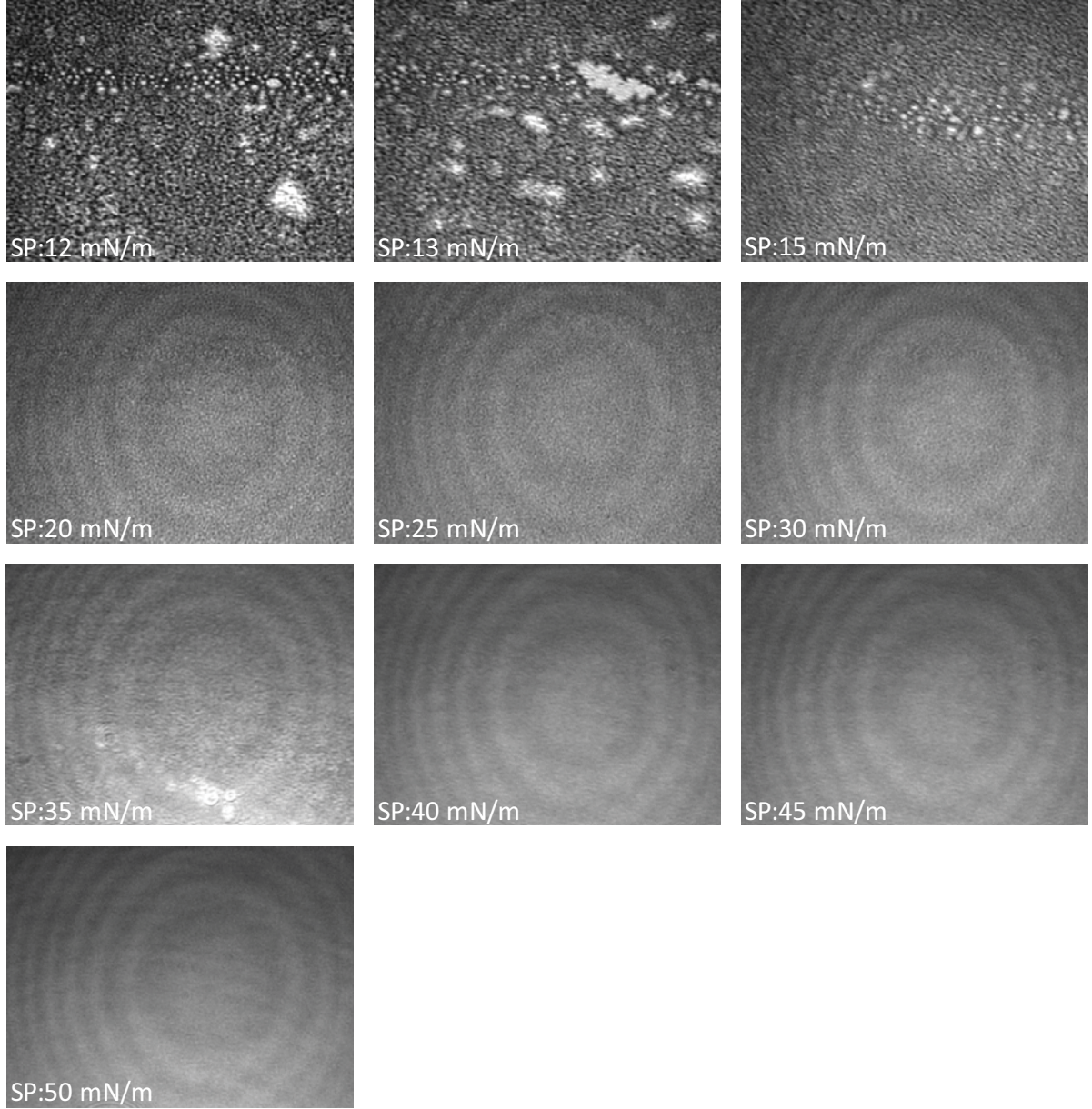
olduğu basınçlarda bazı bölgelerde tam olarak karışmamıştır. Bu görüntülerde sıkışık fazca zengin ve genişletilmiş fazca zengin olmak üzere iki fazlı görüntüler dikkat çekmektedir. Genel olarak bilindiği üzere ikili bir karışım farklı bozulma basıncına (kollap basıncı) sahip bileşenlerden meydana gelmişse genellikle bu karışımın izoterminde daha genişletilmiş faz özelliğine sahip bileşenin bozulma basıncında bir plato bölgesi ortaya çıkar ve bu plato bölgesine ulaşıncaya kadar yüzeyde faz ayrımları gözlemlenir (C.PETTY, 1996; Chou ve Chu, 2002; Lee, 2008; Shen ve ark., 2008; Takamoto ve ark., 2001). Buna göre bizim karışımlarımızın izotermelerinde PEG40St'nin iki boyutlu yapısının bozulduğu 35 mN/m civarı meydana çıkan plato bölgeleri bir kısım PEG40St molekülünün yüzeyden ayrılışını temsil edebilir. Yaklaşık 42 mN/m civarında görülen küçük platolar *Xing ve ark.'nın* sonuçlarına benzer şekilde, sıkışık fazlı paketlenmiş adacıklar arasında sıkışan PEG40St moleküllerinin yüzeyden kademeli ayrılışını işaret edebilir (Xing ve ark., 2010).



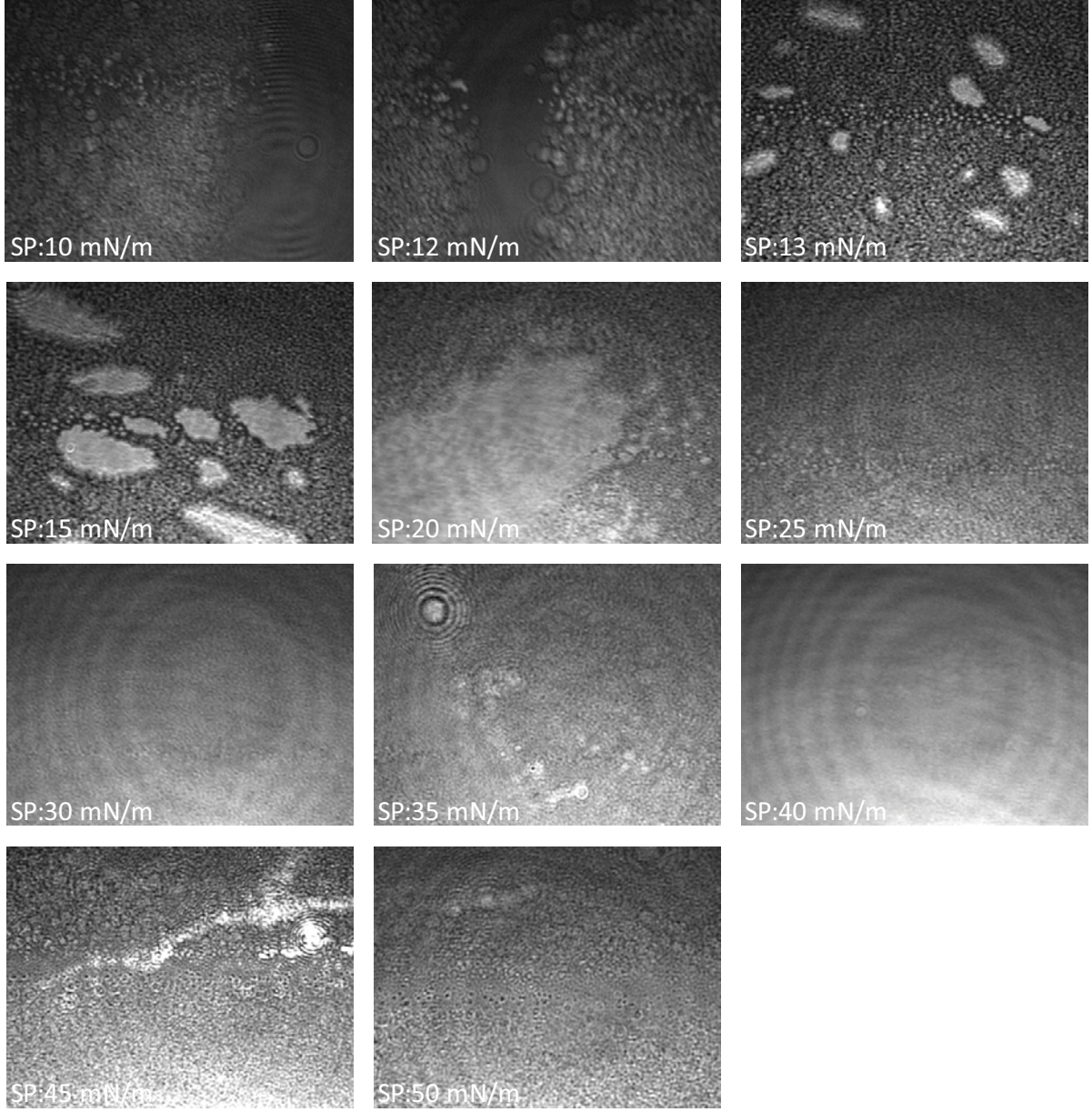
**Şekil 22.** 9:1 DSPC:PEG40St karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri



**Şekil 23.** 8:2 DSPC:PEG40St karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri

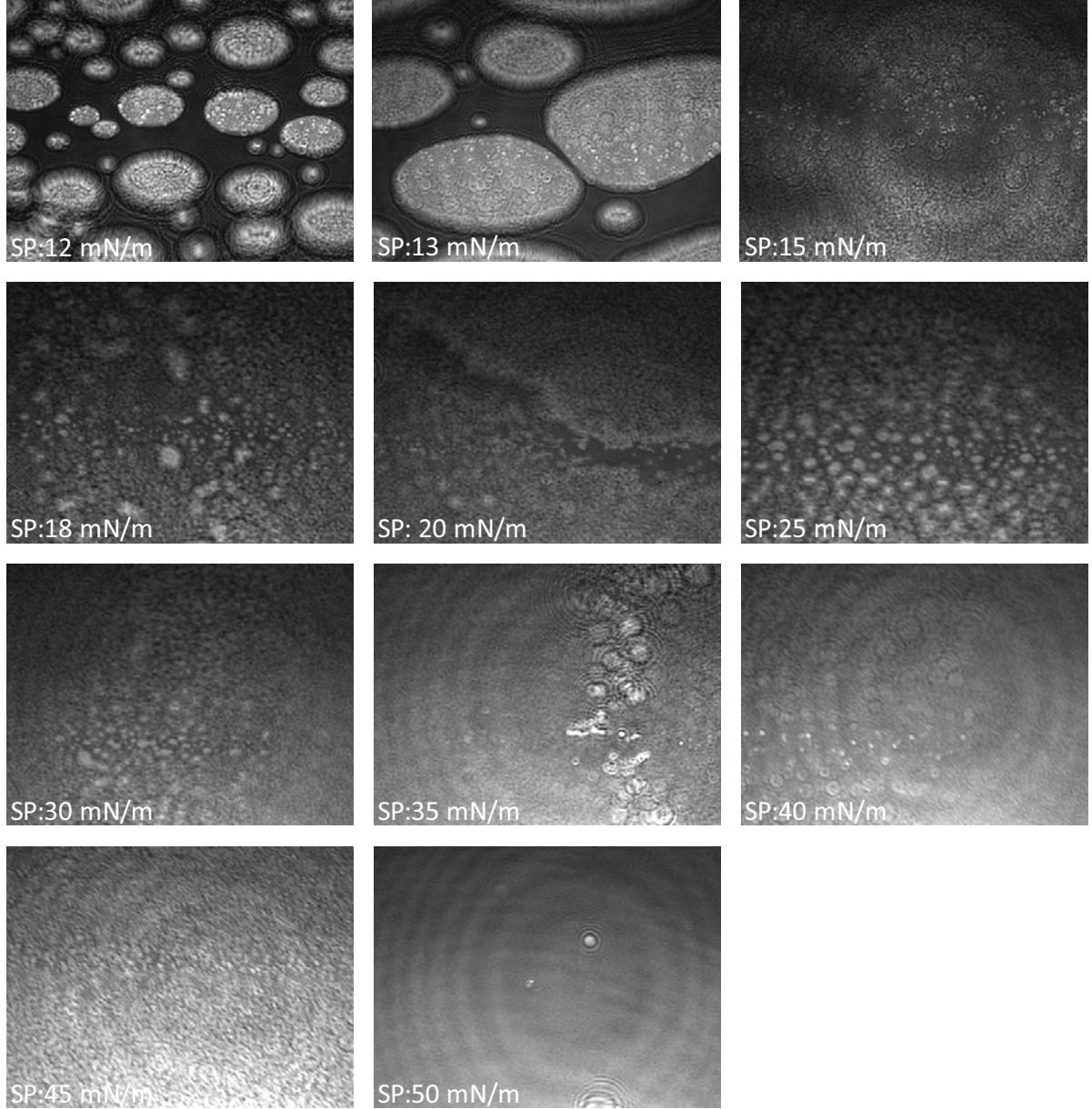


**Şekil 24.** 7:3 DSPC:PEG40St karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri



**Şekil 25.** 6:4 DSPC:PEG40St karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri





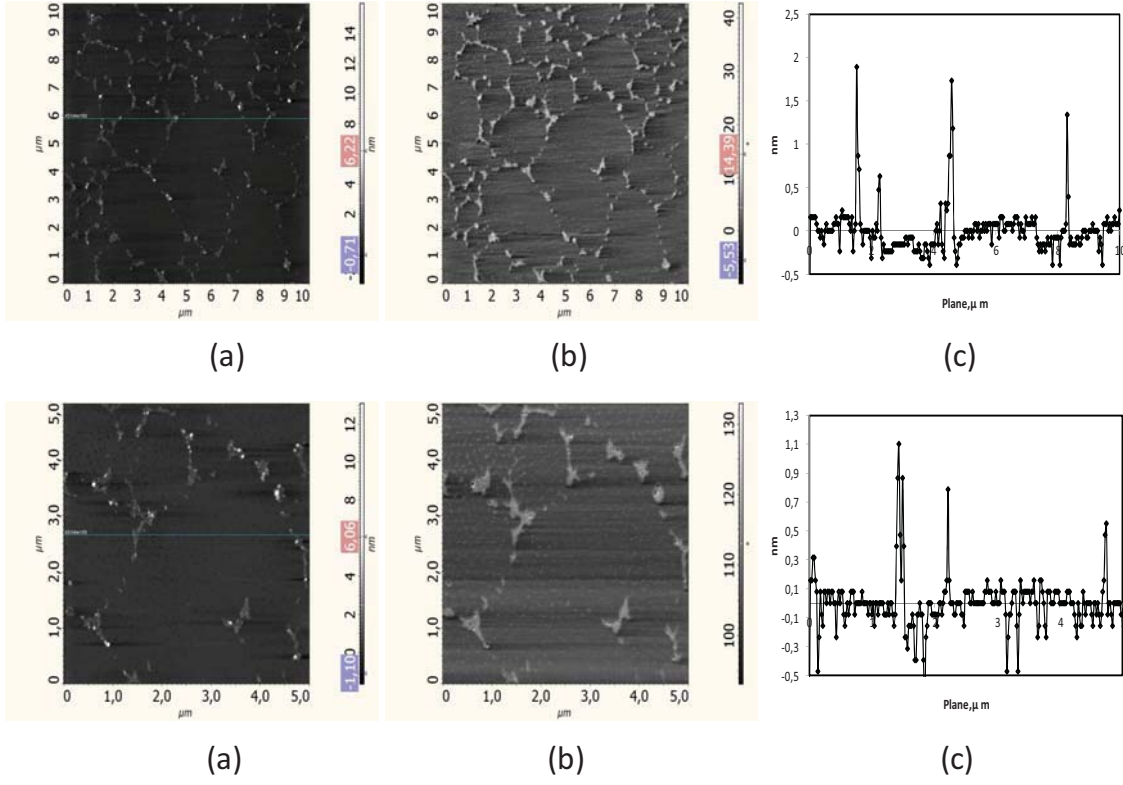
**Şekil 26.** 5:5 DSPC:PEG40St karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri

Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) ile mika üzerine kaplanmış filmler nanometre seviyesinde incelendi. Karışımların filmleri ve DSPC filmi, 2 farklı yüzey basıncında (PEG40St molekülünün iki boyutlu yapısının bozulduğu yüzey basıncının altında (30 mN/m) ve üzerinde (40 mN/m)) mika yüzeyine aktararak kaplama yapıldı. PEG40St filmi ile sadece 30 mN/m yüzey basıncında kaplama yapıldı. Şekil 27 ve Şekil 28’de sırasıyla 30 mN/m ve 40 mN/m’de kaplanan DSPC filmlerinin AFM görüntüleri ve yükseklik profilleri verilmiştir. Bu iki farklı yüzey basıncında çekilen görüntüler birbirinden farklı olmakla birlikte 40 mN/m’de küçük DSPC filminin daha sıkışık yapıda olmasından dolayı küçük kürecikler göze

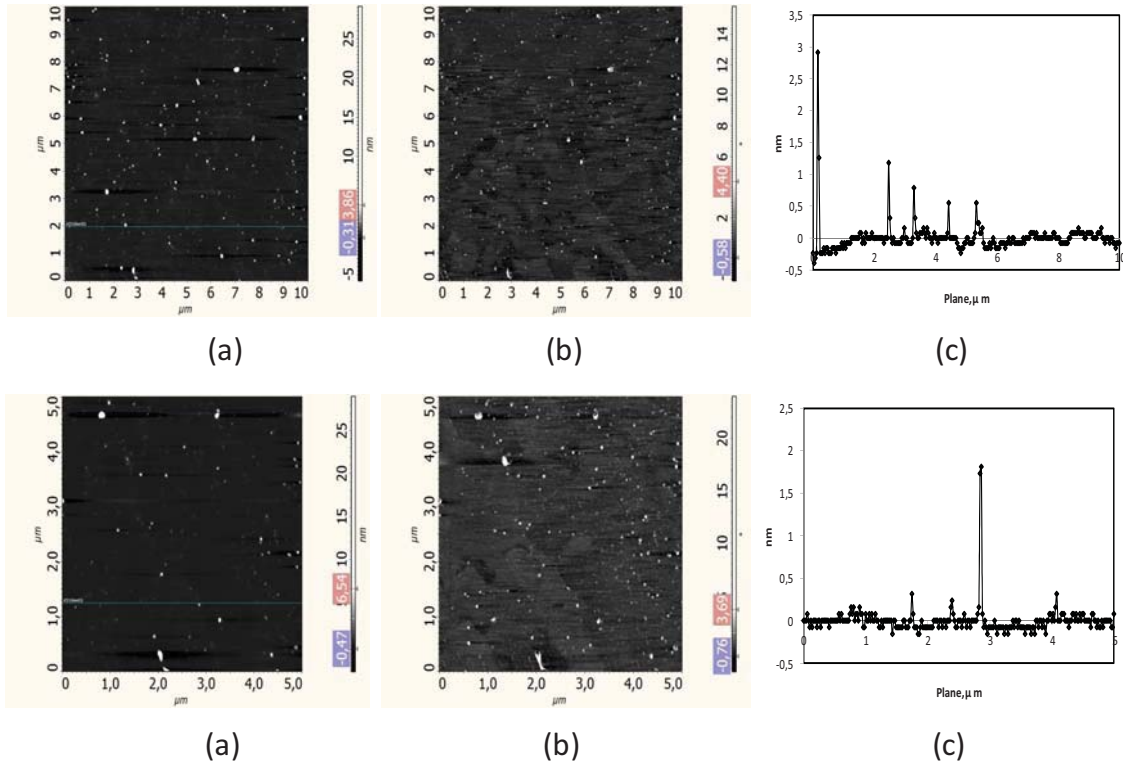
çarpmıştır. Şekil 29’de görüldüğü üzere PEG40St filmi ise DSPC filminden farklı olarak yığıntılı hidrofilik PEG zincirinden dolayı rastgele dallanmış şekiller halinde mika yüzeyinde dağılmışlardır. PEG40St filminin AFM görüntüleri PEG 1500 polimer zinciri görüntülerine benzemektedir (Nettesheim ve ark., 1998). Saf PEG40St monotabakasında, monotabakanın alifatik zincirler arasındaki hidrofobik etkileşimler su içindeki PEG zincirleri arasındaki dolanma ile dengelenebilir. Fakat yüzey basıncının artışıyla hidrokarbon zincirler arasındaki kohezif kuvvetler daha etkili hale gelirken, su içindeki PEG zincirleri arasındaki dolanmalar bu etkiyi azaltabilir. Sonuç olarak PEG40St monotabakasındaki PEG molekülleri arayüzeyden su fazına doğru batabilirler. Şekil 30’da verilen 9:1 mol oranında hazırlanan DSPC:PEG40St karışımının AFM görüntülerinde büyük koyu parçalar ve küçük parlak parçalar görülmüştür. Küçük parlak parçaların PEG zincirinin morfolojisini gösterdiği, DSPC yüzeyini tam olarak kaplayamadığı gözlemlenmiştir. Benzer şekilde *Kwangmeyung ve ark.* tarafından incelenen DPPC/lipopolimer monotabakasının görüntülerinde küçük yuvarlak parçalara rastlanmıştır (Kim ve ark., 2000). Şekil 31’de görülebildiği gibi bu motif 40 mN/m’de bozulmuştur. Ayrıca 40 mN/m’daki 9:1 DSPC:PEG40St karışımının morfolojisinin aynı basınçtaki DSPC filminden farklı olduğu dikkat çekmektedir. Bu sonuç, Borden ve ark.’nın varsayımlarının tam tersine, plato bölgesinin üstündeki basınçlarda da PEG40St molekülünün varlığına kanıt olabilir. PEG40St molekülünün DSPC monotabakasına eklenmesiyle tıpkı daha önceki yapılan bir çalışmada DSPC/DLPC karışımında gözlemlendiği gibi faz ayrılıkları oluşturmuştur (Oguchi ve ark., 2010). Bu faz ayrımı 5:5 DSPC:PEG40St karışımına kadar Şekil 32, Şekil 34, Şekil 36, ve Şekil 38’de görülebildiği gibi karışımlardaki PEG40St miktarının arttırılmasıyla artmıştır. Görülen faz ayrılıkları ve kürecik yapıları, DSPC ve PEG40St moleküllerinin aslında birbirinden ayrı olarak parçalar oluşturduğunu ve az miktarda da birbiri içinde çözündüklerini söylemektedir. 5:5 DSPC:PEG40St karışımında fazla miktarda PEG40St molekülü olduğu için moleküller arası mesafe oldukça geniştir. Bu yüzden de farklı fazlar birbirinden uzak kalmıştır. Bu yüzden 6:4 karışımında ortaya çıkan çiçek desenini andıran görüntüler bu karışımında bozulmuştur. Şekil 33, Şekil 35, Şekil 37 ve Şekil 39’dan görülebileceği gibi 30 mN/m’de görülen yapılar 40 mN/m’da değişmiştir ve PEG zincirlerinin üst üste binmesinden dolayı yükseklik profili artmıştır. Karışımların 40 mN/m’de çekilen AFM görüntüleri plato bölgesinden sonra da yüzeyde belli bir miktarda PEG40St molekülünün varlığına kanıt niteliğindedir. PEG40St ve DSPC moleküllerinin karıştırılması belli bir miktar PEG40St molekülünün yüzeyde kalmasını desteklemiştir. 9:1 ve 5:5 karışımlarının sıkıştırma-genişletme döngü deneyleri sırasında çekilen görüntülerde bu

sonucu desteklemektedir. 5:5 DSPC:PEG40St karışımı hariç diğer incelenen karışımların 40 mN/m'daki BAM görüntüleri homojen bir yüzey göstermiş olmasına rağmen, AFM görüntüleri bu basınçtaki yüzeyin tamamen homojen olmadığını göstermiştir. BAM ve AFM görüntüleri arasındaki bu farklılık, Atomik Kuvvet Mikroskopunun nanometre ölçeğinde bir çözünürlüğe sahip olmasından ve bu sayede monotabakaların daha detaylı görüntülerinin elde edilebilmesinden kaynaklanmaktadır. BAM görüntüleri, sadece mikrometre ölçeğinde yüzey morfolojileri ve faz davranışları hakkında bilgi vermektedir.

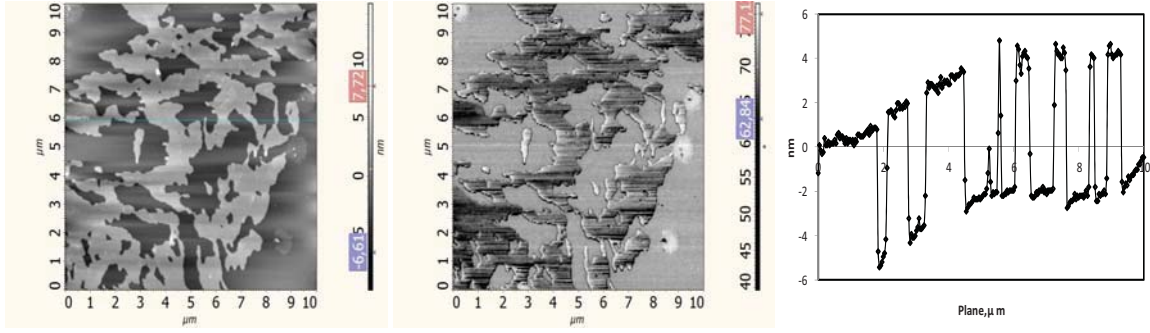
Çalışmamızın bu kısmında bulunan LB, BAM ve AFM sonuçları mikroköpükçüklerin zar bileşenleri arasındaki etkileşimler ve faz davranışları hakkında bilgi vermiştir. Ayrıca, literatürde yoğun bir şekilde tartışılan, sıkıştırma esnasında özellikle PEG40St molekülünün kollaps basıncı civarında monotabakadan ayrılıp ayrılmadığı sorununada yanıt aranmıştır. DSPC ve PEG40St moleküllerinden oluşan karışımların LB izotermelerinin termodinamik analizleri bu moleküllerin birbiri ile karışabilir olduğunu ve moleküller arasında çekici kuvvetlerin baskın olduğunu göstermiştir. Ancak karışımların BAM ve AFM görüntüleri incelendiğinde faz ayrılıkları dikkat çekmiştir. Büyük ihtimalle bazı bölgelerde PEG40St molekülleri, DSPC moleküllerinin arasına girebilmişken bazı bölgelerde ise DSPC bakımından yoğun ve PEG bakımından yoğun fazlar ayrı ayrı bulunmaktadır. PEG40St monotabakasının bozulma basıncının üstünde 50 mN/m'ye kadar gerçekleştirilen sıkıştırma-genişletme deneylerinin sonuçlarına göre birinci sıkıştırma sırasında görülen plato bölgesi, diğer sıkıştırmalar sırasında ortadan kaybolması ilk sıkıştırmadan sonra PEG40St molekülünün yüzeyden kademeli olarak ayrılışına işaret edebilir. Ancak bu döngüler boyunca çekilen BAM görüntüleri ve 40 mN/m'de kaplanan filmlerin AFM görüntüleri yüzeyde sadece DSPC molekülü olmadığını aynı zamanda belli miktarda PEG40St molekülünün de olduğunu göstermektedir. PEG40St molekülünce zengin olan bölgelerde PEG zincirleri birbirine dolanıp yüzeyden kademeli olarak ayrılabilirken, DSPC ve PEG40St moleküllerinin bir arada bulunduğu bölgelerde PEG zincirinin konfigürasyon değişikliğine uğradığı ve bu moleküller arasındaki çekici kuvvetler sayesinde PEG40St moleküllerinin hava-su arayüzeyinde kaldığı düşünülmektedir.



Şekil 27. DSPC'nin 30 mN/m yüzey basıncında kaplanmış filminin AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili



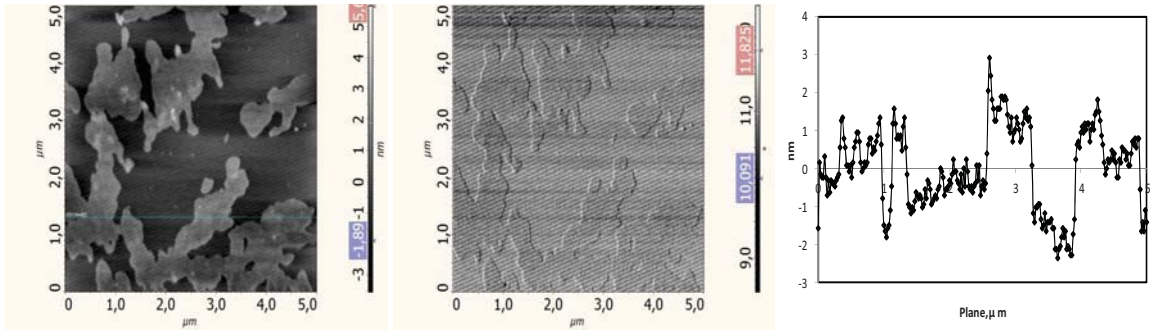
Şekil 28. DSPC'nin 40 mN/m yüzey basıncında kaplanmış filminin AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili



(a)

(b)

(c)

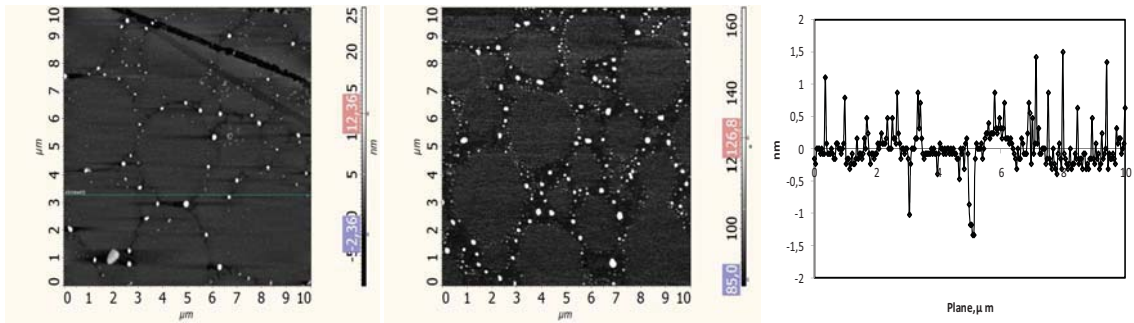


(a)

(b)

(c)

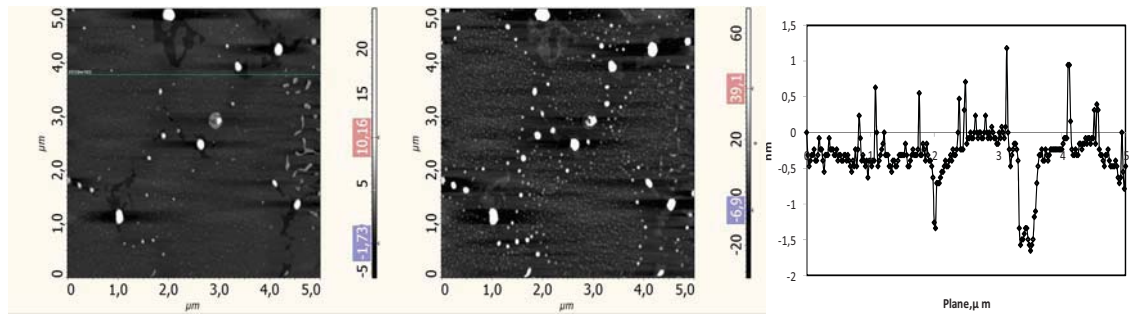
**Şekil 29.** PEG40St'nin 30 mN/m yüzey basıncında kaplanmış filminin AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili



(a)

(b)

(c)

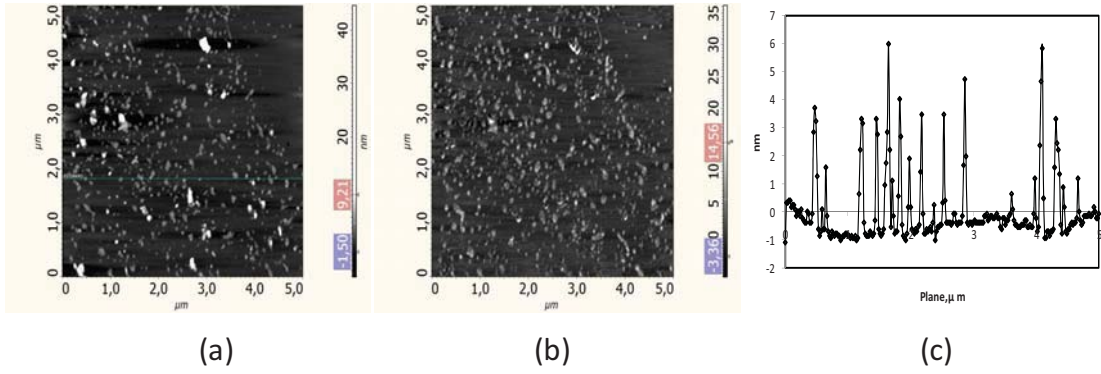
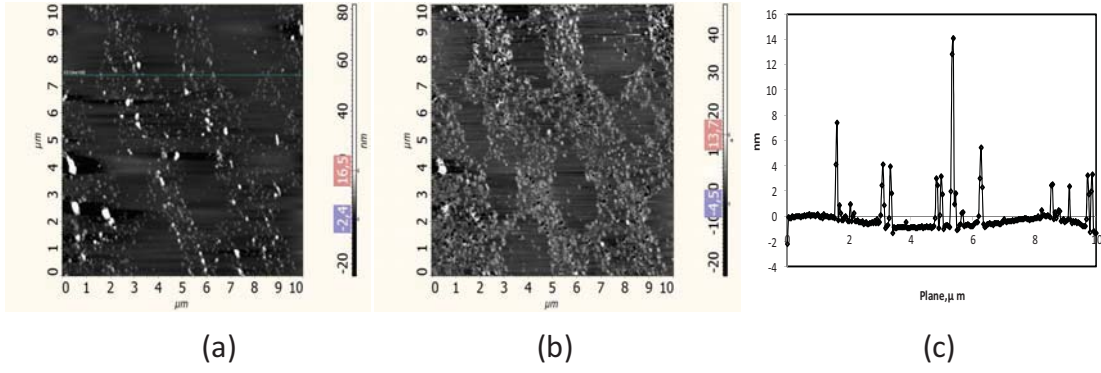


(a)

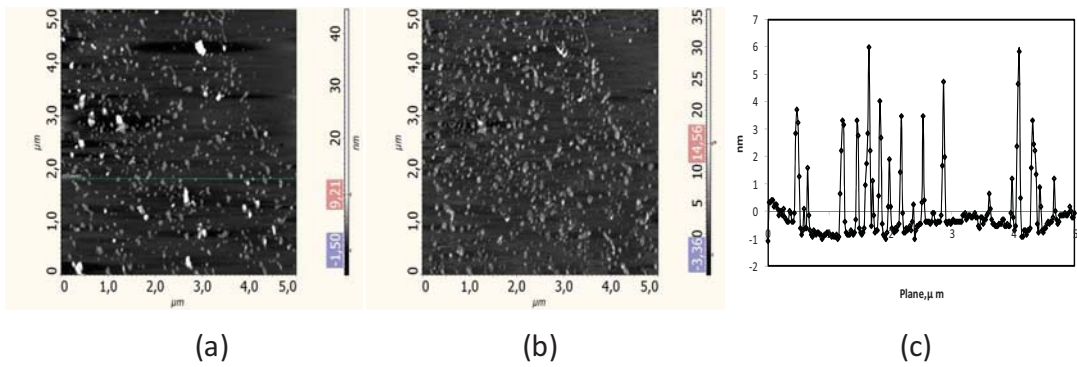
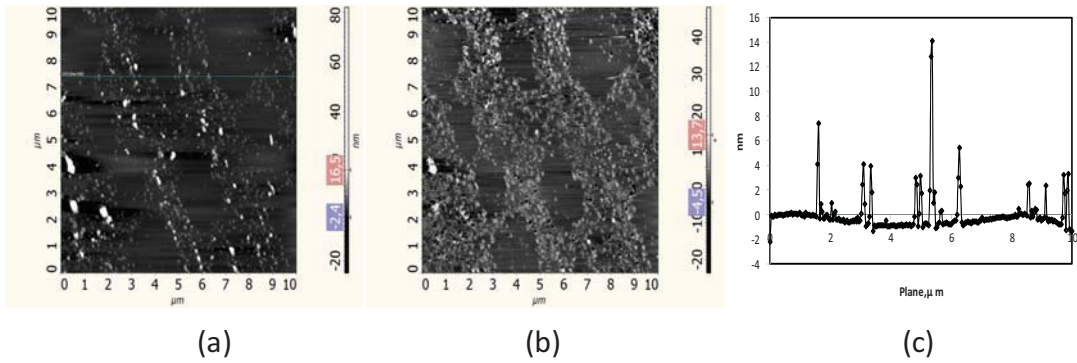
(b)

(c)

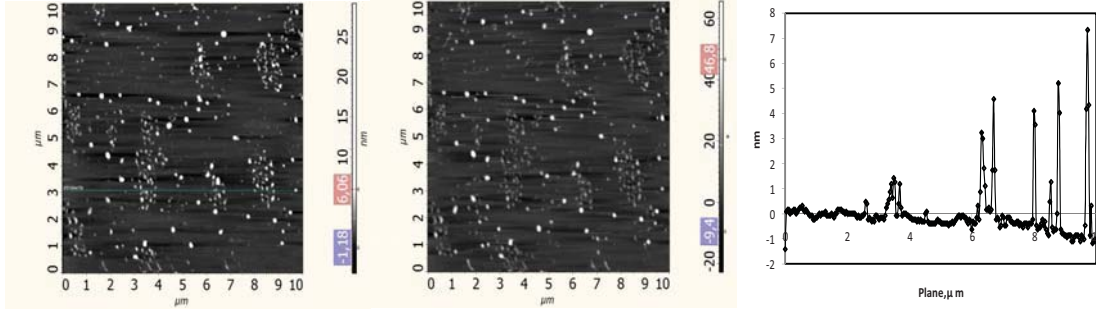
**Şekil 30.** 9:1 DSPC:PEG40St karışımının 30 mN/m yüzey basıncında kaplanmış filminin AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili



Şekil 31. 9:1 DSPC:PEG40St karışımının 40 mN/m yüzey basıncında kaplanmış filminin AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili



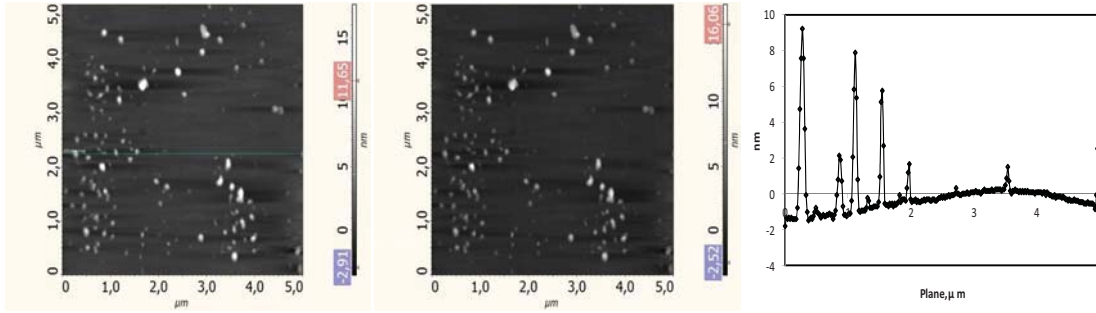
Şekil 32. 8:2 DSPC:PEG40St karışımının 30 mN/m yüzey basıncında kaplanmış filminin AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili



(a)

(b)

(c)

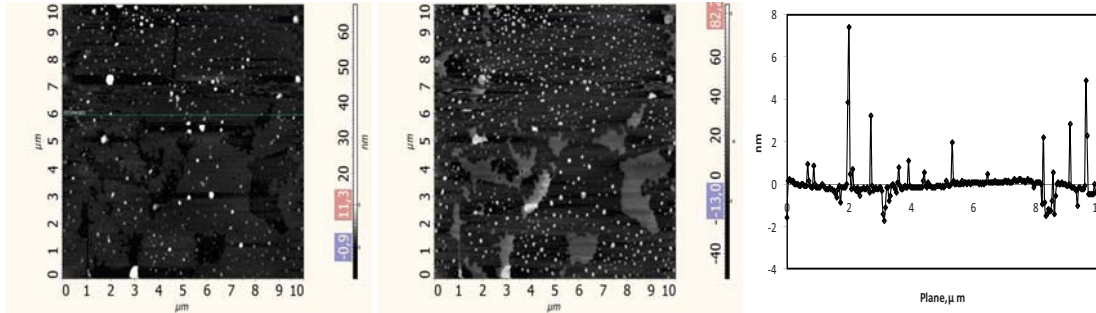


(a)

(b)

(c)

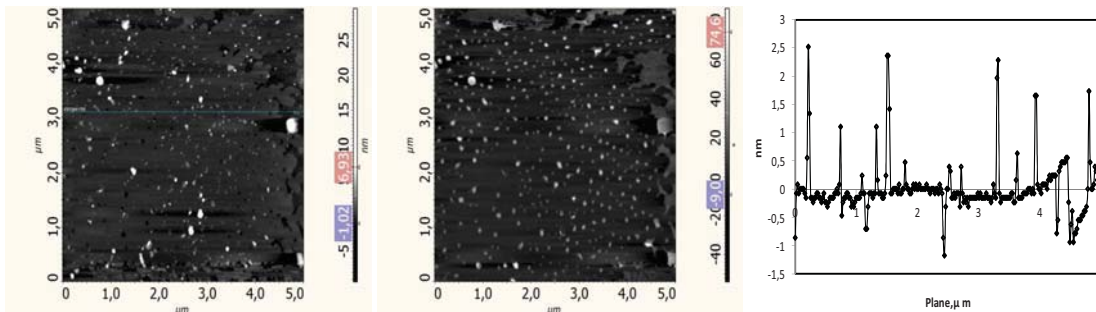
**Şekil 33.** 8:2 DSPC:PEG40St karışımının 40 mN/m yüzey basıncında kaplanmış filminin AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili



(a)

(b)

(c)

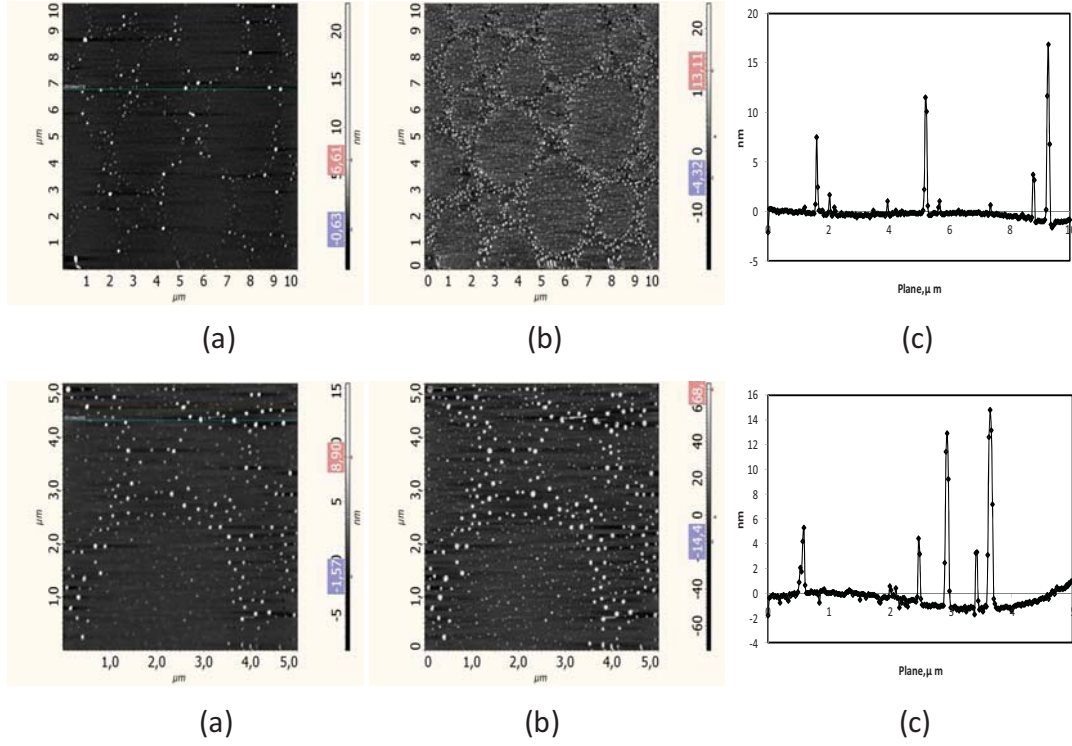


(a)

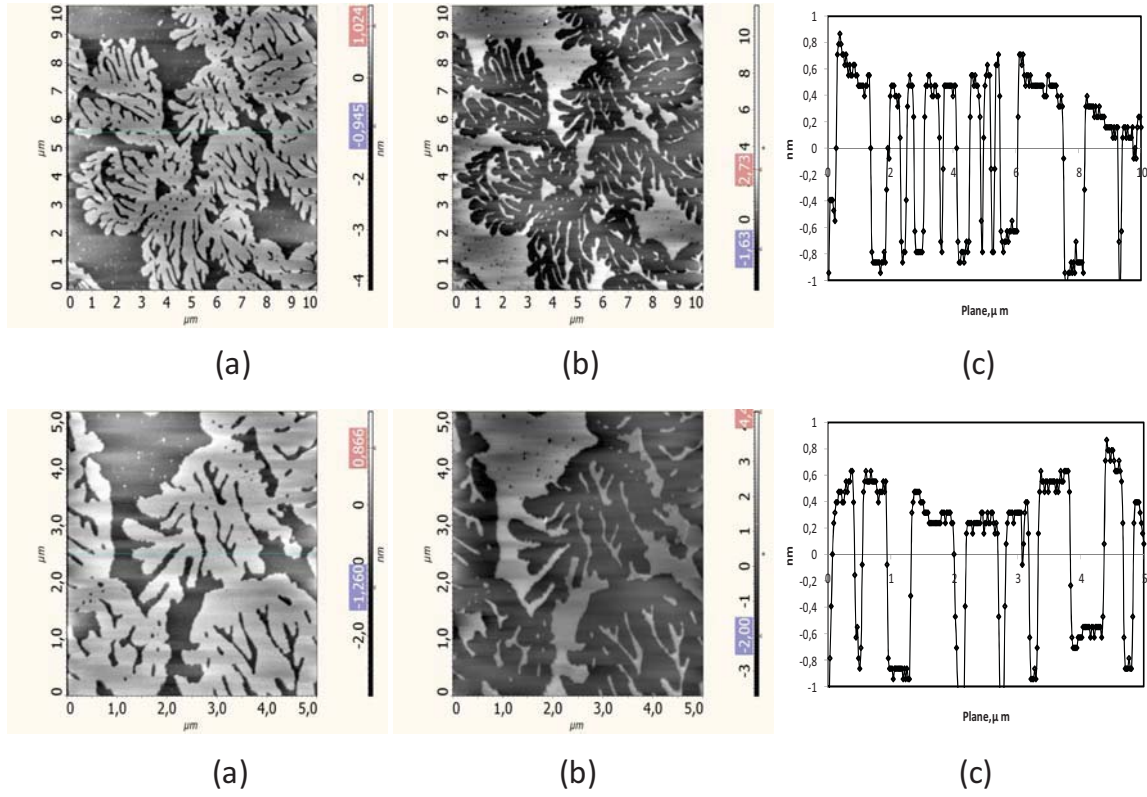
(b)

(c)

**Şekil 34.** 7:3 DSPC:PEG40St karışımının 30 mN/m yüzey basıncında kaplanmış filminin AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili

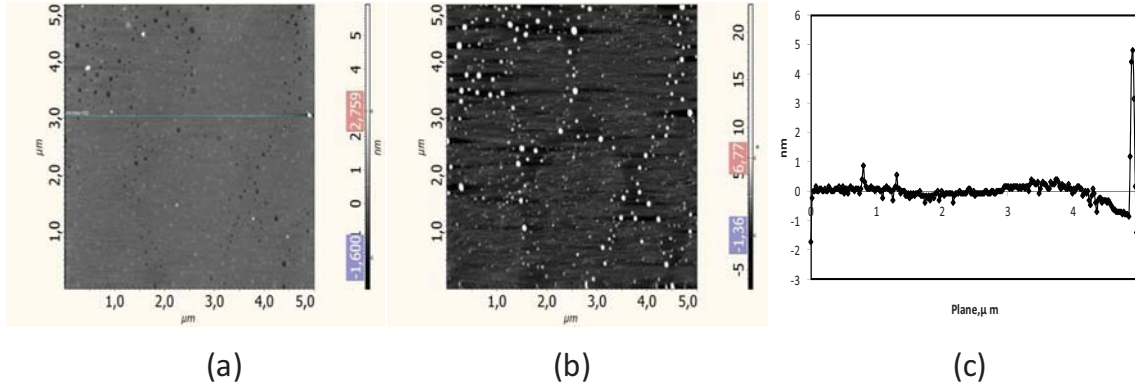
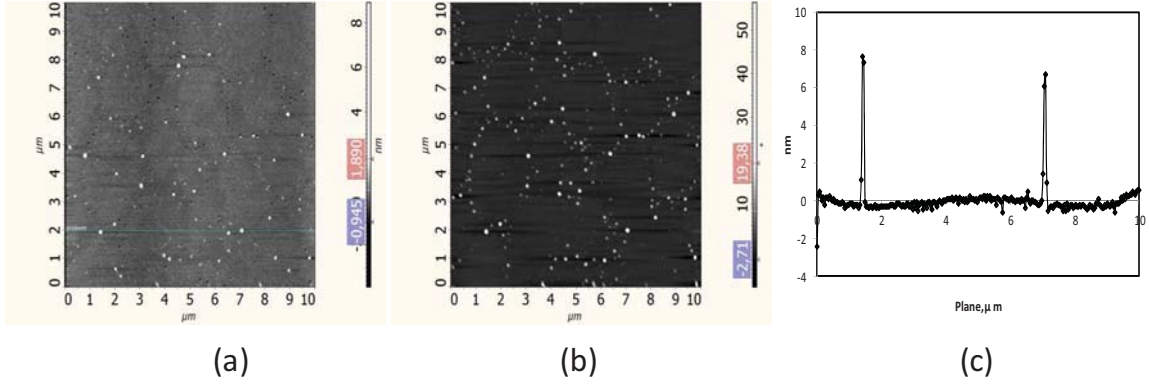


Şekil 35. 7:3 DSPC:PEG40St karışımının 40 mN/m yüzey basıncında kaplanmış filminin AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili

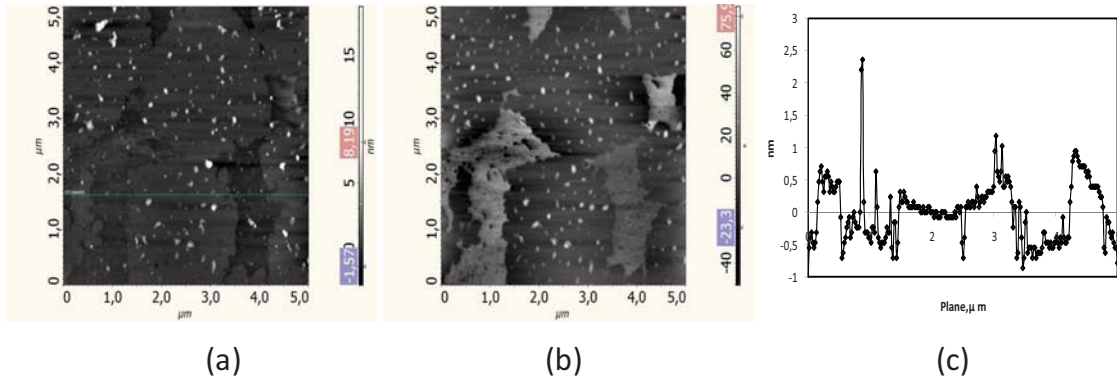
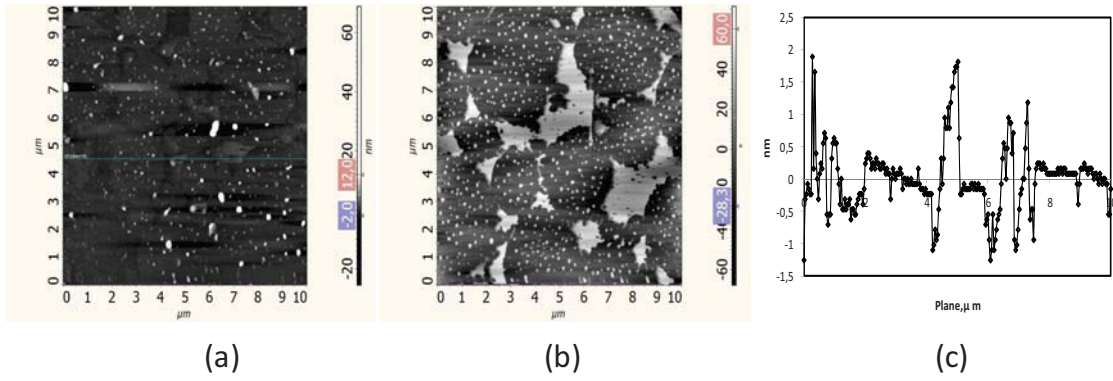


Şekil 36. 6:4 DSPC:PEG40St karışımının 30 mN/m yüzey basıncında kaplanmış filminin AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili

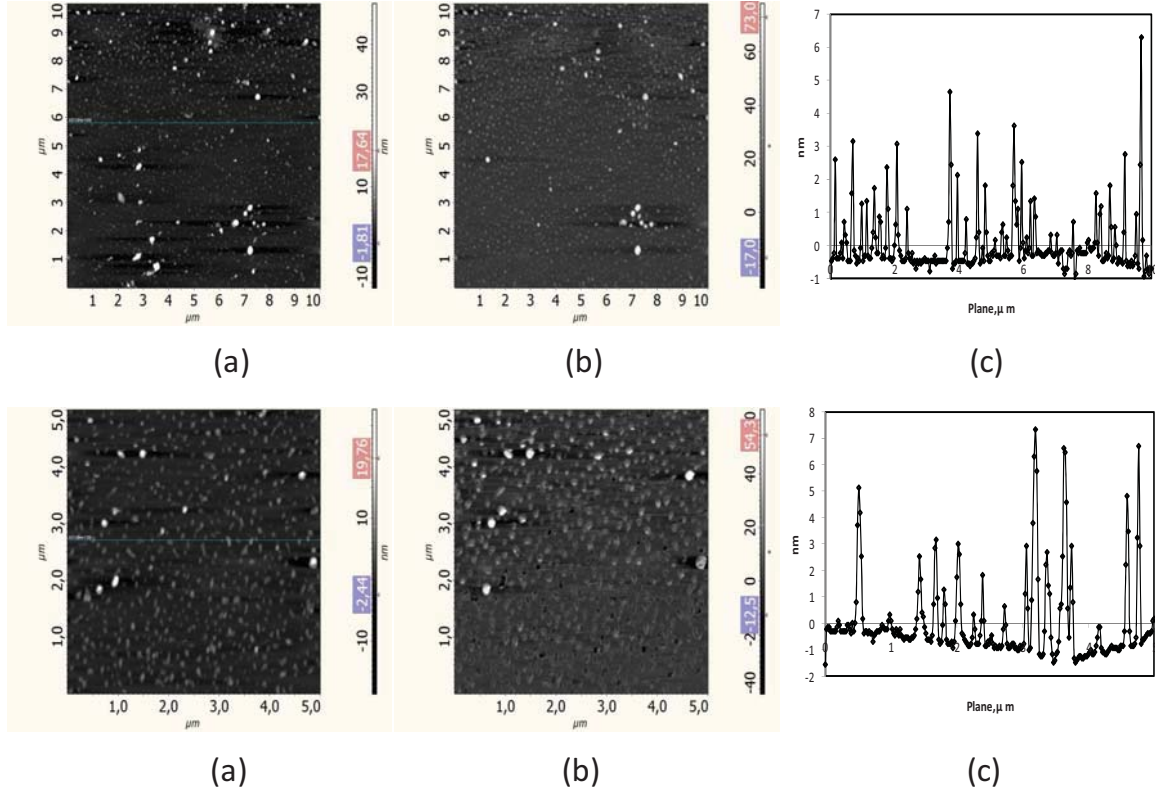




**Şekil 37.** 6:4 DSPC:PEG40St karışımının 40 mN/m yüzey basıncında kaplanmış filminin AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili



**Şekil 38.** 5:5 DSPC:PEG40St karışımının 30 mN/m yüzey basıncında kaplanmış filminin AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili



**Şekil 39.** 5:5 DSPC:PEG40St karışımının 40 mN/m yüzey basıncında kaplanmış filminin AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili

#### 4.1.2. Artan Hidrofobik Etkileşimler: DSPC/Lipopolimer Karışımları:

Bilindiği üzere fosfolipitler yalnız başına bilayer oluşturabilmekte, küresel monotabaka oluşturamamaktadır. Mikroköpükçük yapısını elde edebilmek, mikroköpükçükler arası etkileşimleri azaltmak ve vücuttaki dolaşımı sırasında stabiliteyi arttırmak amacıyla fosfolipitler gibi amfifilik özellik gösteren ikinci bir bileşen kullanılmaktadır. Bu ikinci bileşen emülsifierdir. Emülsifier'in molekül yapısı hava-su arayüzündeki stabiliteyi etkilemektedir (Shen ve ark., 2008). Bu sebeple çalışmamızın bu bölümünde farklı zincir uzunluklarına sahip PEG zinciri içeren lipopolimerler (DSPE-PEG<sub>n</sub>, n=350, 1000, 2000) emulsifier olarak kullanılmıştır. Mikroköpükçüklerin zar yapılarının stabilitesini arttırmaya yönelik olarak, 9:1 ve 5:5 mol oranlarıyla hazırlanan DSPC/ DSPE-PEG<sub>n</sub> karışımlarındaki moleküller arası etkileşimler ve faz davranışları, LB metod ve Brewster Açısı mikroskobu ile incelenmiştir.

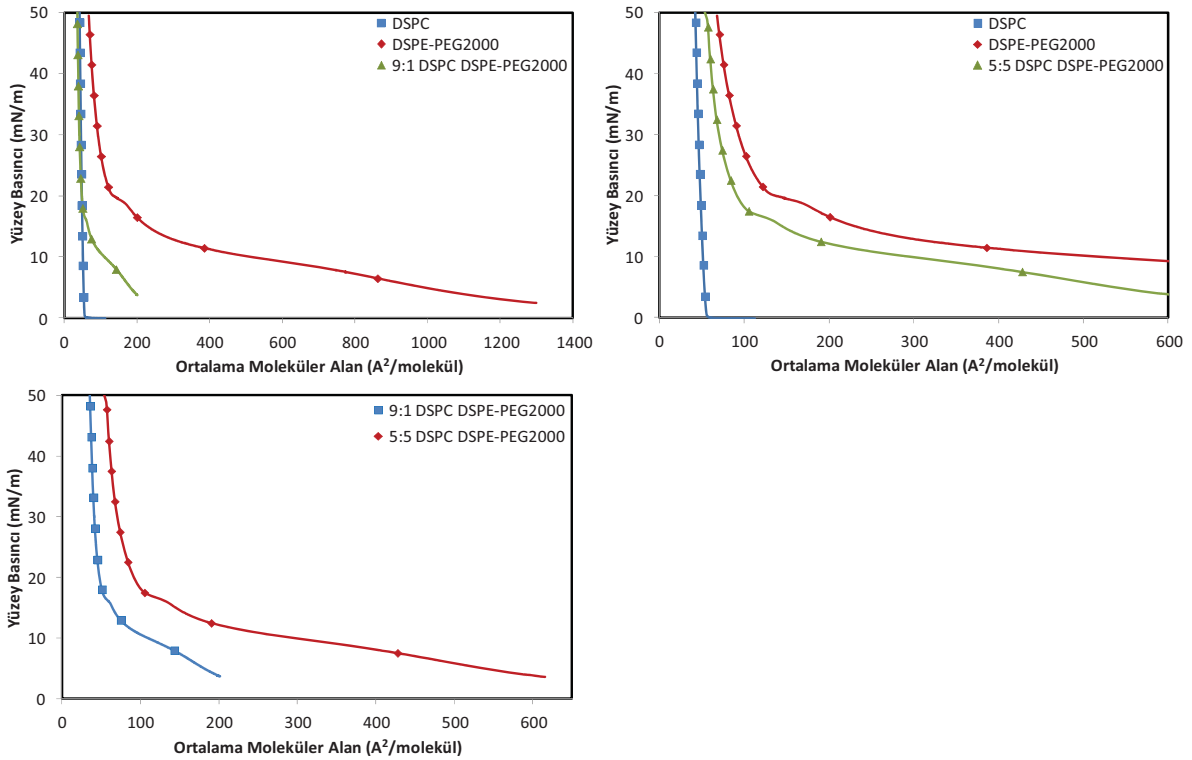
*DSPC:DSPE-PEG2000 İkilili Karışımlarının Yüzey Basıncı-Moleküler Alan İzotermi,  
BAM ve AFM Görüntüleri:*

Saf DSPE-PEG2000 ve farklı mol oranlarıyla hazırlanan DSPC:DSPE-PEG2000 karışımları hava-su ara yüzeyine yayılarak monotabaka oluşturuldu. Hava-su ara yüzeyindeki bu monotabakaların karakteristik özellikleri doğrudan yüzey basıncı-moleküler alan izotermi ( $\pi$ -A) kullanılarak incelenebilir. Saf DSPE-PEG2000 ve DSPC:DSPE-PEG2000 karışımlarının  $\pi$ -A izotermi Şekil 40'de gösterilmektedir. Geniş polimer zinciri içerdikleri için bu monotabakaların yüzey basınçları oldukça büyük moleküler alanlarda ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, Şekil 40'de görüldüğü üzere saf DSPC monotabakası saf DSPE-PEG2000'dan daha sıkışık (kondens) bir film oluşturmuştur. DSPE-PEG2000'in baş grubu hidrofilik özellikli PEG zincirinden oluşmaktadır ve bu zincir lipopolimerin hava-su ara yüzeyinde farklı davranış göstermesine neden olur (Chou ve Chu, 2002). Saf DSPE-PEG2000 izotermi genişletilmiş (expanded) film özelliği ve iki adet geçiş bölgesi gösterdiği görülmektedir. Bu izoterm literatürle uyum içinde olduğu görülmektedir (Baekmark ve ark., 1995; Baekmark ve ark., 1999; Chou ve Chu, 2002; Chou ve Chu, 2003; Jebraill ve ark., 2008; Lozano ve Longo, 2009; Luna ve ark., 2011; Majewski ve ark., 1997; Naumann ve ark., 1999; Xu ve ark., 2001). Düşük yüzey basıncındaki geçiş bölgesi yaklaşık olarak 8 mN/m'de görülürken, yüksek yüzey basıncında göze çarpan geçiş bölgesi yaklaşık olarak 19 mN/m'de civarındadır. Bu geçiş bölgeleri için benzer yüzey basınçları daha önce Naumann ve ark. tarafından da gözlemlenmiştir (Naumann ve ark., 1999). Genellikle, düşük yüzey basıncı geçiş bölgesi PEG zincirinin "bazlama" yapıdan "mantar" yapıya geçişi olarak yorumlanırken, yüksek yüzey basıncındaki geçiş bölgesi hala tartışılmaktadır (Jebraill ve ark., 2008; Naumann ve ark., 1999; Tsukanova ve Salesse, 2003; Xu ve ark., 2001). Baekmark ve ark. yüksek yüzey basınç bölgesini polimer zincirinin "mantar" yapıdan "firça" yapıya geçişi olarak yorumlamıştır (Baekmark ve ark., 1995). Fakat, Baekmark'ın daha sonraki yayınında bu bölgenin mantar yapıdan firça yapıya geçişi olarak yorumlanamayacağını, bu geçiş bölgesinin lipopolimerin CH<sub>2</sub> grubunun düzenlenmesiyle ilgili olduğunu gösterilmiştir (Baekmark ve ark., 1999). Son yıllarda PEG2000 bağlanma fosfolipitlerle yapılan çalışmalar da yüksek yüzey basınç geçiş bölgesinin, fosfolipidin alifatik zincirindeki düzenlemeyle ilgili olduğunu söylemektedir (Lozano ve Longo, 2009; Naumann ve ark., 1999; Tanwir ve Tsoukanova, 2008; Xu ve ark., 2001). Bizim bulduğumuz saf DSPE-PEG2000 için bulunan sonuçlar bu gözlemlere benzerdir. Düşük yüzey basınçlarında PEG zincirleri "bazlama"

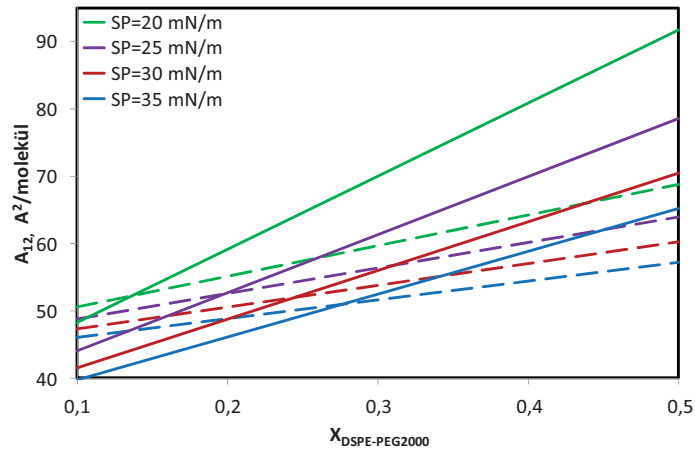
olarak adlandırılan yapıda oldukları için moleküller arası mesafe oldukça geniştir. Polimerin bu yapısından dolayı moleküller arası sterik kuvvetler ortaya çıkar ve bu kuvvetler polimerin büyüklüğüne bağlıdır. Yüksek yüzey basınç geçiş bölgesinin altındaki düşük basınçlarda alkil zincirler arasındaki etkileşimler çok önemli bir rol oynamamaktadır (Baekmark ve ark., 1999). Yüzey basıncının artmasıyla birlikte polimer zincirinin yüzeyden desorbe olduğu ve düşük yüzey basıncı geçiş bölgesince polimer zincirinin konfigürasyon değişimine uğrayarak “mantar” formuna geçtiği düşünülmektedir. Basınç yüksek yüzey basıncına ulaşınca alifatik zincir düzenlenmesinin ve sıkıştırılmasının gerçekleştiği ikinci geçiş bölgesi gözlemlendi. **Şekil 40**'de gösterildiği gibi farklı mol oranlarıyla hazırlanan DSPC:DSPE-PEG2000 karışımları saf DSPC'ye göre daha genişletilmiş film davranışı göstermekle birlikte, bu karışımların izotermi saf bileşenlerin izotermi arasında yer almaktadır. Saf DSPE-PEG2000 izotermine benzer şekilde karışımların izotermi yaklaşık 8 mN/m and 16 mN/m civarlarında iki geçiş bölgesi göstermiştir. Düşük yüzey basıncındaki bölge PEG2000 zincirinin konfigürasyon değişimini gösterirken, yüksek yüzey basıncındaki bölgede DSPE-PEG2000'in alifatik zinciri daha düzenli bir yapıya geçmiş DSPC ve DSPE-PEG2000'in alifatik zincirleri arasındaki kohezif etkileşimler artmıştır (Lozano ve Longo, 2009; Stepniewski ve ark., 2011; Tanwir ve Tsoukanova, 2008). Bir başka gözlem de şudur ki, karışımındaki DSPE-PEG2000 miktarı arttıkça yüksek basınç geçiş bölgesi genişlemiş ve moleküler alan daha büyük alana kaymıştır. Bu durumda karışım içindeki DSPE-PEG2000, PEG zinciri içerdiği için karışımı daha genişletilmiş (expanded) hale getirdiği söylenebilir (Chou ve Chu, 2002; Chou ve Chu, 2003; Tanwir ve Tsoukanova, 2008).

DSPE-PEG2000 karışımlarının monotabakaları için  $A_{ideal}$  ve  $A_{artan}$  sırasıyla denklem (3) ve denklem (4) kullanılarak hesaplandı. Şekil 41 farklı yüzey basınçlarında gerçek moleküler alanın ( $A_{12}$ ) idealden sapmasını göstermektedir.  $A_{12}$  değerleri DSPE-PEG2000 mol oranının fonksiyonu olarak verilmiştir ve kesikli çizgiler de hesaplanan  $A_{ideal}$  değerlerini temsil etmektedir. Şekil 41'deki sonuçlara göre DSPC ve DSPE-PEG2000 ideal olmayan davranış göstermekte ve hava-su arayüzeyinde karışabilmektedir ve bu sonuçlar bu konu ile daha önceden yapılan çalışmalarla desteklenmektedir (Chou ve Chu, 2002; Chou ve Chu, 2003; Tanwir ve Tsoukanova, 2008). Şekil 42'de ise karışımların artan serbest enerjileri farklı yüzey basınçlarında verilmiştir. Görüldüğü üzere bu ikili karışımların artan serbest enerjileri negatif değerdedir ve bu yüzden moleküller arası çekici kuvvetler daha baskındır denilebilir. Karışımların bu karakteristik özellikleri çeşitli PC/PE-PEG2000 sistemlerinin

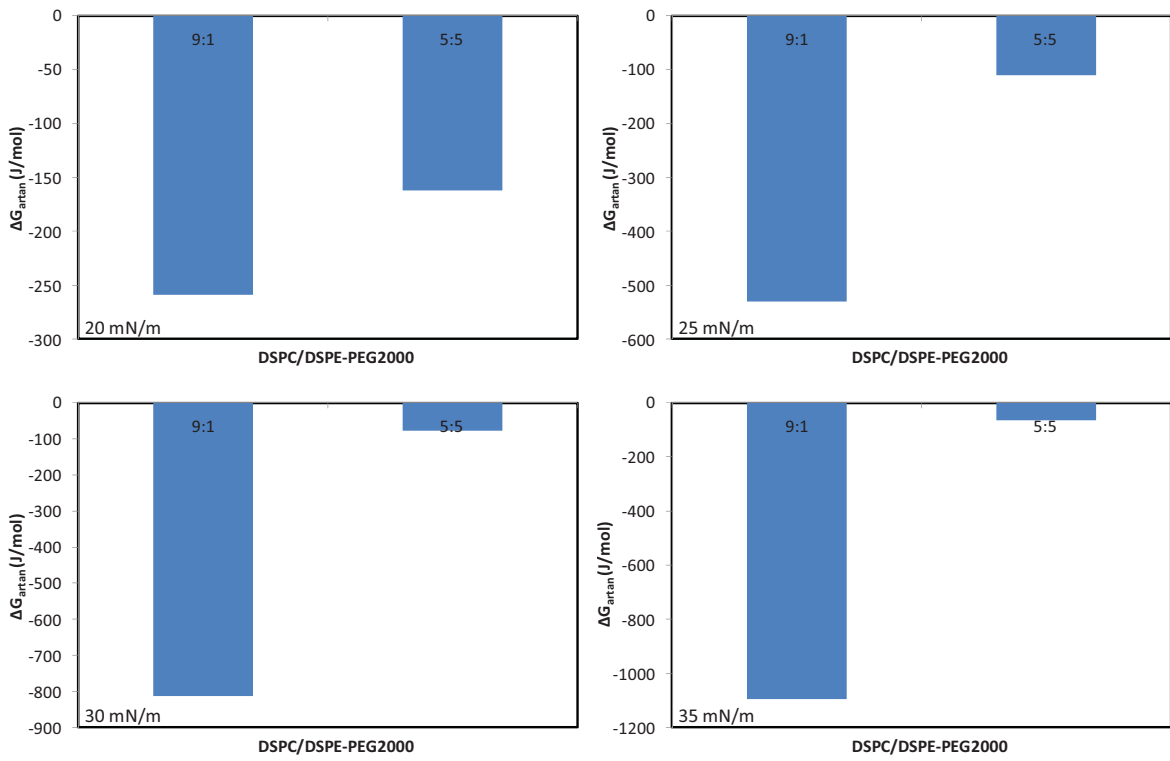
özellikleri ile uyum içerisindedir (Chou ve Chu, 2002; Chou ve Chu, 2003). 5:5 mol oranında hazırlanan DSPC:DSPE-PEG2000 monotabakası fazla miktarda DSPE-PEG2000 içermesinden dolayı bu karışımında PEG zincirinin itici ve genişletici etkisi fazla olmuştur ve karışımındaki moleküller birbirlerine çok fazla yaklaşmamışlardır. Bu durumun etkisi olarak 5:5 DSPC:DSPE-PEG2000 karışımının  $\Delta G_{\text{artan}}$  değerleri 9:1 karışımından daha büyüktür, bu yüzden 5:5 lik karışımındaki moleküller arasındaki etkileşim daha zayıftır. 5:5 karışımında, monotabakadaki PEG zincir yoğunluğundan ötürü, monotabakanın daha düzensiz bir form alması, ve PEG zincirlerinin konfigürasyon değişiminin gerçekleşmediği ya da kısmen gerçekleştiği de düşünülmektedir.



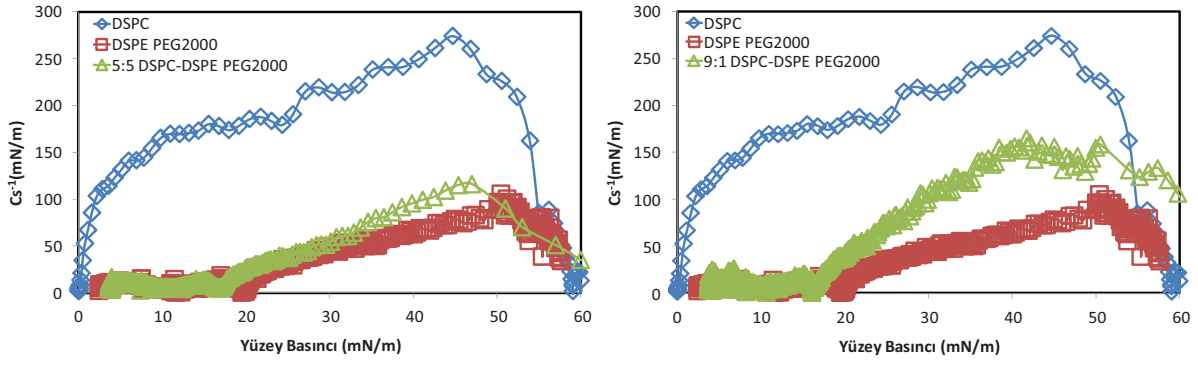
**Şekil 40.** DSPC:DSPE-PEG2000 karışımlarının Yüzey Basıncı-Ortalama moleküler alan ( $\pi$ -A) izotermeleri



**Şekil 41.** Farklı mol oranlarında DSPE-PEG2000 içeren DSPC:DSPE-PEG2000 karışımlarının ortalama moleküler alan değerleri ( $A_{12}$ )



**Şekil 42.** Farklı basınçlarda DSPC:DSPE-PEG2000 karışımlarının artan Gibbs enerjileri

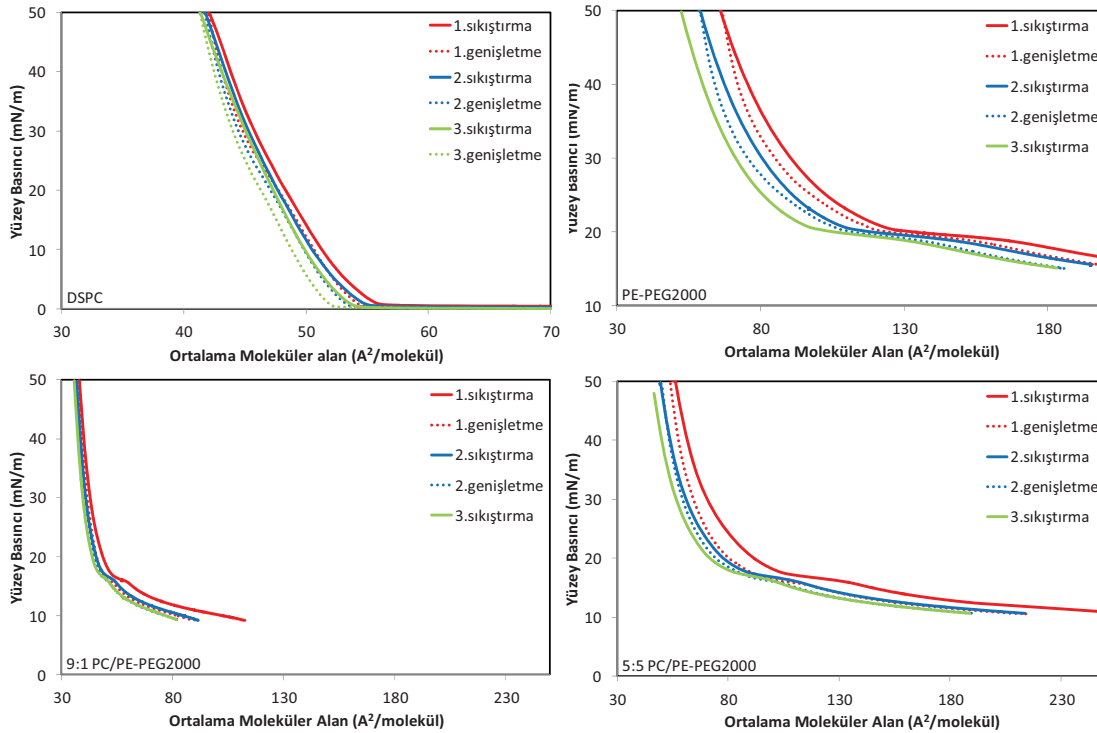


**Şekil 43.** DSPC:DSPE-PEG2000 karışımlarının yüzey basıncına karşı  $C_s^{-1}$  (mN/m) değerleri

Bu bulgulara ek olarak saf bileşenlerin ve DSPC:DSPE-PEG2000 karışımlarının sıkıştırılabilirlik modülü değerleri ( $C_s^{-1}$ ) hesaplandı. Şekil 43’de gösterildiği gibi saf DSPE-PEG2000 monotabakası PEG zincirinin etkisinden dolayı, saf DSPC monotabakasına göre daha sıkıştırılabilir davranış göstermektedir. Karışımların  $C_s^{-1}$  değerleri saf bileşenlerinkilerin arasında kalmıştır. Ayrıca, karışımındaki DSPE-PEG2000 miktarı arttıkça karışımın sıkıştırılabilirliği arttığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara göre DSPE-PEG2000’in karışıma ilave edilmesiyle, tıpkı daha önceki çalışmalarda incelendiği gibi, monotabaka daha sıkıştırılabilir hale gelmiştir (Chou ve Chu, 2002; Chou ve Chu, 2003; Lozano ve Longo, 2009). Bu değerlerle ilgili bir başka gözlem de yüzey basıncı-moleküler alan izotermelerinde geçiş bölgelerine denk gelen yüzey basınçlarında iki adet minimum pik görülmesidir. *Lozano ve ark*’nın gözlemlendiği gibi düşük yüzey basıncında görülen ilk pik DSPE-PEG2000’in polimer baş grubundaki konfigürasyon değişikliğini desteklerken, yüksek yüzey basıncındaki pik ise alkil zincirleri arasındaki yeni bir düzenlemeye işaret etmektedir (Lozano ve Longo, 2009).

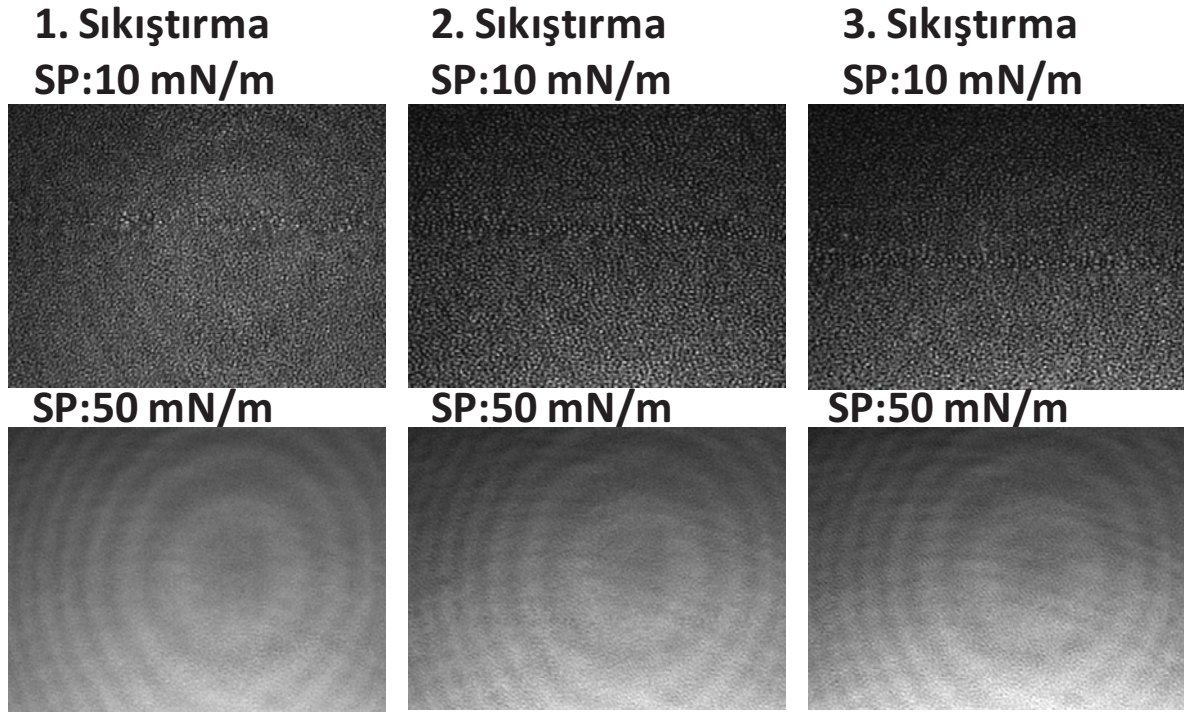
Saf bileşenlerin ve karışımların monotabakalarının tekrar yayılabilirlik özelliklerini incelemek için sıkıştırma-genişletme deneyleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 44 saf DSPC, saf DSPE-PEG2000 ve DSPC:DSPE-PEG2000 karışımların sıkıştırma-genişletme döngü izotermelerini göstermektedir. İkinci ve üçüncü sıkıştırma ile birlikte saf DSPC izotermi çok az sola kayarken, PEG zincirinin etkisinden dolayı saf DSPE-PEG2000 izotermi sola doğru çok daha fazla kayma göstermiştir. Bu durumda *Baekmark ve ark.* tarafından gözlemlendiği gibi PEG zinciri moleküllerin tekrar düzene girmesini önlemiş olabilir ve sıkıştırma boyunca PEG zincirleri birbirlerine dolanmış olabilir (Baekmark ve ark., 1995). Karışımlarda DSPE-

PEG2000 bileşenin varlığından dolayı ikinci ve üçüncü sıkıştırılmalarda sola doğru kaymıştır ve bu kayma miktarı karışımındaki DSPE-PEG2000 mol miktarının artmasıyla birlikte artmıştır. Ayrıca karışımların ve saf DSPE-PEG2000 bileşenin ilk sıkıştırılışı sırasında gözlemlenen yüksek basınç geçiş bölgeleri sıkıştırma-genişletme döngüleri boyunca aynen kalmıştır. Bu durumda döngüler boyunca monotabakadaki moleküller yüzeyden ayrılmadan monotabakada kalmıştır. Bu izotermlere ek olarak sıkıştırma-genişletme deneyleri sırasında monotabakadaki değişimleri daha detaylı inceleyebilmek için karışımların monotabakalarının sıkıştırma-genişletme döngüsü sırasında BAM görüntüleri kaydedilmiştir. Şekil 45’de 9:1 ve Şekil 46’de 5:5 DSPC:DSPE-PEG2000 karışımlarının sıkıştırma-genişletme döngülerinin BAM görüntüleri verilmektedir. Şekillerde görüldüğü üzere, monotabakaların yüzey morfolojisinde herhangi bir değişikliğe rastlanmamıştır. Buradan moleküllerin hava-su ara yüzeyinde ayrılarak altfaza geçmeleri söz konusu olmadığı ve/veya PEG zincirleri arasındaki olası konfigürasyon değişiminin tersinir olduğu söylenebilir. Bu sonuçlara ve daha önce literatürde yapılmış çalışmalara göre saf DSPE-PEG2000 ve DSPC:DSPE-PEG2000 karışımlarının monotabakalarında yüzeyden ayrılma (squeeze-out) olayı söz konusu değildir (Borden ve ark., 2006).

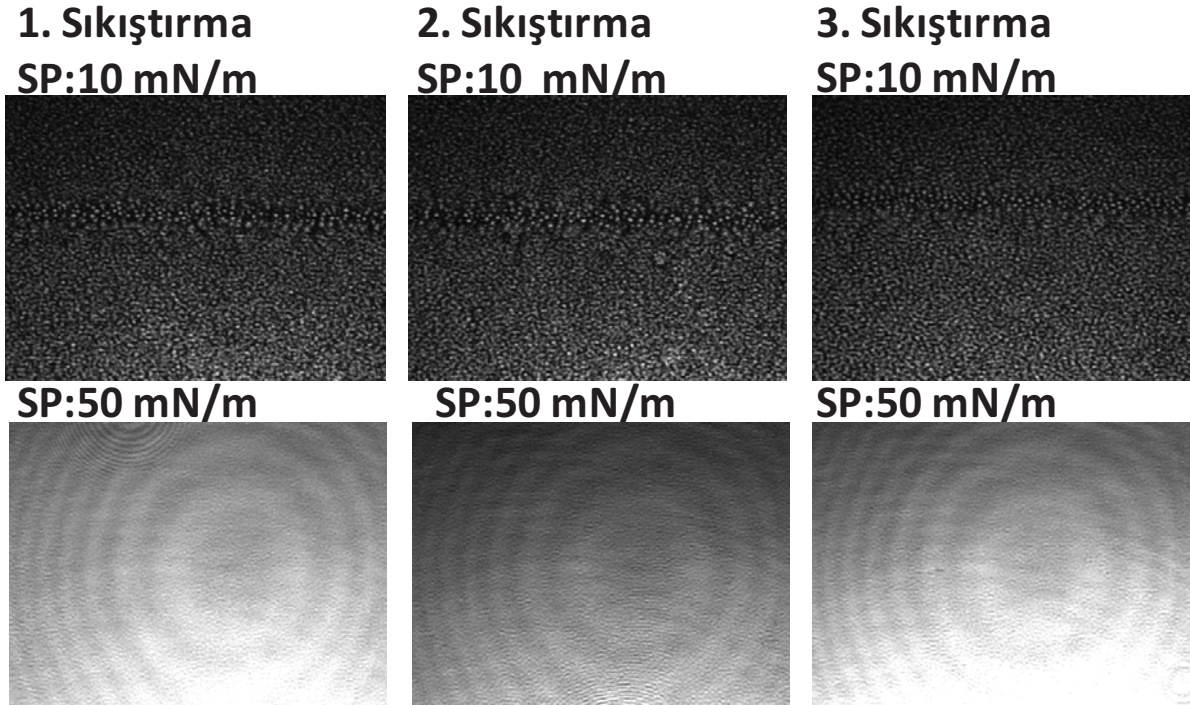


**Şekil 44.** Saf bileşenlerin ve DSPC:DSPE-PEG2000 karışımlarının sıkıştırma-genişletme döngü izotermleri



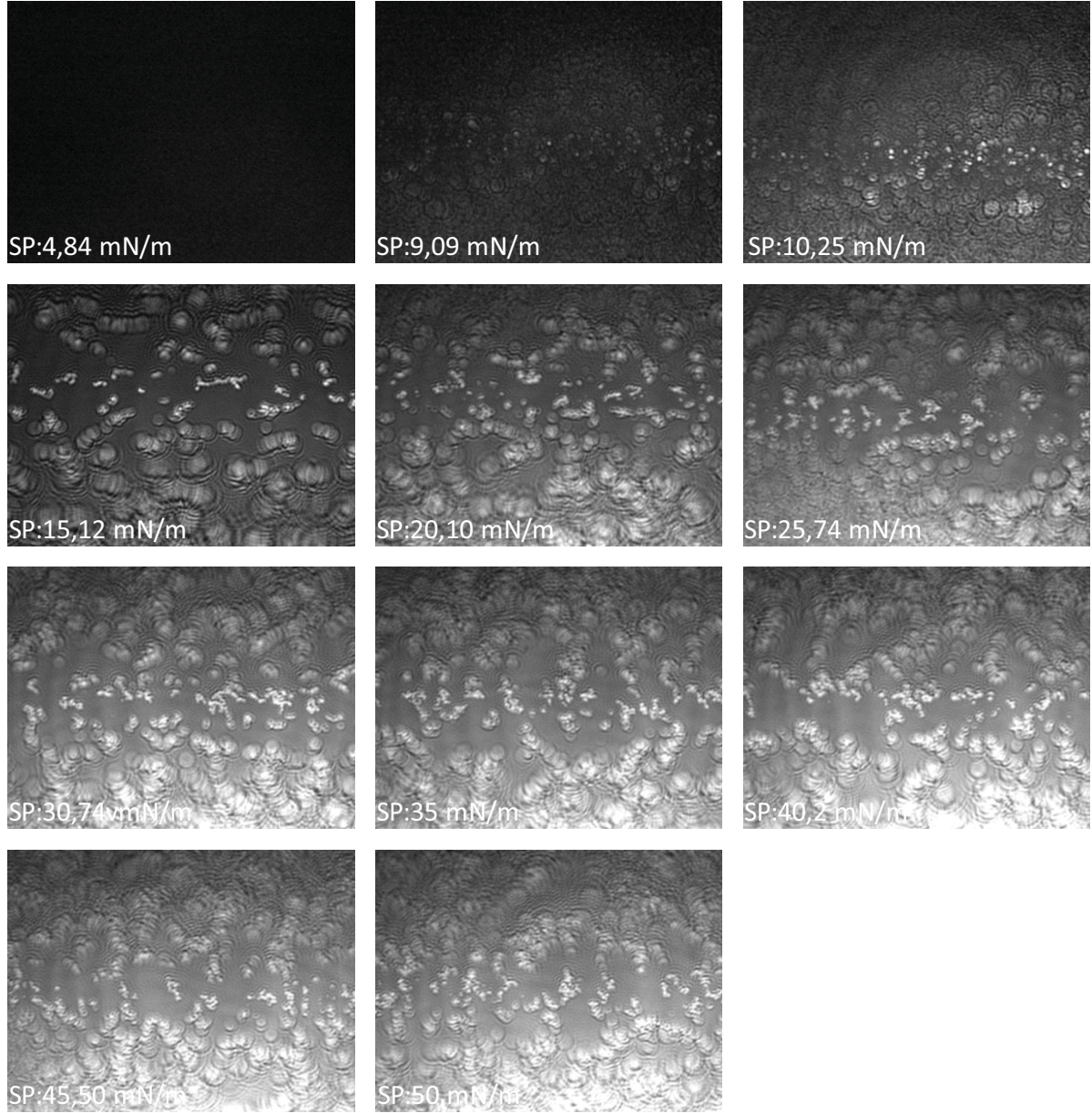


**Şekil 45.** 9:1 DSPC:DSPE-PEG2000 karışımının sıkıştırma-genişletme döngülerinin BAM görüntüleri

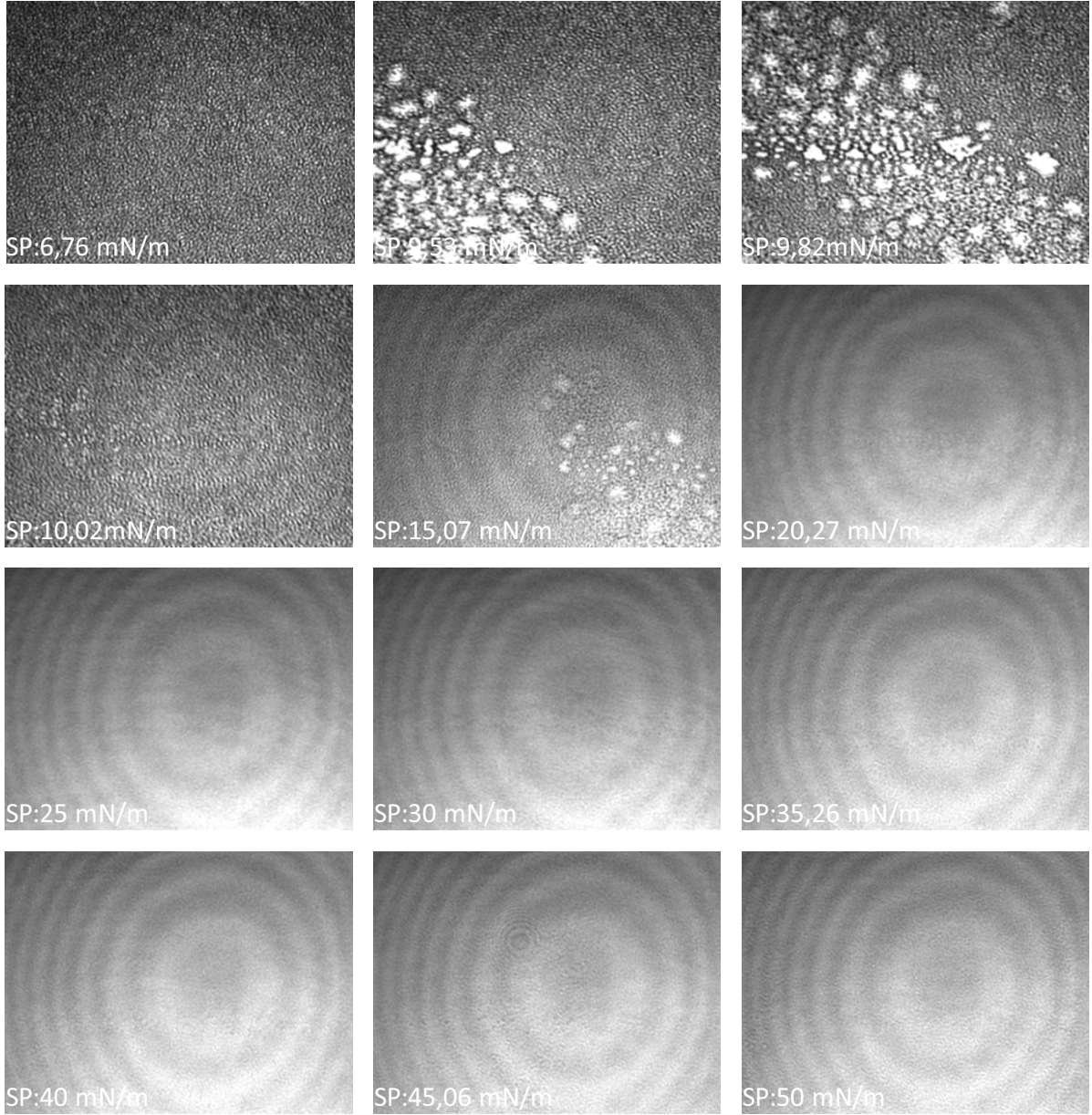


**Şekil 46.** 5:5 DSPC:DSPE-PEG2000 karışımının sıkıştırma-genişletme döngülerinin BAM görüntüleri

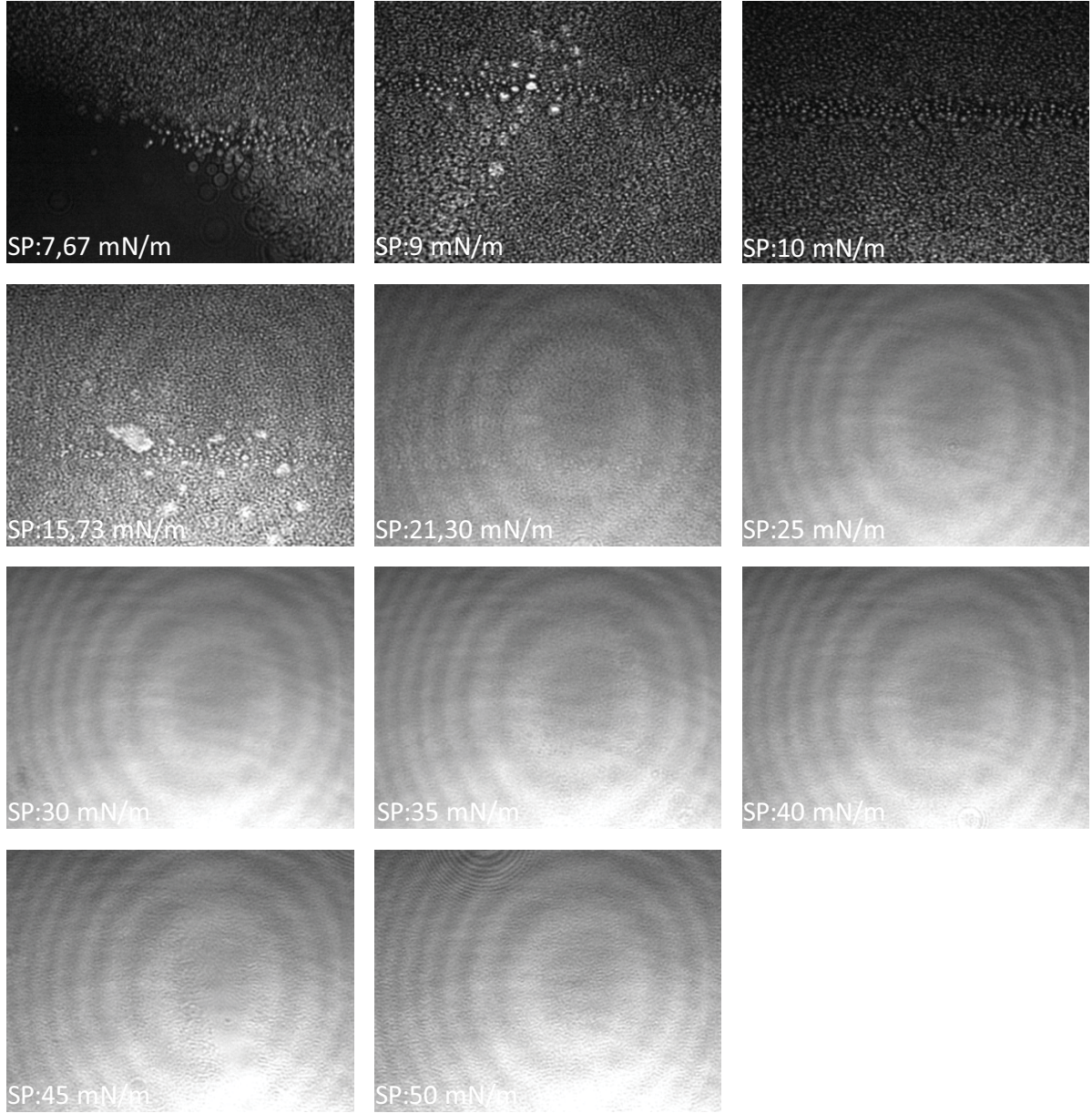
Morfolojik özellikleri incelemek için saf DSPE-PEG2000 ve DSPC:DSPE-PEG2000 karışımlarının BAM görüntüleri değişik yüzey basınçlarında çekilmiştir. Şekil 47’de gösterildiği gibi saf DSPE-PEG2000 filmi düşük basınçlarda oldukça karanlık bir görüntü vermiştir. Görüntülerdeki karanlık ya çok ince bir film tabakasını ifade eder ya da moleküllerin yoğunluğunun düşüklüğü anlamına gelir (Stepniewski ve ark., 2011). Yüzey basıncının artmasıyla birlikte monotabaka film daha görünür hale geldiği ve yüzeyde parlak tanecikler belirdiği görülmektedir. Yaklaşık olarak 9 mN/m’de görülen bu tanecikler PEG zincirinin “bazlama” yapıdan “mantar” yapıya geçişini ifade ettiği, PEG zincirlerinin suya doğru yöneldikleri düşünülmektedir. Bu yüzey morfolojisi maksimum yüzey basıncına kadar aynı şekilde kalmıştır. Benzer morfolojik değişim DPPE-PEG2000 ve DSPE-PEG2000 monotabakaları için *Jebrail ve ark.* tarafından da görülmüştür (Jebrail ve ark., 2008). 9:1 DSPC:DSPE-PEG2000 karışım için yapılan BAM deneyinin sonuçları Şekil 48’de verilmektedir. Düşük yüzey basınçlarında homojen bir yüzey gözlemlenmiş, ancak sıkıştırma ile birlikte yüzeyde küçük parlak adacıklar ortaya çıktığı görülmüştür. 9 mN/m ve 16 mN/m civarlarında gözlemlenen bu parçacıklar sırasıyla PEG zincirinin ve alkil zincirin düzenlenmesini temsil edebilir. Daha fazla sıkıştırma ile monotabaka tamamen homojen bir hale gelmiştir. Şekil 49’da 5:5 mol oranlı DSPC:DSPE-PEG2000 karışımının BAM görüntüleri verilmiştir. Bu karışımında DSPE-PEG2000 miktarı fazla olduğu için karışımındaki moleküller daha geç bir araya gelebilmektedir. Bu nedenle düşük yüzey basınçlarında koyu renkli bölgeler görüldü. 9:1 karışıma benzer olarak yaklaşık 9 mN/m ve 16 mN/m’de yüzeyde parlak küçük parçacıklar göze çarpmakta ve yüzeyin daha fazla sıkıştırma ile birlikte homojenleştiği görülmektedir.



**Şekil 47.** Saf DSPE-PEG2000'nin Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri



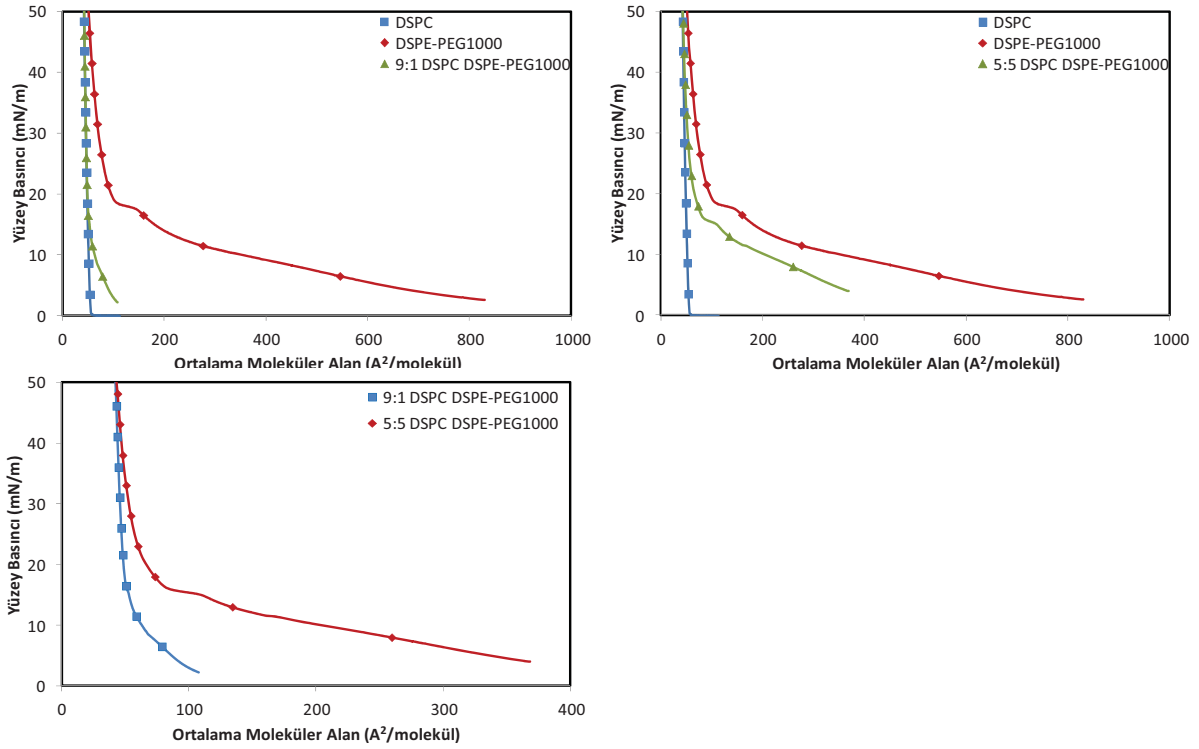
**Şekil 48.** 9:1 DSPC:DSPE-PEG2000 karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri



**Şekil 49.** 5:5 DSPC:DSPE-PEG2000 karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri

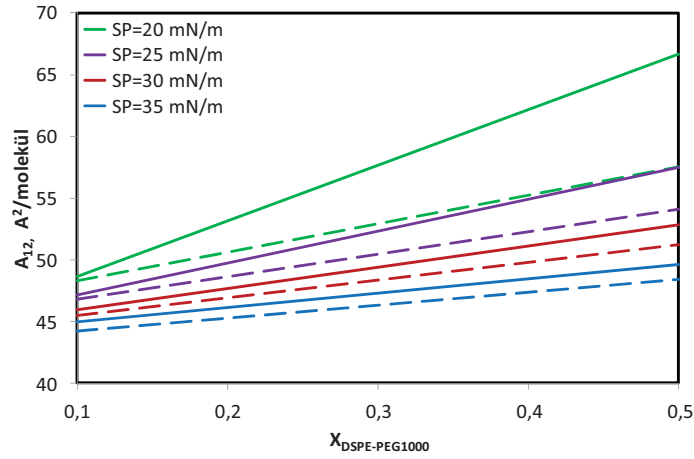
*DSPC:DSPE-PEG1000 İkili Karışımlarının Yüzey Basıncı-Moleküler Alan İzotermi ve Brewster Açısı Mikroskop Görüntüleri:*

Saf DSPE-PEG1000 bileşeni ve DSPC:DSPE-PEG1000 ikili sistemleri için yüzey basıncına karşılık moleküler alan izotermi ( $\pi$ -A) değişik yüzey basınçlarında deneysel olarak elde edildi. Şekil 50'de saf DSPC, saf DSPE-PEG1000 ve farklı mol oranlarında hazırlanan DSPC:DSPE-PEG1000 karışımlarının  $\pi$ -A izotermi gösterilmektedir.



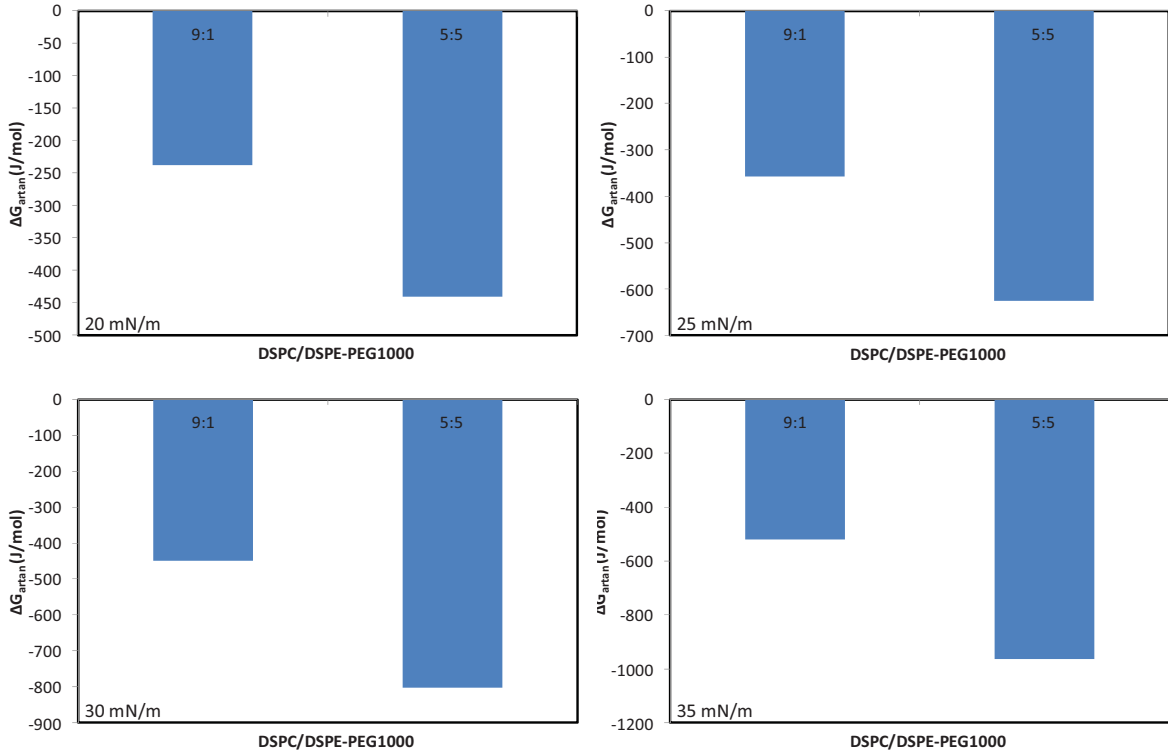
**Şekil 50.** DSPC:DSPE-PEG1000 karışımlarının Yüzey Basıncı-Ortalama moleküler alan ( $\pi$ -A) izotermeleri

Saf DSPE-PEG1000 monotabakası, saf DSPE-PEG2000 monotabakasına göre daha az genişletilmiş (expanded) bir özellik göstermektedir. Şekil 50’de görüldüğü üzere saf DSPE-PEG1000 bileşeni DSPE-PEG2000’e göre daha kısa PEG zincirine sahip olduğu için DSPE-PEG1000 monotabakasının ortalama moleküler alanı DSPE-PEG2000 ile kıyaslanıldığında aynı yüzey basınçlarında daha küçüktür. DSPC:DSPE-PEG2000 ikili karışımlarına benzer şekilde DSPE-PEG1000 bileşenin DSPC monotabakasına katılmasıyla karışım daha genişletilmiş (expanded) davranış gösterdi. PEG zincirinin “bazlama” yapısından “mantar” yapısına geçişini temsil eden düşük basınç geçiş bölgesi hem saf DSPE-PEG1000 hem de DSPC:DSPE-PEG1000 karışımlarının izotermelerinde yaklaşık olarak 8 mN/m yüzey basıncında gözlemlendi. Buna ek olarak alifatik zincirin düzenli yapıya geçmesine işaret eden yüksek basınç geçiş bölgesi yaklaşık 16 mN/m’de ortaya çıkmıştır. Karışımlardaki bu geçiş bölgesi DSPE-PEG1000 miktarının artmasıyla birlikte daha belirginleşmiş ve artan hidrofilik PEG zincirleri arasındaki sterik etkileşimlerden dolayı daha büyük ortalama moleküler alan saptanmıştır.



**Şekil 51.** Farklı mol oranlarında DSPE-PEG1000 içeren DSPC:DSPE-PEG2000 karışımlarının ortalama moleküler alan değerleri ( $A_{12}$ )

DSPE-PEG1000 karışımları için hesaplanan  $A_{\text{ideal}}$  ve  $A_{\text{artan}}$  değerleri Şekil 51’de verilmiştir. Şekil 51’de görüldüğü üzere gerçek ortalama moleküler alan ideallikten sapmıştır. Bu durumda tıpkı DSPC:DSPE-PEG2000 ikili karışımlarında bulunduğu gibi, DSPC ve DSPE-PEG1000 ideal davranmamakta ve hava-su ara yüzeyinde birbiri ile karışabilmektedir (Chou ve Chu, 2002; Chou ve Chu, 2003; Tanwir ve Tsoukanova, 2008). DSPC ve DSPE-PEG1000 molekülleri arasındaki etkileşimleri incelemek için hesaplanan DSPC:DSPE-PEG1000 karışımlarının artan serbest enerjileri ( $\Delta G_{\text{artan}}$ ) Şekil 52’de gösterilmiştir. DSPC:DSPE-PEG1000 karışımlarının  $\Delta G_{\text{artan}}$  değerleri negatif olarak bulunmuştur. Bundan dolayı bu moleküller arasında çekici kuvvetlerin etkili olduğu söylenebilir. DSPC:DSPE-PEG2000 karışımlarından farklı olarak, en negatif  $\Delta G_{\text{artan}}$  değerleri 5:5 mol oranıyla hazırlanan karışımında elde edilmiştir. Burada, PEG zincirinin daha kısa olması sebebi ile konfigürasyon değişimlerinin daha etkili bir şekilde gerçekleştiği ve bu nedenle artan DSPE-PEG1000 miktarı ile birlikte ideallikten negatif sapmaların baskın olduğu söylenebilir. DSPE-PEG2000 içeren monotabakada, PEG’in hidrofilik karakterinden dolayı düzgün (smooth) bir tek tabaka oluşturamadığı için, konfigürasyonel değişimlerinin olma olasılığının düşük olduğu ihtimalini akıllara getirebilir.

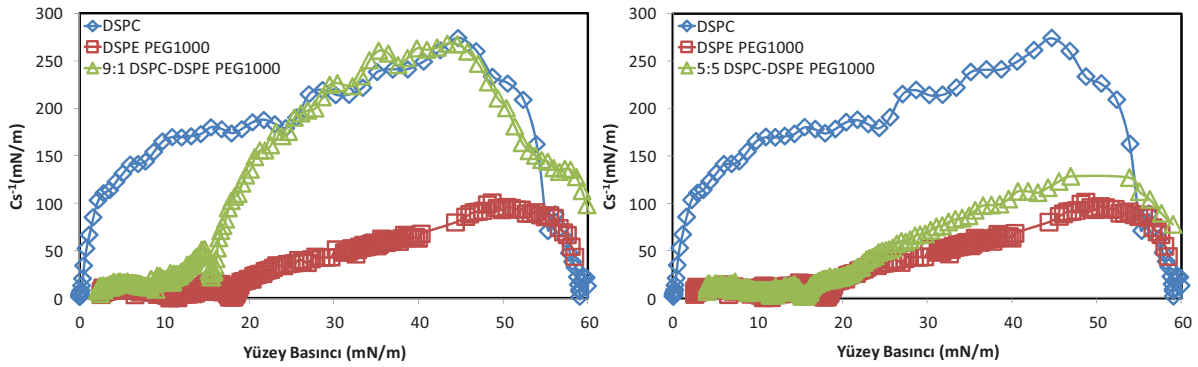


**Şekil 52.** Farklı basınçlarda DSPC:DSPE-PEG1000 karışımların artan Gibbs enerjileri

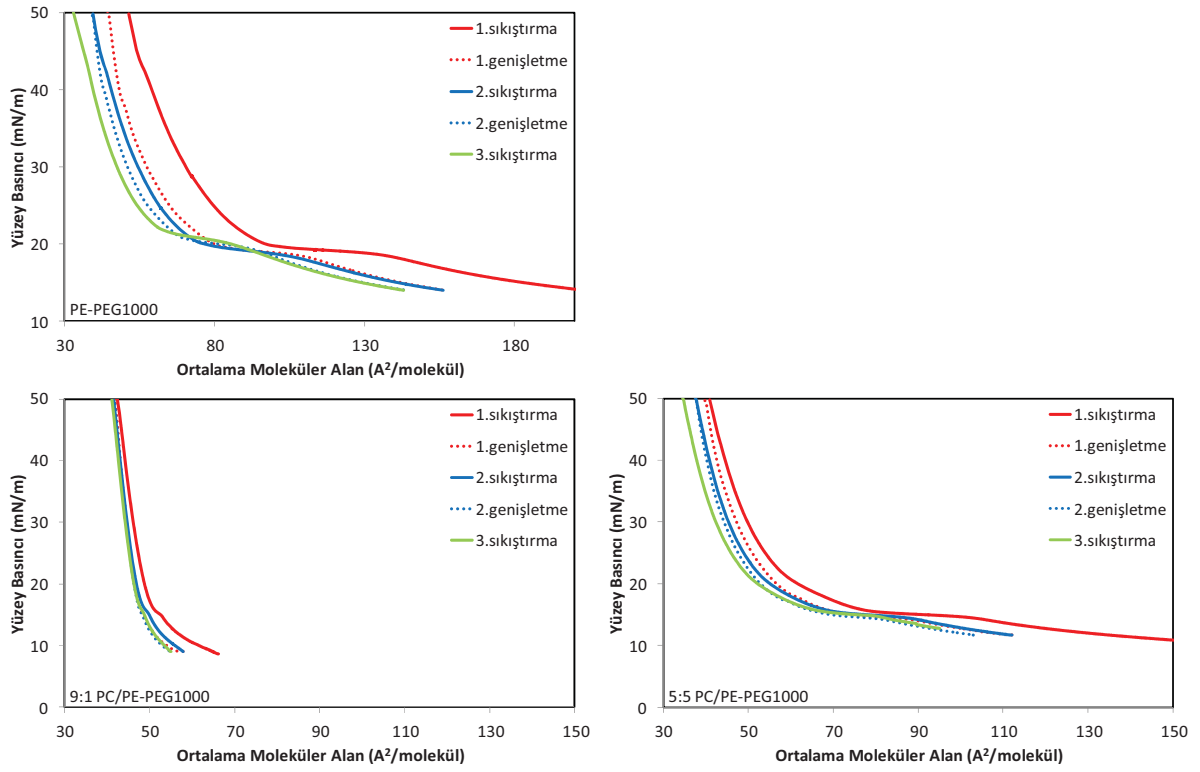
Saf DSPE-PEG1000 ve DSPC:DSPE-PEG1000 karışımlarının monotabakalarının sıkıştırılabilirlik özelliklerini incelemek amacıyla hesaplanan hava-su ara yüzeyinde sıkıştırılabilirlik modülü değerleri ( $C_s^{-1}$ ) Şekil 53’de görülmektedir. PEG zinciri içeren saf DSPE-PEG1000 monotabakası saf DSPC monotabakasına göre daha düşük sıkıştırılabilirlik modülü değerine sahip olduğu gözlemlenmiştir. DSPE-PEG2000 içeren monotabakalarda gözlemlendiği gibi, saf DSPE-PEG1000 ve DSPC:DSPE-PEG1000 karışımları için de yüzey basıncı-moleküler alan izotermelerindeki geçiş bölgelerinin basınçlarına yakın basınçlarda iki minimum pik göze çarpmıştır. Ayrıca, yaklaşık 15-16 mN/m üzeri yüzey basınçlarında 9:1 DSPC:DSPE-PEG1000 karışımının sıkıştırılabilirlik modülü DSPC’ninkine benzer bir davranış gösterirken, 5:5 karışımı daha çok DSPE-PEG1000 molekülünün sıkıştırılabilirlik modülüne benzer bir davranış göstermiştir. Buradan, 9:1 karışımında yüksek yüzey basıncında “bazlama”dan “fırça” yapısına doğru PEG zincir konfigürasyonunun tamamlandığı, ancak 5:5 karışımı için hala sıkıştırılabilir bölgelerin olduğu anlaşılmaktadır. İlave olarak, saf DSPE-PEG1000 ve DSPC:DSPE-PEG1000 karışımlarının sıkıştırma-genişletme deneyleri sırasında elde edilen izotermeler Şekil 54’de verilmiştir. Saf DSPE-PEG1000 ve DSPC:DSPE-PEG1000 karışımlarının birinci sıkıştırma ile elde edilen



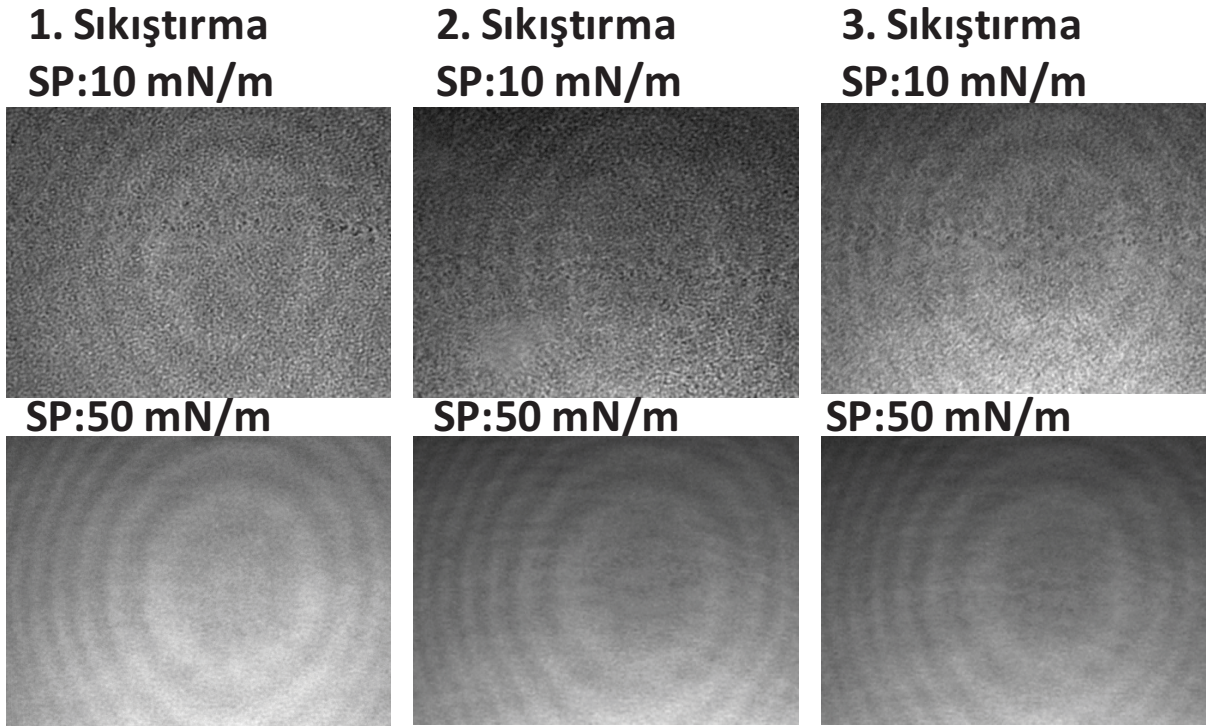
izotermlerine kıyasla, ikinci ve üçüncü sıkıştırma PEG zincirinin etkisinden dolayı izotermeler sola doğru kaymıştır. Ayrıca ilk sıkıştırma ortaya çıkan geçiş bölgeleri sıkıştırma-genişletme döngüleri boyunca tekrar görülmüştür. Bu koşullar altında DSPC:DSPE-PEG1000 karışımları yüzeyden ayrılma davranışı göstermedikleri ve moleküler etkileşime bağlı monotabaka oluşumunun tersinir olduğu söylenebilir. Şekil 55 ve Şekil 56'de DSPC:DSPE-PEG1000 karışımlarının sıkıştırma-genişletme döngüleri boyunca çekilen BAM görüntülerinden görüldüğü üzere, tekrar tekrar sıkıştırma-genişletme sırasında görüntülerde her sefer sıkırtmada daha sıkışık bir monotabaka elde edildiği görülmektedir ki, bunun PEG zincirlerindeki konfigürasyon değişiminden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu durum 5:5 karışımında daha bariz görülmektedir.



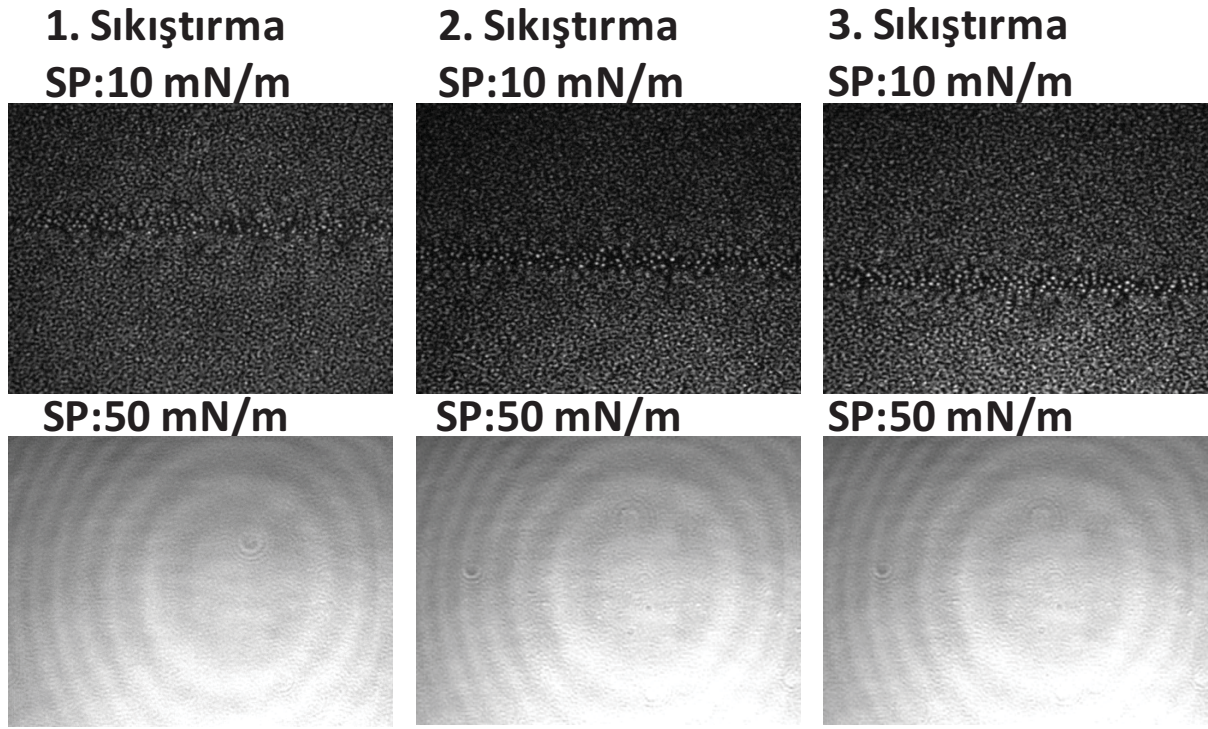
Şekil 53. DSPC:DSPE-PEG1000 karışımların yüzey basıncına karşı  $C_s^{-1}$  (mN/m) değerleri



**Şekil 54.** Saf bileşenlerin ve DSPC:DSPE-PEG1000 karışımlarının sıkıştırma-genişletme döngü izotermleri



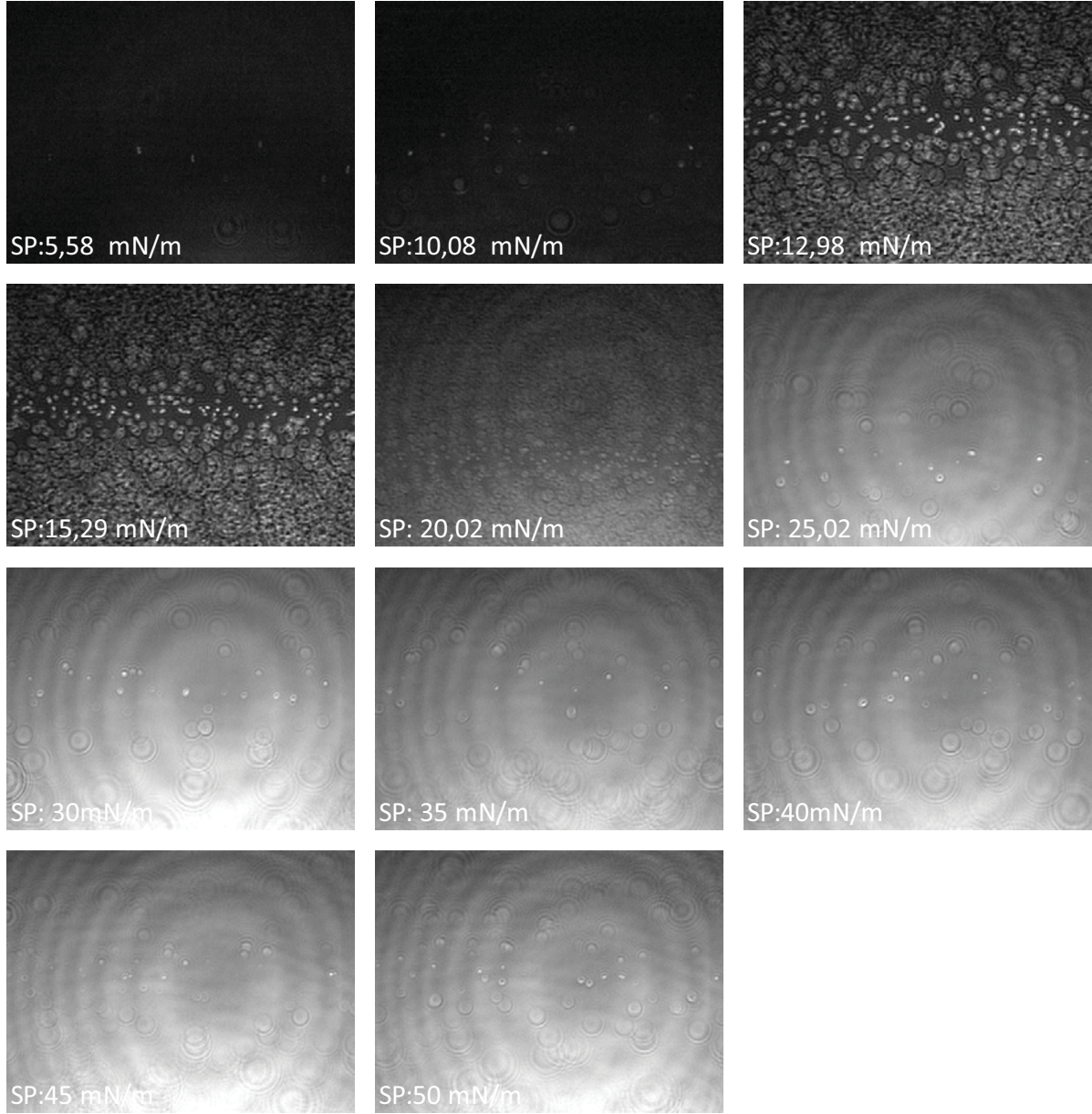
**Şekil 55.** 9:1 DSPC:DSPE-PEG1000 karışımının sıkıştırma-genişletme döngülerinin BAM görüntüleri



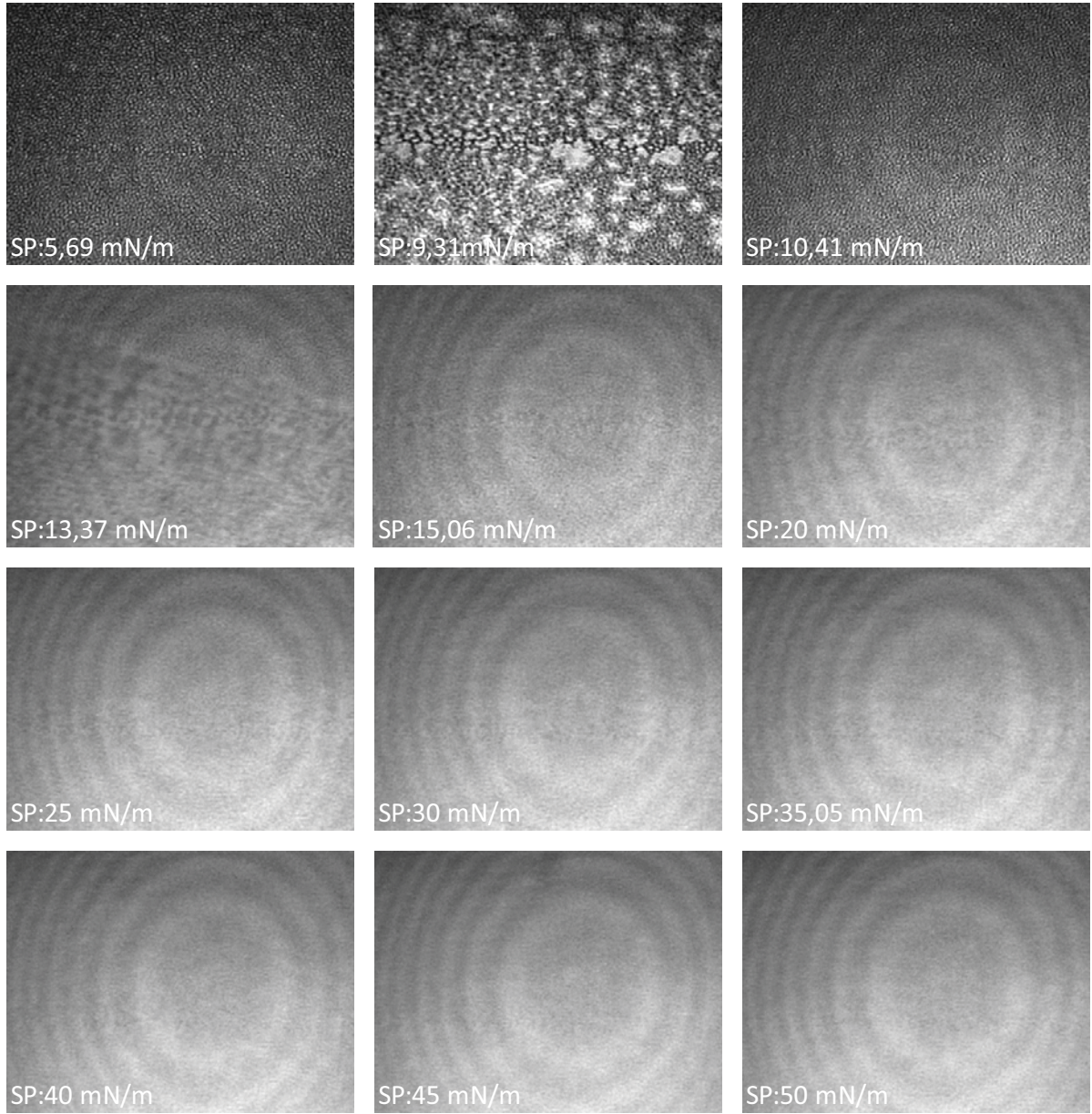
**Şekil 56.** 5:5 DSPC:DSPE-PEG1000 karışımının sıkıştırma-genişletme döngülerinin BAM görüntüleri

Farklı yüzey basınçlarında çekilen saf DSPE-PEG1000 monotabakasının BAM görüntüleri Şekil 57’de verilmiştir. Şekilde görüldüğü üzere büyük moleküler alanlarındaki görüntüler daha karanlık olup, sıkıştırma ile yüzeyde küçük parlak noktalar belirmeye başlamıştır. Bunun, büyük bir olasılıkla sıkıştırma ile birlikte PEG zincirlerinin konfigürasyon değişimine uğramasından ve hidrokarbon zincirlerinin yüzeye daha dik konuma geçmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bundan dolayı bu küçük parlak noktalar bir araya gelmeye başlayarak daha belirginleşmiştir. Sıkıştırmaya devam edildikçe yüzey daha homojen bir hale gelmiş ve bu küçük parlak noktacıklar görülmeye devam etmiştir. 9:1 mol oranında hazırlanan DSPC:DSPE-PEG1000 karışımının BAM görüntüleri Şekil 58 gösterilmiştir. Bu BAM görüntüleri 9:1 DSPC:DSPE-PEG2000 karışımının görüntülerine benzemektedir. Düşük basınç bölgesinde yuvarlak parlak yapılar görülmüş, devam eden sıkıştırma ile homojen bir yüzey meydana gelmiştir. Bu homojen daha parlak görüntü ise çok iyi bir şekilde düzenlemiş moleküler yapıyı temsil etmektedir (Brandal ve ark., 2007). Şekil 59’de verilen 5:5 mol oranıyla hazırlanan DSPC:DSPE-PEG1000 karışımının BAM görüntüleri 5:5 lik DSPC:DSPE-PEG2000 karışımının görüntülerine benzemekle birlikte fazla miktarda PEG zincirinin olmasından dolayı moleküller arası mesafe fazladır ve yüzeyde koyu bölgeler fark

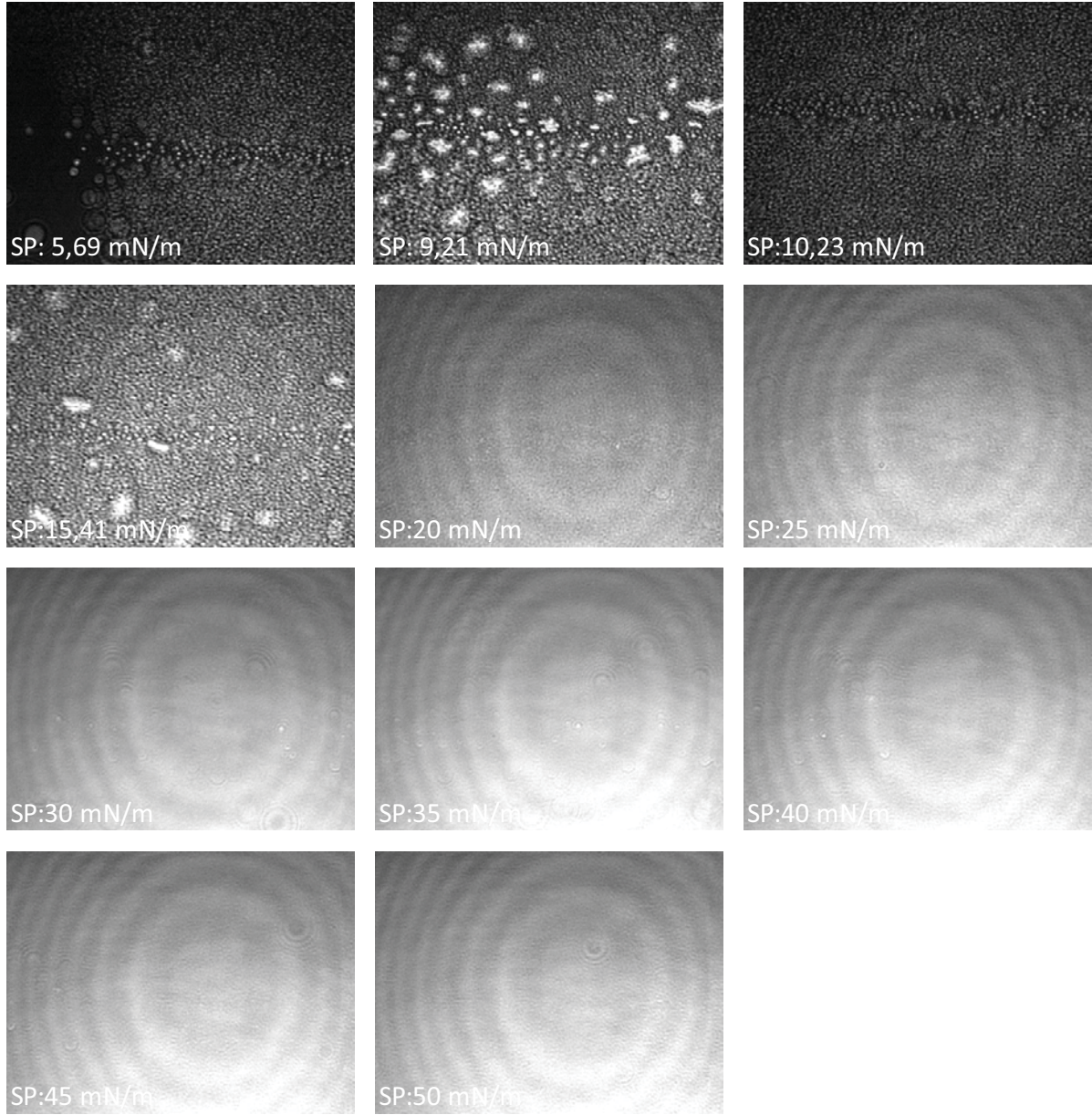
edilmektedir. Ayrıca, yaklaşık olarak düşük ve yüksek geçiş bölgelerinin basınçlarında parlak ve daha sıkışmış adacıklar olduğu göze çarpmaktadır.



**Şekil 57.** Saf DSPE-PEG1000'nin Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri



**Şekil 58.** 9:1 DSPC:DSPE-PEG1000 karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri



**Şekil 59.** 5:5 DSPC:DSPE-PEG1000 karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri

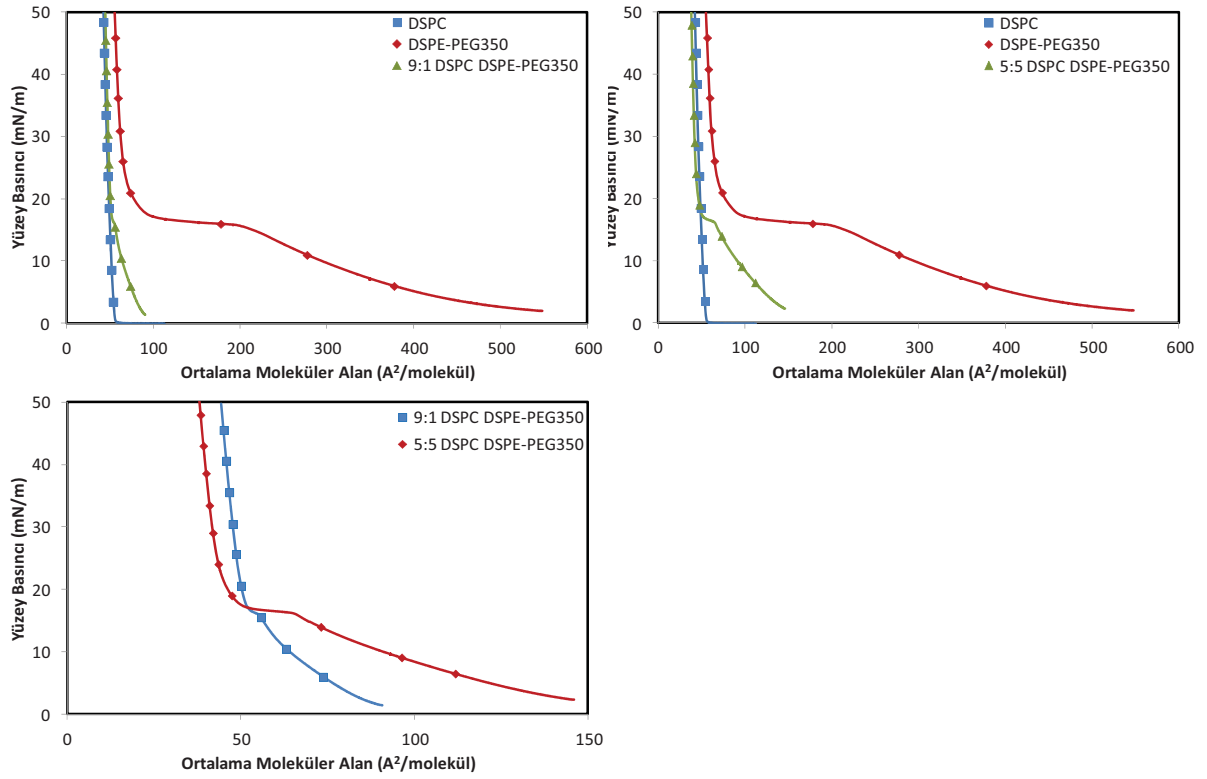
*DSPC:DSPE-PEG350 İkili Karışımlarının Yüzey Basıncı-Moleküler Alan İzotermi ve Brewster Angle Mikroskop Görüntüleri:*

Saf DSPE-PEG350 ve DSPC:DSPE-PEG350 karışımlarının monotabakalarının yüzey basınçlarının ortalama moleküler alana göre değişimleri Şekil 60'de verilmektedir. Saf DSPE-PEG350 filmi saf DSPC 'ye göre daha genişletilmiş davranış göstermiştir; fakat saf DSPE-PEG2000 ve saf DSPE-PEG1000'den farklı olarak izotermde sadece yüksek basınç geçiş

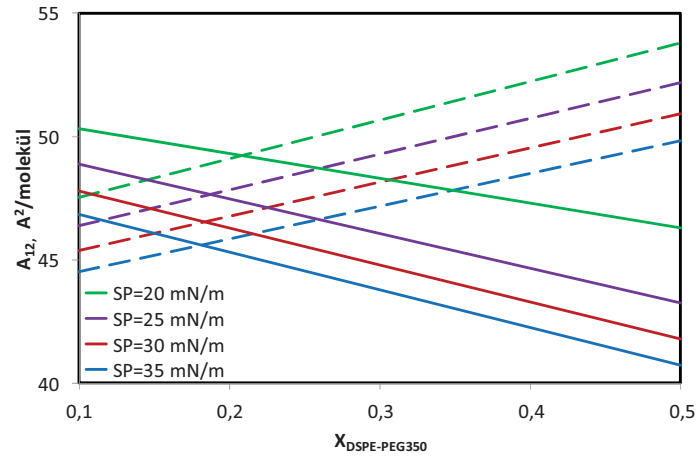
bölgesi görülmüştür. DSPE-PEG350 ve DSPC'nin karıştırılmasıyla oluşturulan monotabakalar da yüksek basınç geçiş bölgesine kadar genişletilmiş film davranışı göstermiştir. Saf DSPE-PEG350 ile aynı şekilde DSPC:DSPE-PEG350 karışımlarının izotermelerinde de düşük basınç geçiş bölgeleri belli olmamakla birlikte yaklaşık 16 mN/m civarı yüksek basınç geçiş bölgesi fark edilmektedir. Düşük basınç geçiş bölgesi PEG zincirinin konfigürasyonundaki değişimi temsil etmesine rağmen lipopolimerdeki PEG zincirinin kısalmasıyla bu bölge çok belli olmamıştır. Kısa PEG zincirinin bu etkisinden dolayı PEG zincirindeki yapısal değişim çok net bir şekilde görülemediği. Daha önce yapılan bir çalışmada benzer sonuçlar *Mathe ve ark.* tarafından tartışılmıştır ve kısa PEG zinciri içeren lipopolimerlerin monotabakalarında alkil zincirin düzenlenmesiyle ortaya çıkan tek geçiş bölgesi görülürken, uzun PEG zinciri içeren lipopolimerlerde ise tipik lipopolimer davranışı ve iki geçiş bölgesi gözlemlendiği belirtilmiştir (Mathe ve ark., 2000). Diğer taraftan DSPC:DSPE-PEG2000 ve DSPC:DSPE-PEG1000 karışımlarında olduğu gibi DSPC:DSPE-PEG350 karışımında da lipopolimer miktarı artırıldıkça ortalama moleküler alan artmıştır.

İdeal davranıştan sapmaları incelemek için DSPC:DSPE-PEG350 karışımlarının  $A_{ideal}$  değerleri hesaplandı ve  $A_{12}$  değerleri ile kıyaslandı. Karışımındaki DSPE-PEG350'nin mol oranının fonksiyonu olarak  $A_{ideal}$  ve  $A_{12}$  değerleri grafiğe geçirildi. Şekil 61'de gösterildiği gibi DSPC:DSPE-PEG350 karışımındaki moleküller ideal olmayan davranış sergilemiş ve birbiri ile karışabilmiştir. Buna ek olarak Şekil 62'de verilen karışımların artan serbest enerjilerini ( $\Delta G_{artan}$ ) incelediğimizde ise DSPC ve DSPE-PEG350 molekülleri arasında çekici kuvvetlerin etkili olduğu görülmektedir. DSPC:DSPE-PEG1000 karışımlarına benzer şekilde DSPC:DSPE-PEG350 karışımları için en negatif  $\Delta G_{artan}$  değerleri 5:5 mol oranıyla hazırlanan karışımında bulunmuştur.

Şekil 63'de gösterilen saf DSPE-PEG350 ve DSPC:DSPE-PEG350 karışımlarının sıkıştırılabilirlik modülü ( $C_s^{-1}$ ) grafiklerinde 16 mN/m civarı ortaya çıkan yüzey basıncı-moleküler alan izotermelerindeki yüksek basınç geçiş bölgelerine denk gelen minimum pik dikkat çekmektedir. Ayrıca DSPC:DSPE-PEG2000 ve DSPC:DSPE-PEG1000 karışımlarında gözlemlendiği gibi bu karışımlarda da monotabakaya DSPE-PEG350 molekülünün ilave edilmesiyle karışım saf DSPC'ye göre daha sıkıştırılabilir hale gelmiştir.

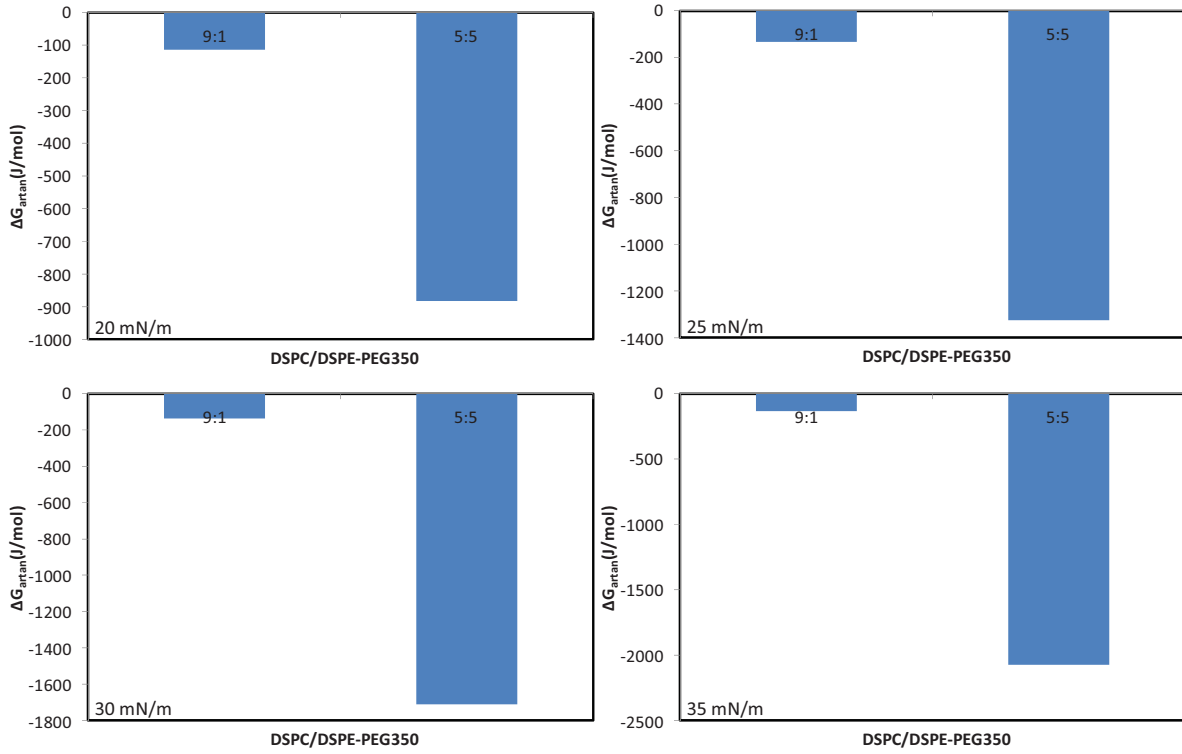


Şekil 60. DSPC:DSPE-PEG350 karışımlarının Yüzey Basıncı-Ortalama moleküler alan ( $\pi$ -A) izotermeleri

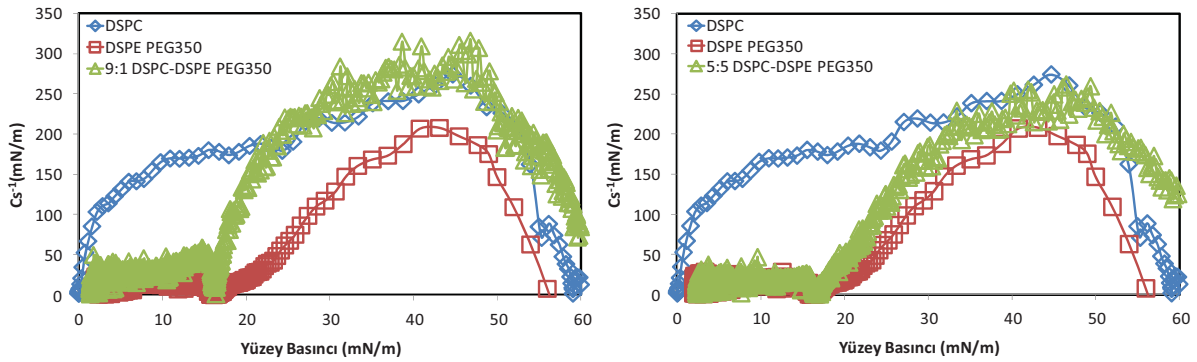


Şekil 61. Farklı mol oranlarında DSPE-PEG2000 içeren DSPC:DSPE-PEG350 karışımlarının ortalama moleküler alan değerleri ( $A_{12}$ )





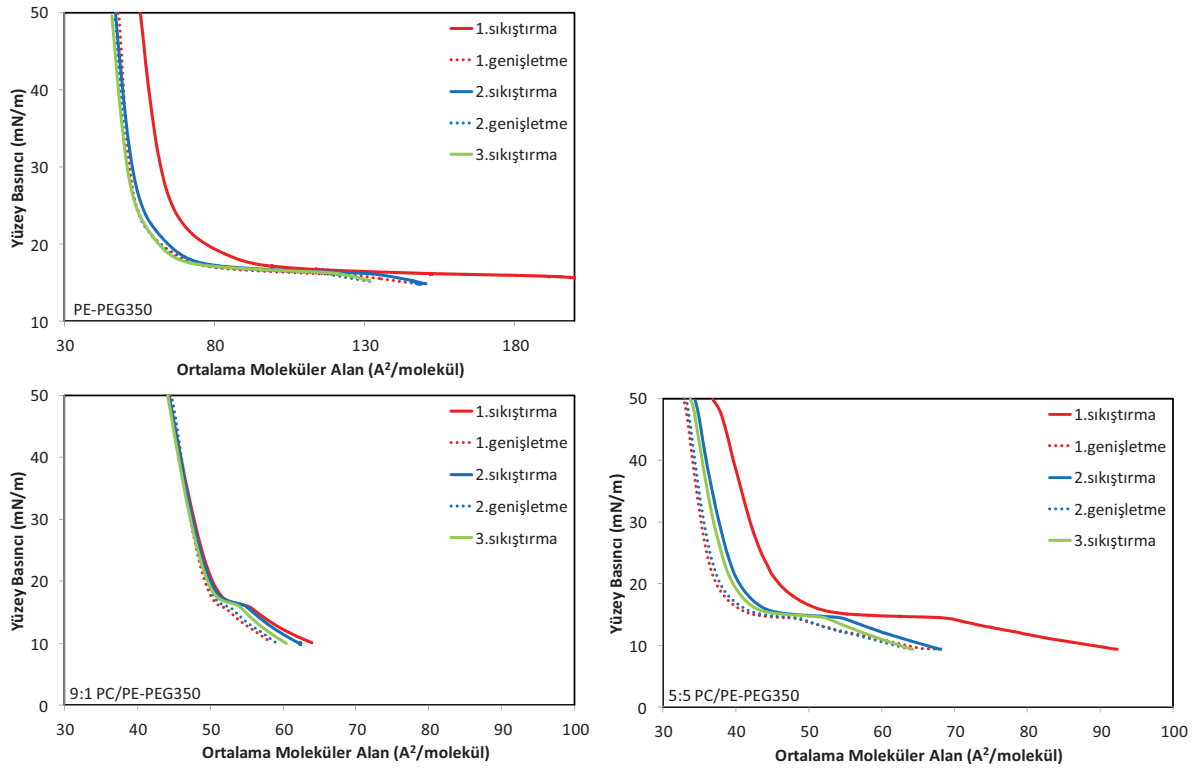
Şekil 62. Farklı basınçlarda DSPC/ DSPE-PEG350 karışımların artan Gibbs enerjileri



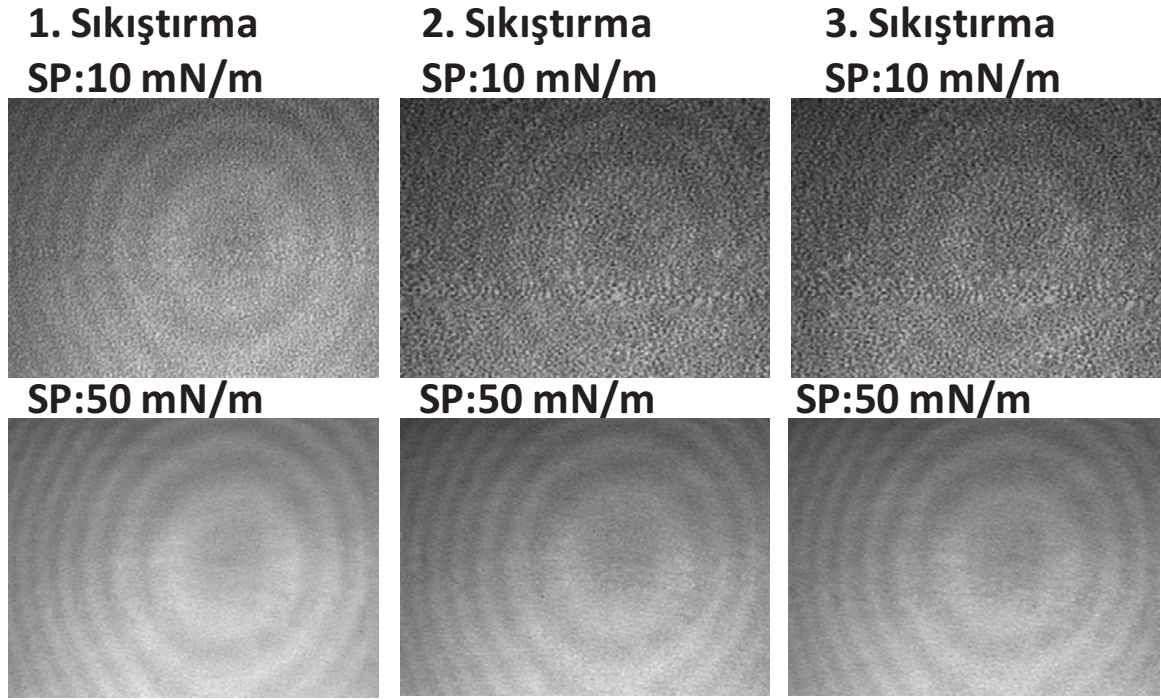
Şekil 63. DSPC/ DSPE-PEG350 karışımların yüzey basıncına karşı  $C_s^{-1}$  (mN/m) değerleri

Şekil 64'de saf DSPE-PEG350 ve DSPC:DSPE-PEG350 karışımlarının sıkıştırma ve genişletme izotermi gösterilmiştir. Karışımların ve saf DSPE-PEG350'nin monotabakalarının ikinci ve üçüncü sıkıştırma izotermi PEG zincirinin etkisinden dolayı ilk sıkıştırma izotermine kıyasla daha küçük moleküler alanda yükselmiştir. Buna ek olarak ilk sıkıştırma esnasında 16 mN/m yüzey basıncı civarı ortaya çıkan geçiş bölgesi sıkıştırma- genişletme döngüsü boyunca aynen kalmıştır. Şekil 65 ve Şekil 66'de 9:1 ve 5:5

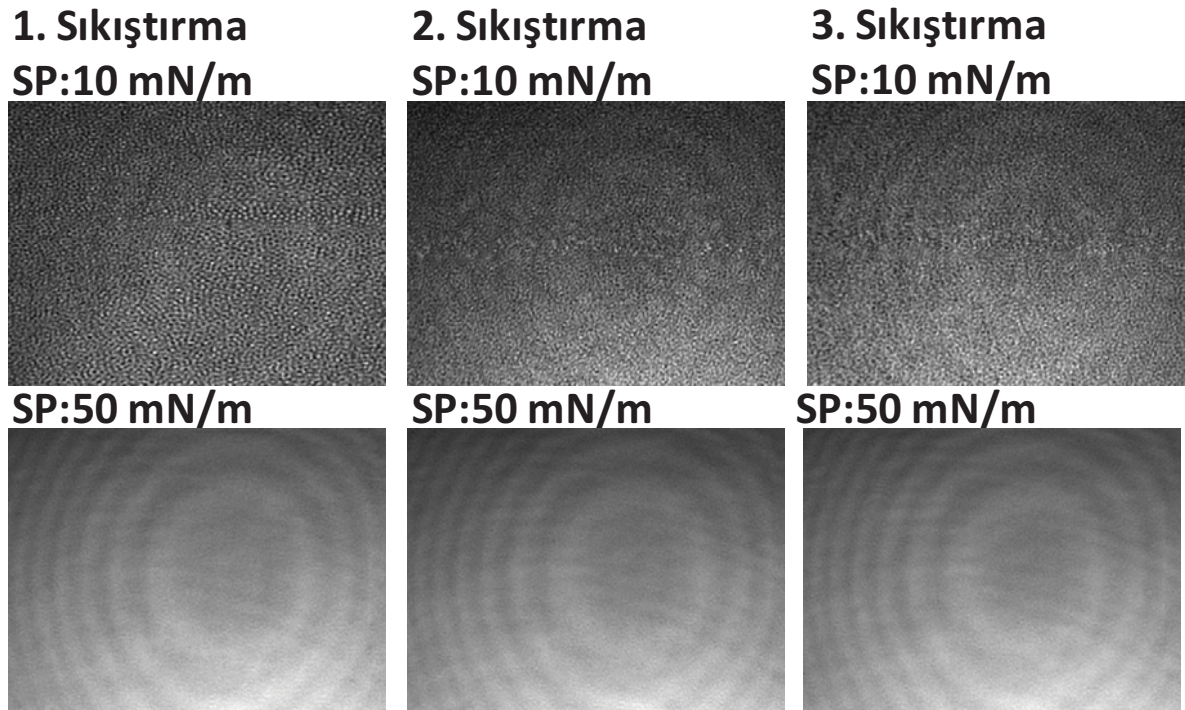
DSPC:DSPE-PEG350 karışımlarının sıkıştırma-genişletme döngüleri için alınan BAM görüntüleri incelendiğinde sıkıştırma-genişletme çevrimleri sırasında görüntülerde herhangi bir değişiklik göze çarpmamıştır. Bundan dolayı moleküllerin literatürde tartışıldığı üzere yüzeyden ayrılmasının söz konusu olmadığı kanaatine varılmıştır. Burada bulunan sonuçlar DSPC:DSPE-PEG2000 ve DSPC:DSPE-PEG1000 karışımları için yapılan gözlemlere benzer niteliktedir.



**Şekil 64.** Saf bileşenlerin ve DSPC/ DSPE-PEG350 karışımlarının sıkıştırma-genişletme döngü izotermeleri



**Şekil 65.** 9:1 DSPC:DSPE-PEG350 karışımının sıkıştırma-genişletme döngülerinin BAM görüntüleri

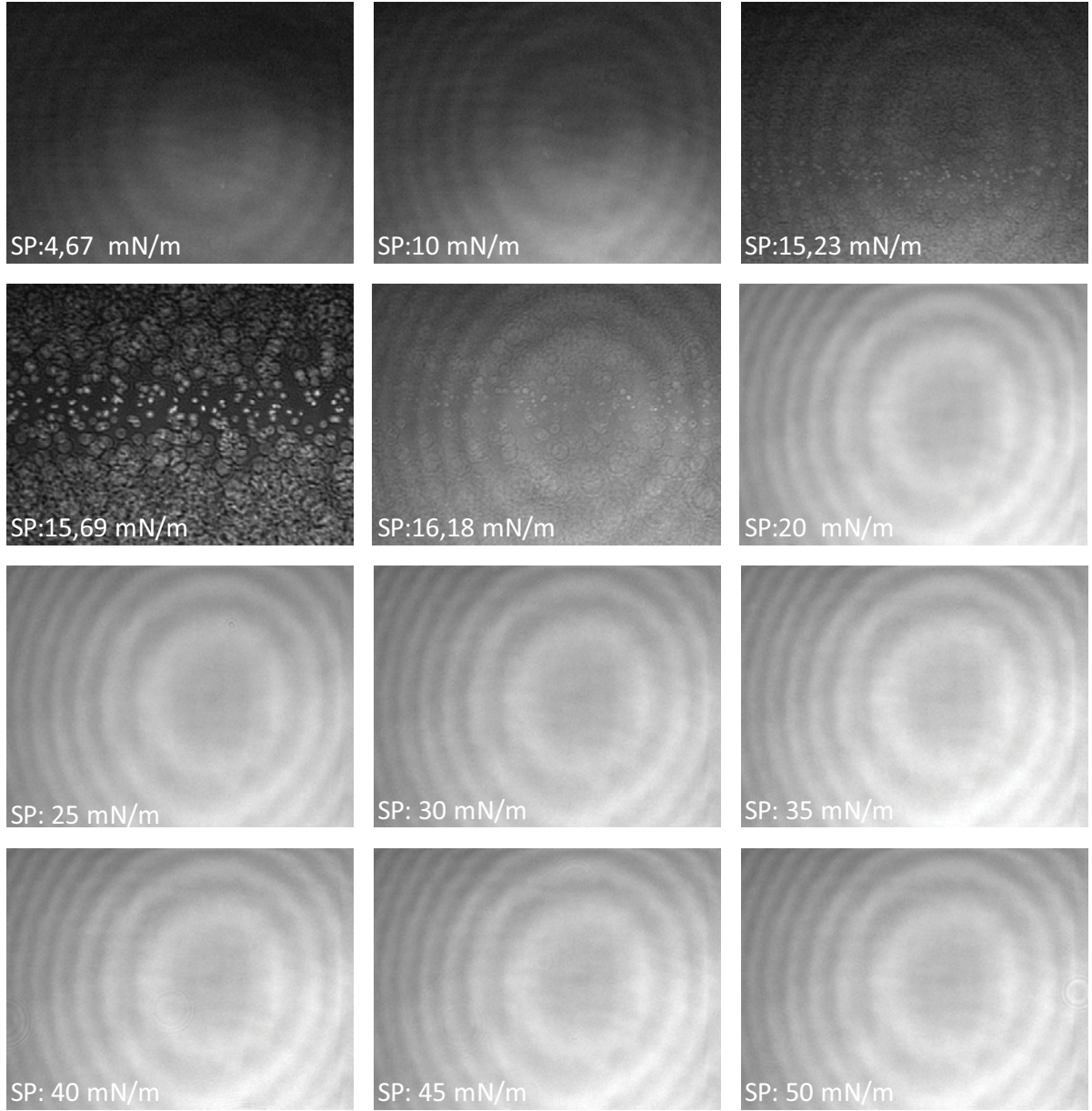


**Şekil 66.** 5:5 DSPC:DSPE-PEG350 karışımının sıkıştırma-genişletme döngülerinin BAM görüntüleri

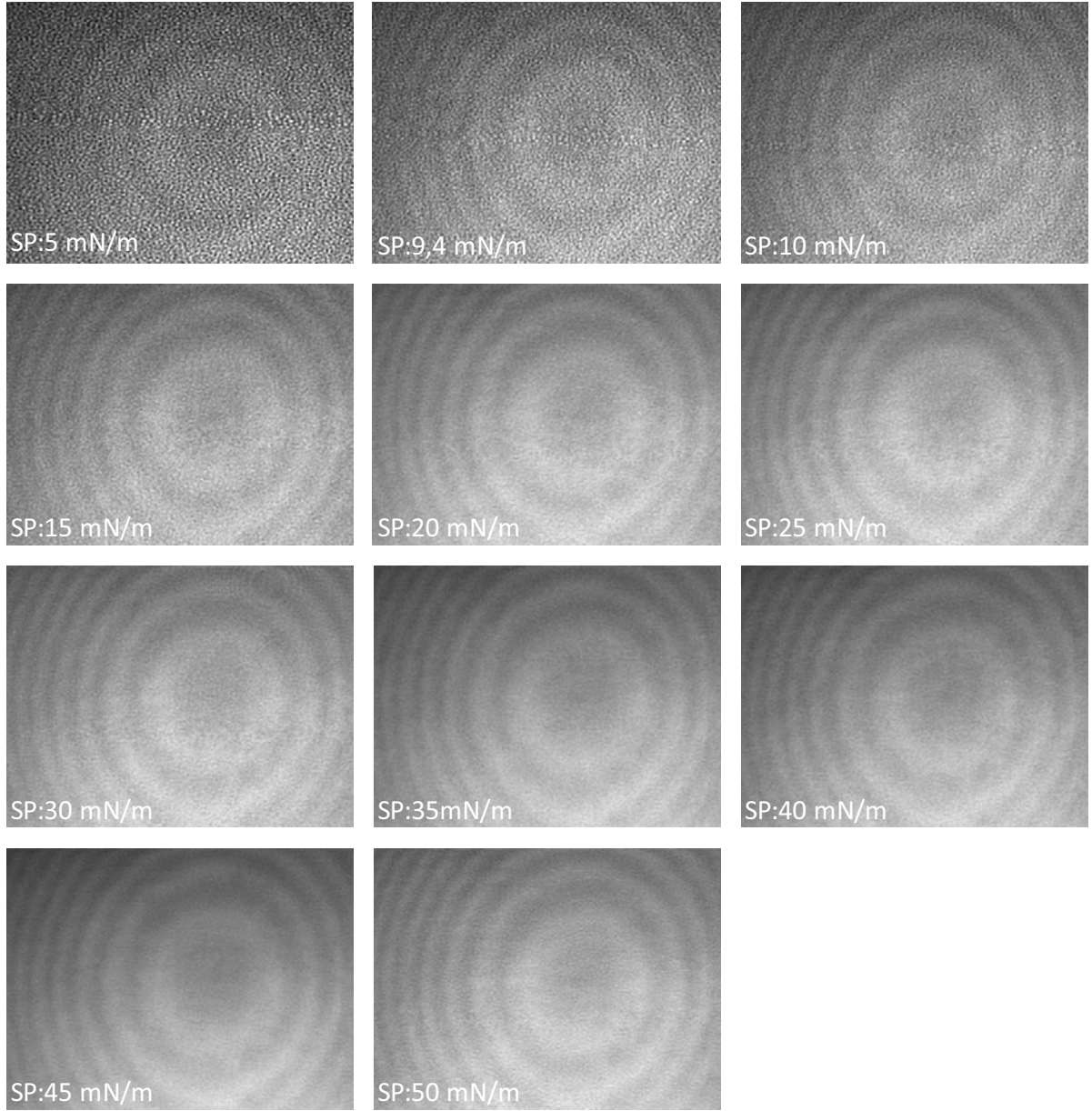
Şekil 67’de görüldüğü gibi saf DSPE-PEG350’in BAM görüntüleri düşük yüzey basınçlarında karanlıktır ve yüzey basıncı 15 mN/m’ye ulaşıncaya kadar yüzeyde herhangi bir değişiklik görülmemiştir. *Mathe ve ark.*’nın tartışmalarına göre kısa PEG zinciri içeren lipopolimerler tam olarak doymuş alkil zincir içeren yağ (lipid) gibi davranabilirler (Mathe ve ark., 2000). Belki de bu nedenden dolayı DSPE-PEG350 monotabakalarında düşük basınç geçiş bölgesi görülememektedir. Yüzey basıncı yaklaşık olarak 15 mN/m’ye ulaştığında ise küçük parlak noktacıkların yüzeyde belirlemeye başladığı ve basınç artmaya devam ettikçe bu noktacıkların birbirine yaklaşarak birbiri içine geçerek daha homojen bir film oluşturdukları görülmektedir. Saf DSPE-PEG1000 ve saf DSPE-PEG2000 monotabakalarının aksine, saf DSPE-PEG350 monotabakasında kısa PEG zincirleri sayesinde sıkıştırma ile moleküller bir araya gelerek homojen bir yüzey oluşturabilmektedirler. 9:1 mol oranıyla hazırlanan DSPC:DSPE-PEG2000 ve DSPC:DSPE-PEG1000 karışımlarına kıyasla, Şekil 68’de verilen 9:1 DSPC:DSPE-PEG350 karışımının BAM görüntülerinde daha homojen bir görüntüye rastlanırken yüzeyde herhangi bir faz ayırımına rastlanmamıştır. 5:5 DSPE-PEG350 içeren DSPC:DSPE-PEG350 karışımının BAM görüntüleri Şekil 69’de verilmiştir. 5:5 mol oranıyla hazırlanan DSPC:DSPE-PEG2000 ve DSPC:DSPE-PEG1000 karışımlarında gözlemlendiği gibi, moleküller arası mesafe 9:1 karışıma göre fazladır. Ayrıca yaklaşık 9 mN/m ve 16 mN/m civarı yüzey basınçlarında farklı figürlerin ortaya çıktığı görülmüştür.

Bu sonuçlara göre, DSPE-PEG350, DSPE-PEG1000 ve DSPE-PEG2000 moleküllerinin DSPC monotabakasına ilave edilmesi, hava-su arayüzeyindeki monotabakasına genişletici (expanded) bir etki yapmıştır. DSPE-PEG350, DSPE-PEG1000, DSPE-PEG2000 molekülleri ile DSPC molekülünün karışabilir olduğu, bu moleküller arasında ise çekici kuvvetlerin etkili olduğu yüzey basıncı-moleküler alan izoterminden ve hazırlanan karışımların termodinamik analizlerinden elde edilen sonuçlardan anlaşılmaktadır. Farklı lipopolimerler kullanarak hazırlanan karışımları incelediğimizde, *Dori ve ark.*’nın da gözlemlendiği gibi ortalama moleküler alanın lipopolimerdeki PEG zincirinin uzunluğu arttıkça arttığı fark edilmiştir (Dori ve ark., 2000). Çünkü izotermdeki moleküler alanı polimer zincirinin büyüklüğü belirlemektedir (Baekmark ve ark., 1999). Ayrıca DSPC:DSPE-PEG1000 ve DSPC:DSPE-PEG350 karışımlarında karışımındaki lipopolimer miktarı arttıkça moleküller arası çekici kuvvetlerin daha güçlü olduğu gözlemlenirken DSPC:DSPE-PEG2000 karışımları için bu durumun tam tersi geçerli olmuştur. Bunun, PEG zincirlerinin hidrofilik karakterinden dolayı hava-su arayüzeyinde lipopolimerlerin düz bir

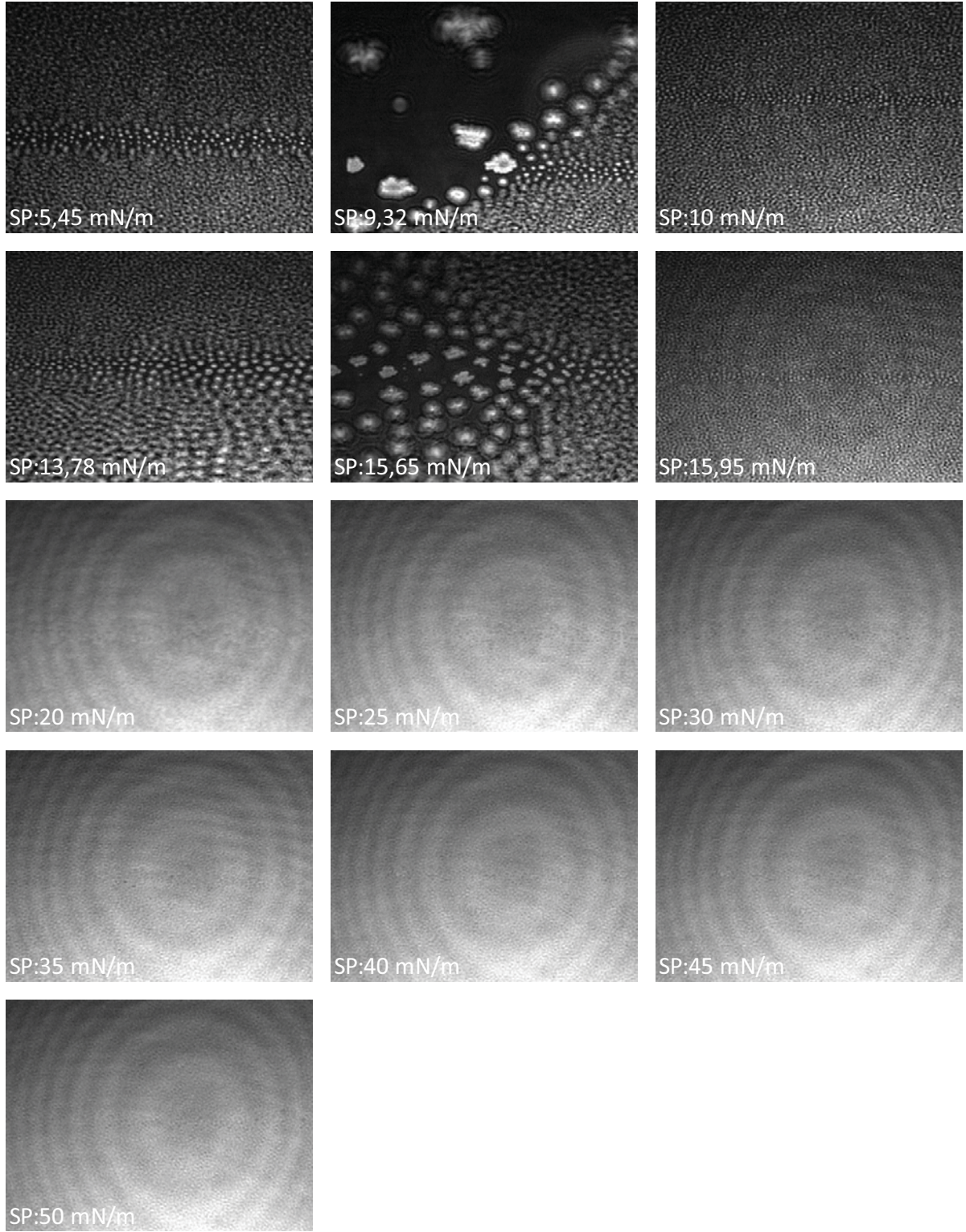
monotabaka oluşturmamaları ve dolayısıyla sterik kuvvetlerin PEG zincirlerinin konfigürasyon değişiminde etkili olmadıklarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Gerçekleştirilen BAM çalışmalarının sonuçlarına göre %50 lipopolimer içeren karışımlarda hem düşük basınç geçiş bölgelerinde hem de yüksek basınç geçiş bölgelerinde faz ayrılıklarına rastlanmıştır. Bu faz ayrımları yalnız DSPC fazı olarak yorumlanabileceği gibi DSPC/lipopolimer karışım fazı olarak da yorumlanabilir (Tanwir ve Tsoukanova, 2008). %10 DSPE-PEG2000 içeren DSPC:DSPE-PEG2000 karışımında da bu bölgelerde faz ayrımlarına rastlanmıştır. Ancak 9:1 DSPC:DSPE-PEG1000 karışımında yüzeyde farklılıklar sadece düşük basınç geçiş bölgesinde gözlemlenmiştir. Aynı mol oranıyla hazırlanan DSPC:DSPE-PEG350 karışımında ise PEG zincirinin çok kısa olmasından dolayı karışımındaki moleküller bir araya yaklaşabilmiş ve yüzeyde homojen bir görüntü oluşturmuşlardır. Sonuç olarak ikili karışımlardaki moleküller arası etkileşimlerin karışımı oluşturan bileşenlerin türünden etkilendiği ve lipopolimerlerin DSPC ile karışımlarında dağılımlarının sadece yüzey basıncına bağlı olmadığı aynı zamanda karışımındaki lipopolimerin de miktarına bağlı olduğu tespit edilmiştir.



**Şekil 67.** Saf DSPE-PEG350'nin Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri



**Şekil 68.** 9:1 DSPC:DSPE-PEG350 karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri



**Şekil 69.** 5:5 DSPC:DSPE-PEG350 karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri



#### 4.1.3. DSPC:PEG40St ve Hidrojen Bağı Yapabilen Lipid Karışımları:

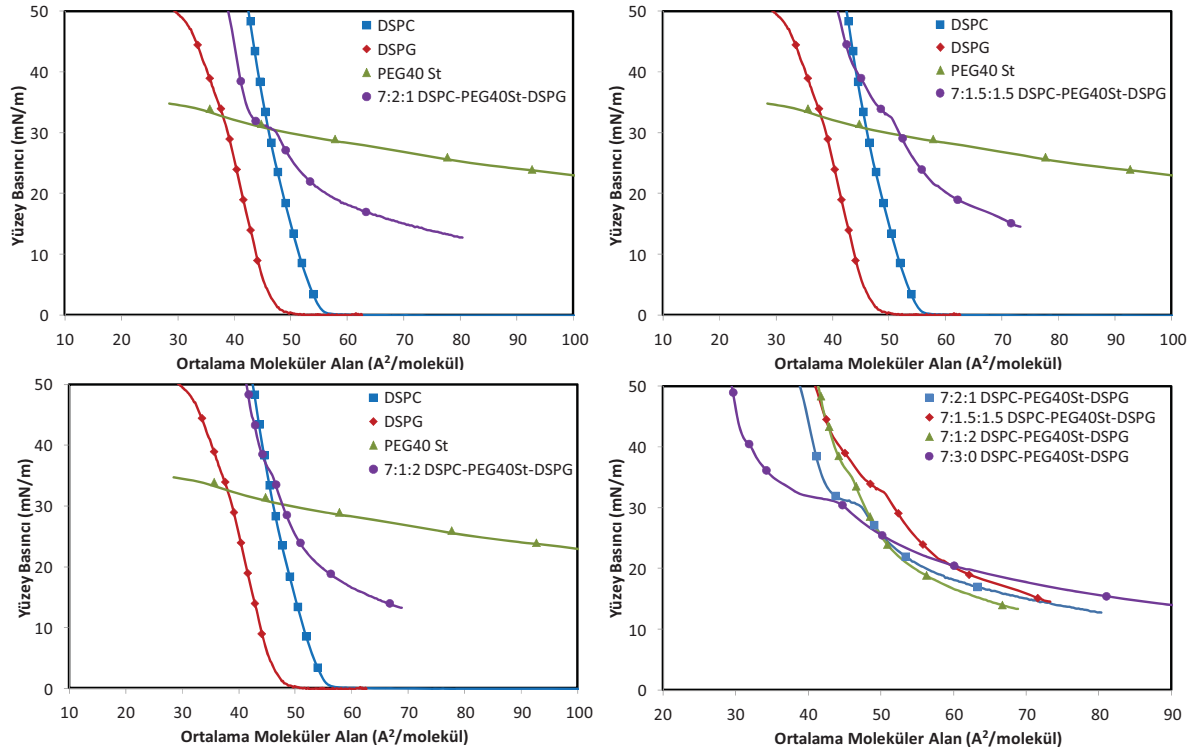
Aynı uzunlukta alkil zincir içeren fakat farklı hidrojen bağı yapma kapasitesine sahip farklı baş grupları (head group) içeren lipidler ve yağ molekülleri kullanılarak, bu bileşenlerin mikroköpükçükleri oluşturan monotabakanın morfolojisi ve faz davranışı üzerine etkisi incelenmiştir.

DSPG, DSPE, DSPA, ve StGly'nin farklı baş gruba sahip olmalarından dolayı hidrojen bağı yapma kapasitelerinin ve dolayısıyla diğer moleküllerle etkileşimlerinin farklı olabileceği düşünülmüştür. Bu sebeple farklı mol oranlarında, üçüncü molekül kullanılarak üçlü karışımlar hazırlanmış, Langmuir-Blodgett metod ile elde edilen yüzey basıncı–ortalama moleküler alan izotermelerinden ( $\pi$ -A) yararlanarak bu moleküllerin birbiri ile etkileşme ilişkisi araştırılmış, bileşenlerin karışabilirlikleri ve karışımların kararlılıkları araştırılmıştır. Moleküllerin faz davranışları ve morfolojileri Brewster Açısı mikroskobu kullanılarak mikroskobik seviyede, AFM ile de nanoskobik seviyede incelenmiştir.

*DSPC:PEG40St:DSPG Üçlü Karışımlarının Yüzey Basıncı-Moleküler Alan İzotermeleri, BAM ve AFM Görüntüleri*

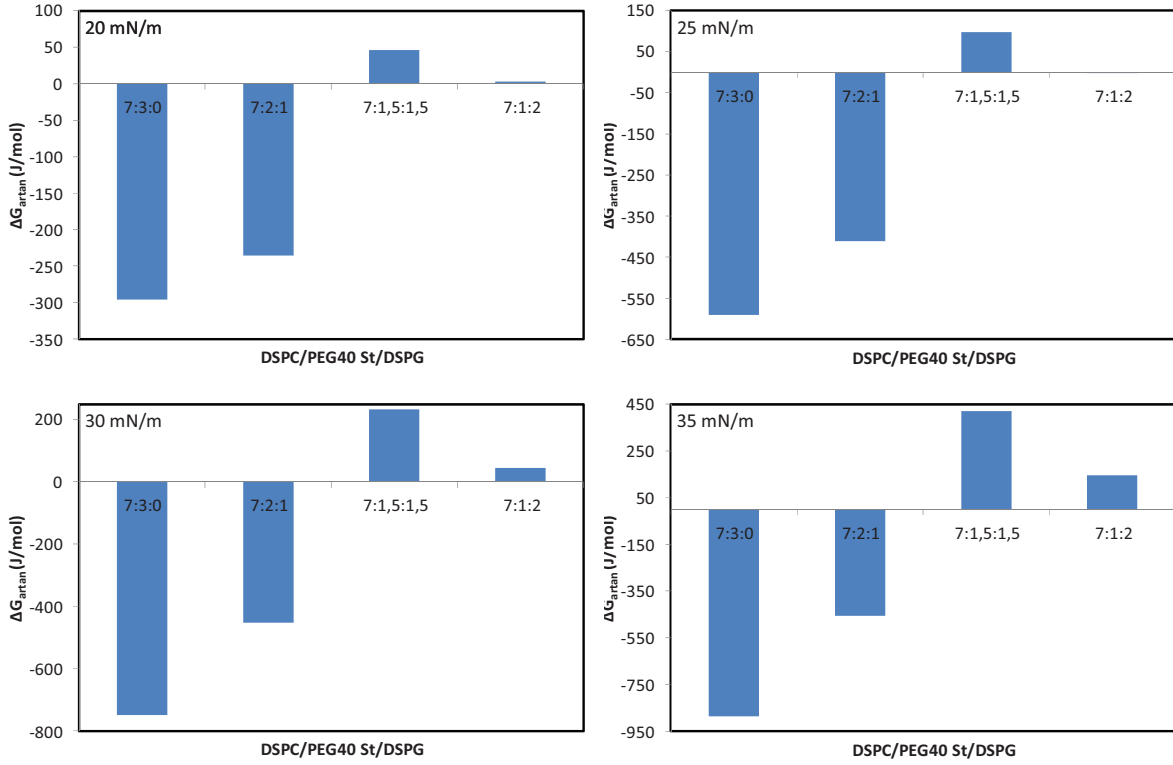
Çalışmamızın bu kısmında mikroköpükçükleri oluşturan monotabakaya ek fosfolipit olarak ilave edilen DSPG'in monotabakanın karışabilirlik ve stabilitesi üzerine etkisi ve bu fosfolipidin DSPC ve PEG40St bileşenleri ile etkileşimi incelenmiştir. DSPC:PEG40St ve DSPC/PEG-lipid karışımları için yapılan incelemelerde zar yapmayı oluşturan bileşenlerin kompozisyonlarının değiştirilmesiyle moleküller arası etkileşimlerin ve faz özelliklerinin değiştiği gözlemlenmişti. Bu sebepten dolayı sırasıyla DSPC ve PEG40St mol oranları 0.7 ve 0.5 tutularak farklı mol oranlarında DSPG içeren karışımlar hazırlandı ve ikili karışımları incelemek için kullanılan yöntemlerle hazırlanan karışımlar incelendi. 7:2:1, 7:1,5:1,5, 7:1:2 mol oranlarıyla hazırlanan DSPC:PEG40St:DSPG karışımlarının ortalama moleküler alana karşı çizilen yüzey basıncı izotermeleri ( $\pi$ -A) Şekil 70'de verilmiştir. Şekilde görüleceği üzere, saf DSPG monotabakası DSPC monotabakasına benzer şekilde sıkışık (kondens) film özelliği göstermiştir. DSPG izoterminde gözlemlenen bu davranış literatürde yapılan çalışmalarla uyum içinde olduğu görülmektedir (Bos ve Nylander, 1996; Greenough ve Blanchard,

2009). DSPC ve DSPG fosfolipitler aynı uzunlukta hidrokarbon zincirine sahip olmalarına rağmen fosfolipitlerin polar baş grupları yapı olarak birbirinden farklıdır. DSPG negatif yüklü iken DSPC nötral bir lipittir, ve DSPC'nin baş grubu DSPG'ninkinden daha büyüktür (Bos ve Nylander, 1996; Wydro ve Witkowska, 2009). DSPC ve DSPG monotabakaları için kaydedilen  $\pi$ -A izotermi karşılaştırıldığında, fosfolipitlerdeki baş grupların etkisinden dolayı DSPG'nin izotermi DSPC'ye göre daha küçük moleküler alanlarda yer almaktadır. Bu durumda *Bos ve ark.*'nin da gözlemlediği gibi DSPG molekülleri arasındaki mesafe DSPC moleküllerine göre daha küçüktür (Bos ve Nylander, 1996). Şekil 70'te verilen karışımların izotermelerinde düşük yüzey basınçlarında genişletilmiş (expanded) film davranışı gözlemlenirken yaklaşık 35 mN/m civarı yüzey basıncında plato ortaya çıkmıştır. Bu plato bölgesinden sonra ise DSPC:PEG40St ikili karışımlarında olduğu gibi sıkıştırılmış film davranışı dikkat çekmektedir. Şekil 70'deki DSPC:PEG40St:DSPG üçlü karışımlarında karışımındaki DSPG miktarı arttırıldıkça izotermeler daha büyük moleküler alanlara kaymıştır. PG molekülleri yapısında hidroksil grubu bulundurduğu için hidrojen bağı yapma özelliğine sahip olmasına rağmen, PG-PG molekülleri arasındaki hidrojen bağının negatif iyon yüklü bu moleküller arasındaki elektrostatik itici kuvvetler yüzünden zayıfladığı savunulmaktadır (Dickey ve Faller, 2008; Inoue ve Nibu, 1999; Maniti ve ark., 2009; Watry ve ark., 2003; Wydro ve Witkowska, 2009). Bu sebepten karışımlardaki moleküller arası mesafenin karışımındaki DSPG miktarının artmasıyla genişlediği düşünülebilir. Ancak, yukarıda da bahsedildiği gibi, DSPG'nin daha küçük baş gruba sahip olması nedeniyle de sola kayması beklenmektedir. Bu durumda, göz ardı edilmemesi gereken diğer bir husus ise, DSPG'nin OH grubu ile PEG zincirleri arasında hidrojen bağı yapabileceği ve bu etkileşimden dolayı PEG zincirlerinin sterik itme kuvvetleri altında alt-faza doğru uzama olasılığının azalabileceği olmaktadır (Xie, 2009).



**Şekil 70.** 7:2:1, 7:1,5:1,5, 7:1:2 DSPC:PEG40St:DSPG karışımlarının Yüzey Basıncı-Ortalama moleküler alan ( $\pi$ -A) izotermeleri

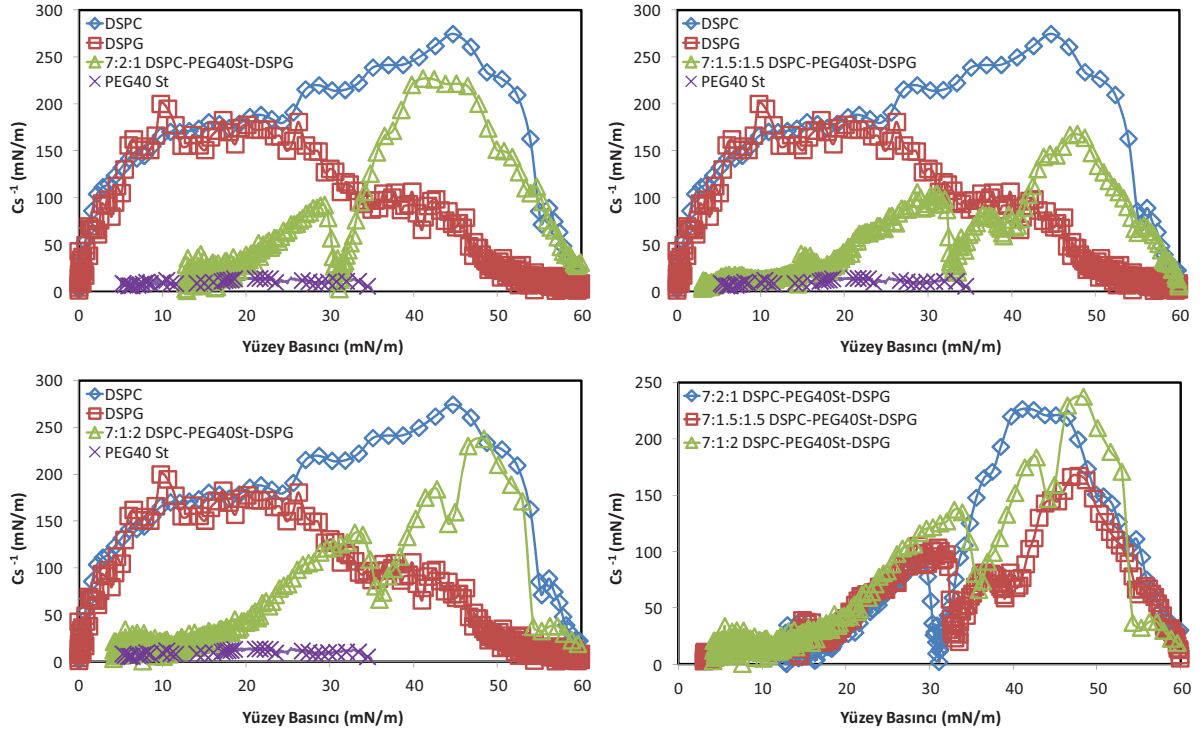
İncelenen bu karışımlardaki moleküller arası etkileşimleri incelemek için karışımların hesaplanan artan serbest enerjileri ( $\Delta G_{\text{artan}}$ ) farklı yüzey basınçlarında Şekil 71’de verilmektedir. 7:2:1 DSPC:PEG40St:DSPG karışımının  $\Delta G_{\text{artan}}$  değerleri tüm basınçlarda negatif iken, diğer karışımların  $\Delta G_{\text{artan}}$  değerleri ise pozitiftir. Bu değerlere göre 7:2:1 karışımındaki moleküller arasında çekici kuvvetler baskın iken diğer karışımlardaki moleküller arasında itici kuvvetler baskındır. Karışımında DSPG oranının artması ile ortamda negatif yüklü lipid yoğunluğunun artması ve bu itici kuvvetleri perdeleyecek nötral PEG moleküllerinin konsantrasyonunun azalması, artan DSPG konsantrasyonlarında itici kuvvetlerin daha baskın hale gelmesine sebep olabilir. Ayrıca, artan DSPG miktarı ile PEG zincirleri arasında da bir hidrojen bağ oluşumu olabilir ki, bu da sıkıştırma ile PEG zincirlerinde olabilecek konfigürasyon değişimine engel teşkil edebilir. Nitekim artan yüzey basıncı ile daha pozitif  $\Delta G_{\text{artan}}$  değerlerinin gözlenmesi bunun bir göstergesi olabilir.



**Şekil 71.** Farklı basınçlarda 7:2:1, 7:1,5:1,5, 7:1:2 DSPC:PEG40St:DSPG karışımların artan Gibbs enerjileri

7:2:1, 7:1,5:1,5, 7:1:2 mol oranlarında hazırlanan DSPC:PEG40St:DSPG karışımları için hesaplanan sıkıştırılabilirlik modülü grafikleri Şekil 72’de gösterilmiştir. Karışımların  $C_s^{-1}$  değerleri birbirine yakın olmakla birlikte DSPC:PEG40St ikili karışımlarında da görüldüğü gibi 35 mN/m civarında minimum piklere rastlanmıştır. Karışımlar içindeki PEG40St miktarı azaltıldıkça minimum piklerin sıfır değerine kadar düşmediği görülmüştür. Bu sebeple minimum piklerin dolayısıyla plato bölgesinin karışımındaki PEG40St miktarı ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Karışımların izotermelerinde ikinci bir plato bölgesi görülmemesine rağmen sıkıştırılabilirlik modülü grafiklerinde karışımında DSPG miktarının artmasıyla birlikte yaklaşık 40 mN/m civarında ikinci minimum nokta dikkat çekmiştir. Bu ikinci minimum % 15 ve % 20 DSPG içeren karışımlarda daha belirgin olduğu görülmektedir. Bu noktada, az miktarda DSPG molekülünün DSPC:PEG40St karışımına (7:2:1 lik mol oranı) ilave edilmesiyle moleküller arası etkileşimlerin arttığı, fakat karışımındaki DSPG miktarının artırılmasıyla birlikte karışımında negatif yüklü lipid yoğunluğunun artması, lipidler arası itici kuvvetleri perdeleyecek nötr PEG40St moleküllerinin azalması ve PEG zincirleri ile olası hidrojen bağı nedeni ile konfigürasyon değişiminin (alt faza doğru uzaması) olma olasılığının

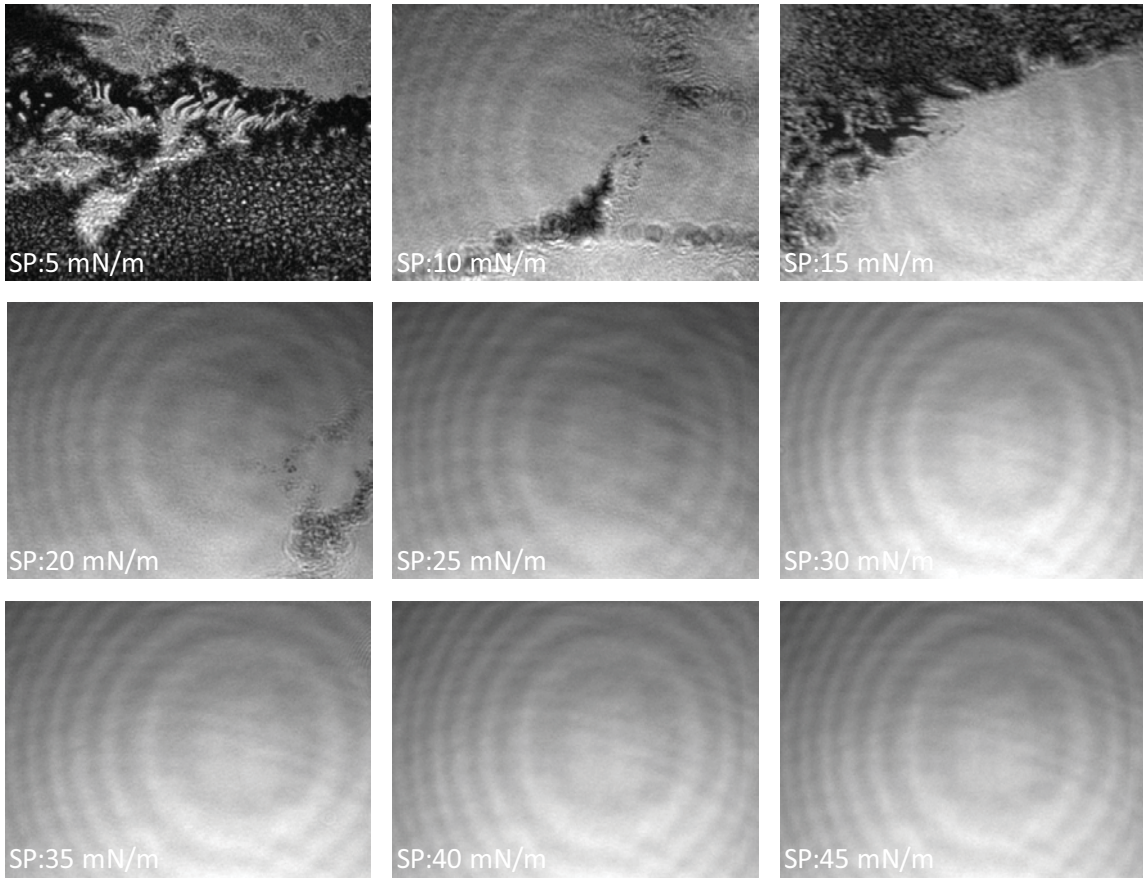
azalması gibi sebeplerin bu ikinci minimumların oluşmasına sebebiyet verdiği söylenebilir. Plato bölgesinde bir kısım PEG40St molekülünün yüzeyden kademeli olarak ayrılacağı da olasılıklar arasında değerlendirilmektedir.



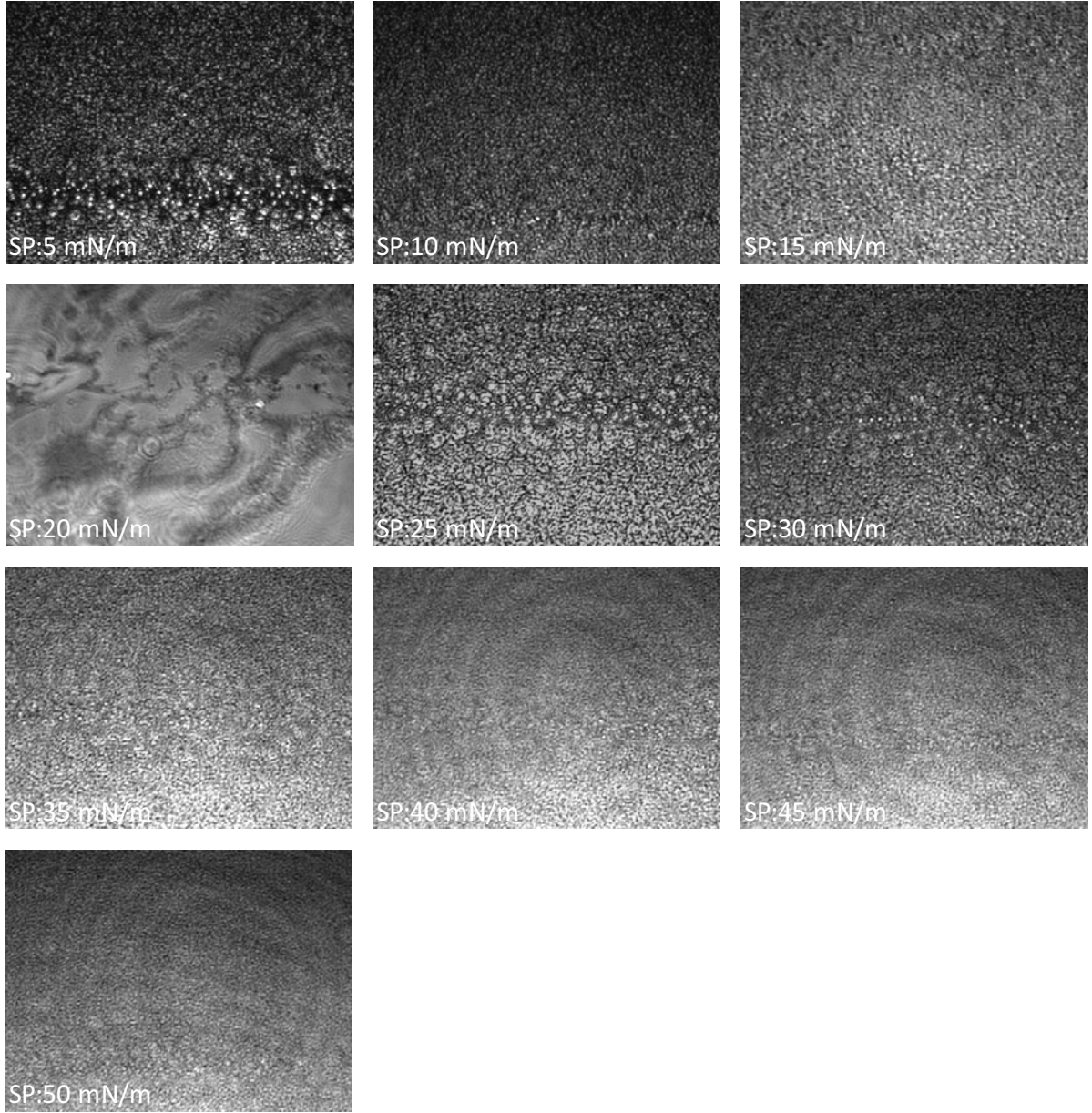
**Şekil 72.** 7:2:1, 7:1,5:1,5, 7:1:2 DSPC:PEG40St:DSPG karışımların yüzey basıncına karşı  $C_s^{-1}$  (mN/m) değerleri

Şekil 73’de gösterilen BAM görüntülerinden anlaşılacağı gibi saf DSPG’nin görüntüleri saf DSPC’ye çok benzemektedir. Düşük yüzey basınçlarında yüzeyde dağınık halde gezinen sıkışık (kondens) faz gösteren büyük parçacıklar, sıkıştırma ile bir araya gelerek yüzeyi tamamen kaplamıştır. DSPG monotabakasının sıkışık film özelliği göstermesinden dolayı yüzey tamamen homojenleşmiştir. DSPC:PEG40St ikili karışımlarının aksine Şekil 74, Şekil 75 ve Şekil 76’de gösterilen DSPC:PEG40St:DSPG karışımlarının BAM görüntülerinde büyük sıkışık fazca zengin bölgelere rastlanmamıştır. Şekil 74, Şekil 75 ve Şekil 76’de görüldüğü üzere yüzeyde genişletilmiş (expanded) faz içinde dağılmış küçük parlak domainler vardır ve daha homojen olarak dağıldıkları söylenebilir. Saf DSPG’nin aksine sıkıştırma ile birlikte yüzey tamamen homojenleşmemiştir. DSPG molekülünün DSPC ve PEG40St moleküllerinin arasına katılması 7:2:1 karışımın 20 mN/m’deki BAM

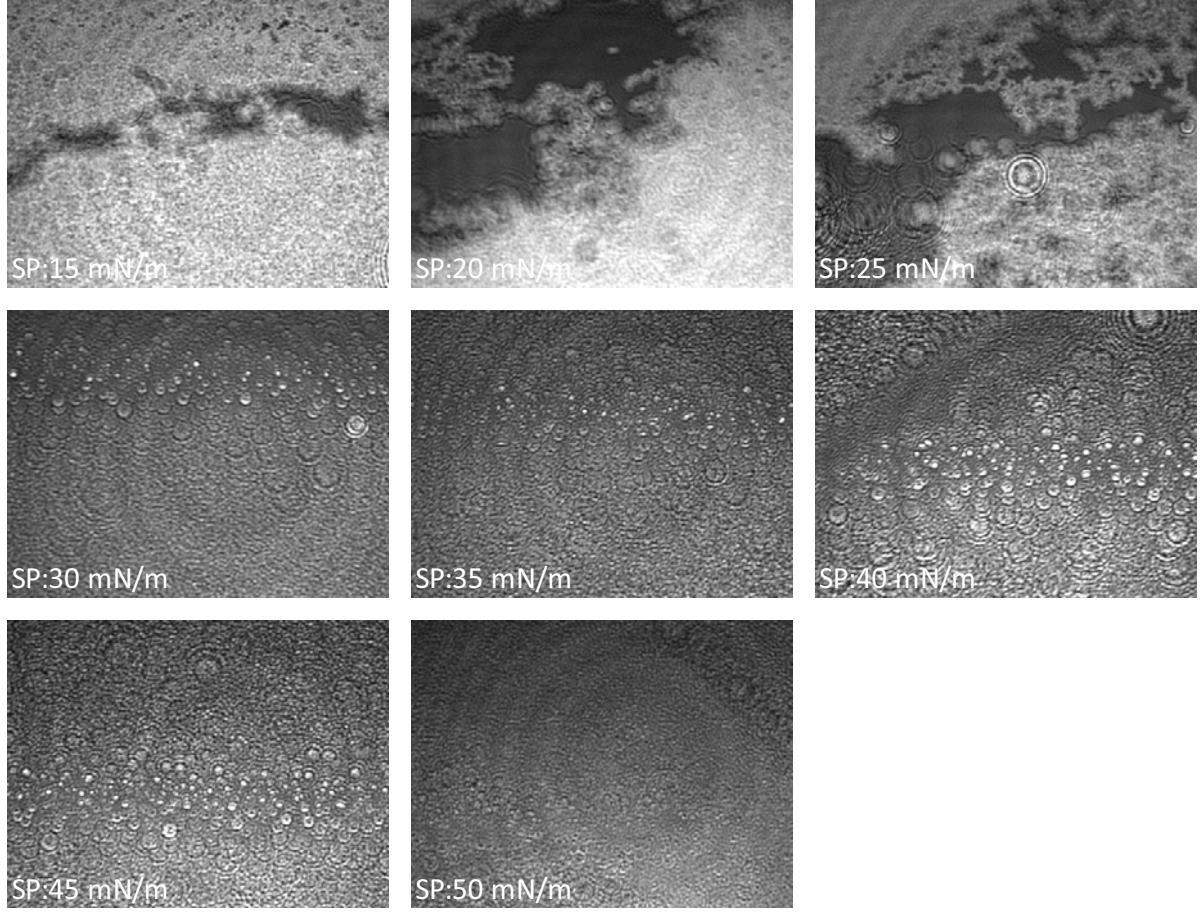
görüntüsünde görüldüğü gibi sıkışık ve genişletilmiş fazın iç içe geçmesine katkıda bulunmuş olabilir. Fakat 7:1,5:1,5 DSPC:PEG40St:DSPG karışımının BAM görüntülerinde geniş moleküller arası mesafeler yüzey basıncı 30 mN/m'ye ulaşıncaya kadar görülmüştür. Bu karışımındaki moleküller arasındaki itici kuvvetlerin molekülleri birbirinden uzaklaştırdığı ve moleküller arasındaki mesafeyi arttırdığı söylenebilir. 7:1:2 DSPC:PEG40St:DSPG karışımında ise düşük yüzey basınçlarından itibaren sıkışık fazın genişletilmiş faz içinde homojen olarak dağıldığı görülmektedir (Şekil 76). Burada, PEG miktarının azalmış olmasının da bir etkisi olabileceği değerlendirilmektedir.



**Şekil 73.**Saf DSPG'nin Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri

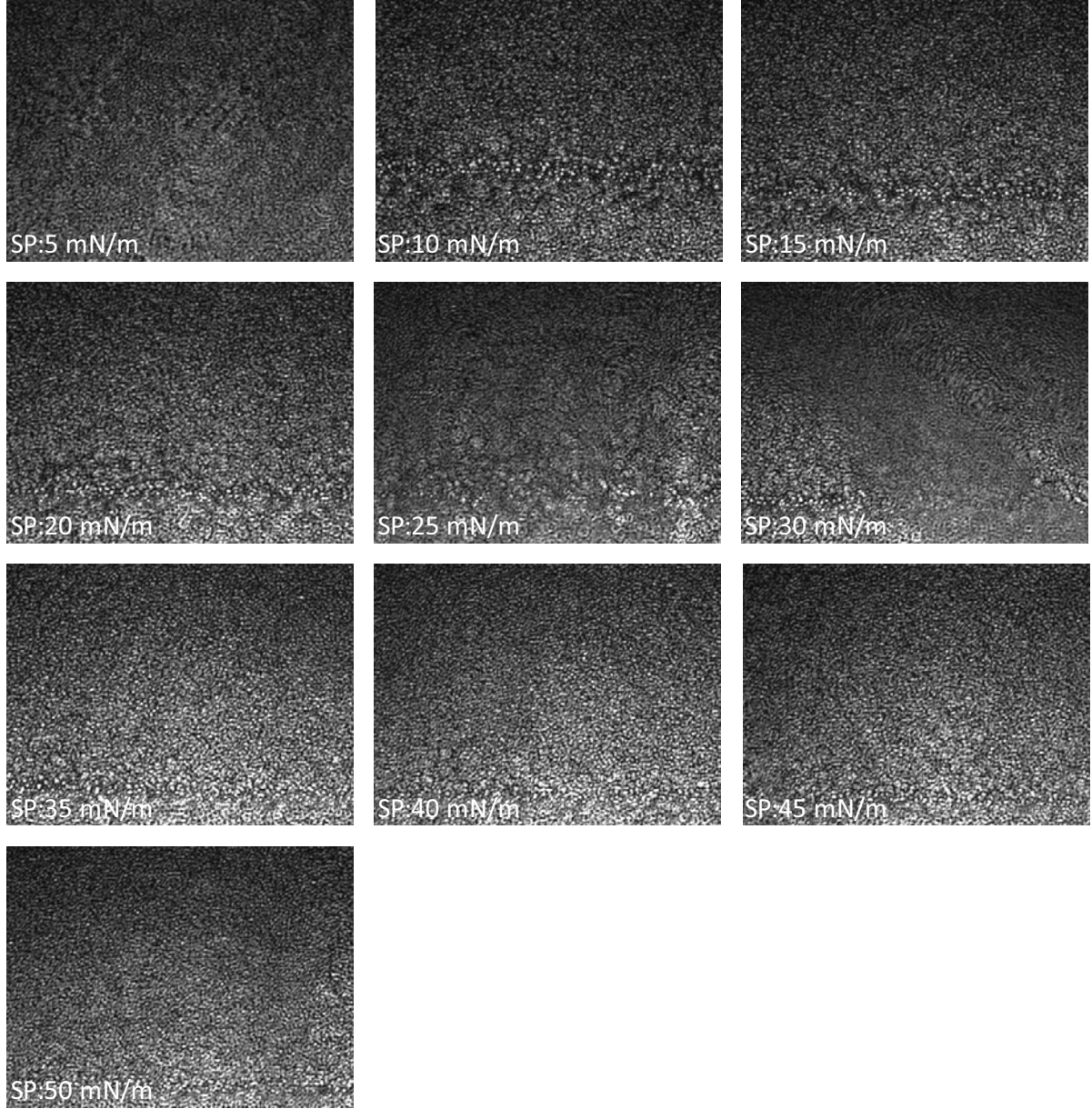


**Şekil 74.** 7:2:1 DSPC:PEG40St:DSPG karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri



**Şekil 75.** 7:1,5:1,5 DSPC:PEG40St:DSPG karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri

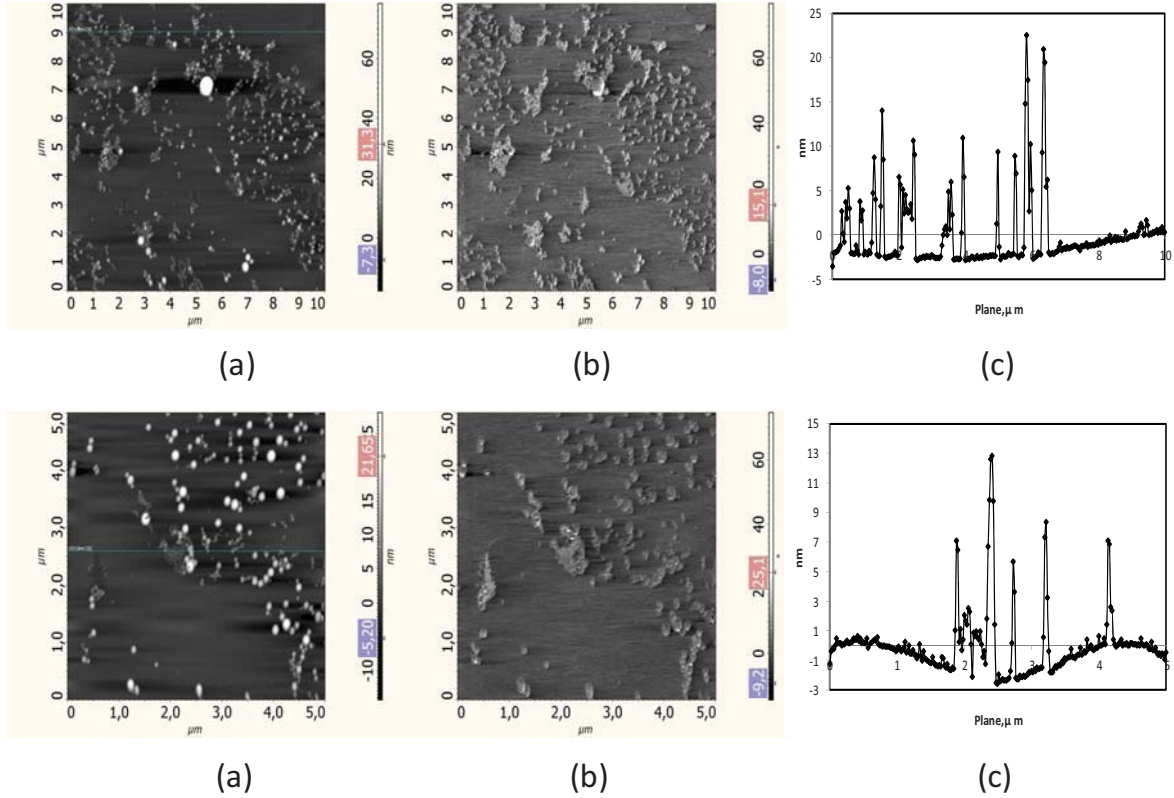




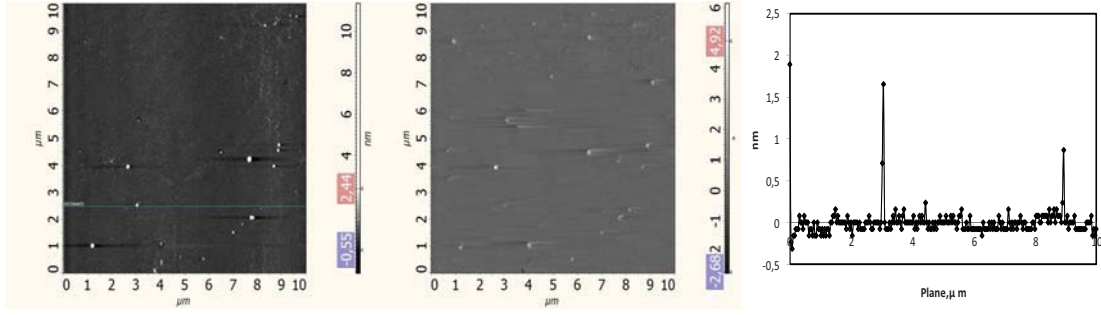
**Şekil 76.** 7:1:2 DSPC:PEG40St:DSPG karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri

Faz özelliklerini daha detaylı incelemek için saf DSPG, saf DSPC ve DSPC'nin mol oranı 0.7 tutularak hazırlanan DSPC:PEG40St:DSPG karışım filmleri PEG40St'nin kollaps basıncının altında (30 mN/m) ve üstünde (40 mN/m) mika yüzeyine transfer edilerek AFM (atomik kuvvet mikroskop) görüntüleri elde edilmiştir. Saf DSPG'nin sırası ile 30 mN/m ve 40 mN/m'deki kaplanan filmlerinin AFM görüntüleri Şekil 77 ve Şekil 78'de verilmektedir. 30 mN/m'de yüzeyde bazı bölgelerde moleküllerde yığılma görülmüşken, 40 mN/m'de moleküllerin daha sıkışık bir film oluşturmalarından dolayı yüzeyde daha homojen bir

dağılıma rastlanmıştır. Şekil 79'de gösterilen 7:2:1 karışımın AFM görüntülerinde ise yumru halinde yapılar dikkat çekmiştir. Şekil 80'de görüldüğü gibi 40 mN/m'de de bu yapılar aynı şekilde yüzeyde kalmıştır. Şekil 83 ve Şekil 84 incelendiğinde benzer yapılar 7:1:2 karışımın görüntülerinde de ortaya çıkmıştır. 7:1,5:1,5 karışımında ise 30 mN/m'de yüzeyde dağılmış küçük adacıklara rastlanırken, 40 mN/m'da kısmen daha homojen bir görüntü oluşmuştur. Bu sonuçlara göre 7:2:1 karışımındaki yumru halindeki yapılar moleküller arasındaki çekici kuvvetlerin etkisinin sonucu olarak ortaya çıkmışken, dağınık halde yüzeye yayılan şekiller de hem PEG zincirlerinden hem de PG moleküllerinin itici etkisi sonucu oluşmuş olduğu değerlendirilmektedir.



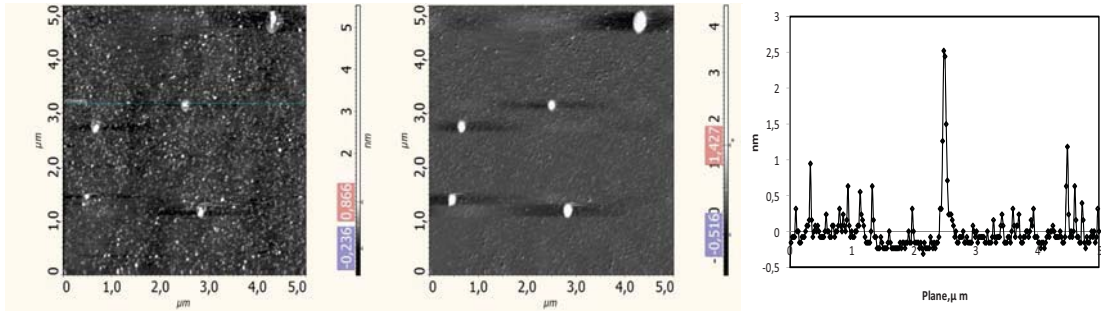
Şekil 77. DSPG'nin 30 mN/m'deki AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili



(a)

(b)

(c)

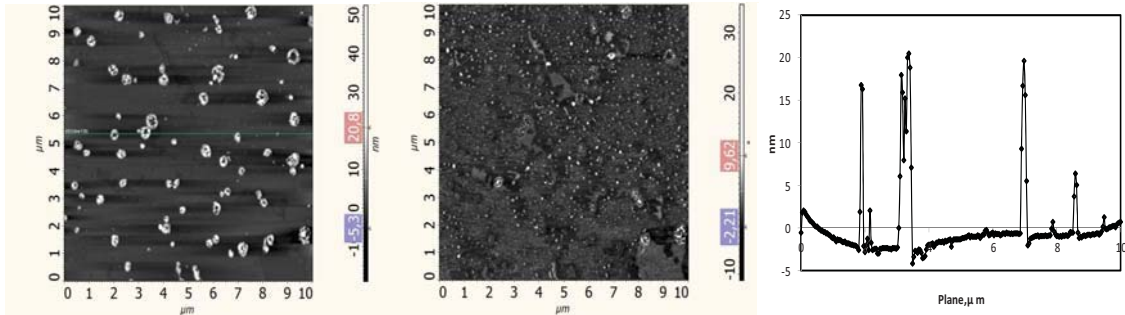


(a)

(b)

(c)

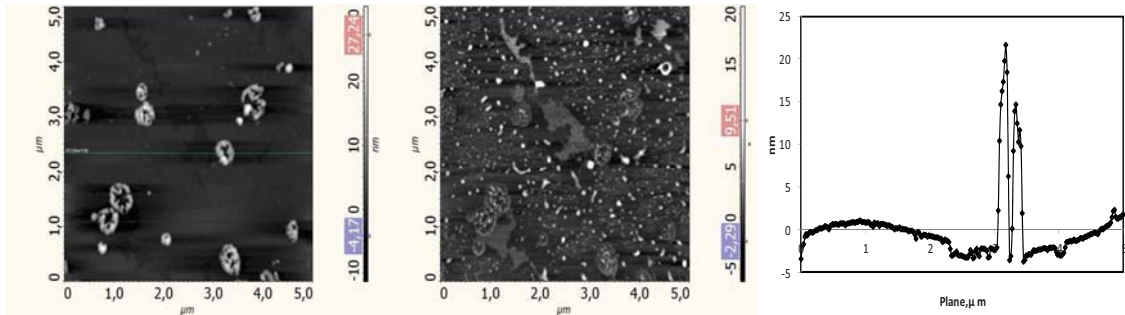
Şekil 78. DSPG'nin 40 mN/m'deki AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili



(a)

(b)

(c)

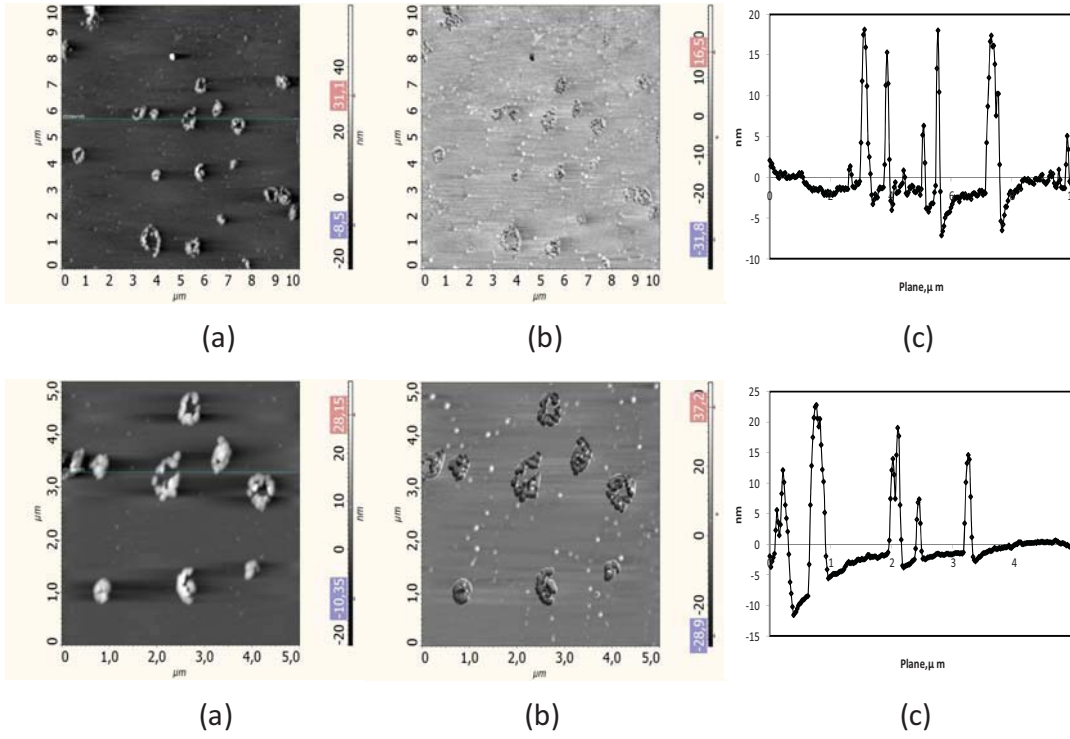


(a)

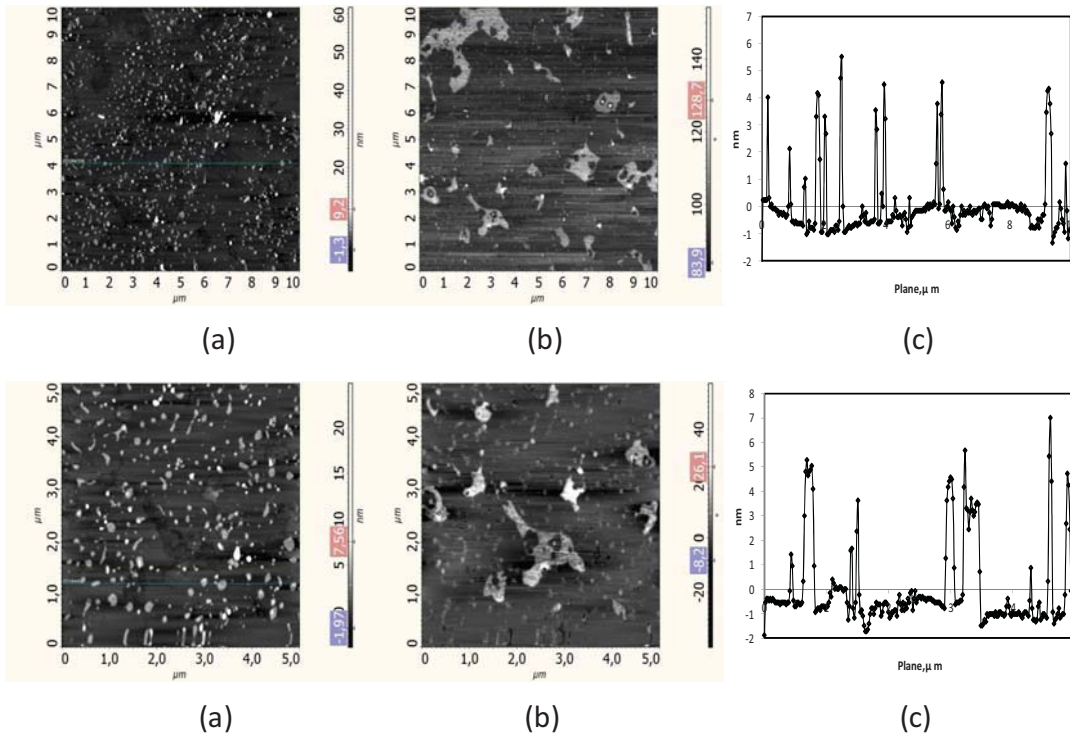
(b)

(c)

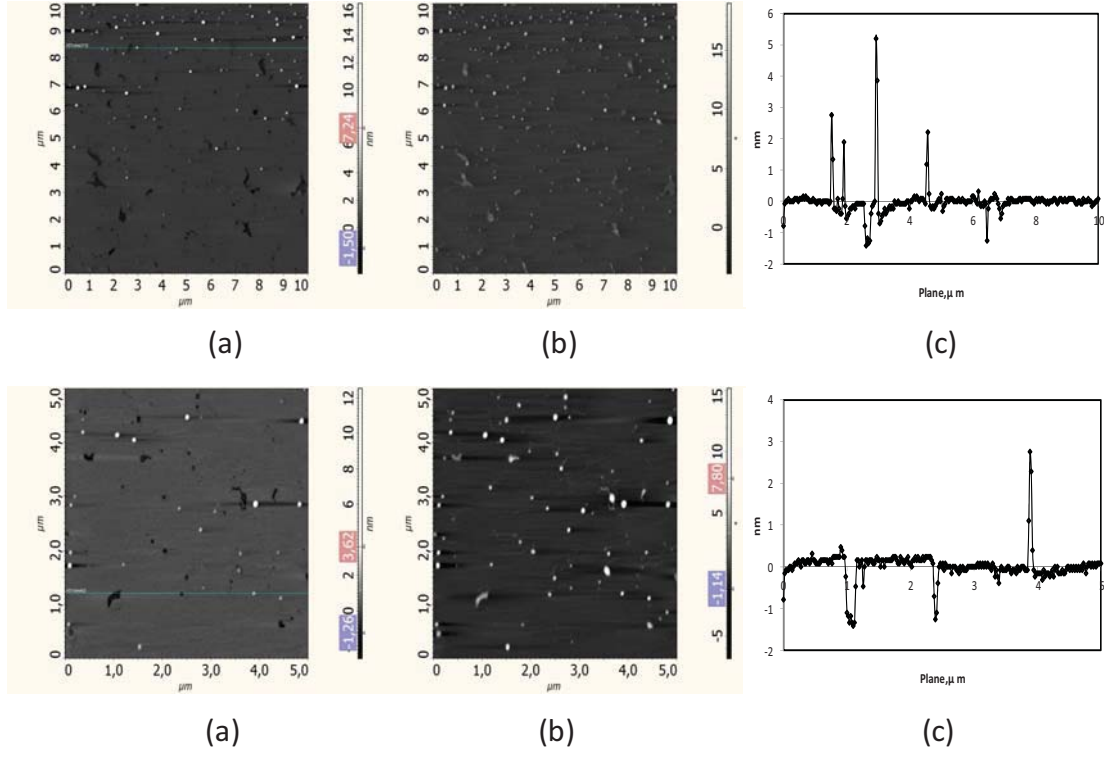
Şekil 79. 7:2:1 DSPC:PEG40St:DSPG karışımının 30 mN/m'deki AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili



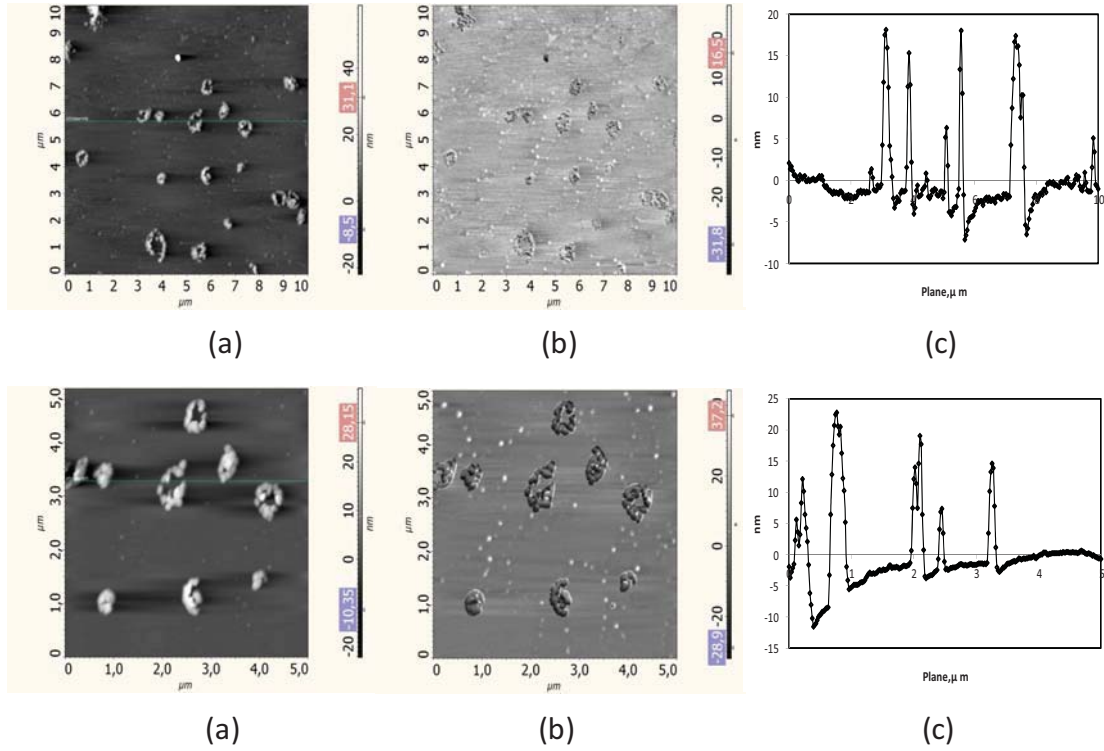
**Şekil 80.** 7:2:1 DSPC:PEG40St:DSPG karışımının 40 mN/m'deki AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili



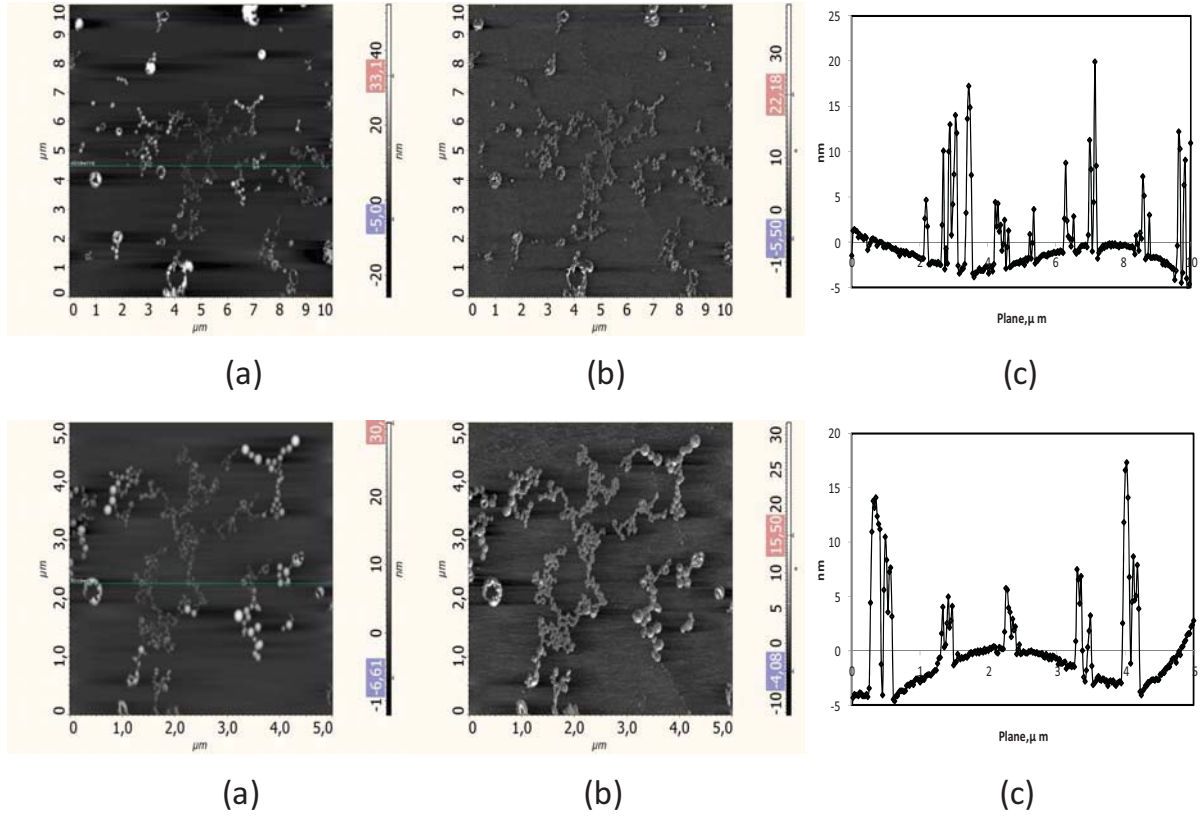
**Şekil 81.** 7:1,5:1,5 DSPC:PEG40St:DSPG karışımının 30 mN/m'deki AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili



Şekil 82. 7:1,5:1,5 DSPC:PEG40St:DSPG karışımının 40 mN/m'deki AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili

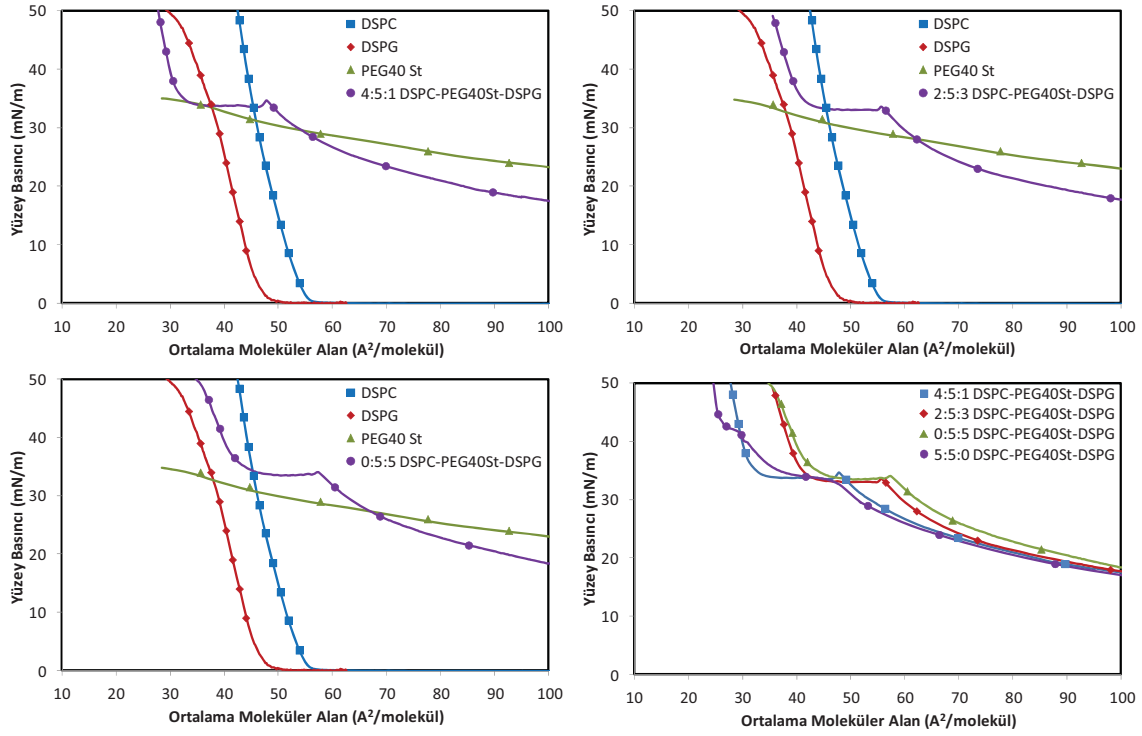


Şekil 83. 7:1:2 DSPC:PEG40St:DSPG karışımının 30 mN/m'deki AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili

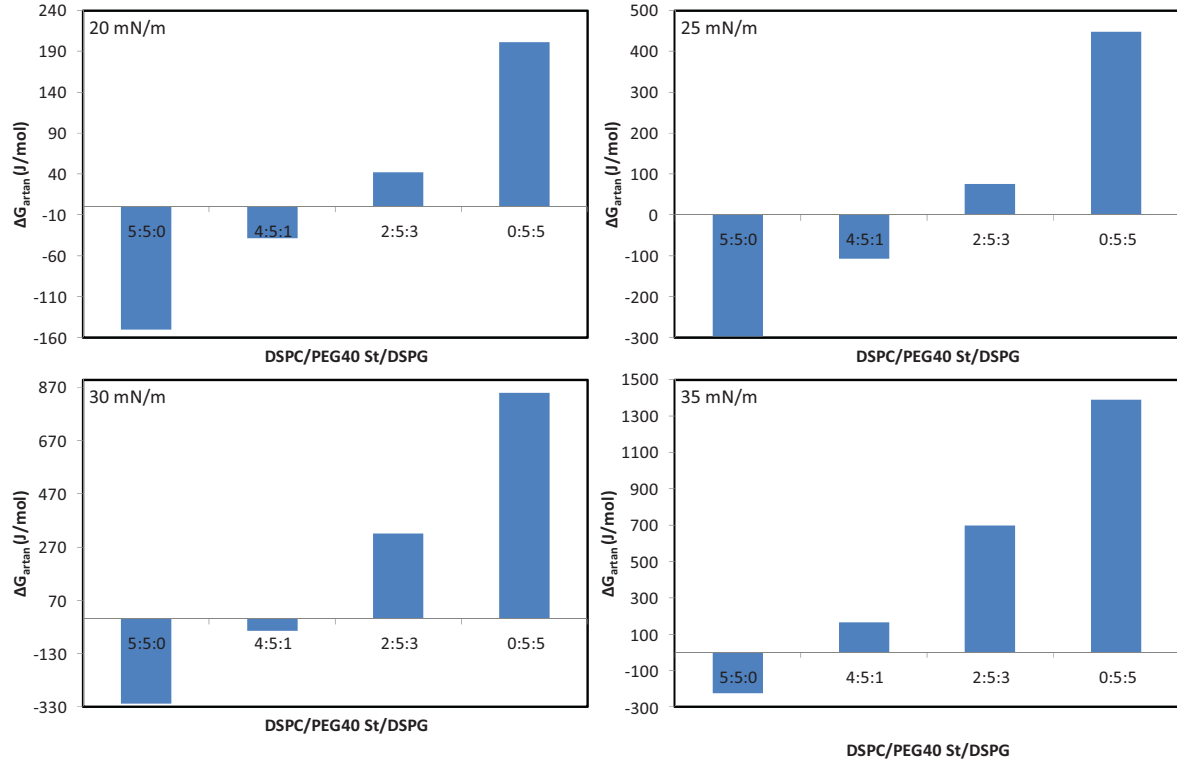


**Şekil 84.** 7:1:2 DSPC:PEG40St:DSPG karışımının 40 mN/m'deki AFM görüntüleri (a)topografya (b)faz (c)yükseklik profili

PEG40St'nin mol oranının %50 olarak sabit tutulduğu DSPC:PEG40St:DSPG karışımlarının yüzey basıncı-moleküler alan ( $\pi$ - A) izotermeleri Şekil 85'de gösterilmiştir. Bir önceki kısımda, DSPC'nin mol oranının 0.7 tutularak hazırlandığı karışımlarda görüldüğü gibi 35 mN/m'de bir plato bölgesi ortaya çıkmıştır ve bu karışımlar daha fazla miktarda PEG40St içerdiği için plato bölgesi daha uzundur. Yine benzer şekilde karışımındaki DSPG miktarının artırılmasıyla birlikte izotermeler daha büyük moleküler alanlara kaymıştır. Şekil 86'de görüldüğü üzere 4:5:1 mol oranında hazırlanan DSPC:PEG40St:DSPG karışımının  $\Delta G_{\text{artan}}$  değerleri negatif iken karışımındaki DSPG mol oranının artmasıyla  $\Delta G_{\text{artan}}$  değerleri pozitif olmuştur. Bu durumda, 4:5:1 karışımındaki moleküller arasında çekici kuvvetler etkili iken karışımında DSPC miktarının azaltılmasıyla itici kuvvetler etkili hale gelmiştir.



**Şekil 85.** 4:5:1, 2:5:3, 0:5:5 DSPC:PEG40St:DSPG karışımlarının Yüzey Basıncı-Ortalama moleküler alan ( $\pi$ -A) izotermeleri

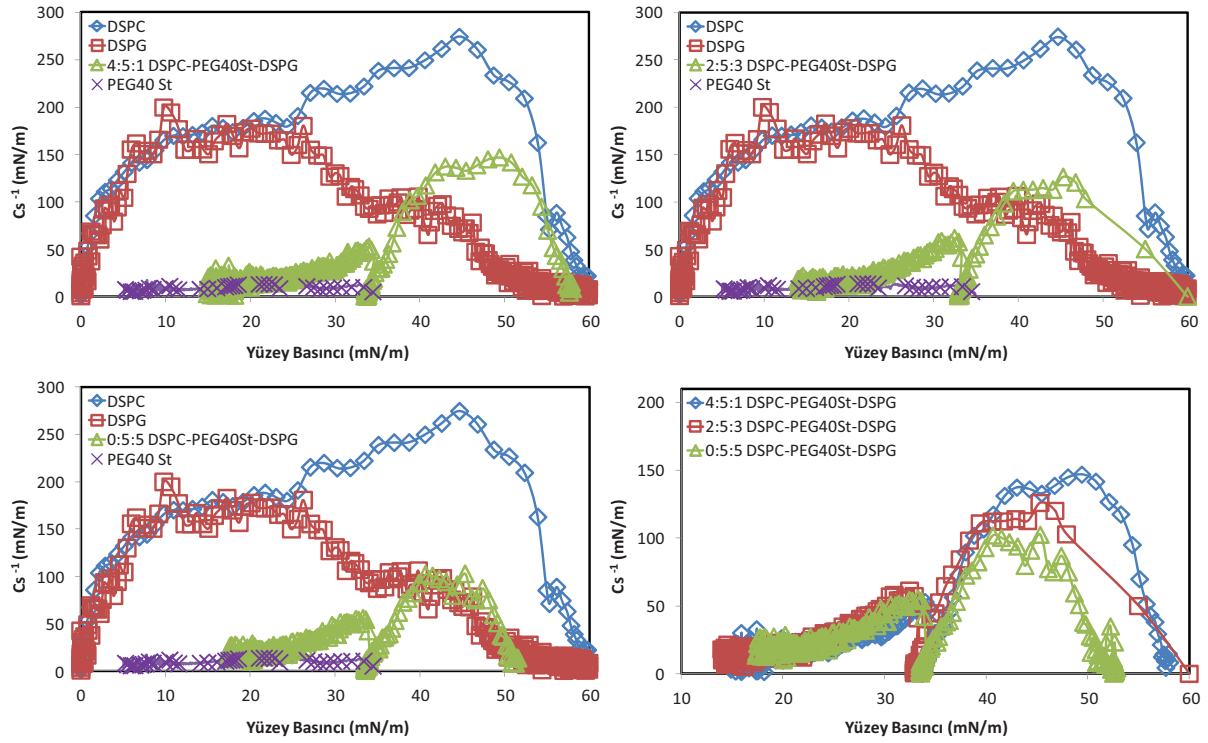


**Şekil 86.** Farklı basınçlarda 4:5:1, 2:5:3, 0:5:5 DSPC:PEG40St:DSPG karışımların artan Gibbs enerjileri

Buna ilaveten 7:2:1, 7:1,5:1,5, 7:1:2 karışımlarına benzer olarak, Şekil 87’de verilen  $Cs^{-1}$  grafiklerinden görülebileceği üzere 4:5:1, 2:5:3, 0:5:5 karışımlarında da izotermelerindeki plato bölgesinin ortaya çıktığı yüzey basıncına yakın basınçlarda minimum piklere rastlanmıştır. Ayrıca, 4:5:1, 2:5:3, 0:5:5 mol oranlarındaki DSPC:PEG40St:DSPG karışımlarının  $Cs^{-1}$  değerleri daha fazla miktarda PEG40St içerdikleri için DSPC’nin mol oranının %70 olarak sabit tutulduğu karışımlara nazaran daha küçüktür.

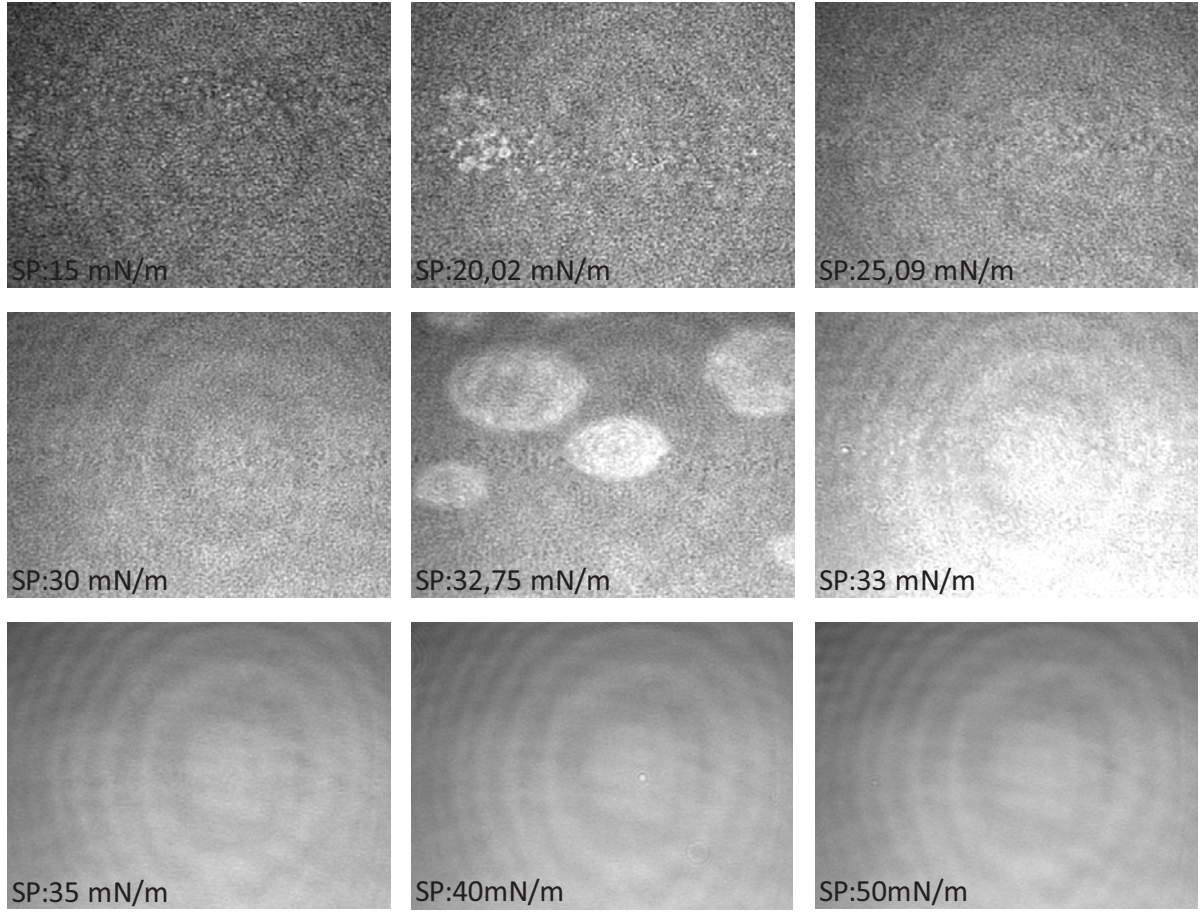
Farklı yüzey basınçlarında elde edilen 4:5:1 DSPC:PEG40St:DSPG karışımının BAM görüntüleri Şekil 88’de verilmiştir. 20 mN/m’de çok az faz ayrılığı görülse de düşük basınçlarda genel olarak homojen bir yüzey gözlemlenmiştir. Yaklaşık 33 mN/m’de büyük parlak yuvarlak domainlerin belirlediği, yüzey basıncının artmasıyla bu domainlerin iç içe geçtiği görülmüştür. Daha sonra bu parlak yüzey tamamen homojenleşmiştir. Parlak yüzey, ya monotabakanın kalınlığının arttığını yada daha sıkışık bir monotabakanın oluştuğu anlamına gelir ki, bu parlamaların izoterm plato bölgesine tekabül etmesi moleküler düzeyde bir kofigürasyon değişimi olduğuna işaret etmektedir. Şekil 89’de ise 2:5:3 DSPC:PEG40St:DSPG karışımının BAM görüntüleri gösterilmiştir. Yüzey basıncı 30 mN/m’ye kadar sıkışık fazın genişletilmiş faz içinde dağıldığı görülmektedir. 4:5:1 karışımında olduğu gibi plato bölgesine tekabül eden 33 mN/m civarı yüzey basıncında parlak bir yüzey gözlemlenmiştir. Fakat daha sonra sıkıştırma ile homojen film oluşmuştur. Şekil 90’de gösterilen 0:5:5 karışımının BAM görüntülerinde moleküller arasındaki mesafenin geniş olmasından dolayı koyu bölgeler dikkat çekmiştir. 5:5 mol oranıyla hazırlanan DSPC:PEG40St karışımından farklı olarak, sıkıştırma boyunca faz ayrılıklarına rastlanmamıştır. 2:5:3 karışımında olduğu gibi yaklaşık 33 mN/m’de yüzeyde parlama görülmüş ve daha sonra bu parlama tüm yüzeyi kaplayarak homojenleşmiştir. Karışımların yüzeylerinde görülen bu parlamalar PEG40St molekülünün yüzeyden ayrılışını temsil edebileceği gibi, PEG40St molekülündeki konfigürasyon değişimini de temsil edebilir. Ayrıca fazla miktarda PEG40St bileşeni içeren karışımlarda yüzey, sıkıştırma ile tamamen homojenleşirken, DSPC miktarı %70 olarak sabit tutularak hazırlanan karışımlarda ise yüzey tamamen homojenleşmemiştir.



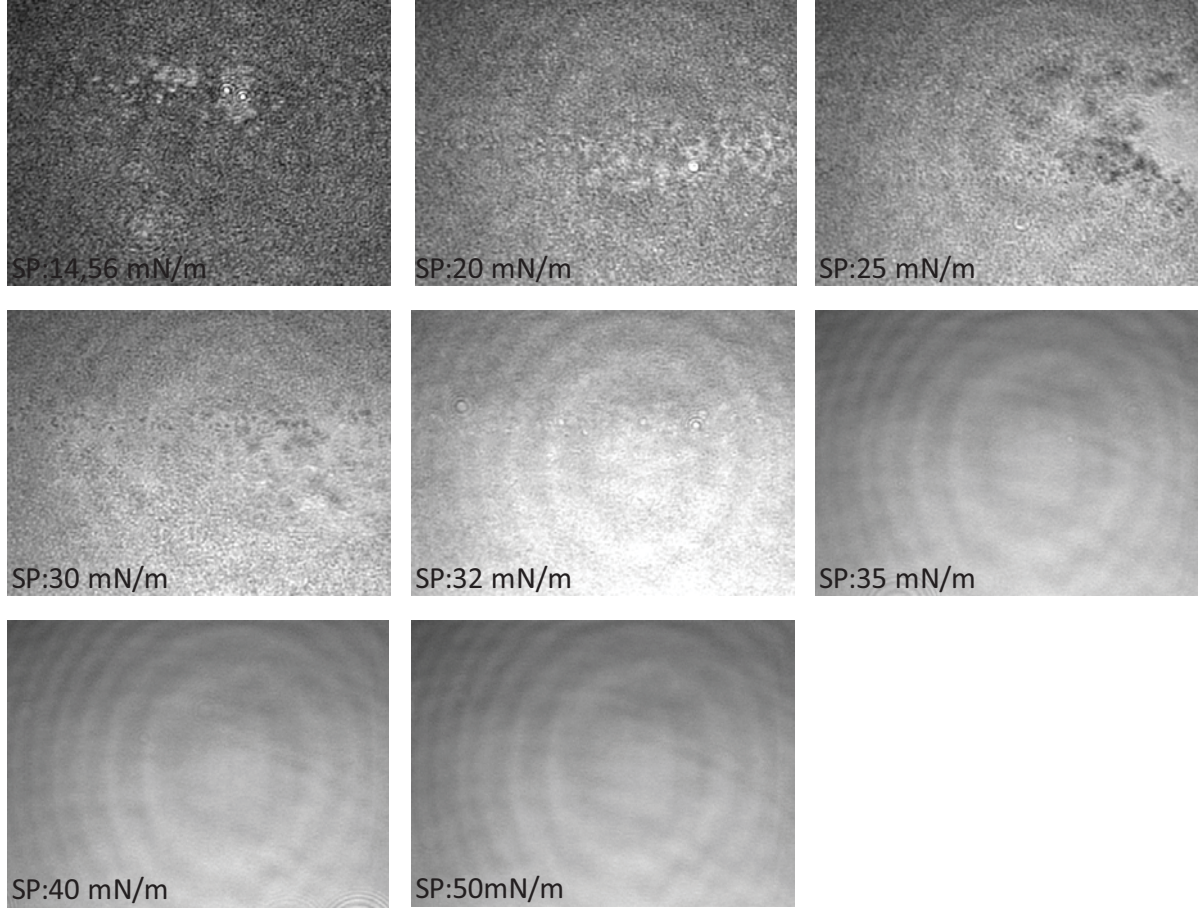


**Şekil 87.4.5:1, 2:5:3, 0:5:5 DSPC:PEG40St:DSPG karışımların yüzey basıncına karşı  $C_s^{-1}$  (mN/m) değerleri**

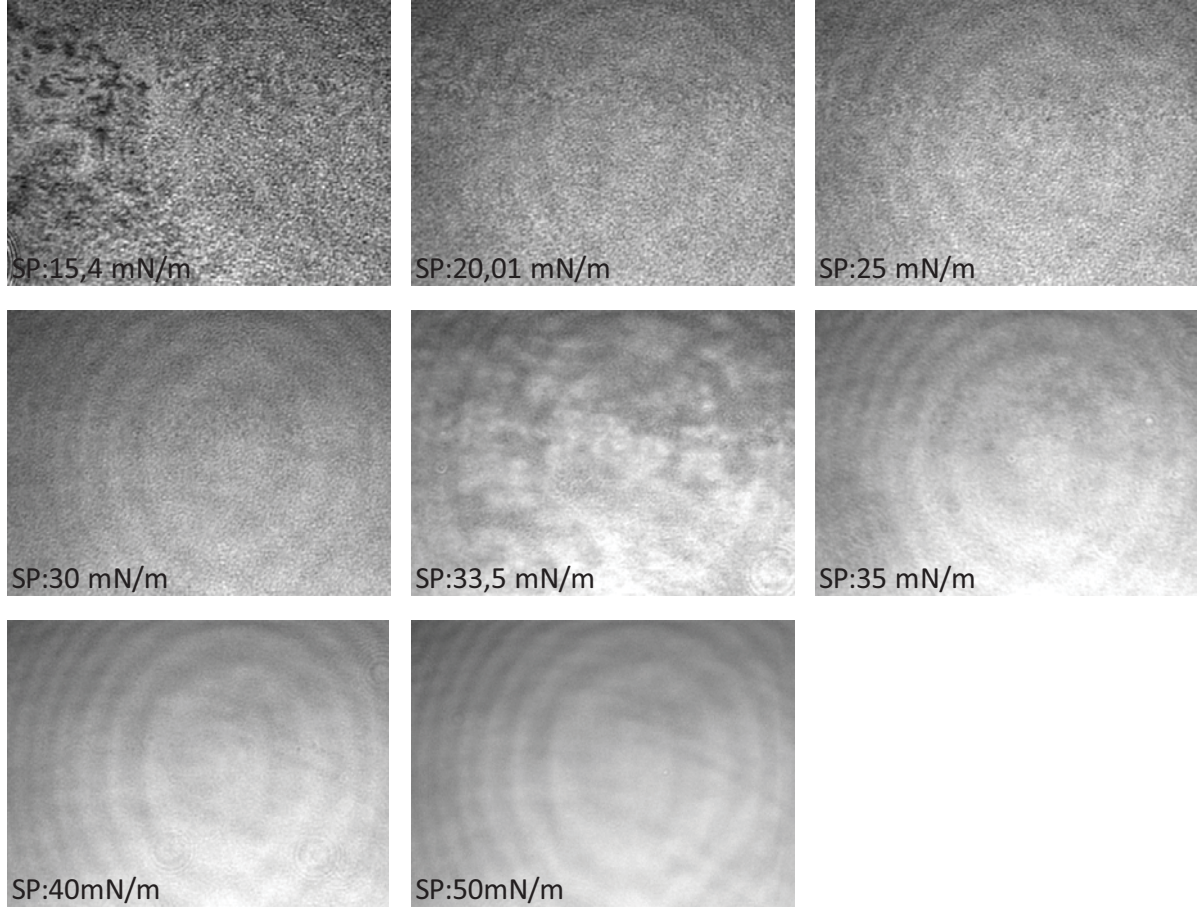
DSPC:PEG40St:DSPG karışımlarının incelenmesiyle elde edilen sonuçlara göre karışımlarda PEG40St ve DSPG miktarının artırılmasıyla, büyük hidrofilik PEG zincirleri arasındaki sterik etkilerden ve negatif yüklü PG molekülleri arasındaki elektrostatik itmeden dolayı karışımındaki moleküller arasındaki etkileşim zayıflayabilir (Shen ve ark., 2008; Watry ve ark., 2003; Wydro ve Witkowska, 2009). Literatürde daha önce yapılan bir çalışmada nötr PE molekülünün PG molekülüne eklenmesiyle elektrostatik itme etkisinin azaldığı rapor edilmiştir. Benzer olarak, DSPC:PEG40St:DSPG karışımlarında nötral özellikli DSPC molekülünün DSPG ve PEG40St molekülleri arasına girmesiyle bu itici kuvvetlerin etkisinin azaltılması olasılığı yüksektir (Inoue ve Nibu, 1999; Wydro ve Witkowska, 2009). Bundan dolayı az miktarda DSPG molekülünün, fazla miktarda DSPC içeren DSPC/PEG40 monotabakasına ilave edilmesiyle moleküller arasında çekici kuvvetlerin baskın olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca, bu karışımların BAM görüntülerinde büyük faz ayrılıklarına rastlanmamıştır. Elde edilen bu BAM görüntülerinden DSPG'nin ilave edilmesiyle karışım içindeki moleküller arasında pozitif bir sinerjinin oluştuğu söylenebilir.



**Şekil 88.** 4:5:1 DSPC:PEG40St:DSPG karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri



**Şekil 89.** 2:5:3 DSPC:PEG40St:DSPG karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri



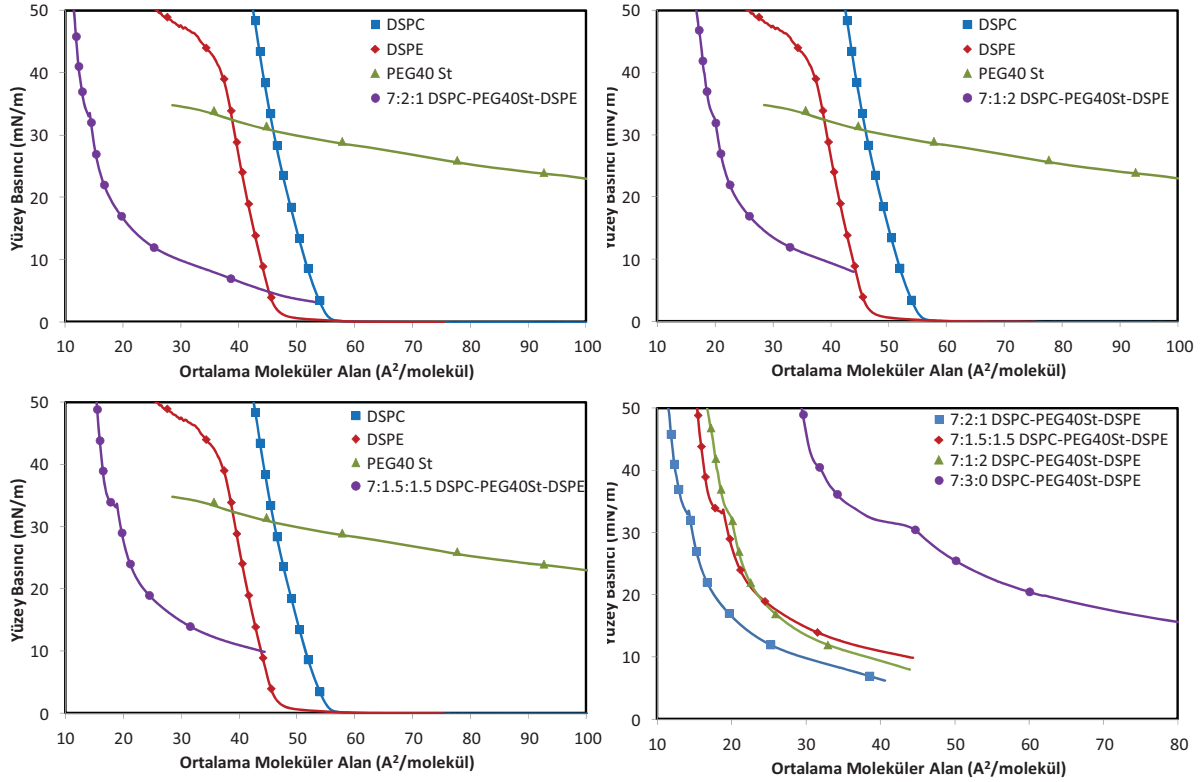
**Şekil 90.** 0:5:5 DSPC:PEG40St:DSPG karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri

*DSPC:PEG40St:DSPE Üçlü Karışımlarının Yüzey Basıncı-Moleküler Alan İzotermleri, BAM ve AFM Görüntüleri:*

Çalışmanın bu kısmında DSPG molekülünden polar baş grubunun yapısından dolayı farklılık gösteren DSPE molekülü ilave bileşen olarak kullanılmıştır. PG molekülleri negatif yüklü iken PE molekülleri tıpkı PC molekülleri gibi zwitterionik özelliğe sahiptir. DSPG fosfolipiti yapısında hidroksil grubu içerdiğinden, DSPE fosfolipidinin ise yapısında amonyum bulunduğundan her ikisi de hidrojen bağı yapabilmektedir (Dickey ve Faller, 2008; Mansour ve Zografı, 2007; Watry ve ark., 2003; Wydro ve Witkowska, 2009). Bu yapısal farklılıklardan dolayı DSPE fosfolipidi DSPC ve PEG40St içeren karışımında DSPG'den farklı davranış gösterebilir. Bu yüzden, DSPE molekülünün mikroköpükçükleri oluşturan monotabakanın faz davranışlarına etkisi ve diğer zar bileşenleriyle (DSPC, PEG40St)

etkileşimi incelendi. DSPG ile yapılan üçlü karışımlarda olduğu gibi, DSPC bileşenin mol oranı 0.7 ve PEG40St mol oranı 0.5 tutularak karışımlar hazırlandı. Saf DSPE ile DSPE içeren karışımlar için yüzey basıncı-ortalama moleküler alan izotermi (  $\pi$ -A) elde edildi. 7:2:1, 7:1,5:1,5, 7:1:2 mol oranlarıyla hazırlanan DSPC:PEG40St:DSPE karışımlarının ve saf bileşenlerin izotermi Şekil 91’de verilmiştir. Saf DSPE’nin izotermi şekil itibari ile hava-su ara yüzeyinde sıkışık bir monotabaka özelliği taşımakta olup, elde edilen izoterm izoterm literatür ile uyum içerisindedir (Bos ve Nylander, 1996; Cannan ve ark., 2004; Dufrêne ve ark., 1997; Haç-Wydro ve ark., 2012; Sánchez-González ve ark., 1998; Schneider ve ark., 2000; Wydro ve Witkowska, 2009). Ayrıca DSPC, DSPG ve DSPC fosfolipitlerinin baş gruplarının büyüklükleri arasındaki ilişki: DSPC > DSPE  $\approx$  DSPG şeklinde olduğu için DSPE’in izotermi DSPG’ninkine çok benzemişken, DSPC molekülüne göre daha küçük moleküler alana sahiptir (Doménech ve ark., 2005; Garidel ve Blume, 1998; Hac-Wydro ve ark., 2007; Sánchez-González ve ark., 1998). Ethanolamine grubunun boyutunun küçük olmasından ve hidrasyonundan dolayı DSPE monotabakadaki moleküller birbirine yaklaşabilmektedir ve moleküller arası van der Waals kuvvetleri güçlüdür (Doménech ve ark., 2005; Garidel ve Blume, 1998; Hac-Wydro ve ark., 2007; Sánchez-González ve ark., 1998). Şekil 91’te gösterilen karışımlar için kaydedilen yüzey basıncı-ortalama moleküler alan izotermi saf bileşenlere göre oldukça küçük moleküler alana sahiptirler. DSPE fosfolipiti baş grubundaki amin grubundan dolayı hidrojen bağı vericisi (donor) olarak davranırken, fosfat grubu içermesinden dolayı hidrojen bağı alıcısı (acceptor) olarak da davranmaktadır. Fakat, DSPC fosfolipiti yapısında fosfat grubu bulundurduğu için sadece hidrojen bağı alıcısı olarak davranmaktadır. DSPE molekülünün küçük boyutlu baş grubu ve güçlü hidrojen bağı kurabilme özelliği sayesinde DSPE filmi oldukça sıkışık film davranışı göstermiştir (Anglin ve Conboy, 2009; Garidel ve Blume, 1998; Thurmond ve ark., 1991; Watry ve ark., 2003; Wydro ve Witkowska, 2009). Bu yüzden DSPE’nin etkili hidrojen bağı yapma kapasitesi ve sahip olduğu küçük baş grubu, karışımların hava-su ara yüzeyinde küçük moleküler alanlara sahip olmasına neden olmuştur. Şekil 91’den görülebileceği üzere DSPE molekülünün karışıma az miktarda eklenmesiyle moleküler alan küçülürken, karışımındaki DSPE miktarının artırılmasıyla moleküler alan biraz artmıştır. Bu durumun, DSPE’nin artması ve PEG40St miktarının azalmasına bağlı olarak, DSPC’nin kolin grubu ile DSPE’nin amin grupları arasındaki elektrostatik itici kuvvetlerin artmasından kaynaklanacağı (Cong, 2009), aynı zamanda DSPE miktarının artmasıyla DSPE molekülünün içeriğindeki ethanolamin gruplarının hidrasyonunun karışımındaki moleküllerin birbirine yaklaşmasını önlemesinden

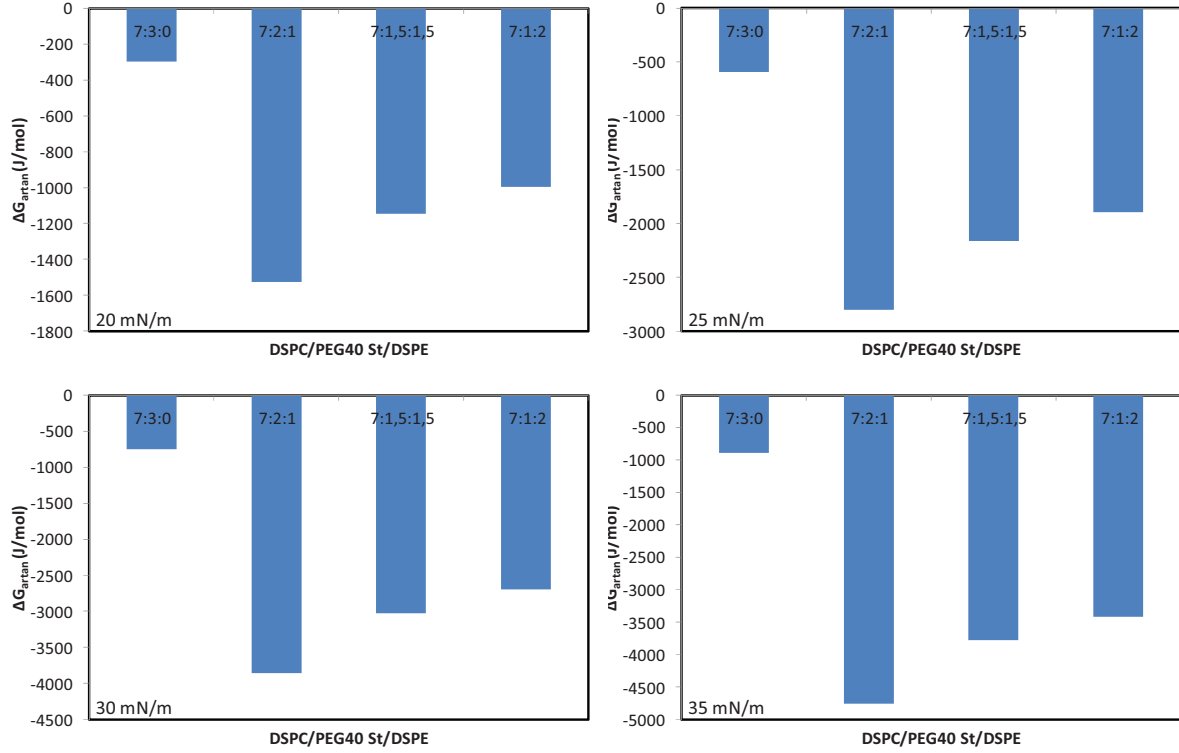
de kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Sánchez-González ve ark., 1998). Ayrıca, DSPC:PEG40St:DSPE karışımlarının izotermelerinde gözlemlendiği gibi DSPE’li karışımların izotermelerinde de 35 mN/m civarında ya PEG40St molekülünün yüzeyden ayrılışını ya da moleküler düzenlenmeyi temsil eden bir plato bölgesine rastlanmıştır.



**Şekil 91.** 7:2:1, 7:1,5:1,5, 7:1:2 DSPC:PEG40St:DSPE karışımlarının Yüzey Basıncı-Ortalama moleküler alan ( $\pi$ -A) izotermeleri

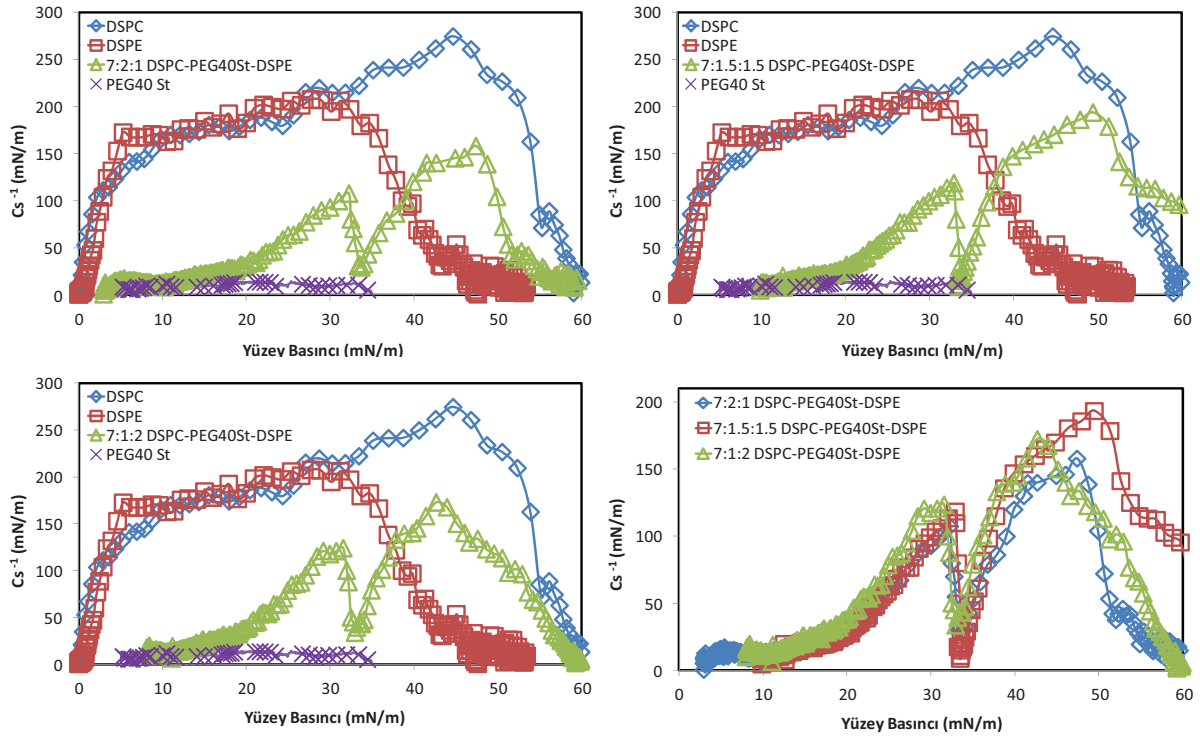
Termodinamik açıdan PEG40St ve karışımındaki fosfolipitlerin ilişkileri artan serbest enerji ( $\Delta G_{artan}$ ) hesaplanarak incelendi. Hesaplanan  $\Delta G_{artan}$  değerleri Şekil 92’de verilmiştir. 7:2:1, 7:1,5:1,5, 7:1:2 DSPC:PEG40St:DSPE karışımları için farklı yüzey basınçlarında bulunan negatif  $\Delta G_{artan}$  değerleri karışımındaki moleküller arasında güçlü çekici kuvvetlerin olduğunu işaret etmiştir. Ayrıca 7:2:1 mol oranıyla hazırlanan karışımın minimum  $\Delta G_{artan}$  değerlerine sahip olmasından dolayı bu karışımındaki termodinamik stabilite diğer karışımlara göre daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. DSPC:PEG40St karışımına az miktarda eklenen DSPE molekülü sıkıca paketlenmiş yapısı ve komşu moleküllerle etkili hidrojen bağı kurabilme kapasitesi sayesinde karışımındaki moleküller arası çekici kuvvetlerin artmasını sağlamıştır. Benzer şekilde Gonzalez ve ark. tarafından bulunan sonuçlara göre az miktarda DSPE içeren

DSPC/DSPE karışımında moleküller arası çekici kuvvetler baskındır (Sánchez-González ve ark., 1998). Domenech ve ark. tarafından gerçekleştirilen başka bir çalışmada da PC ve PE molekülleri arasında çekici kuvvetlerin etkili olduğu ve bu moleküllerden oluşan karışımların yüksek stabilite gösterdiği bulunmuştur (Doménech ve ark., 2005).



**Şekil 92.** Farklı basınçlarda 7:2:1, 7:1,5:1,5, 7:1:2 DSPC:PEG40St:DSPE karışımların artan Gibbs enerjileri

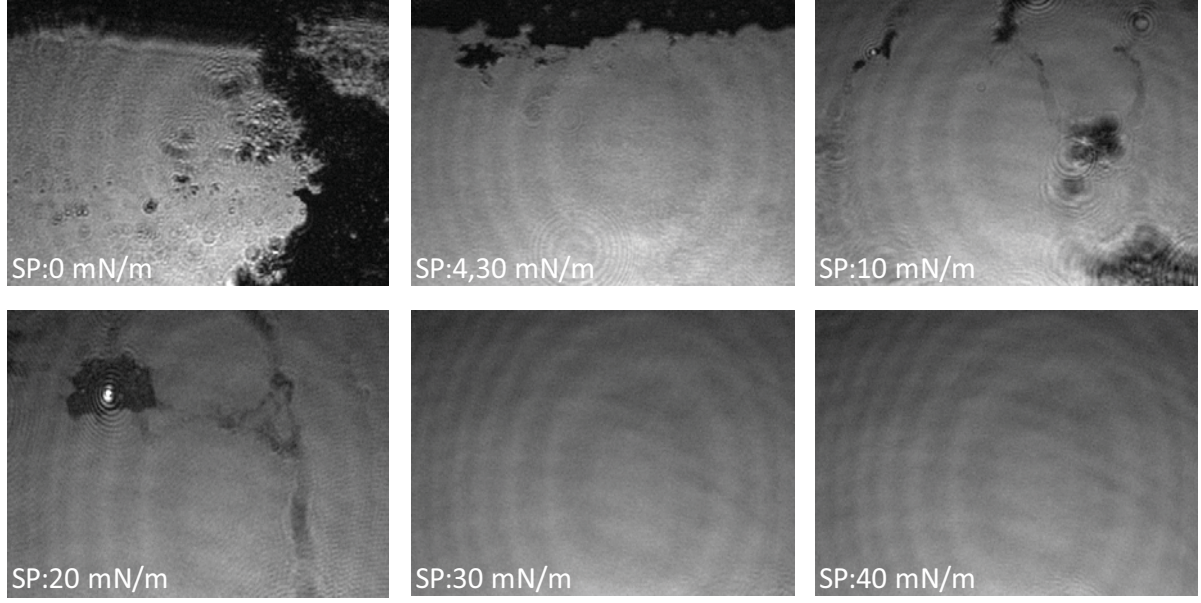
Bu incelemeye ek olarak,  $\pi$ -A izotermelerindeki veriler kullanılarak, 7:2:1, 7:1,5:1,5, 7:1:2 mol oranlarındaki DSPC:PEG40St:DSPE karışımlarının sıkıştırılabilirlik modülü ( $C_s^{-1}$ ) değerleri hesaplanmıştır. Şekil 93'de görülebileceği üzere DSPE ve DSPC saf bileşenleri karışımlara göre oldukça sıkışık film davranışı göstermişlerdir. Karışımlardaki PEG40St bileşenin yapısındaki PEG zinciri monotabakanın esnekliğini artırmıştır. Ayrıca, tıpkı DSPC:PEG40St:DSPE karışımlarında olduğu gibi DSPE içeren karışımların izotermelerinde ortaya çıkan plato bölgesi  $C_s^{-1}$  grafiklerinde minimum nokta olarak görülmüştür. Bu nokta muhtemel bir faz değişimini ya da PEG40St molekülünün yüzeyden ayrılışını temsil ettiği değerlendirilmektedir.



**Şekil 93.** 7:2:1, 7:1,5:1,5, 7:1:2 DSPC:PEG40St:DSPE karışımların yüzey basıncına karşı  $C_s^{-1}$  (mN/m) değerleri

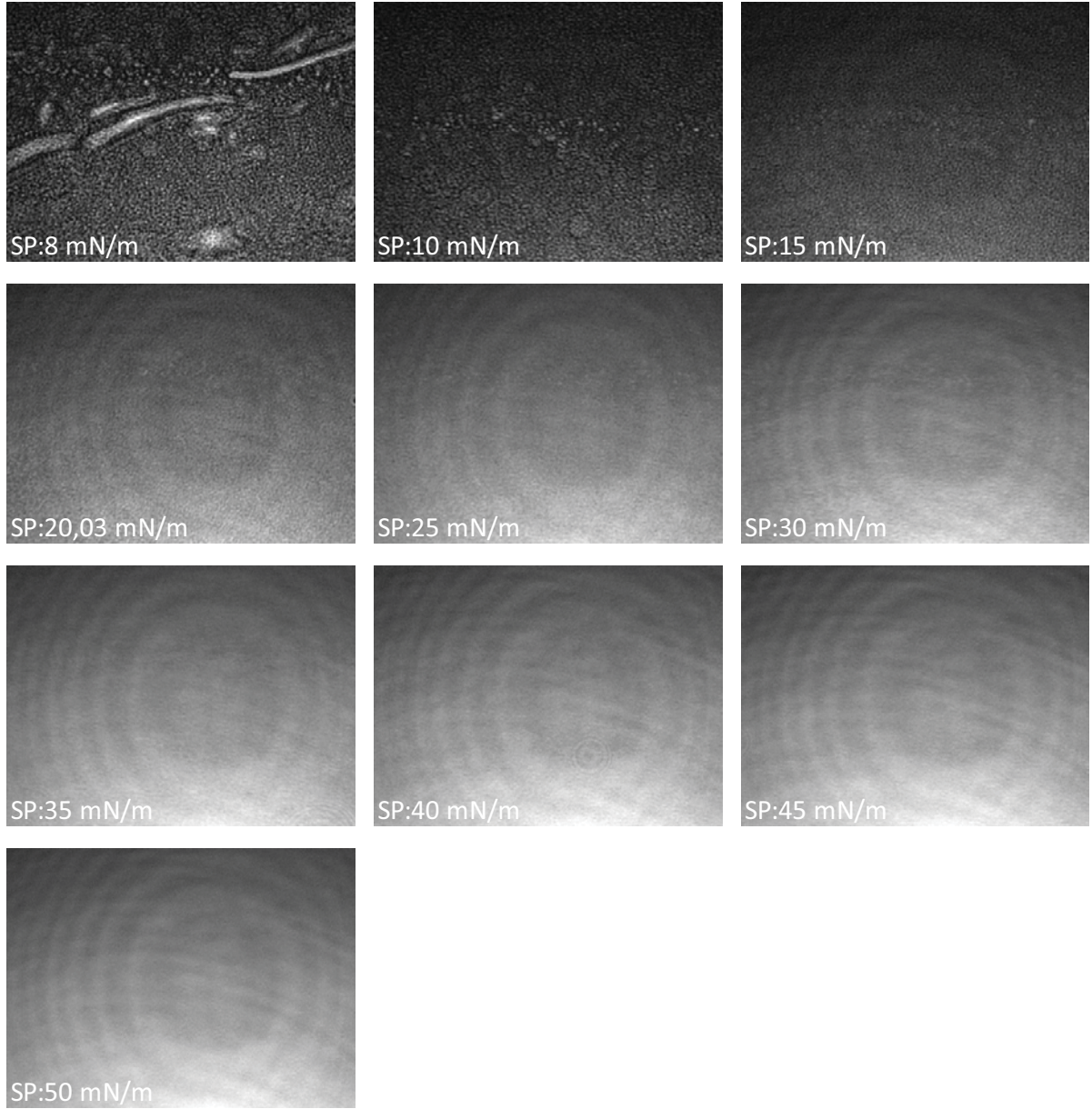
Karışımların faz davranışları hakkında daha fazla bilgi sahibi olmak için Brewster Açısı Mikroskobu kullanılarak monotabakalar görüntülenmiştir. Şekil 94’de verilen saf DSPE’nin BAM görüntüleri büyük moleküler alanlarda sıkışık domainler göstermiştir. Daha sonra artan sıkıştırma ile bu parçalar bir araya yaklaşarak tamamen homojen bir yüzey oluşturmuşlardır. Daha önce *Hac-Wydro ve ark.* tarafından yapılan çalışmada çekilen DSPE’nin BAM görüntüleri bu çalışmada bulunan sonuçlara oldukça benzerdir (*Hac-Wydro ve ark., 2012*).



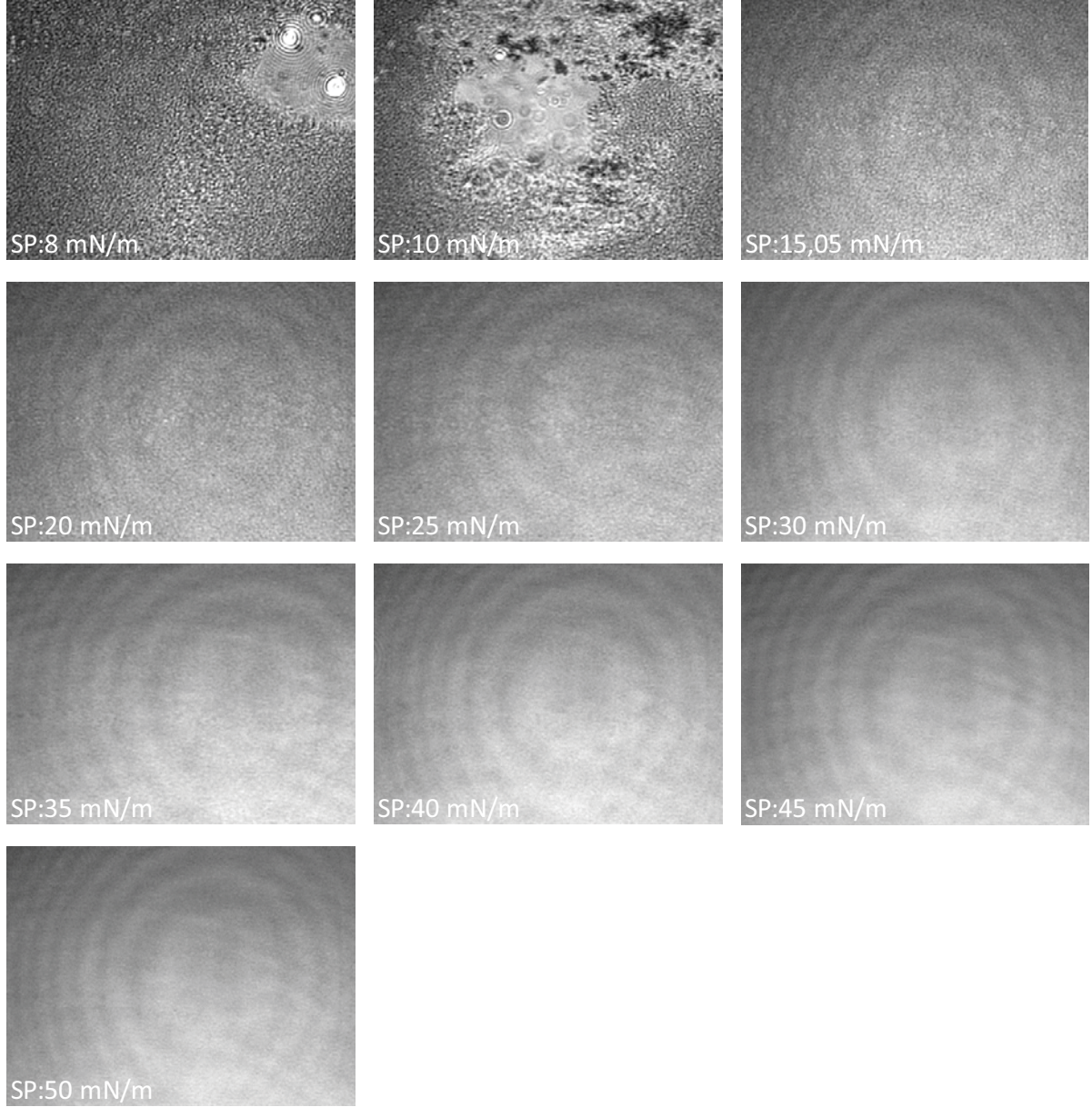


**Şekil 94.** Saf DSPE'nin Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri

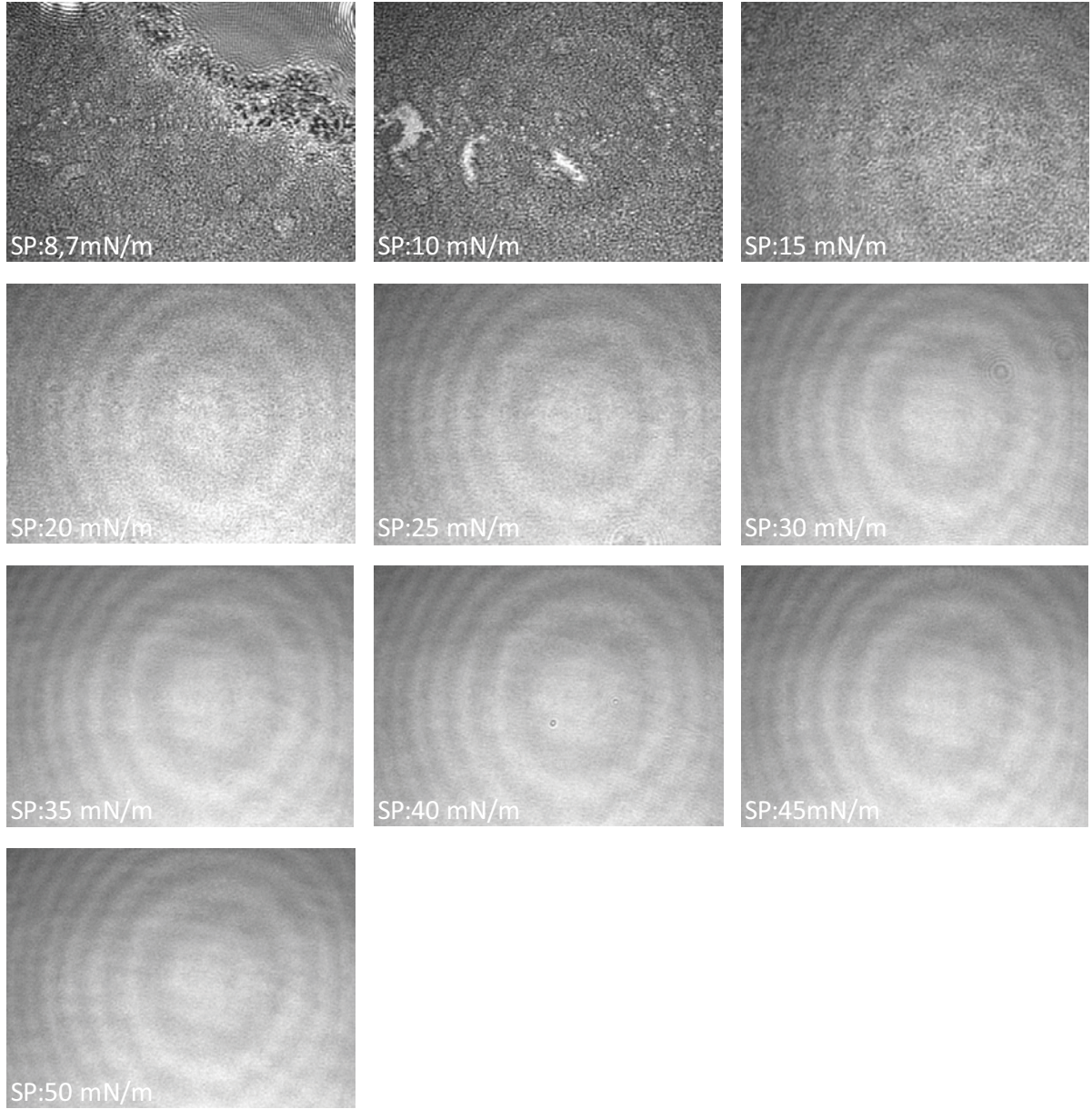
Şekil 95'de gösterilen 7:2:1 DSPC:PEG40St:DSPE karışımının BAM görüntülerinde, düşük yüzey basınçlarında, şeritler halinde sıvı sıvı fazda yapılar rastlanmıştır; ancak artan yüzey basıncı ile yüzey homojenleşmiştir. 7:1,5:1,5 DSPC:PEG40St:DSPE karışımının BAM görüntüleri ise Şekil 96'de verilmiştir. Yüzey basıncı 15 mN/m'ye ulaşıncaya kadar yüzeyde daha parlak ve daha az parlak olmak üzere farklı fazlar görülmüştür. Fakat yine yüzey basıncının artmasıyla daha homojen bir yüzey oluşmuştur. Bu iki karışıma benzer görüntüler 7:1:2 karışımının görüntülerinde de ortaya çıkmıştır. Tüm bu karışım sistemleri için kaydedilen BAM görüntüleri düşük yüzey basınçlarında az miktarda da olsa bir faz farklılığının olduğunu belirtmiştir. Ancak DSPC:PEG40St:DSPG karışım sisteminden farklı olarak, artan yüzey basıncıyla birlikte yüzeyde homojenleşme gerçekleşmiştir. Buradan DSPC/DSPE karışımları için düşünüldüğü gibi düşük basınçlarda karışımın bazı bölgelerinde moleküllerin tam olarak karışmadığı kanaatine varılmıştır (Anglin ve Conboy, 2009).



**Şekil 95.** 7:2:1 DSPC:PEG40St:DSPE karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri



**Şekil 96.** 7:1,5:1,5 DSPC:PEG40St:DSPE karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri

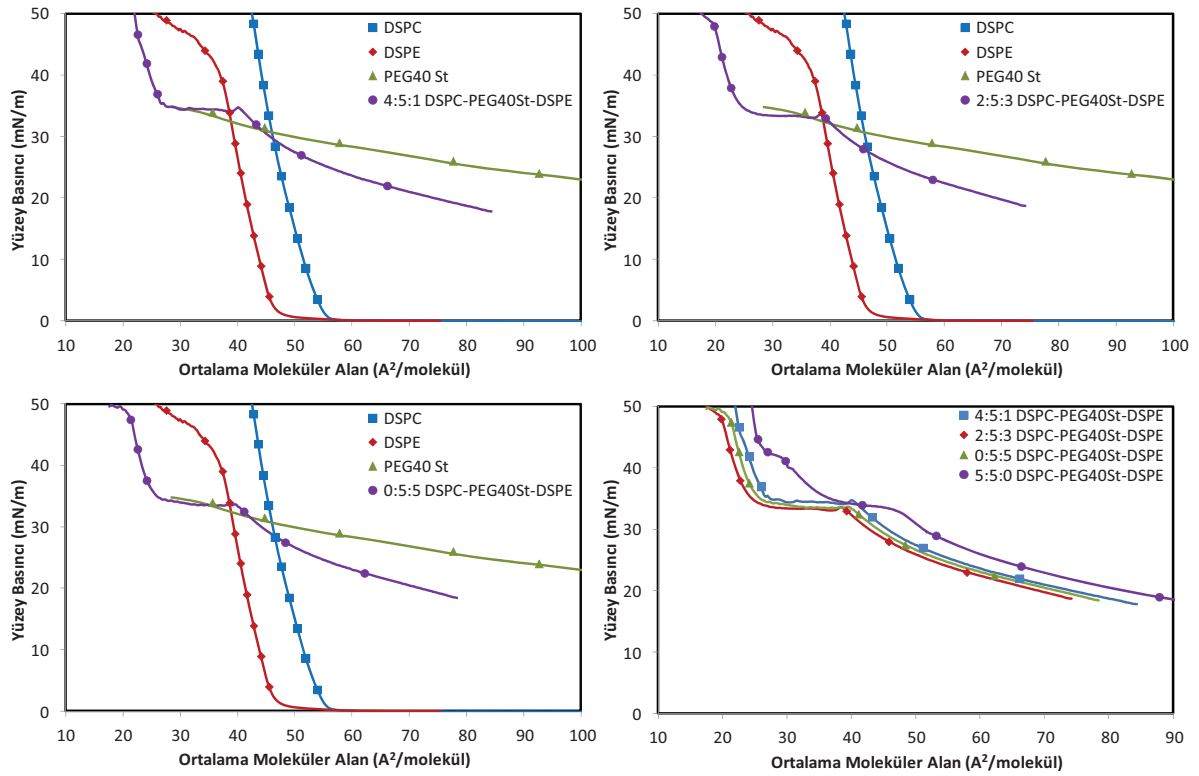


**Şekil 97.** 7:1:2 DSPC:PEG40St:DSPE karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri

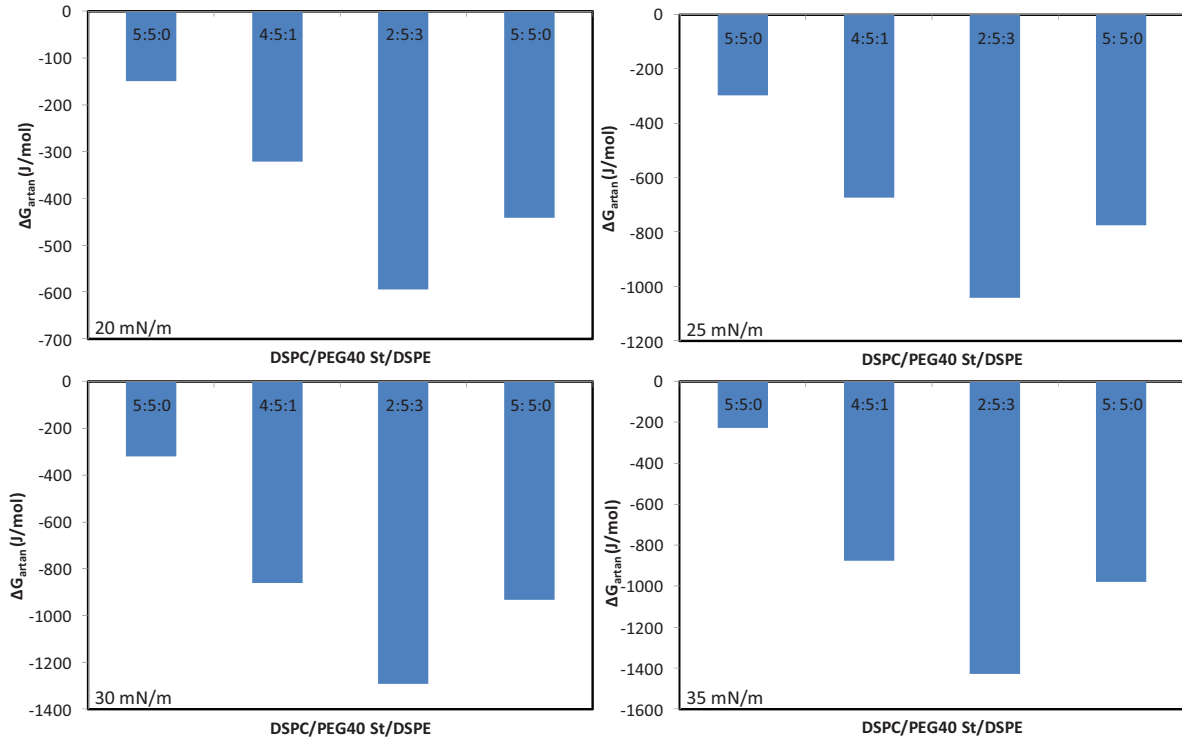
4:5:1, 2:5:3, 0:5:5 mol oranlarıyla hazırlanan DSPC:PEG40St:DSPE karışımlarının yüzey basıncı-ortalama moleküler alan izotermleri Şekil 98’de verilmiştir. Bu karışımlar fazla miktarda PEG40St molekülü içerdiği için düşük yüzey basınçlarında DSPC miktarının sabit tutulmasıyla hazırlanan karışımlara göre daha çok genişletilmiş film davranışı sergilemiştir. Diğer incelenen karışımların monotabakaları gibi, bu karışımların monotabakalarının izotermlerinde 35 mN/m civarında bir plato bölgesi ortaya çıkmıştır. İzotermlerdeki bu

bölgeden sonraki daha yüksek yüzey basınçlarında sıkışık monotabaka özelliği gözlemlenmiştir. 4:5:1 ve 2:5:3 DSPC:PEG40St:DSPE karışımlarının izotermeleri karşılaştırıldığında karışıma DSPE ilavesi ile, DSPE fosfolipidinin yüksek hidrojen bağı yapma kapasitesine ve küçük baş gruba (head group) sahip olmasından dolayı izotermin daha küçük moleküler alanlara doğru kaydığı gözlemlenmiştir. DSPC mol miktarının 0.7 olarak tutulduğu DSPC:PEG40St:DSPE karışımlarına kıyasla 4:5:1, 2:5:3, 0:5:5 karışımların izotermeleri PEG zincirinin etkisiyle daha büyük moleküler alanlarda yükselmiştir. Bu sebeple karışım içinde DSPE moleküllerinin bir araya gelme olasılıkları düşük olduğu için belki de bu moleküller karışımındaki diğer moleküllerle etkileşim kurabildikleri düşünülmektedir. Literatürde, DSPC'nin kolin grubu ile DSPE'nin amin grubu arasındaki itici elektrostatik kuvvetlerin hidrojen bağı oluşumunu olumsuz yönde etkileyebileceği yönünde bazı görüşler olmasına rağmen, karışımındaki nötr PEG40St moleküllerinin bu kuvvetleri perdeleyerek itici kuvvetleri minimize ettiği düşünülmektedir (Cong, 2009; Wydro, 2009). Bu izotermelerin analizlerine ek olarak karışımlar için hesaplanan artan serbest enerji ( $\Delta G_{artan}$ ) değerleri Şekil 99'da verilmiştir. İncelenen tüm kompozisyonlar için  $\Delta G_{artan}$  değerlerinin negatif bulunması moleküller arasında çekici kuvvetlerin baskın olduğuna işaret etmektedir. DSPE bileşenin mol oranının 0.3 tutulmasıyla hazırlanan DSPC:PEG40St:DSPE karışımı minimum  $\Delta G_{artan}$  değerleri göstermesi bu karışımın filminin termodinamik olarak daha stabil olduğunu göstermektedir. Şekil 100'de ise bu karışımların sıkıştırılabilirlik modülü ( $C_s^{-1}$ ) grafikleri gösterilmiştir. Karışımların  $C_s^{-1}$  değerleri saf bileşenlere ve  $x_{DSPC}=0.7$  tutularak hazırlanan karışımlara göre daha düşüktür. Diğer karışımlarda gözlemlendiği gibi yine 35 mN/m civarında minimum pik ortaya çıkmıştır. Bu karışımların özelliklerini ortaya koymak için filmlerin BAM görüntüleri elde edilmiştir. Şekil 101'deki 4:5:1 karışımın BAM görüntüleri incelendiğinde izotermelerde plato bölgesinin görüldüğü yüzey basıncı olan yaklaşık 33 mN/m'ye kadar yüzeyin hemen hemen homojen olduğu göze çarpmıştır. Fakat daha sonra 33 mN/m civarlarında 4:5:1 DSPC:PEG40St:DSPG karışımlarında gözlemlendiği gibi parlak yuvarlak adacıklar gözlemlenmiş, daha sonra sıkıştırma ile bu parçalar bir araya gelerek homojen bir yüzey meydana getirmişlerdir. Şekil 102'de 2:5:3 karışım için verilen görüntüler düşük yüzey basınçlarında genel olarak homojen bir dağılıma sahip olsa da sıkışık fazın genişletilmiş faz içinde dağıldığı dikkat çekmektedir. DSPC:PEG40St:DSPG karışımıyla aynı şekilde 33 mN/m civarlarında yüzeyde parlamalar belirmesinin ardından yüzey homojenleşmiştir. Şekil 103'de gösterilen 0:5:5 DSPC:PEG40St:DSPE karışımında da benzer görüntüler saptanmıştır. Bu karışımların BAM görüntülerinin analizine göre yüzeyde büyük

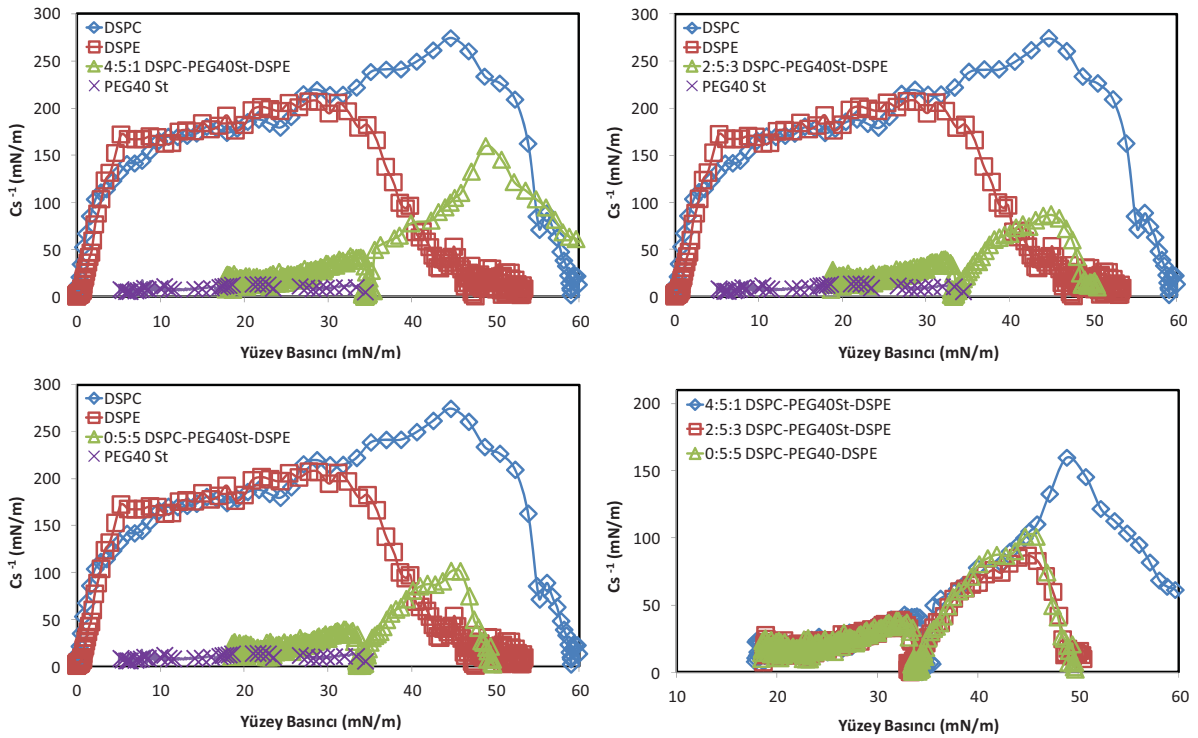
faz ayrılıklarına rastlanmamıştır. Ancak 33 mN/m civarlarında meydana gelen parlamalar DSPC mol oranının 0.7 olarak sabit tutularak hazırlanan DSPC:PEG40St:DSPE karışımlarının görüntülerinde gözlemlenmemiştir. Bu parlamaların ortaya çıkması, hava-su ara yüzeyindeki fazla miktarda PEG40St içeren karışımlarda, amin grubu ile PEG zincirleri arasında hidrojen bağı oluşumu nedeni ile Peg zincirlerinin konfigürasyon değişimine gidememesi ve dolayısıyla monotabaka film kalınlığının artmasının bir sonucu olabilir..



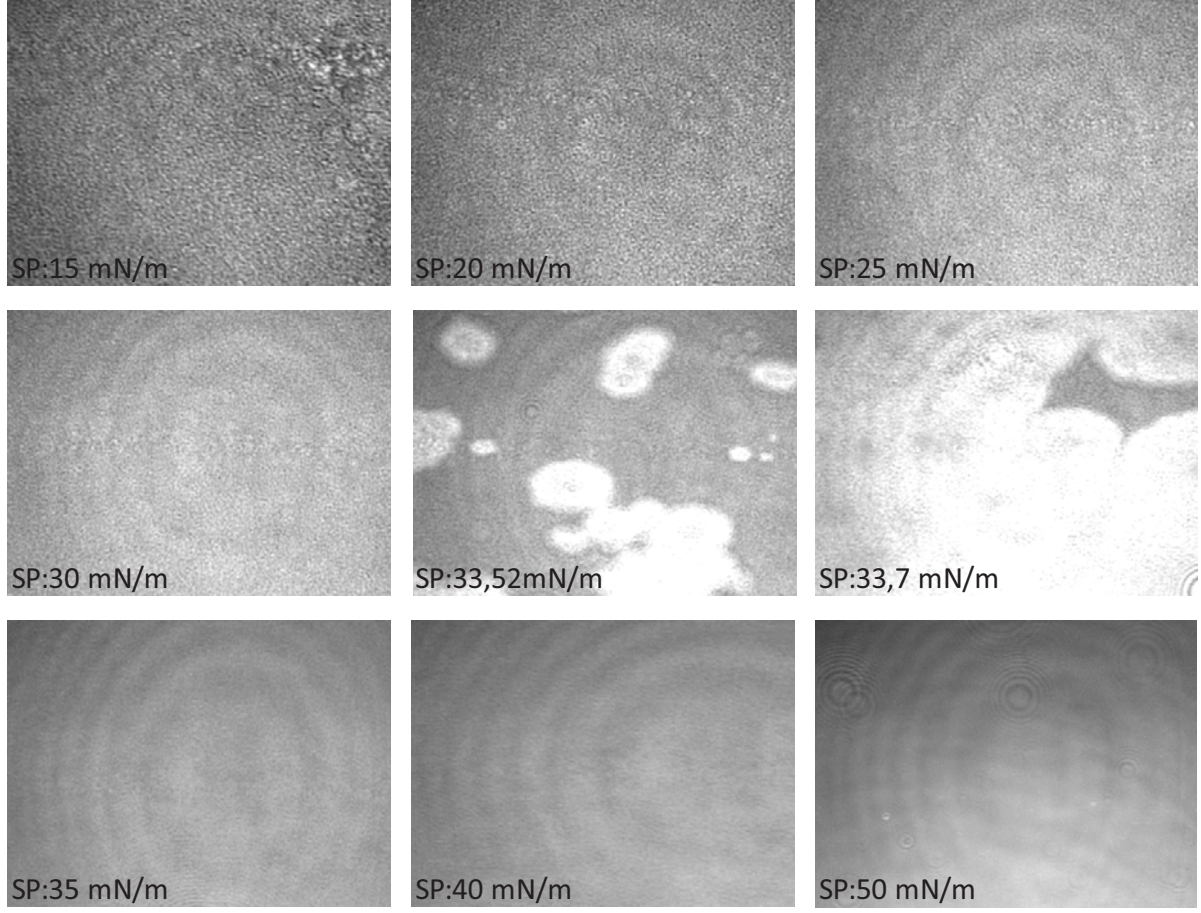
**Şekil 98.** 4:5:1, 2:5:3, 0:5:5 DSPC:PEG40St:DSPE karışımlarının Yüzey Basıncı-Ortalama moleküler alan ( $\pi$ -A) izotermeleri



Şekil 99. Farklı basınçlarda 4:5:1, 2:5:3, 0:5:5 DSPC:PEG40St:DSPE karışımların artan Gibbs enerjileri

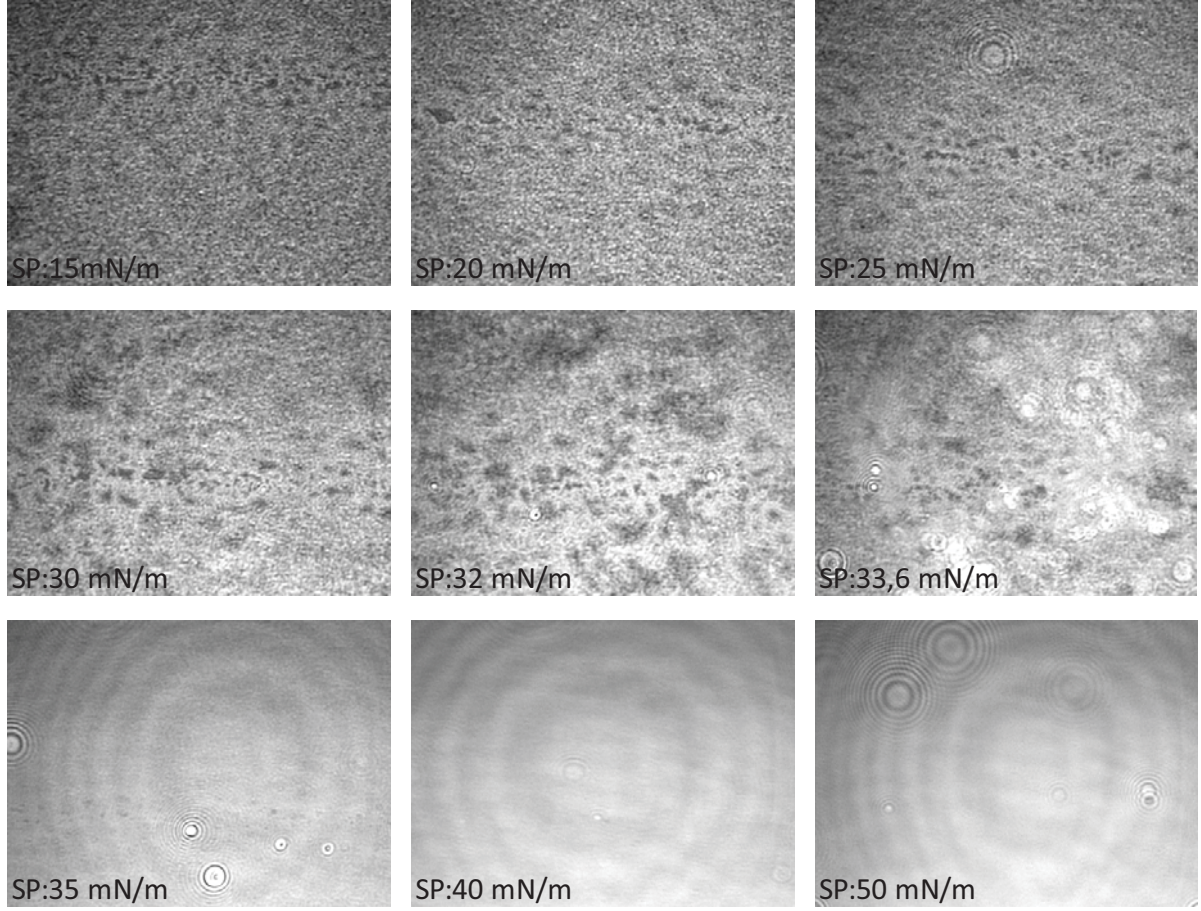


Şekil 100. 4:5:1, 2:5:3, 0:5:5 DSPC:PEG40St:DSPE karışımların yüzey basıncına karşı  $C_s^{-1}$  (mN/m) değerleri

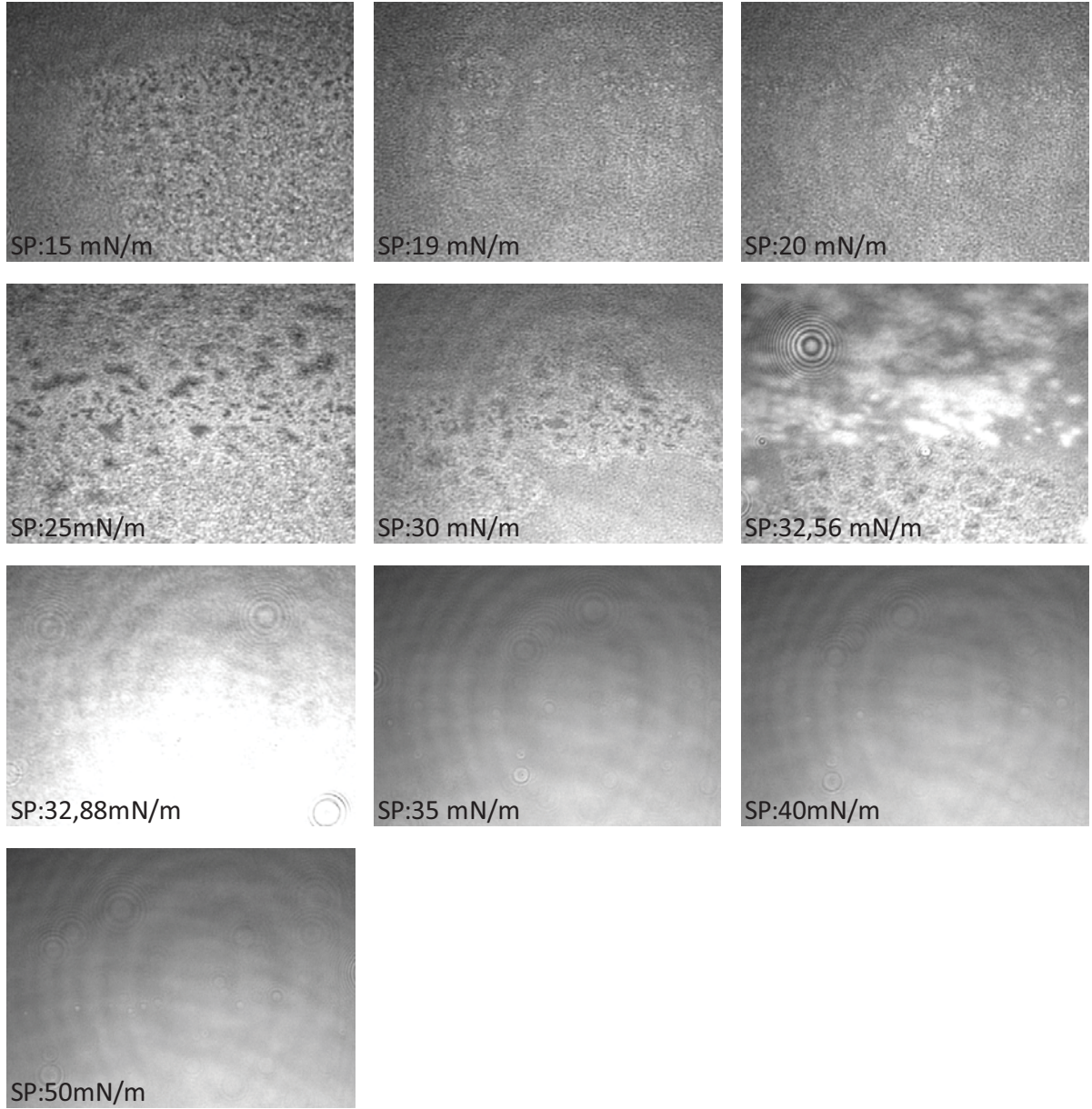


**Şekil 101.** 4:5:1 DSPC:PEG40St:DSPE karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri





**Şekil 102.** 2:5:3 DSPC:PEG40St:DSPE karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri



**Şekil 103.** 0:5:5 DSPC:PEG40St:DSPE karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri

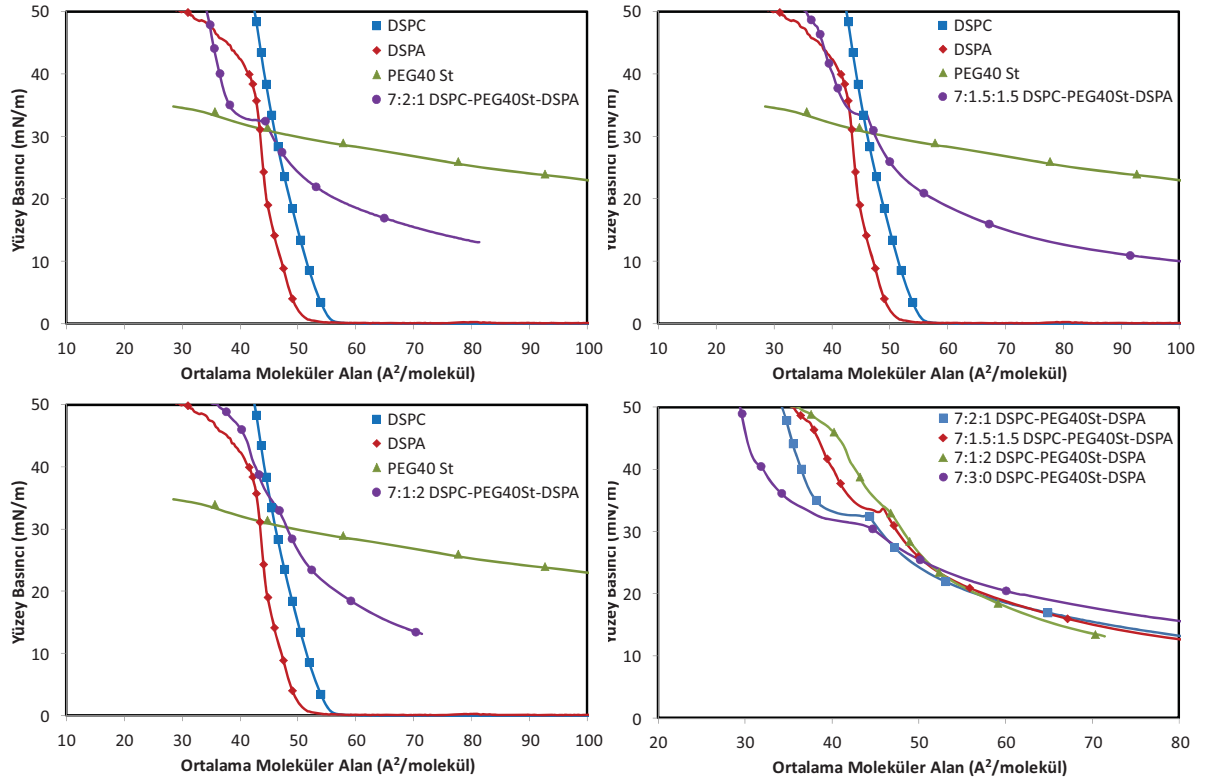
Hidrojen bağı yapabilen DSPE molekülünün etkilerinin 2D boyut düzleminde incelendiği bu kısımdan elde edilen sonuçlara göre, DSPC:PEG40St monotabakasına DSPE molekülünün eklenmesiyle, DSPE'nin etkili hidrojen bağı yapma kapasitesi ve sıkı paketlenmiş yapısı sayesinde karışımındaki moleküller arasındaki çekici kuvvetlerin etkisi artmıştır. Ayrıca yüzey basıncı-moleküler alan izotermelerinin ve BAM görüntülerinin sonuçlarına göre DSPC'nin mol oranı 0.7 olarak hazırlanan karışımlarda moleküller arası etkileşimler daha fazladır. DSPC:PEG40St:DSPE karışımları ile kıyasladığımızda

DSPC:PEG40St:DSPE karışımlarının  $\Delta G_{\text{artan}}$  değerleri daha negatifken yüksek basınçlarda alınan BAM görüntülerinden daha homojen olduğu görülmüştür. Zira DSPG'nin yapısındaki gliserol'ün hidrojen bağı kapasitesi daha zayıftır (Garidel ve Blume, 2000). Bu durumda mikroköpükçüklerin zar yapısının stabilitesi DSPC:PEG40St karışımına DSPE eklenmesiyle arttırılabileceği düşünülebilir.

*DSPC:PEG40St:DSPA Üçlü Karışımlarının Yüzey Basıncı-Moleküler Alan İzotermi ve BAM Görüntüleri:*

Çalışmanın bu kısmında, polar kısımda PA içeren bir fosfolipidin mikroköpükçük zar yapısının stabilitesine etkisini ve zar yapıda bulunan DSPC ve PEG40St molekülleri ile etkileşimini incelemek amacıyla DSPA fosfolipiti zar formülasyonunda ilave bileşen olarak kullanılmıştır.

DSPG ve DSPA molekülleri aynı zincir uzunluğuna sahip olmaları ve her ikisi de negatif yüklü olmalarına rağmen polar baş gruplarının yapıları birbirinden farklıdır. DSPA sadece bir tane hidroksil grubu içerirken, DSPG iki adet hidroksil içerir. Bu yüzden her iki molekülde hem kendi kendilerine hem de komşu moleküllerle hidrojen bağı kurabilirler (Dickey ve Faller, 2008; Garidel ve Blume, 1998; Inoue ve Nibu, 1999). Bu değişik baş grupların mikroköpükçük zarının stabilitesi üzerine etkisi farklı olabilir. Bu sebepten dolayı çalışmamızın bu bölümünde farklı mol oranlarında DSPC, PEG40St ve DSPA içeren karışımlar hazırlandı ve DSPA'nın moleküller arası etkileşime etkisi incelendi. DSPG ve DSPE içeren karışımlarla aynı şekilde DSPA'li karışımlar da sırasıyla DSPC ve PEG40St'nin mol oranları 0.7 ve 0.5 tutularak hazırlandı. DSPC'nin mol oranı 0.7 tutularak hazırlanan karışımların yüzey basıncı-ortalama moleküler alan izotermi Şekil 104'de verilmiştir.

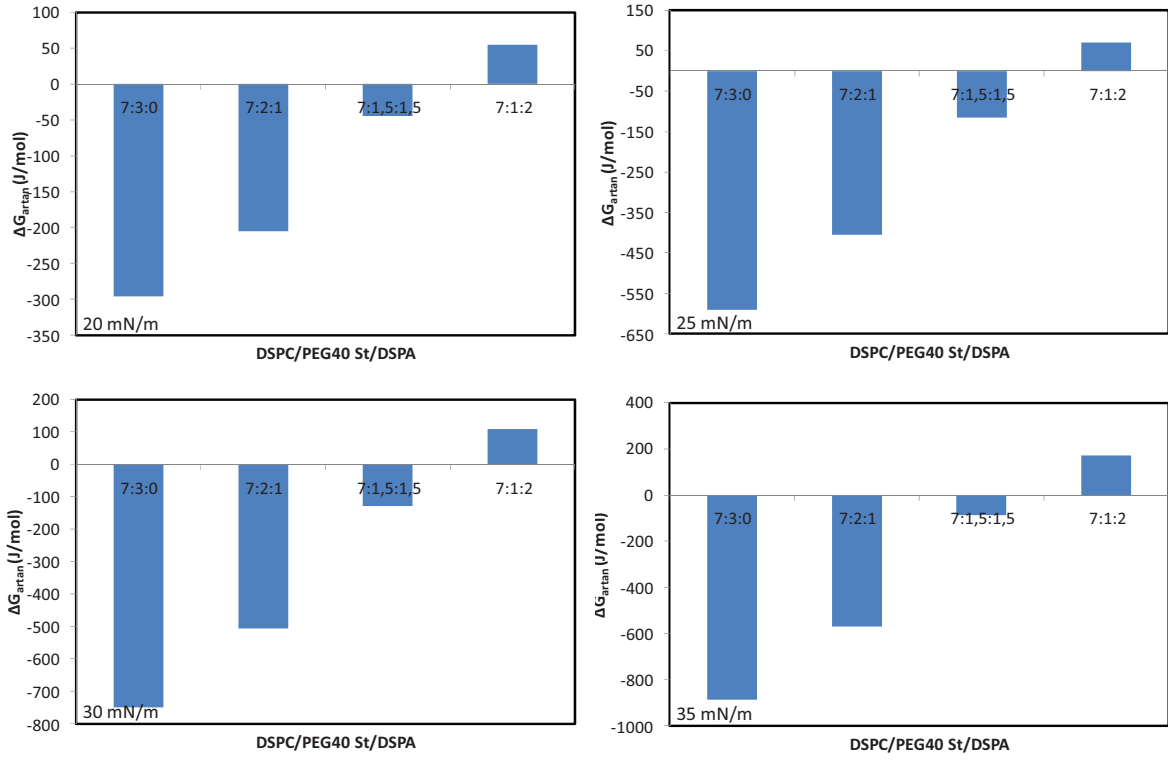


**Şekil 104.** 7:2:1, 7:1,5:1,5, 7:1:2 DSPC:PEG40St:DSPA karışımlarının Yüzey Basıncı-Ortalama moleküler alan ( $\pi$ -A) izotermi

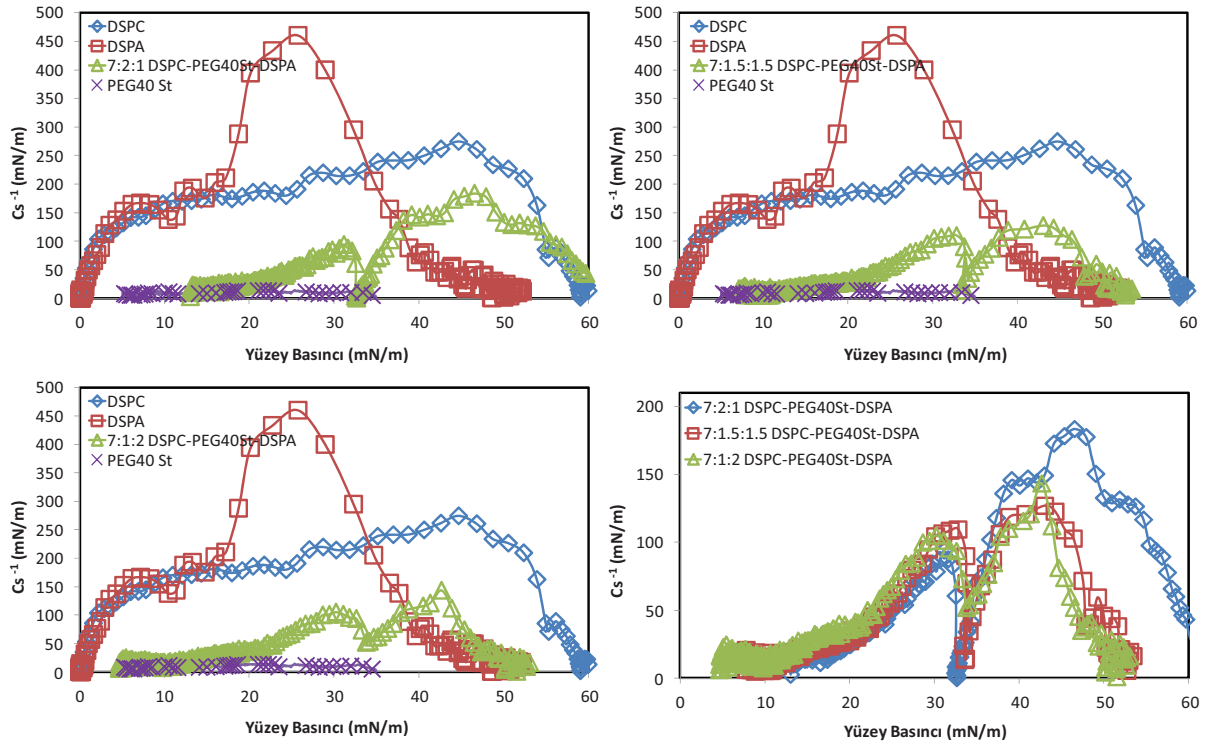
Saf DSPA molekülü, saf DSPC, DSPG ve DSPE moleküllerine benzer şekilde hava-su ara yüzeyinde oldukça düzenli yapıda bir film oluşturmuştur ve bu izoterm literatürde daha önce yapılan çalışmanın sonuçlarıyla uyumludur (Yoon ve ark., 2010). Ayrıca Şekil 104’de görülebileceği gibi DSPA monotabakasındaki moleküller, baş gruplarının boyutlarındaki farklılıktan dolayı DSPC monotabakasına göre daha yoğun paketlenmiş ve daha sıkışık bir film özelliği göstermiştir. PA molekülünün baş grubunun büyüklüğü PC molekülünden çok küçük olduğu için PA molekülleri arasındaki çekici kuvvetlerin çok daha güçlü olduğu bilinmektedir (Bos ve Nylander, 1996; Dickey ve Faller, 2008; Estrela-Lopis ve ark., 2004; Garidel ve Blume, 1998; Lee ve ark., 2006). Bu sebepten dolayı DSPA monotabakasının moleküler alanı DSPC’ye göre oldukça küçüktür. Karışımlar düşük yüzey basınçlarında saf DSPC ve DSPA’dan farklı olarak Şekil 104’de gösterildiği gibi genişletilmiş film özelliği göstermiştir. Buna ek olarak tüm diğer karışımların izotermelerinde bulunan 35 mN/m civarındaki plato, bu karışımların izotermelerinde de ortaya çıkmıştır.  $x_{\text{DSPC}}=0.7$  mol oranı sabit tutularak hazırlanan DSPC:PEG40St:DSPG karışımlarıyla aynı şekilde, DSPC:PEG40St:DSPA karışımlarına fazla miktarda DSPA molekülünün eklenmesi

monotabaka özelliklerini etkilemiştir. Özellikle, DSPA miktarının artması ile birlikte PEG40St miktarının azalmasına rağmen plato bölgesinin üstünde izotermilerin daha az sıkışık bir faz oluşturdukları görülmektedir. DSPA negatif yüklü bir lipid olup, itici elektrostatik etkilerden dolayı izotermi daha büyük moleküler alanlara kaydığı değerlendirilmiştir (Cambrea ve ark., 2007; Garidel ve ark., 1997).

Bu karışımların içindeki moleküller arası ilişkileri incelemek amacıyla artan serbest enerji değerleri ( $\Delta G_{\text{artan}}$ ) hesaplandı. Şekil 105'deki grafiklerden anlaşılacağı gibi 7:2:1 ve 7:1,5:1,5 karışımlardaki moleküller arasında çekici kuvvetler etkilidir. Daha önce yapılan başka bir çalışmada benzer şekilde DPPC/DPPA karışımındaki moleküller arasında çekici kuvvetlerin var olduğu bulunmuştur (Lee ve ark., 2006). Ancak, 9:1 DSPC:PEG40St karışımında artan serbest enerji değerleri negatif iken, PEG40St miktarının %10 olarak tutulup sadece fosfolipid oranı değiştirildiğinde (7:1:2 karışımı) pozitif değerlere kaydığı görülmektedir. PEG40St miktarının %20 olarak sabit tutulduğu 8:2:0 ve 7:2:1 karışımlarında ise, serbest enerji değerlerinde belirgin bir değişim olmadığı ve değerlerin negatif oldukları görülmüştür. Ayrıca, artan yüzey basıncıyla  $\Delta G_{\text{artan}}$  değeri 7:2:1 ve 7:1,5:1,5 karışımları için daha negatif değere giderken, 7:1:2 karışımı için daha pozitif bir değer almıştır. Bu grafiklere ek olarak hesaplanan sıkıştırılabilirlik modülü ( $C_s^{-1}$ ) grafikleri de Şekil 106'de verilmiştir. İncelenen farklı fosfolipit içeren diğer karışımlarda olduğu gibi karışımlardaki PEG zinciri karışım üzerinde genişletici etki yapmıştır. Bu sebeple saf DSPC ve DSPA'ya göre karışımlar daha düşük  $C_s^{-1}$  değerlerine sahiptir. Yine öncekilerle benzer şekilde 35 mN/m civarında monotabakada bir değişim olduğunu gösteren minimum pikler dikkat çekmiştir. Karışımlarda göze çarpan bu düşük  $C_s^{-1}$  değerleri monotabakada daha elastik bir davranışı temsil etmektedir (Quiroga ve ark., 2011).

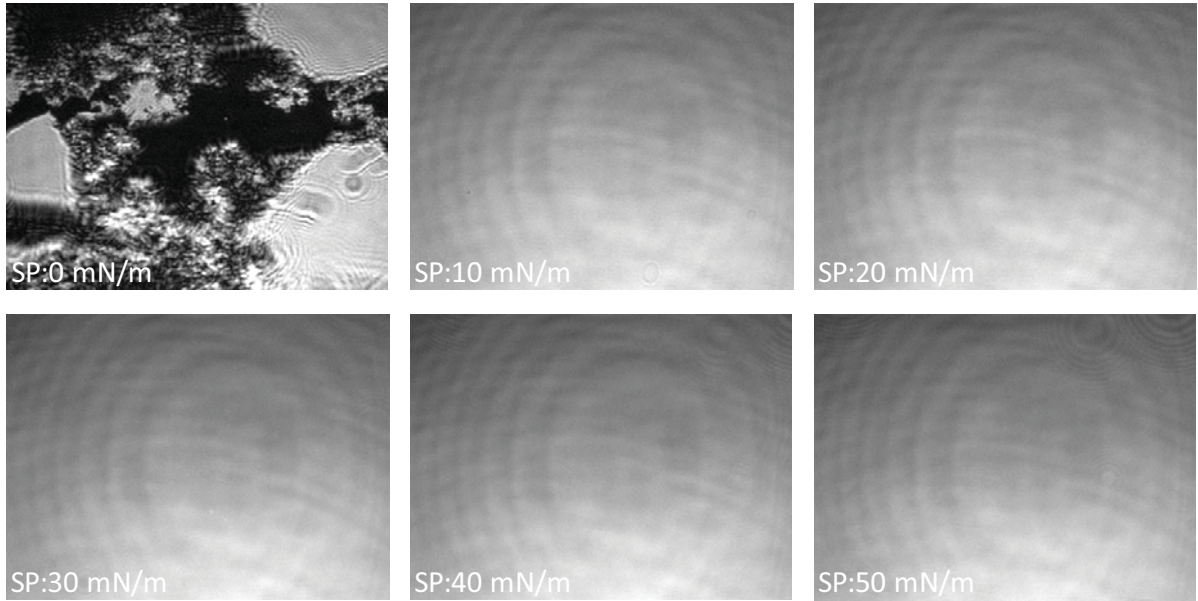


Şekil 105. Farklı basınçlarda 7:2:1, 7:1,5:1,5, 7:1:2 DSPC:PEG40St:DSPA karışımların artan Gibbs enerjileri

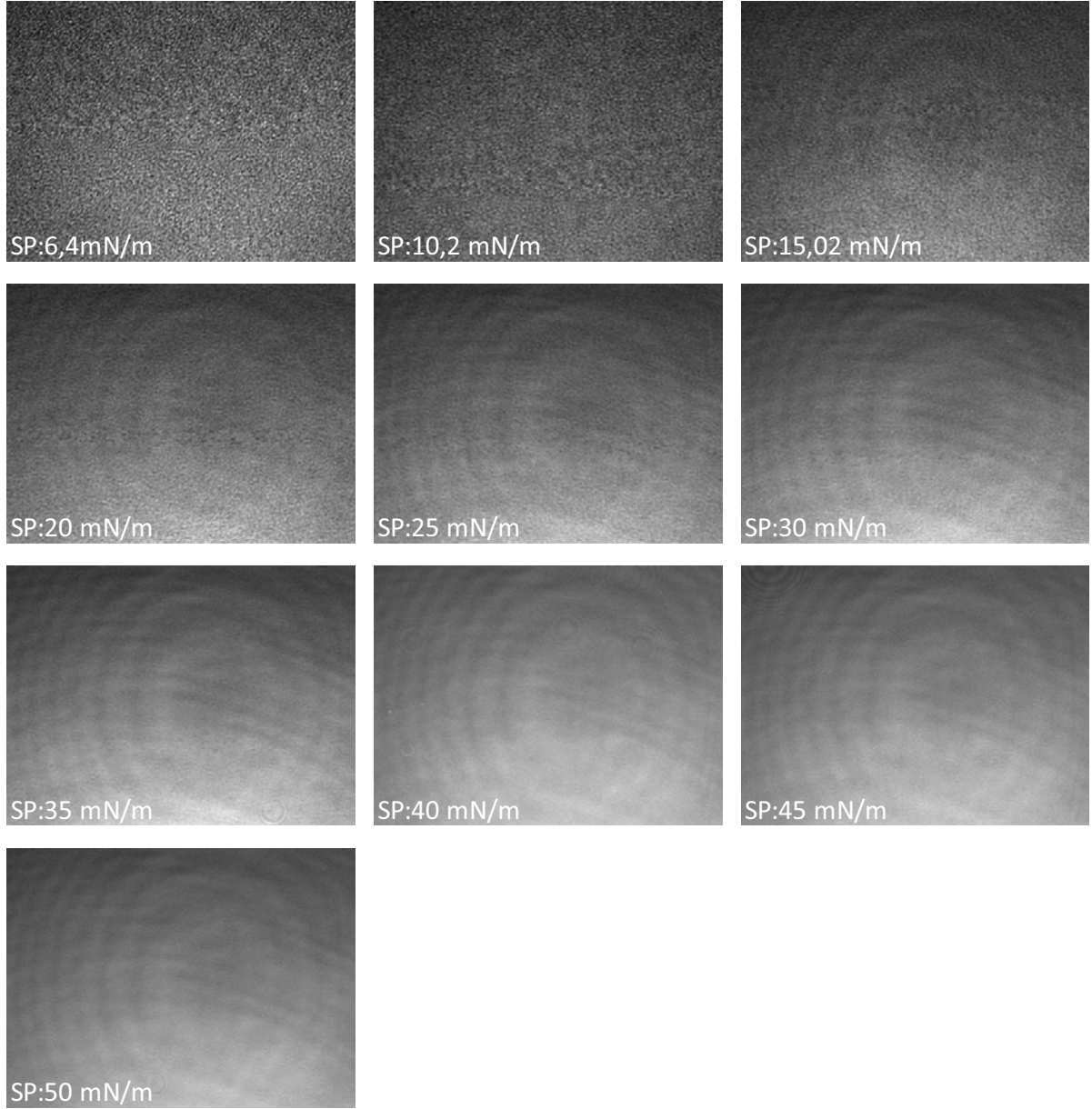


Şekil 106. 7:2:1, 7:1,5:1,5, 7:1:2 DSPC:PEG40St:DSPA karışımların yüzey basıncına karşı  $C_s^{-1}$  (mN/m) değerleri

Saf DSPA için elde edilen BAM görüntüleri Şekil 107’de görülebilmektedir. Tıpkı saf DSPC ve DSPG molekülleri gibi DSPA monotabakasında da düşük yüzey basınçlarında sıkışık bölgeler görülürken, artan yüzey basıncıyla bu bölgelerin bir araya gelerek homojen bir film meydana getirdiği gözlemlenmiştir. Şekil 108’deki 7:2:1 DSPC:PEG40St:DSPA karışımının BAM görüntülerinde sırasıyla Şekil 109 ve Şekil 110’de verilen 7:1,5:1,5 ve 7:1:2 karışımların görüntülerine göre yüzeyde daha homojen bir dağılım fark edilmiştir. 7:1,5:1,5 karışımın yüzeyinde düşük yüzey basınçlarında moleküller arası geniş mesafeler ve küçük parlak sıkışık yapılar görülmüştür. Ayrıca, 7:1:2 karışımın görüntülerinde yaklaşık 5 mN/m ve 10 mN/m yüzey basınçlarında yüzeydeki genel film davranışına göre daha sıkışık özellikli yuvarlak parçalar dikkat çekmiştir.  $x_{\text{DSPC}}=0.7$  mol oranıyla hazırlanan DSPC:PEG40St:DSPG ve DSPC:PEG40St:DSPE karışımlarına kıyasla DSPC:PEG40St:DSPA karışımları daha homojen film özelliği göstermiştir. Üstelik DSPC:PEG40St karışımına %10 oranında DSPA ilavesinin, 8:2 karışımını daha homojen hale getirdiği görülmüştür (Şekil 23 and Şekil 108). Fakat, aynı durumun 9:1 DSPC:PEG40St karışımı için söz konusu olduğunu söylemek mümkün değildir (Şekil 22) Bu sonuçlardan, fosfolipitlerin baş gruplarının yükleri, büyüklükleri ve karışım içindeki miktarlarının moleküller arasındaki etkileşimleri ve morfolojilerini yakından etkilediği anlaşılmaktadır.

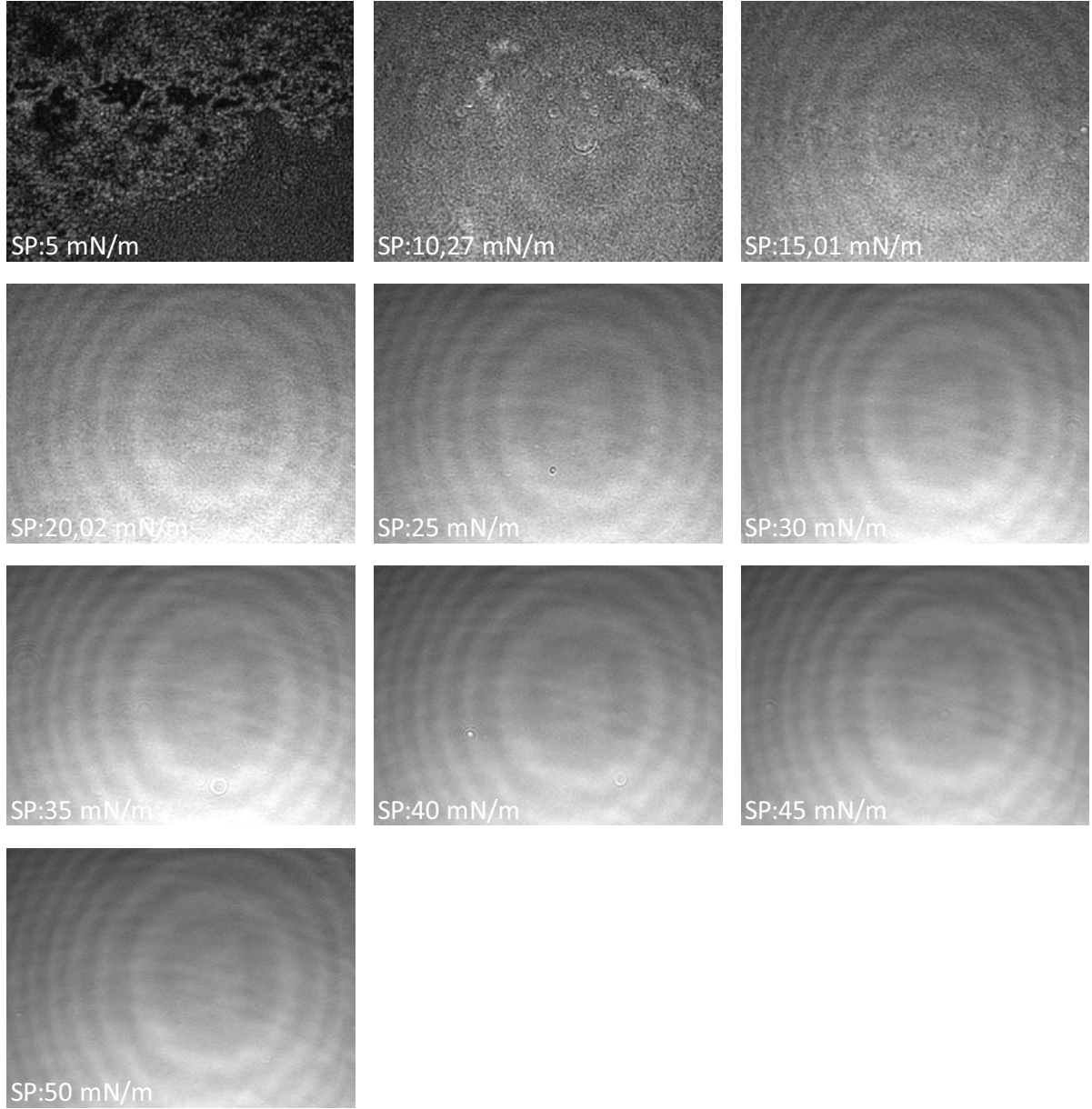


Şekil 107. Saf DSPA'nın Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri

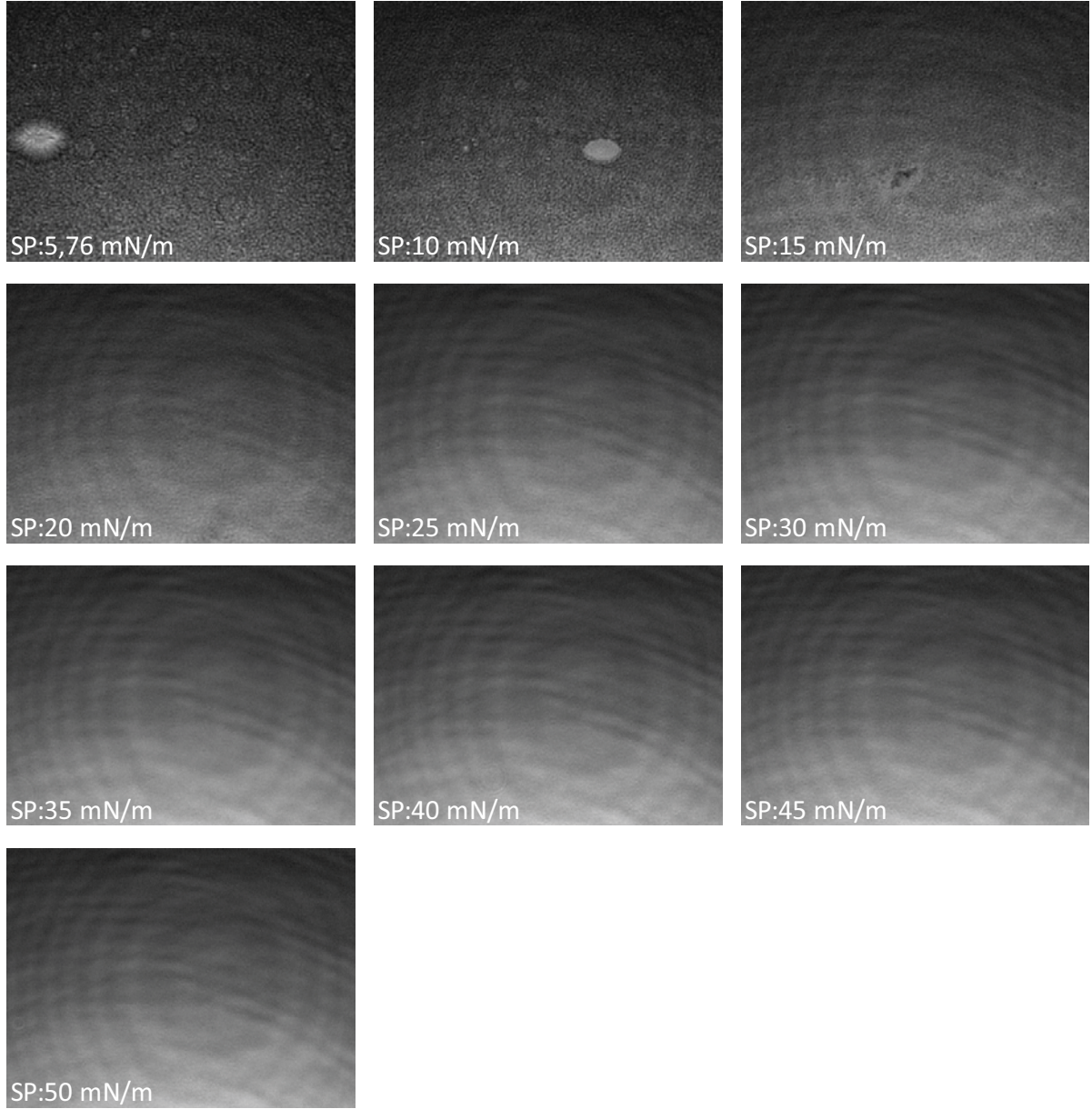


**Şekil 108.** 7:2:1 DSPC:PEG40St:DSPA karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri





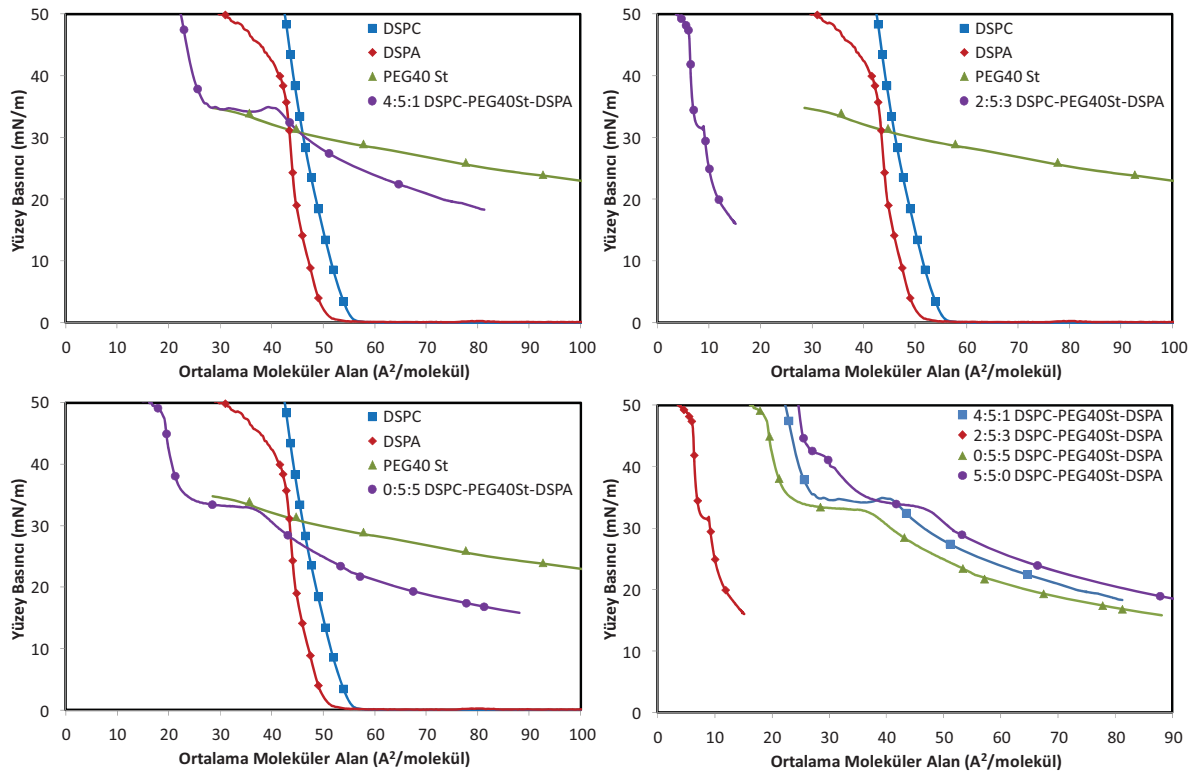
**Şekil 109.** 7:1,5:1,5 DSPC:PEG40St:DSPA karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri



**Şekil 110.** 7:1:2 DSPC:PEG40St:DSPA karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri

Mol oranları 4:5:1, 2:5:3, 0:5:5 olan DSPC:PEG40St:DSPA karışımlarının moleküler alana karşılık yüzey basıncı grafikleri Şekil 111’de verilmiştir. 4:5:1 ve 2:5:3 karışımları karşılaştırıldığında karışımlardaki DSPA miktarının artmasıyla izotermin sola doğru kaydığı fark edilmiştir. DSPA’nın DSPC’ye kıyasla çok küçük baş gruba ve hidrojen bağı yapabilme kapasitesine sahip olması, 2:5:3 karışımının izoterminin çok küçük moleküler alanda yer almasına sebep olmuş olabilir. 0:5:5 mol oranı kullanarak hazırlanan DSPC:PEG40St:DSPA

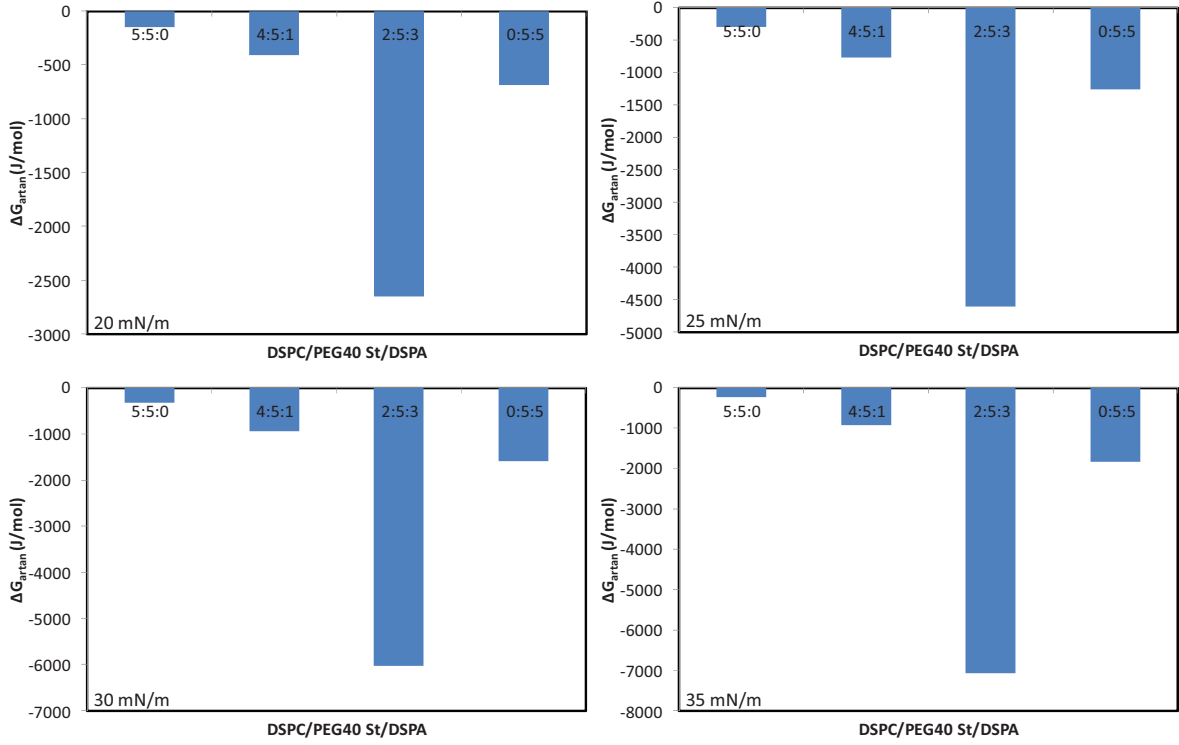
karışımında ise bu trend bozulmuştur. Buradan, negatif yüklü DSPA molekülleri arasındaki itici kuvvetlerin hidrojen bağ oluşumunu olumsuz yönde etkilediği sonucu çıkmaktadır. Diğer yandan, DSPA'nın PEG zinciri ile hidrojen bağ yaparak konformasyon değişimini baskıladığı ve bu yüzden izotermin daha büyük moleküler alanlara kaymış olabileceği de düşünülmektedir. Ayrıca, tüm incelenen diğer karışımlarda olduğu gibi burada da 35 mN/m civarında izotermlerde bir plato bölgesi ortaya çıkmıştır. 2:5:3 karışımında, plato bölgesinin daha kısa olması ve izoterminin diğerlerine kıyasla daha solda yer alması, PEG zincirlerinin konfigürasyon değişimi göstermediği ve yüzeye adsorplanmış olarak kalan PEG40St moleküllerinin bir kısmının yüzeyden sıkıştırma ile ayrılmış olabileceği ihtimalini akıllara getirmektedir. Her ne kadar Şekil 112'den DSPA'nın mol oranının 0.3 olduğu karışımında minimum  $\Delta G_{artan}$  değeri gözlemlense de bunun arayüzdeki moleküler kayıptan kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.



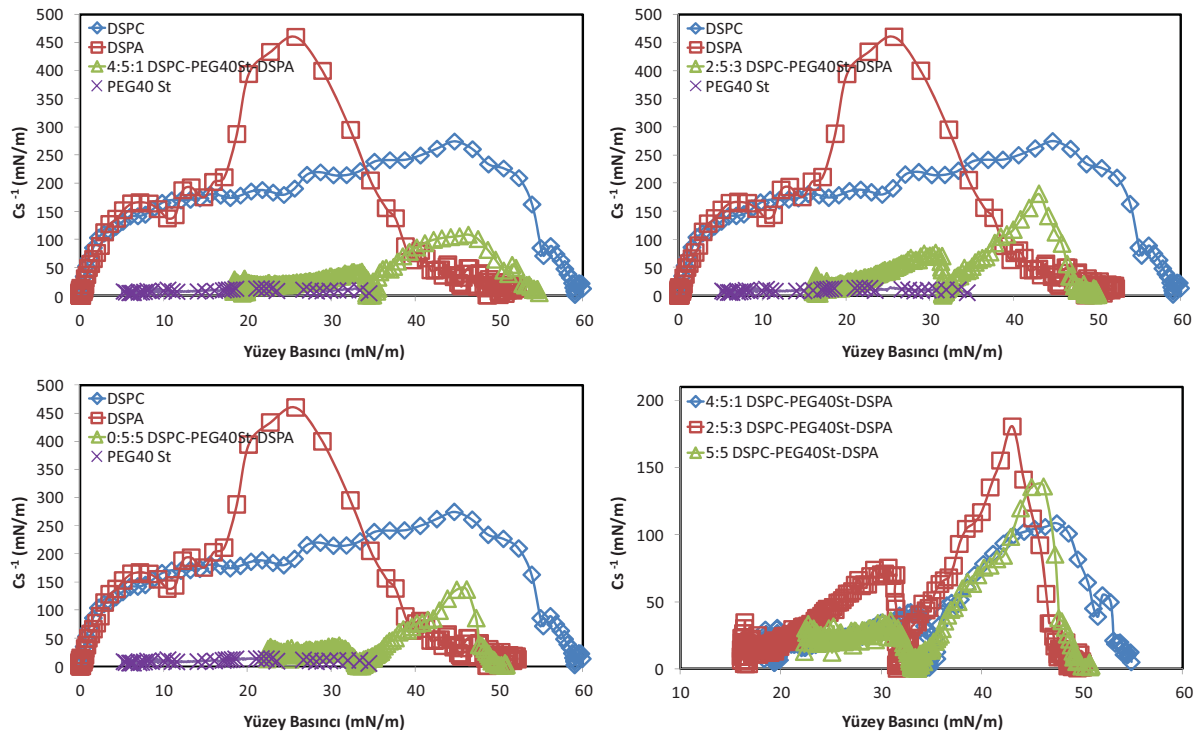
**Şekil 111.** 4:5:1, 2:5:3, 0:5:5 DSPC:PEG40St:DSPA karışımlarının Yüzey Basıncı-Ortalama moleküler alan ( $\pi$ -A) izotermleri

Bu karışımların  $Cs^{-1}$  değerleri Şekil 113'de grafiksel olarak verilmiştir. Yaklaşık 35 mN/m civarı minimum pikler görülmüşken, karışımların  $Cs^{-1}$  değerlerinin saf DSPC ve

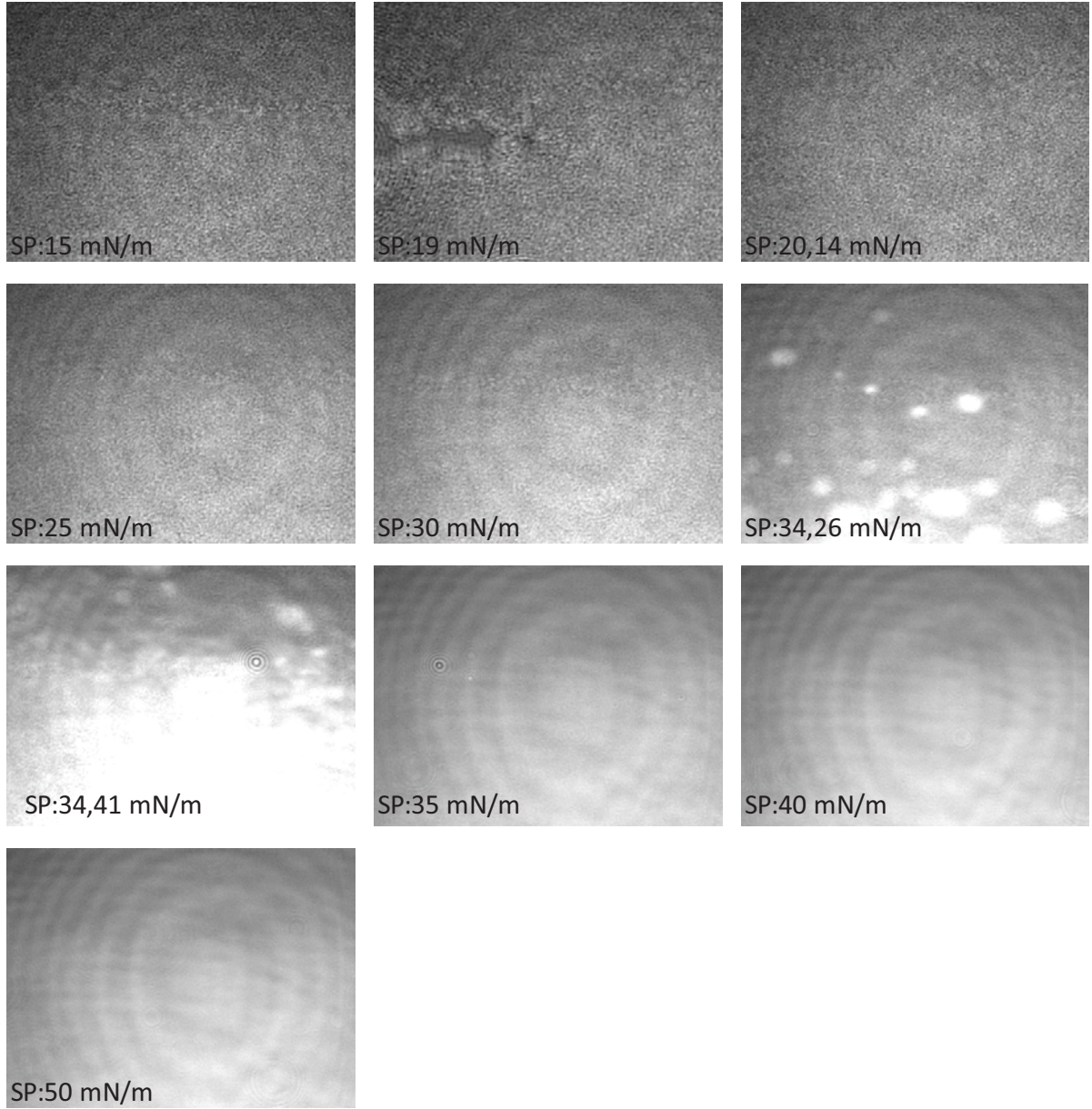
DSPA'dan küçük olduğu dikkat çekmiştir. Aynı sonuçlar DSPC:PEG40St:DSPG ve DSPC:PEG40St:DSPE karışımlarında da izlenmiştir. 2:5:3 karışımında daha yüksek  $Cs^{-1}$  değerlerinin gözlemlenmiş olması monotabakanın elastisitesinin düştüğünü göstermektedir ki, bu da PEG moleküllerinin monotabakadan ayrılmış olabileceğini gösterebilir. Sırasıyla, Şekil 114, Şekil 115 ve Şekil 116'de farklı yüzey basınçlarında, 4:5:1, 2:5:3, 0:5:5 mol oranlarındaki karışımların monotabakalarının morfolojik özellikleri gösterilmektedir. 4:5:1 DSPC:PEG40St:DSPA karışımının BAM görüntülerinde görüldüğü gibi 19 mN/m civarı küçük koyu bir bölge olmasına rağmen yüzey basıncı 34 mN/m'ye ulaşıncaya kadar homojen bir yüzey gözlenmiştir. Yaklaşık 34 mN/m'da ise küçük yuvarlak parlak parçalar oluştuğu ve sıkıştırma ile birlikte bu parçalar bir araya gelerek tekrar homojen bir yüzey görüntüsü verdiği anlaşılmaktadır. Benzer yuvarlak parlak parçalar, 4:5:1 mol oranıyla hazırlanan DSPC:PEG40St:DSPG ve DSPC:PEG40St:DSPE karışımlarında da görülmüştür. Tıpkı daha önce Lee ve ark. tarafından çekilen DPPA/DPPC karışımının BAM görüntülerinde olduğu gibi, 2:5:3 DSPC:PEG40St:DSPA karışımının BAM görüntülerinde koyu bölgeler fark edilmiştir (Lee ve ark., 2006). BAM görüntülerinde, koyu renkli domainler film kalınlığının düşük olduğu ve genişletilmiş bir film yapısının hakim olduğunu gösterir. Her ne kadar 2:5:3 karışımına ait izoterm ve analizlerinden PEG40St moleküllerinin yüzeyden ayrılmış olabileceği ortaya çıksada, BAM görüntülerinin saf DSPA'ninkinden farklı olması, yüzeyde bir kısım PEG40St moleküllerinin kaldığını göstermektedir. Ayrıca, yüzey basıncı 31 mN/m civarlarında iken yüzeyde parlamalar oluşmuştur. Şekil 116'de görülebileceği gibi 0:5:5 karışımının yüzeyinde düşük yüzey basınçlarında sıkışık (kondens) faz ile genişletilmiş faz ayırımı dikkat çekmiş, diğer karışımlarda olduğu gibi 33-34 mN/m civarlarında parlamalar olmuştur. Bu parlamaların oluştuğu yüzey basınçları, karışımların  $\pi$ -A yüzey basınçlarında görülen plato bölgesinin basınçlarına tekabül etmektedir. Bu durum, bu basınçlarda yüzeyde moleküler düzeyde bir düzenlemenin olduğuna işaret etmektedir.



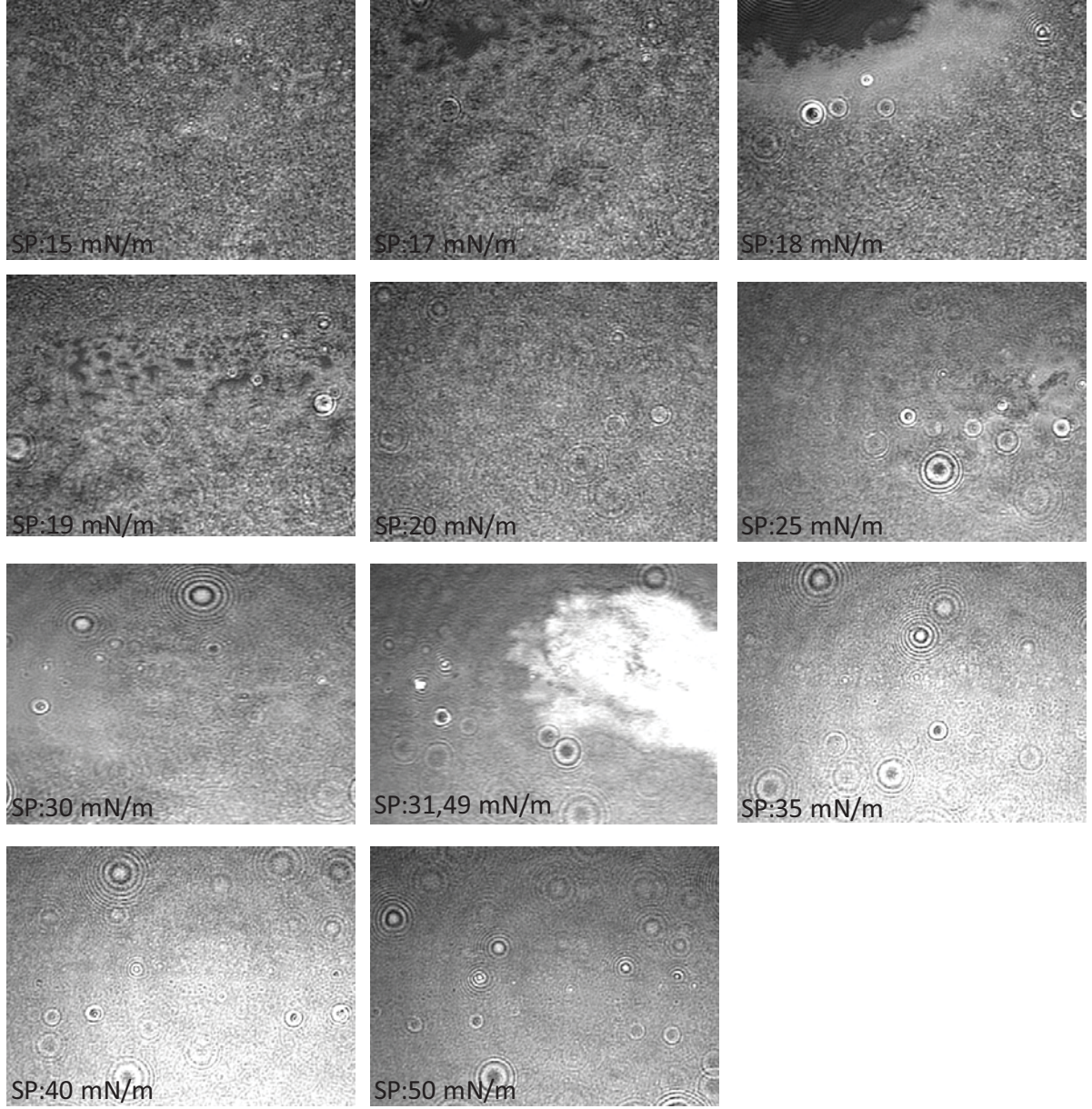
Şekil 112. Farklı basınçlarda 4:5:1, 2:5:3, 0:5:5 DSPC:PEG40St:DSPA karışımların artan Gibbs enerjileri



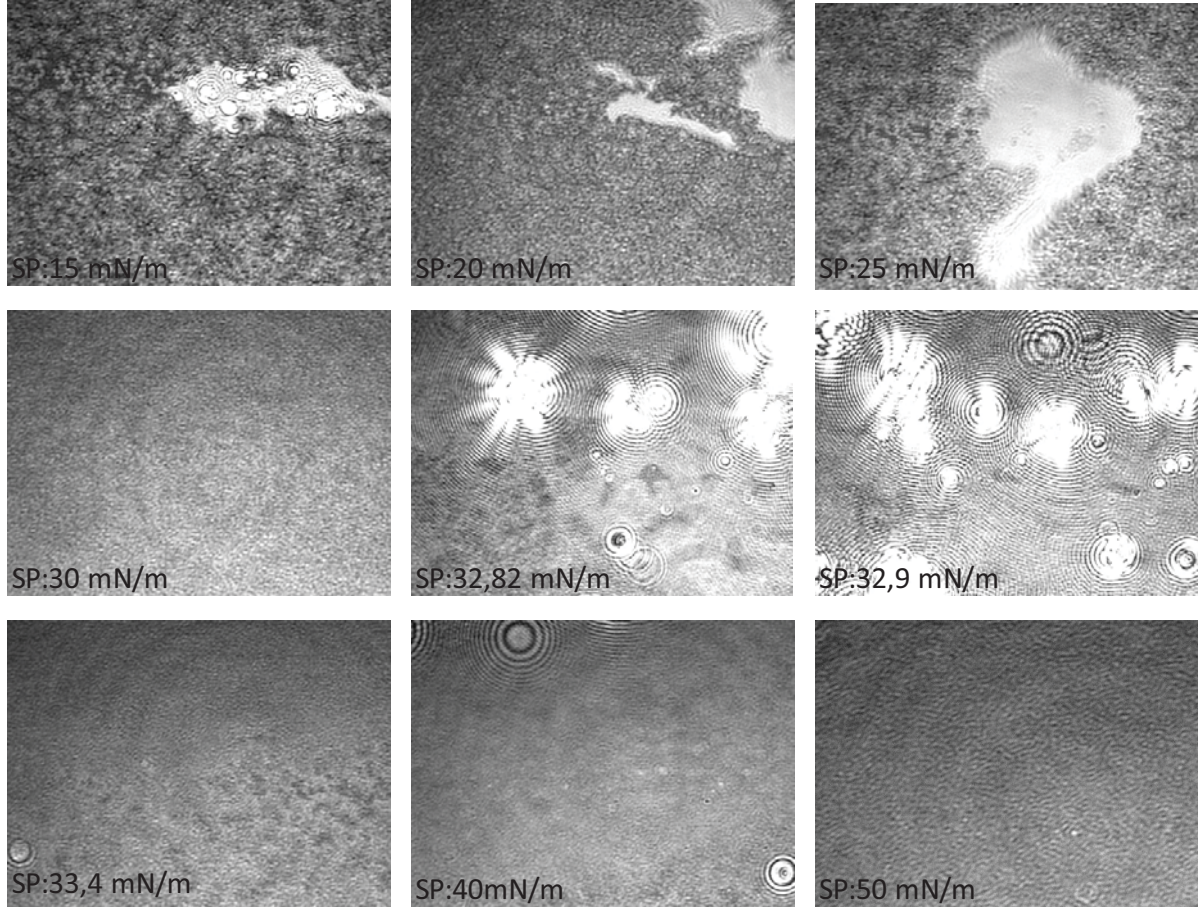
Şekil 113. 4:5:1, 2:5:3, 0:5:5 DSPC:PEG40St:DSPA karışımların yüzey basıncına karşı  $C_s^{-1}$  (mN/m) değerleri



**Şekil 114.4:5:1** DSPC:PEG40St:DSPA karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri



**Şekil 115.** 2:5:3 DSPC:PEG40St:DSPA karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri



**Şekil 116.** 0:5:5 DSPC:PEG40St:DSPA karışımının Brewster Açısı Mikroskop (BAM) Görüntüleri

Hidrojen bağı yapabilen fosfolipitlerle 2D boyutta incelemelerin yapıldığı bu kısımda, aynı alkil zincir uzunluklarında fakat farklı baş grup yapılarına sahip fosfolipitlerle PEG40St bileşenin farklı kompozisyonları incelenmiştir. Bu bileşenler arasındaki moleküllerarası kuvvetlere farklı baş grupların etkisi, moleküller arası etkileşimlerin analizi ve BAM görüntüleriyle değerlendirilmiştir. DSPC/PEG40 monotabakanın hava-su ara yüzeyindeki davranışı DSPG, DSPE ve DSPA fosfolipitlerinden birinin ilave edilmesinden etkilenmiştir. Fosfolipitlerin baş grup bölgelerindeki farklılıklardan dolayı bu moleküllerin monotabaka üzerinde etkileri farklı olmuştur. DSPE molekülleri yüksek hidrojen bağı yapma kapasitesine sahip olduğu için karışım içinde çekici kuvvetlerin etkisini arttırmıştır. Bu sebeple  $x_{\text{DSPC}}=0.7$  mol oranının sabit tutulmasıyla hazırlanan karışımları için DSPC:PEG40St:DSPG ve DSPC:PEG40St:DSPA karışımlarına kıyasla DSPC:PEG40St:DSPE karışımlarının daha negatif  $\Delta G_{\text{artan}}$  değerler gösterdiği bulunmuştur. Bu sonuca göre, DSPE'li bu karışımların kullanılması ile daha stabil bir zar yapısının elde edilebileceği düşünülmektedir. Bilindiği



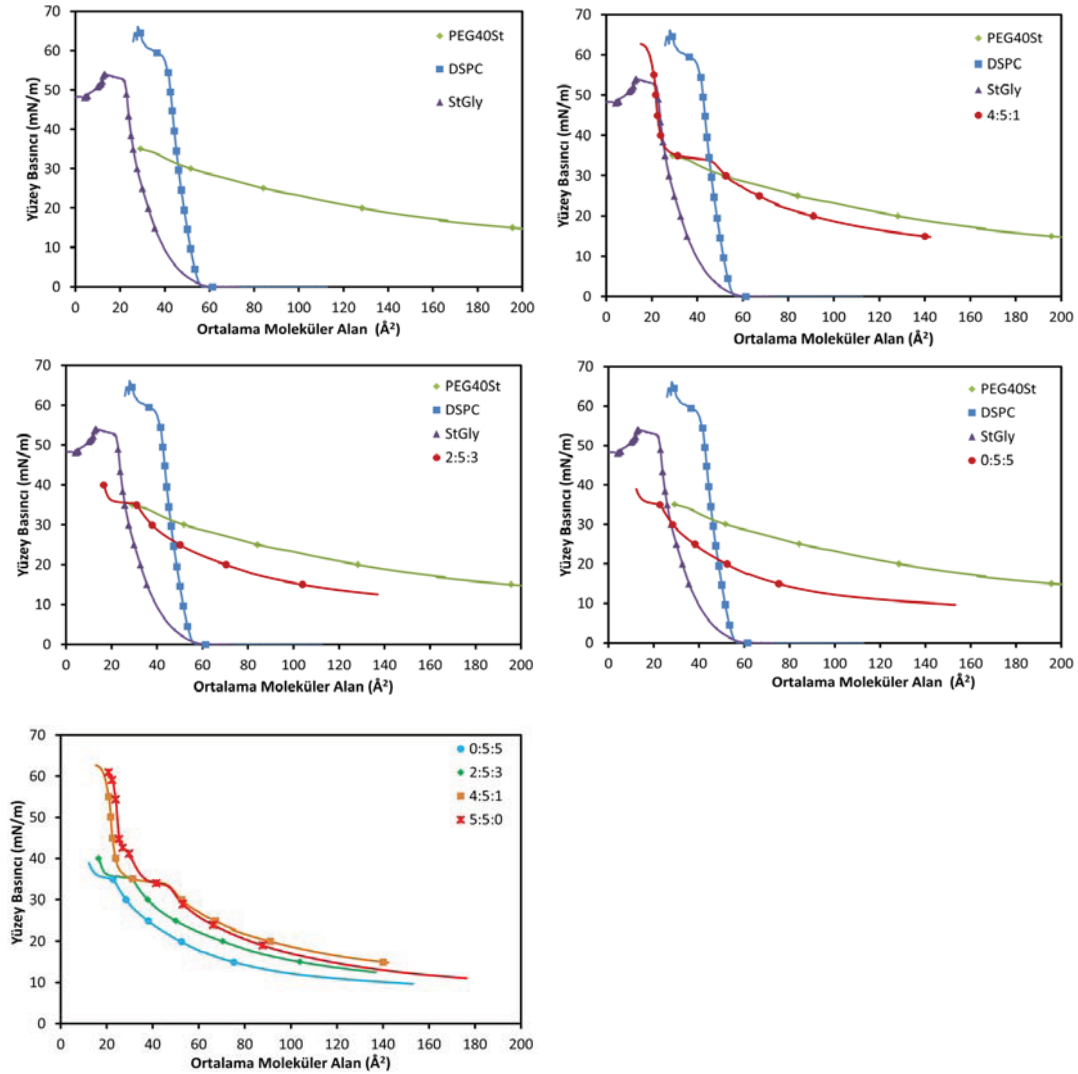
üzere, DSPA ve DSPG molekülleri hem kendi kendilerine hem de komşu moleküllerle kuvvetli hidrojen bağı kurabilirler. Ancak, negatif yüklü baş gruplar arasındaki itici kuvvetler moleküller arasındaki çekici kuvvetlerin zayıflamasına neden olabilmektedir. DSPC'nin mol oranının sabit tutulmasıyla hazırlanan karışımlarda gözlemlenen bu durum,  $x_{\text{PEG40St}}=0.5$  mol oranının sabit tutulduğu karışımlarda bozulmuştur. Bu karışımlarda artan PEG miktarıyla birlikte moleküller arası mesafeler, PEG zincirinin etkisiyle genişlemiş, DSPA-DSPA ve DSPG-DSPG molekülleri arasındaki itici kuvvetlerin etkisi zayıflamıştır. DSPA molekülü oldukça küçük baş gruba sahip olduğu için DSPC:PEG40St:DSPA karışımlarında daha küçük  $\Delta G_{\text{artan}}$  değerleri elde edilmiştir. Karışımların BAM görüntüleri incelendiğinde de bazı bölgelerde faz ayrılıklarının olduğu görülmüştür. Ayrıca  $\pi$ -A izotermelerinde yaklaşık 35 mN/m civarlarında gözlemlenen ya PEG40St molekülünün yüzeyden ayrılışına ya da yapısal değişimi temsil eden plato bölgelerinde yüzey morfolojisinde değişiklikler fark edilmiştir. Genel olarak, hidrojen bağı kurabilen lipidlerin belli oranlarda karışımlarının mikroköpükçük stabilitesini artırma yönünde bir etki gösterebileceği değerlendirilmektedir.

#### *DSPC:PEG40St:StGly Üçlü Karışımlarının Yüzey Basıncı-Moleküler Alan İzotermeleri ve BAM Görüntüleri:*

StGly, DSPG'ye baş grup itibari ile oldukça benzer bir yağ asitidir. DSPG'den farklı olarak hidrofobik kısımda tek bir hidrokarbon zinciri vardır ve baş grupta fosfat grubu içermemektedir. Ama DSPG gibi, iki adet  $\text{OH}$  grubu içermektedir. Dolayısıyla hidrojen bağı yaparak mikroköpükçük stabilitesini artırması ve DSPG'ye kıyasla ucuz olduğu için mikroköpükçük maliyetini düşürmesi beklenmektedir.

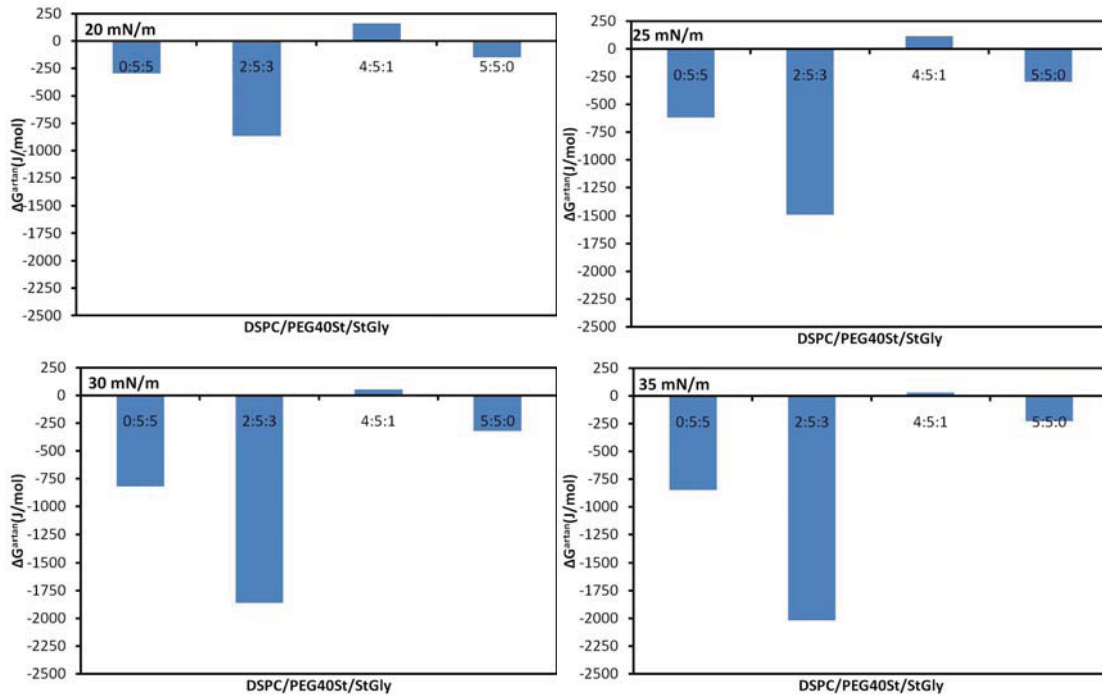
DSPC, PEG40St ve StGly'nin saf hallerinin ve PEG40St'in molar oranının 0.5 olarak sabit tutulduğu karışımların yüzey basıncına karşılık ortalama moleküler alan izotermeleri Şekil 117'de görülmektedir. StGly'nin saf halinin yüzey basıncına karşılık ortalama moleküler alan izotermi DSPC ve PEG40St ile karşılaştırıldığında daha kondens bir yapı gösterdiği görülmektedir. Dolayısıyla moleküller arasında çekme kuvvetinin dominant olması halinde artan StGly molar oranı ile birlikte yüzey basıncına karşılık ortalama moleküler alan izotermiminin de daha kondens bir yapı göstermesi beklenmektedir. Şekil 117'de görüldüğü gibi, artan StGly molar oranı izotermi daha kondens bir yapıya geçmesini sağlamıştır. Şekil

117’de görüldüğü gibi üç karışımında 35 mN/m yüzey basıncında plato bölgesi mevcuttur. Plato bölgelerinin uzunlukları yaklaşık olarak aynıdır. Daha önceki üçlü karışımlarda da olduğu gibi, gözlenen plato bölgesi PEG40St molekülünün bir kısmının monotabaka yapısından ayrılacağına gösterebileceği gibi, bir kısmının sterik moleküler etkileşimden dolayı konformasyon değiştirip daha kondens bir yapıya geçmesinide gösterebilir. 4:5:1 DSPC:PEG40St:StGly karışımının 5:5:0 karışımına kıyasla daha uzun bir plato bölgesi sergilemesi ayrıca dikkat çekicidir. Plato bölgesinin uzaması daha çok PEG’in konformasyon değişimine uğradığı anlamına gelebilir ki, bunun PEG40St moleküllerinin yüzeyden ayrılmasının 4:5:1 karışımında daha az olduğu anlamına geldiği düşünülebilir.



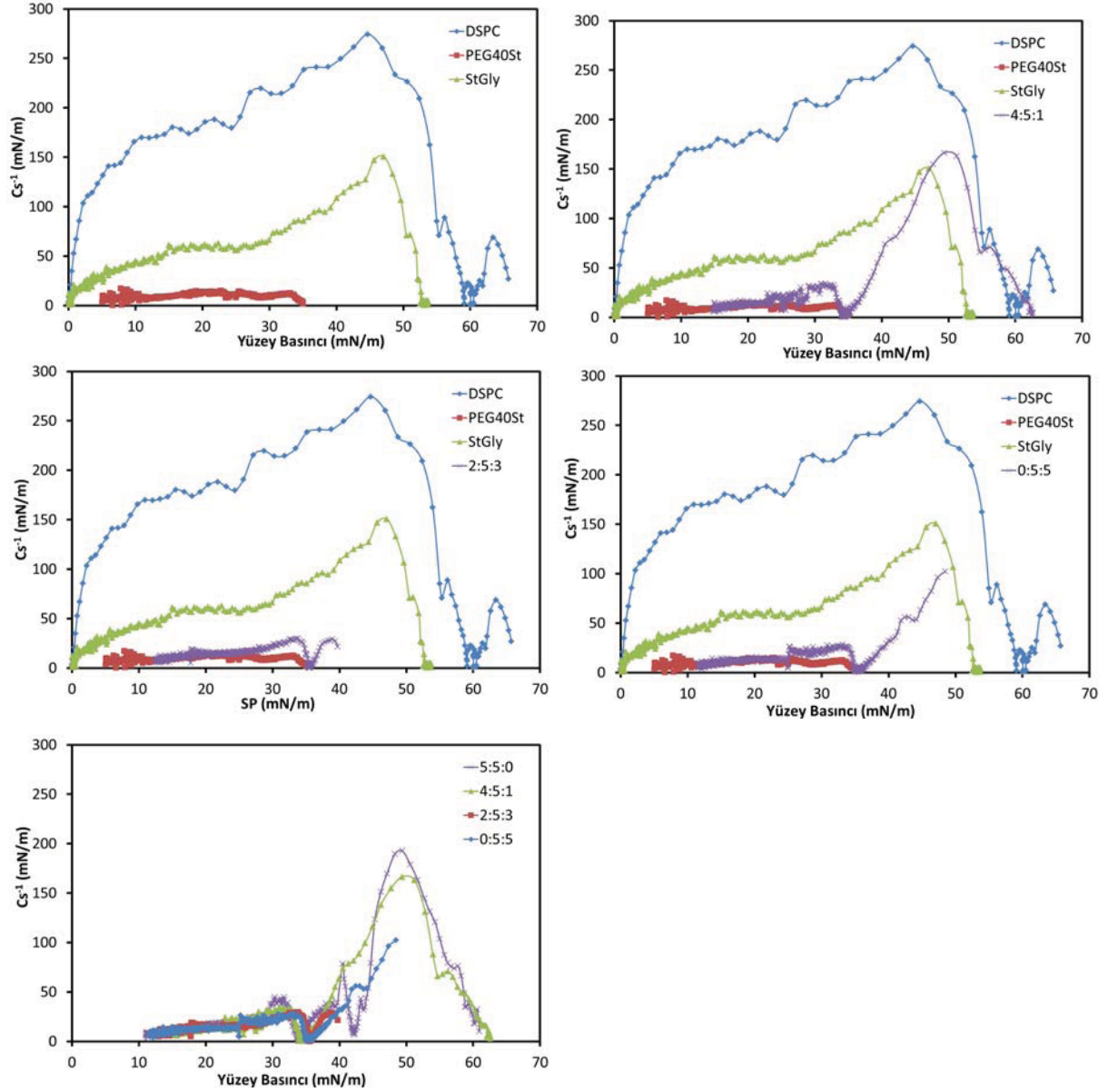
**Şekil 117.** Saf bileşenlerin ve 4:5:1, 2:5:3 ve 0:5:5 molar oranlarında DSPC:PEG40St:StGly karışımlarının yüzey basıncına karşılık ortalama moleküler alan izotermleri

Karışımların artan Gibbs serbest enerjileri aynı yüzey basıncında karşılaştırıldığında da Şekil 117’de görülen 20, 25, 30 ve 35 mN/m yüzey basınçlarının her birinde 0:5:5 ve 2:5:3 karışımları moleküller arası çekme kuvvetlerinin dominant olmasına bağlı olarak negatif artan Gibbs serbest enerji değerleri verirken, 4:5:1 karışımı pozitif artan Gibbs enerji değerleri vermiştir (Şekil 118). DSPC:PEG40St:StGly 0:5:5 ve 2:5:3 karışımları kıyaslandığında 2:5:3 karışımında moleküller arası çekim kuvvetlerinin daha fazla olduğu anlaşılmaktadır. Ancak, 0:5:5 ve 2:5:3 karışımında plato bölgesinin 4:5:1 karışımına kıyasla kısılması (Şekil 117), daha az miktarda PEG40St’nin yüzeyde kalmış olabileceği ihtimalini akıllara getirmektedir. Benzer şekilde, 4:5:1 plato bölgesinin 5:5:0 karışımına kıyasla daha uzun olması, StGly’nin daha çok miktarda PEG40St’in yüzeyde kalmasında pozitif rol oynadığını ortaya koyarak bu ihtimali desteklemektedir. Buradan neden daha fazla StGly ilave edildiğinde etkinin azaldığı sorusu akla gelebilir. StGly’de PEG40St gibi tek bir hidrokarbon zincirine sahiptir. Dolayısıyla artan StGly ile monotabakada hidrofobik etkileşimlerin derecesi azalmaktadır. Dolayısıyla, hidrofilik etkileşimler öne çıkarak, ara yüzeyde daha az stabil bir filmin oluşmasına ve moleküller arası kohezif etkinin azalmasına sebebiyet verebilir. Azalan hidrofobik etkileşimler sonucu mikroköpükçük stabilitesinin düşebileceği de göz ardı edilmemesi gereken bir nokta olmaktadır.



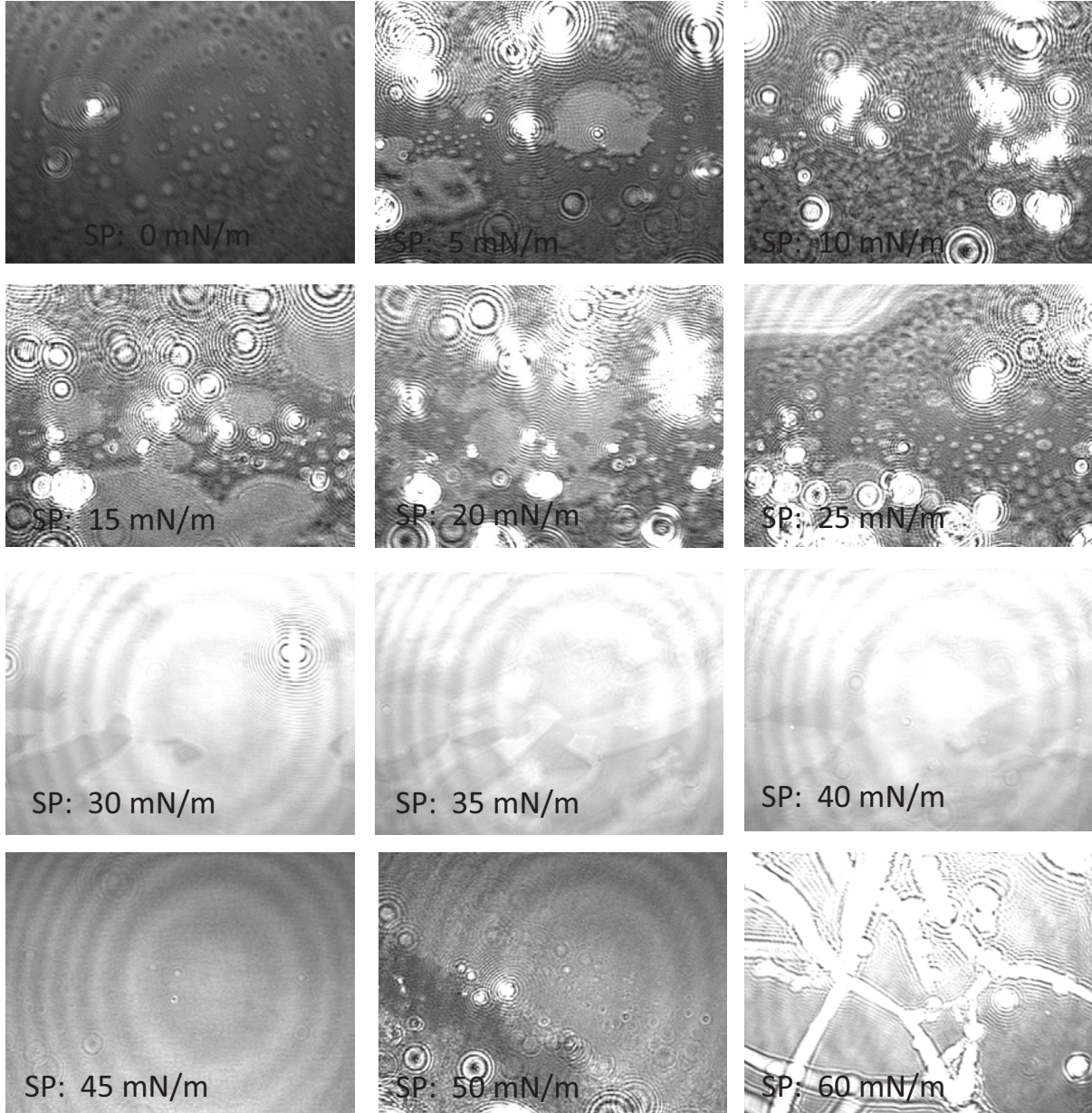
**Şekil 118.** Farklı yüzey basınçlarında DSPC:PEG40St:StGly karışımlarının artan Gibbs serbest enerjilerinin karşılaştırılması

DSPC:PEG40St:StGly karışımlarından oluşan monotabakaların akışkanlık davranışlarının yüzey basıncıyla değişimi Şekil 119'da görülmektedir. Tüm karışımlara ait  $Cs^{-1}$  değerleri, saf haldeki DSPC ve StGly'e göre daha düşük değerlerde yer almaktadır. Bu, monotabakaya ilave edilen PEG40St molekülünden kaynaklanmaktadır. 35 mN/m yüzey basıncına kadar karışımların monotabakaları benzer sıkıştırılabilirlik değerleri göstermektedir. PEG zincirleri arasındaki konfigürasyon değişimine veya PEG40St'nin arayüzeyden ayrılmasına karşılık gelen plato bölgesinde (35 mN/m yüzey basıncında) tüm karışımlarda olduğu gibi bir minimum gözlemlenmiştir. Daha sonra monotabakaların davranışları farklılık göstermeye başlamıştır. 0:5:5 ve 2:5:3 monotabakaları 4:5:1 monotabakasına kıyasla daha elastik bir özellik gösterse de, daha öncede bahsedildiği gibi LB izotermelerinde plato bölgesinin uzunluklarının kısalması (Şekil 117) yüzeyden molekül kaybının olduğuna işaret etmektedir. Bu azalmalar, monotabakanın sanki daha elastik bir film yapısında olduğu izlenimini vermektedir. Benzer şekilde, 4:5:1 karışımından daha az moleküler kayıp olduğu için daha az elastikmiş gibi davranış sergilemektedir.



**Şekil 119.** DSPC:PEG40St:StGly karışımlarının sıkıştırılabilirlik değerlerinin yüzey basıncıyla değişimi

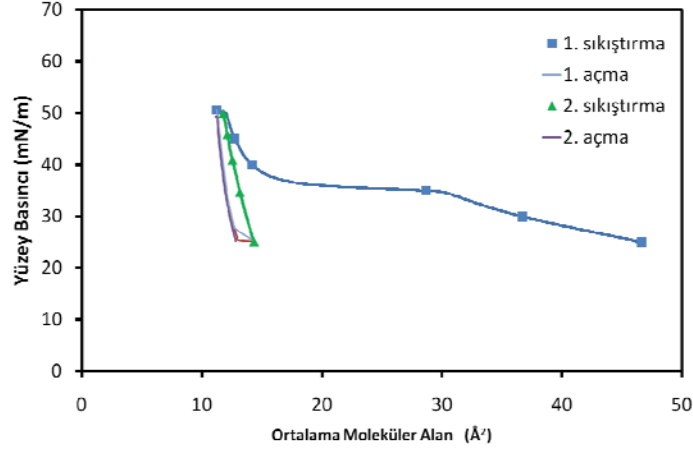
StGly molekülünün hava-su ara yüzeydeki faz davranışını gösteren BAM görüntüleri Şekil 120’ de verilmektedir. Şekilden görüldüğü gibi, StGly molekülü hava – su arayüzeyinde kardioit ve halka şeklinde domainler halinde görünmektedir. 30 mN/m yüzey basıncına kadar yüzeyde faz ayrımları görülmektedir. Yaklaşık 48 mN/m yüzey basıncına kadar homojen görüntüler elde edilmiş, ancak, sonrasında tekrar faz ayrımları görülmüştür. StGly molekülün kollaps olmaya başladığı yaklaşık 55 mN/m yüzey basıncından itibaren yüzeyde parlak ve ince çubuklar halinde görüntüler gözlemlenmiştir.



**Şekil 120.** Stearil-gliserol molekülünün hava – su ara yüzeyindeki BAM görüntüleri

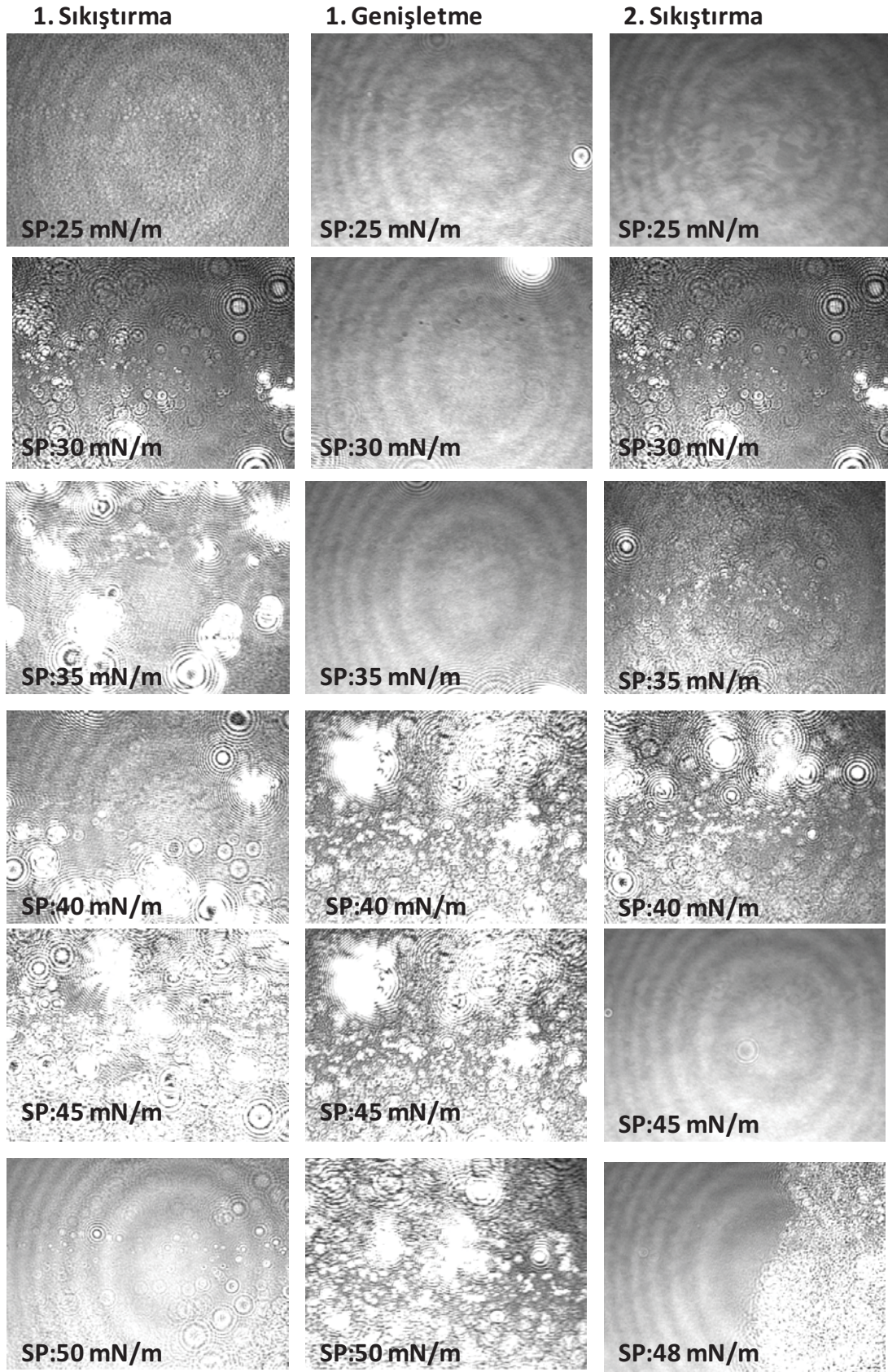
Şekil 120’da görüldüğü gibi StGly molekülü spesifik görüntüler vermektedir. 35 mN/m yüzey basıncından sonra PEG40St molekülünün monotabaka yapısından ayrılıp ayrılmadığını gözlemleyebilmek için 0:5:5 DSPC:PEG40St:StGly karışımının çevrim deneyi yapıldı ve BAM ile görüntüldü. Şekil 121’de görüldüğü gibi, birinci sıkıştırma 35mN/m yüzey basıncında görülen plato bölgesi, ikinci sıkıştırma kaybolmuştur ve izoterm sola kaymıştır. PEG40St’in kollaps basıncında gözlemlenen platonun tekrar görülmemesi bir kısım PEG40St’in tersinmez olarak monotabakadan ayrılması anlamına gelebileceği gibi, yine tersinmez bir konformasyon değişimi olduğu anlamına da gelebilir. 4:5:1 karışımına ait

plato bölgesinin daha uzun olması, 0:5:5 karışımında zaten daha çok moleküler ayrılmaların olduğunu göstermektedir.



Şekil 121. 0:5:5 DSPC:PEG40St:StGly karışımının çevrim deneyi

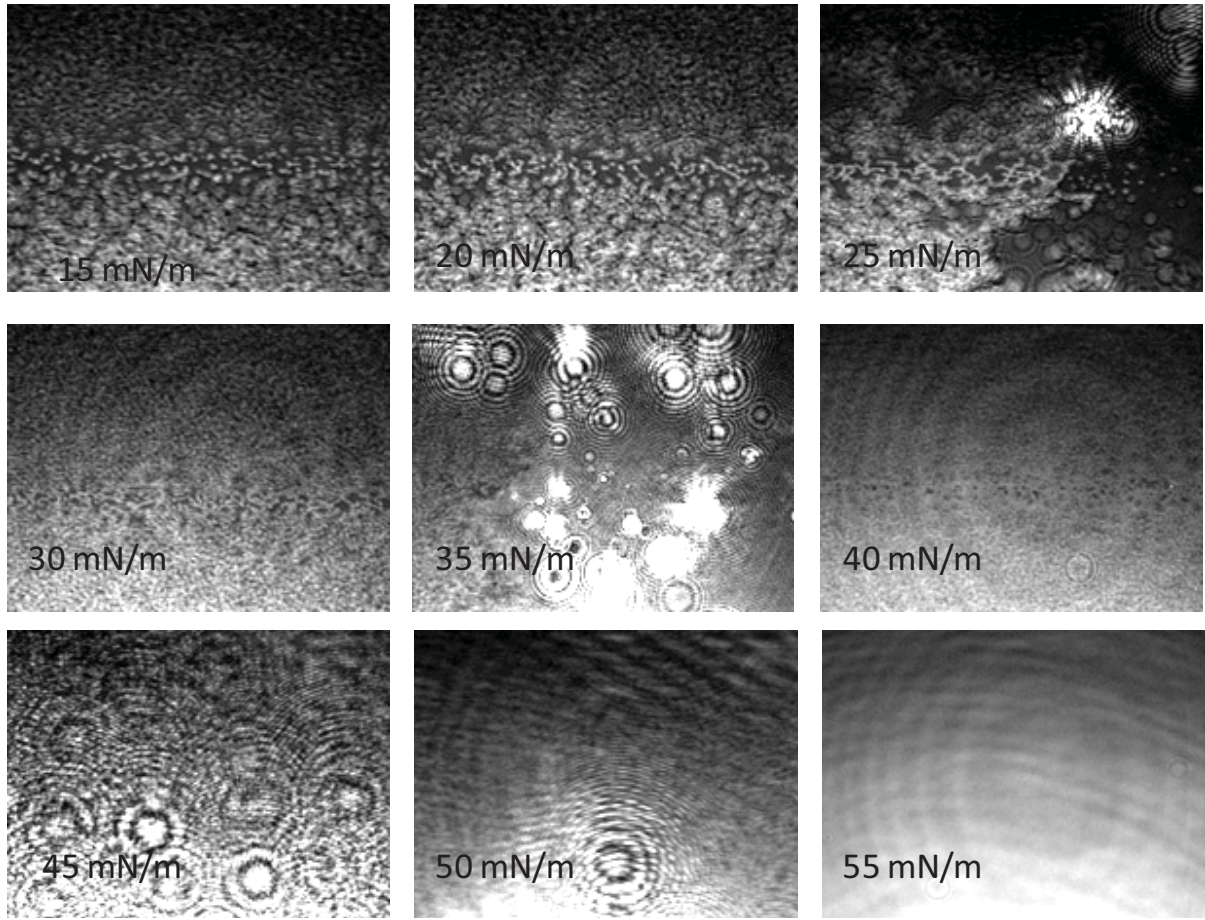
Şekil 122'de görüldüğü gibi 25 mN/m yüze basıncında küçük adacıklar halinde parlak domainlere rastlanmaktadır. Sıkışık faz genişletilmiş faz içinde homojen bir şekilde dağılmıştır. Fakat daha ileri sıkıştırmalarda parlak adacıkların büyüklükleri artmaktadır. Özellikle, plato bölgesine tekabül eden 35 mN/m yüze basıncından bu parlamalar artmaktadır. 45 mN/m yüze basıncına kadar parlamalar artmaktadır. BAM görüntüsünde görülen parlamalar PEG zincirleri arasındaki konformasyon değişimi sonucu daha sıkışık bir filmin oluştuğu anlamına gelebileceği gibi PEG40St'in yüze yden ayrılması sonucu film kalınlığının artması anlamına da gelebilir. StGly, -OH grubuna sahip olması nedeniyle PEG zincirleri ile de hidrojen bağı yapabilir ve hava-su arayüzeyine adsorbe olmuş PEG'in konformasyon değişimine uğrayarak altfaza doğru uzamasını inhibe edebilir. Bu yüzden, film kalınlığında bir artmanın olduğu düşünölmektedir. Oluşan bu yoğun film tabakası genişletme sırasında altfaza geçebilir. Sıkıştırılan film tekrar genişletilirken 35 mN/m'de kısmen daha karanlık bir filmin gözlenmesi ve tekrar sıkıştırılırken daha az parlak domainlerin gözlenmesi hipotezimizi destekler niteliktedir. Hatta, tek hidrokarbon zincirine sahip olması nedeniyle, hidrofobik-hidrofobik etkileşimlerin zayıflamasının sonucu olarak, StGly'nin de yüze yden ayrılmasının söz konusu olduğu da düşünölmektedir.



Şekil 122. 0:5:5 DSPC:PEG40St:StGly Karışımının çevrim deneyinin BAM görüntüleri

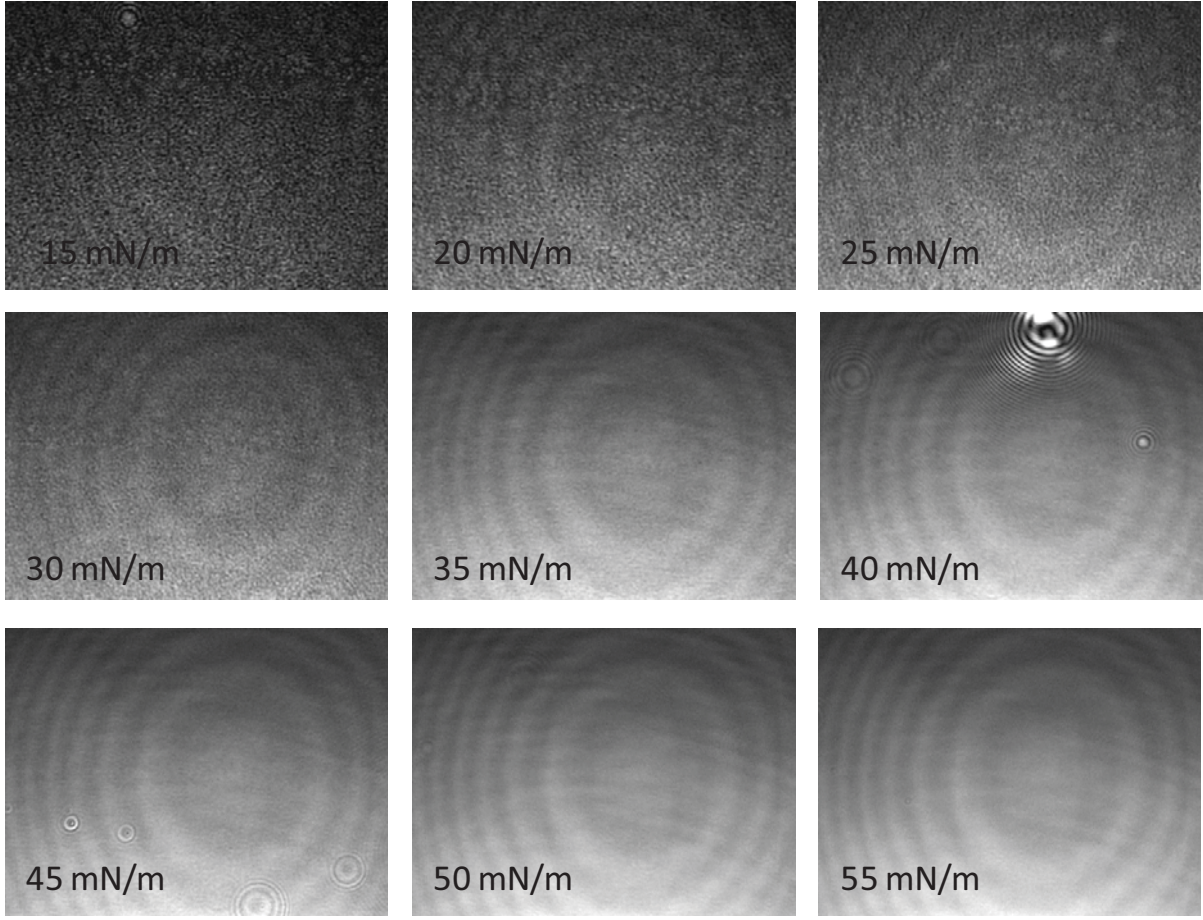


2:5:3 molar oranında DSPC:PEG40St:StGly karışımının BAM görüntüleri Şekil 123'te görülmektedir. Başlangıçta sıkışık fazın genişletilmiş faz içinde homojen bir şekilde dağıldığı BAM görüntülerinden sonra yine plato bölgesinde büyük parlak domain oluşumları gözlemlenmiştir. Bunun, yukarda da bahsedildiği gibi, PEG40St'ın yüzeyden ayrılışının bir sonucu olduğu düşünülmektedir. 2:5:3 karışımında faz ayrımları 0:5:5 karışımına kıyasla daha bariz görülmektedir. 35 mN/m yüzey basıncında yüzeyde parlamalar gözlemlenmektedir.



**Şekil 123.** 2:5:3 DSPC:PEG40St:StGly karışımının hava- su ara yüzeyindeki BAM görüntüleri

Yüzey basıncına karşılık ortalama moleküler alan izotermelerinde en uzun plato bölgesine sahip 4:5:1 DSPC:PEG40St:StGly karışımının BAM görüntüleri Şekil 124'te görüldüğü gibi genellikle homojen görümlü karanlık görüntüler vermiştir. 0:5:5 ve 2:5:3 karışımlarında rastlanan parlak domainlere 4:5:1 karışımında rastlanmamıştır. Özellikle 35 mN/m yüzey basıncı civarı parlak domainlere rastlanılmaması dikkat çekicidir.

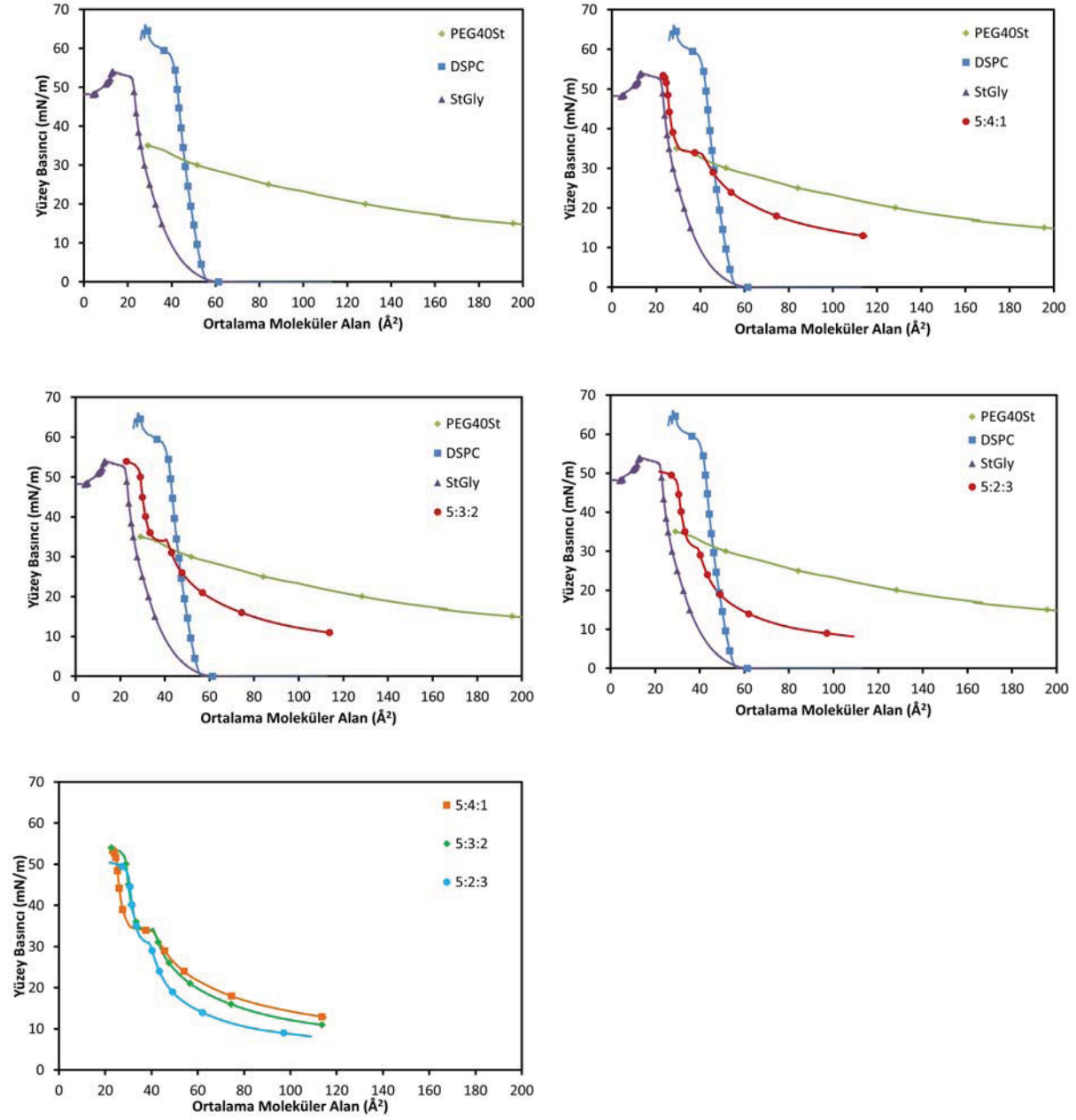


**Şekil 124.** 4:5:1 DSPC:PEG40St:StGly karışımının hava – su ara yüzeyindeki BAM görüntüleri

StGly'nin PEG40St gibi tek hidrokarbon zincirine sahip olması, dolayısıyla hidrofobik-hidrofobik etkileşimlerin zayıflayabileceği ve stabiliteyi olumsuz yönde etkilemesi söz konusu olabilir. Ayrıca, silindirik yapısının mikroköpüklerdeki kavis yapısını destekler nitelikte olmaması dolayısıyla, DSPC:PEG40St:StGly karışımları ile mikroköpük elde edilememesi veya edilse bile daha büyük boyutlarda olması beklenmektedir. Hatta diğer karışımlarda daha fazla PEG40St molekül kaybı olduğu için yalnızca 4:5:1 karışımının potansiyel karışım olabileceği de düşünülmektedir.

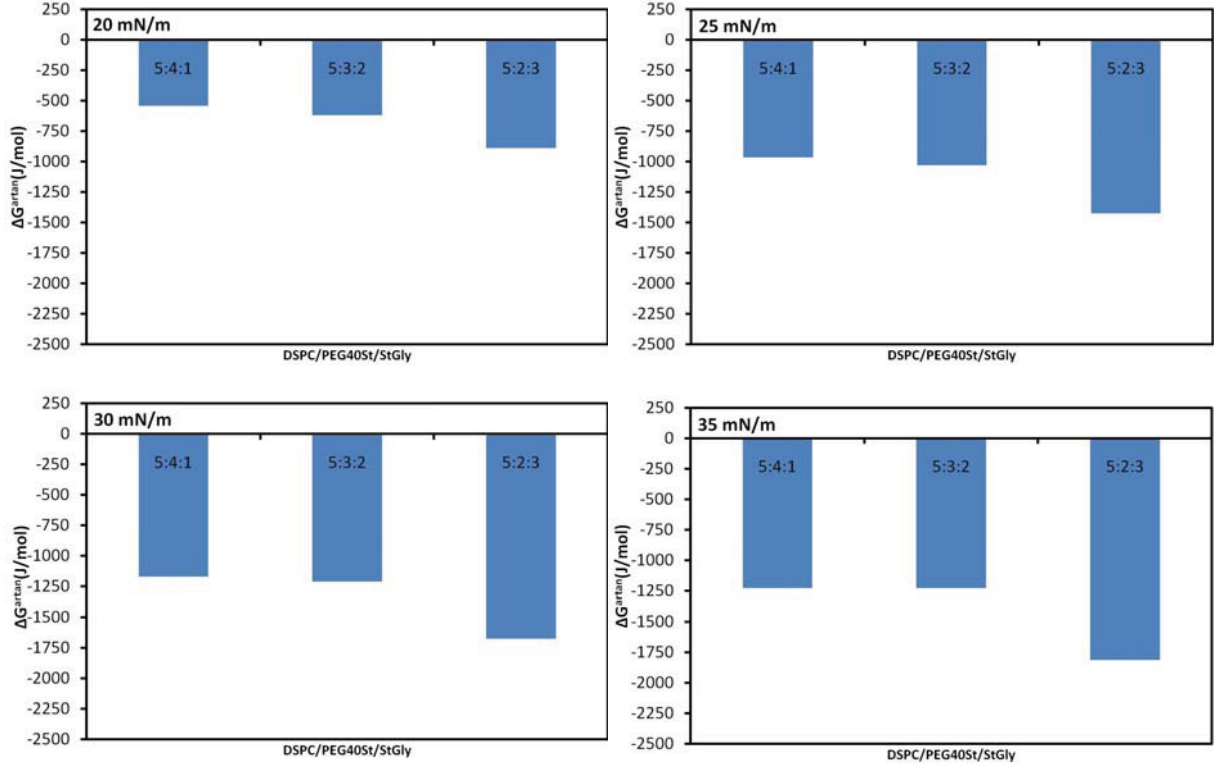
DSPC:PEG40St:StGly'nin PEG40St'nin molar oranının 0.5 olarak sabit tutulduğu 0:5:5, 2:5:3 ve 4:5:1 karışımlarının incelenmesinin yanısıra DSPC mol oranı 0.,5 olarak sabit tutulduğu 5:4:1, 5:3:2 ve 5:2:3 karışımlarının yüzey başına karşılık ortalama moleküler alan izotermi ve BAM görüntüleri aynı koşullarda incelendi. Şekil 125'da görüldüğü gibi artan

StGly molar oranı izotermelerin sola kaymasına neden olmuştur. Ancak, PEG40St oranının değişmesine bağlı olarak plato bölgesinde önemli bir farklılık gözlemlenmemiştir.



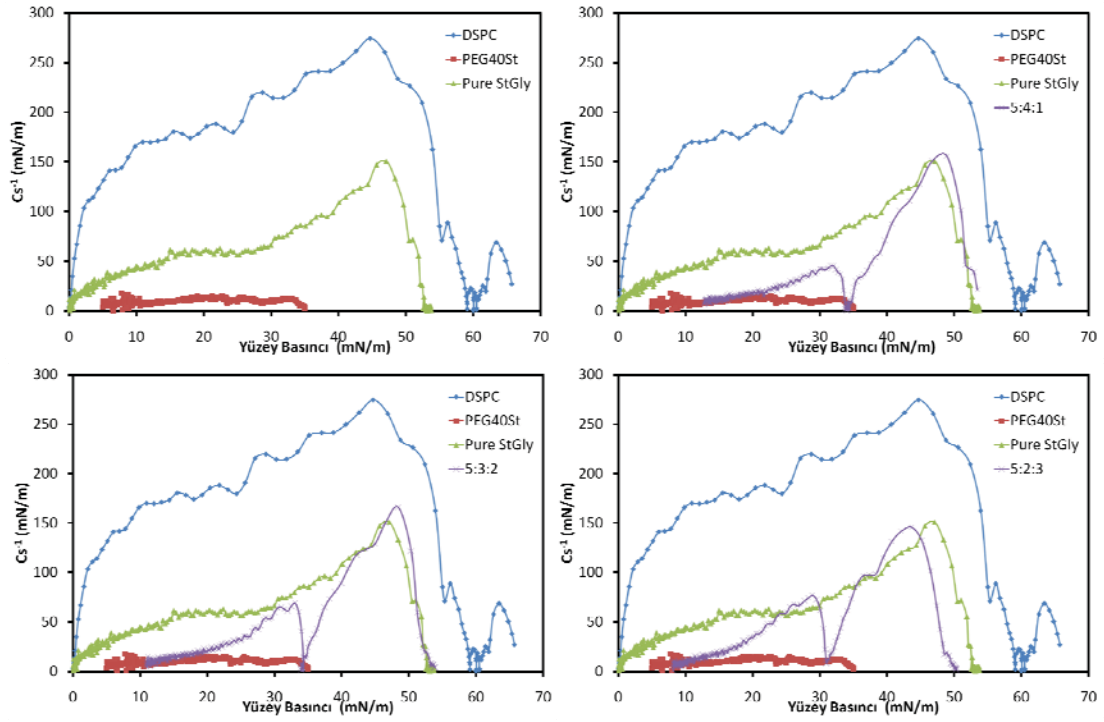
**Şekil 125.** Saf bileşenlerin ve 5:4:1, 5:3:2 ve 5:2:3 molar oranlarında DSPC:PEG40St:StGly karışımlarının yüzey basıncına karşılık ortalama moleküler alan izotermeleri

Şekil 126’de görüldüğü gibi 5:4:1 ve 5:3:2 karışımlarının Gibbs serbest enerji değerleri birbirlerine yakındır. 5:2:3 karışımında ise Gibbs serbest enerji değerleri daha negatiftir ve bu farklılık 25, 30 ve 35 mN/m yüzey basınçlarında daha belirgin olarak görülmektedir.



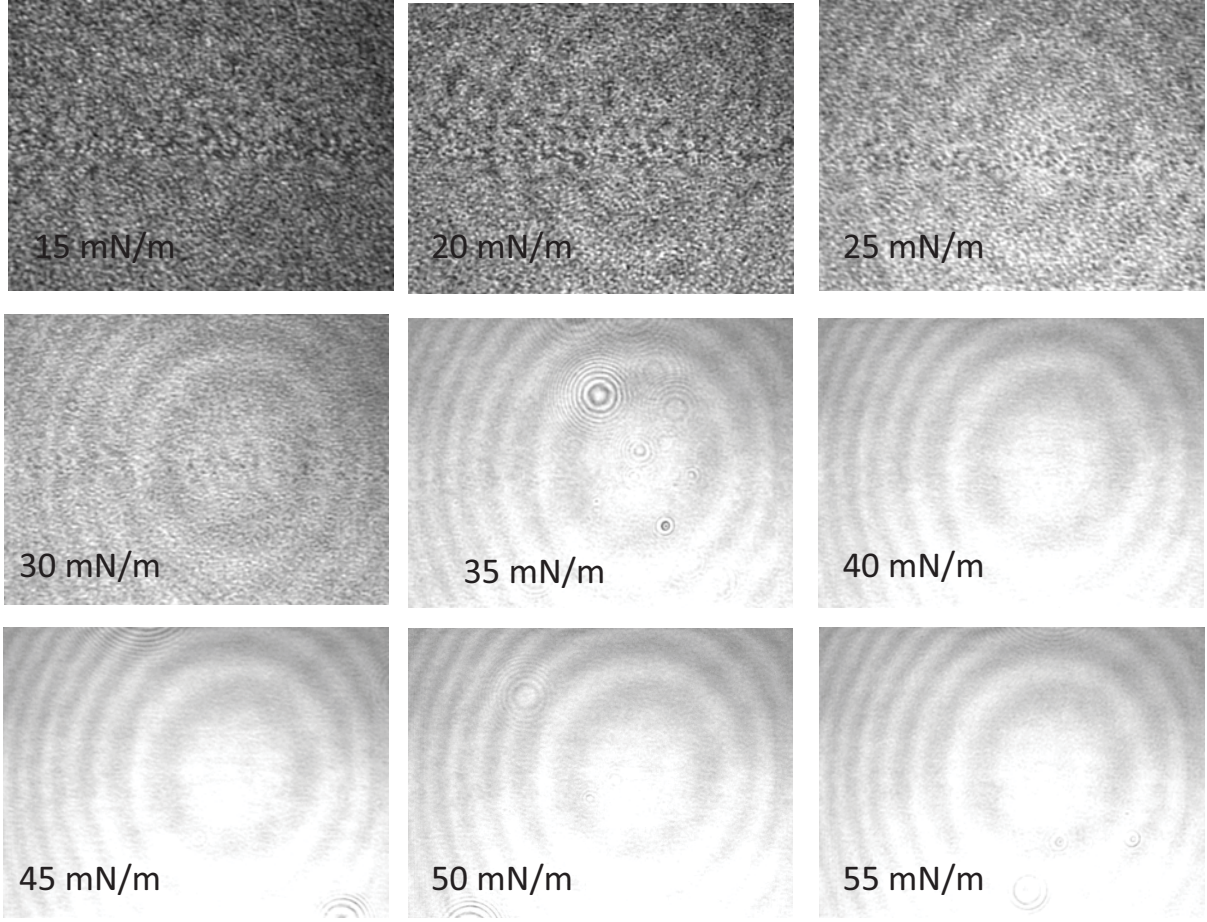
**Şekil 126.** Farklı yüzey basınçlarında DSPC:PEG40St:StGly karışımlarının artan Gibbs serbest enerjilerinin karşılaştırılması

DSPC:PEG40St:StGly’nin 5:4:1, 5:3:2 ve 5:2:3 molar oranlarındaki karışımlarının sıkıştırılabilirlik davranışı Şekil 127’de görülmektedir. Üç karışımında da plato gözlenen yüzey basınçlarında sıkıştırılabilirlik modül değerinin sıfıra indiği görülmektedir. 5:2:3 karışımında plato bölgesi 35mN/m yüzey basıncından önce görüldüğü için minimum değer yaklaşık olarak 32mN/m yüzey basıncında görülmüştür. Plato bölgelerinin öncesinde sıkıştırılabilirlik değerleri kıyaslandığında en elastik davranışı en yüksek PEG40St molar oranını içeren 5:4:1 karışımının gösterdiği görülmektedir. 35mN/m yüzey basıncından sonra ise karışımların elastiklik sıralaması değişmiştir. 5:4:1 ve 5:3:2 karışımlarının sıkıştırılabilirlik değerleri minimum noktalarından sonra birbirlerine çok yaklaşmıştır ve 5:2:3 karışımına göre kısmen daha az elastik bir karakter sergilemektedirler.



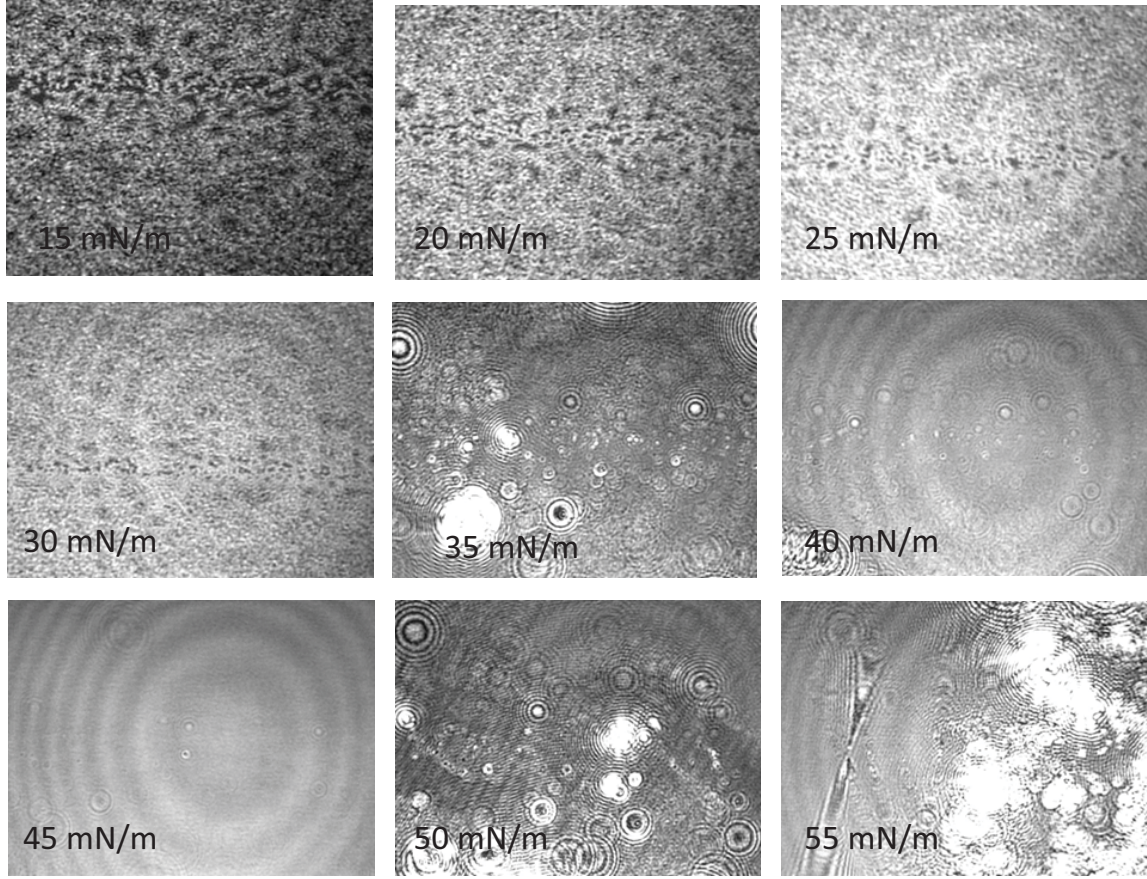
**Şekil 127.** DSPC:PEG40St:StGly karışımlarının sıkıştırılabilirlik değerlerinin yüzey basıncıyla değişimi

Şekil 128’ de görüldüğü gibi 5:4:1 karışımında 30 mN/m yüzey basıncına ulaşıncaya kadar kondens ve daha az kondens olan fazlar bir arada bulunmaktadır. Yüzey basıncının artışına paralel olarak kondens fazların arttığı görülmektedir. 35 mN/m yüzey basıncında yüzeyde halkalar halinde parlamalar gözlemlenmiştir. Daha sonra elde edilen görüntüler kondens yapıya geçiş nedeniyle parlak ve homojendir.



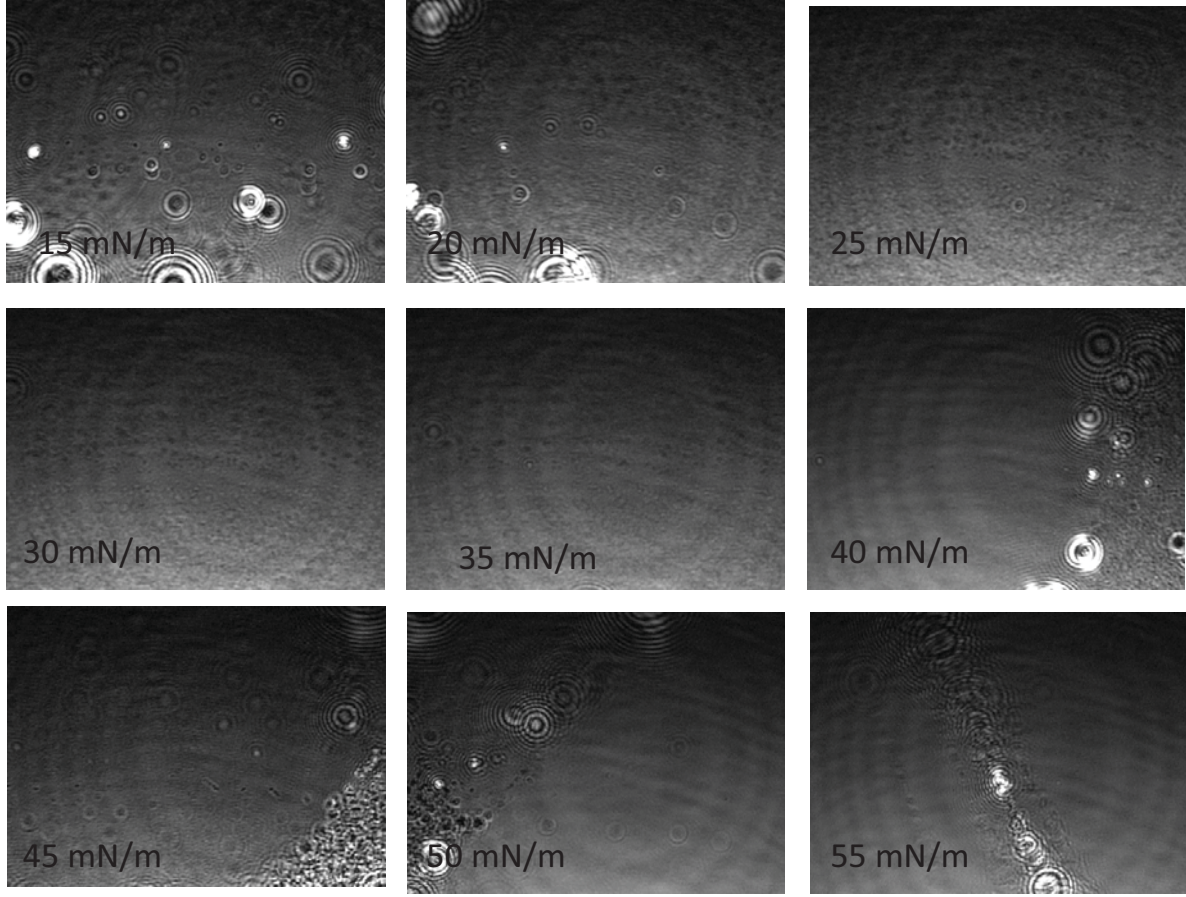
**Şekil 128.** 5:4:1 DSPC:PEG40St:StGly karışımının hava – su ara yüzeyindeki BAM görüntüleri

5:3:2 karışımının BAM görüntüleri 30 mN/m yüzey basıncına kadar Şekil 129’de görüldüğü gibi 5:4:1 karışımının görüntülerine benzerdir. 35mN/m yüzey basıncındaki görüntüde StGly’nin saf halinde alınan görüntülere benzeyen halka şeklinde domainler görülmektedir. Daha sonra monotabaka homojenleşmeye gitmiştir. 50 mN/m yüzey basıncından itibaren faz ayrımları tekrar belirgin halde görülmeye başlanmıştır. Daha sonra homojen bir görüntü alınamamıştır. 55mN/m yüzey basıncında ise monotabakanın kollaps olduğu görülmektedir.



**Şekil 129.** 5:3:2 DSPC:PEG40St:StGly karışımının hava – su ara yüzeyindeki BAM görüntüleri

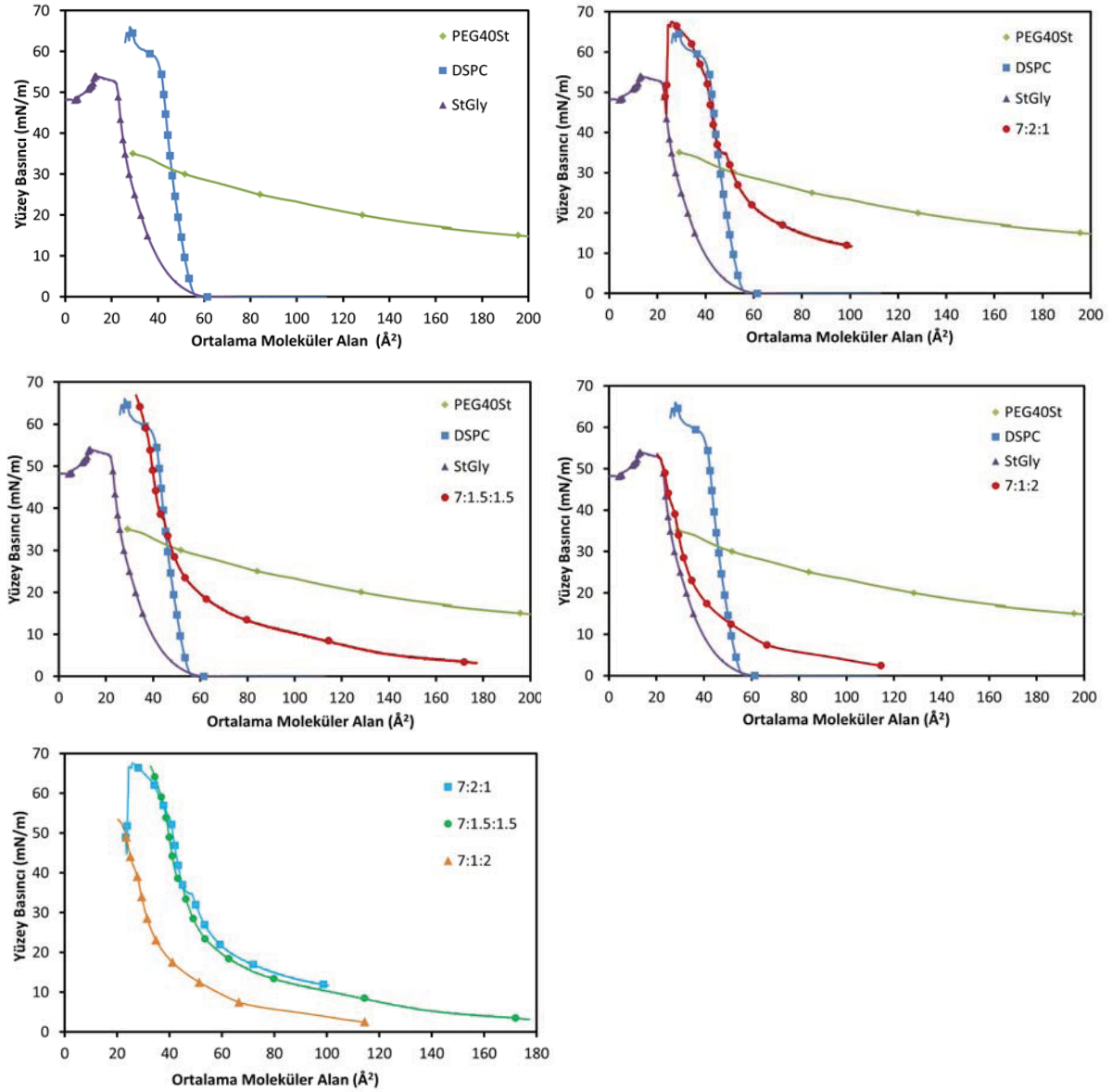
5:2:3 DSPC:PEG40St:StGly karışımının izotermi 5:4:1 ve 5:2:3 karışımlarına kıyasla daha küçük ortalama moleküler alanlarda yer almasına rağmen (Şekil 125), BAM görüntülerinin daha az kondens bir film yapısı gösterdiği görülmektedir (Şekil 130). Dolayısıyla aynı koşullarda alınan Şekil 130'deki görüntüler 5:4:1 ve 5:2:3 karışımlarına oranla daha koyu renklidir. 30 mN/m yüzey basıncından sonra alınan görüntüler 40 mN/m yüzey basıncına kadar homojendir. Daha sonra yüzeyde parlak renkli kondens domainler gözlemlenmiştir. Yaklaşık 55 mN/m yüzey basıncında monotabaka yapısı bozulmuştur.



**Şekil 130.** DSPC:PEG40St:StGly 5:2:3 karışımının hava – su ara yüzeyindeki BAM görüntüleri

DSPC:PEG40St:StGly ile yapılan bir başka çalışmada, DSPC molar oranı 0.7 olarak sabit tutulmuştur. Burada PEG40St ve StGly moleküllerinin molar oranları değiştirilerek monotabaka stabilitesine etkileri incelenmiştir. Şekil 131’te DSPC:PEG40St:StGly 7:2:1, 7:1.5:1.5 ve 7:1:2 karışımlarının yüzey basıncına karşılık molekü alan başına düşen  $\Gamma$  izotermleri görülmektedir. 7:1.5:1.5 ve 7:2:1 karışımlarının izotermlerinde çok büyük farklılıklar görülmemektedir. Ancak 7:1:2 karışımında moleküllerin daha iyi organize oldukları görülmektedir. Karışımlarda PEG40St mol oranının düşük olması nedeniyle diğer karışımlarda 35 mN/m yüzey basıncında görülen plato bölgeleri oldukça kısadır ve belirgin değildir.

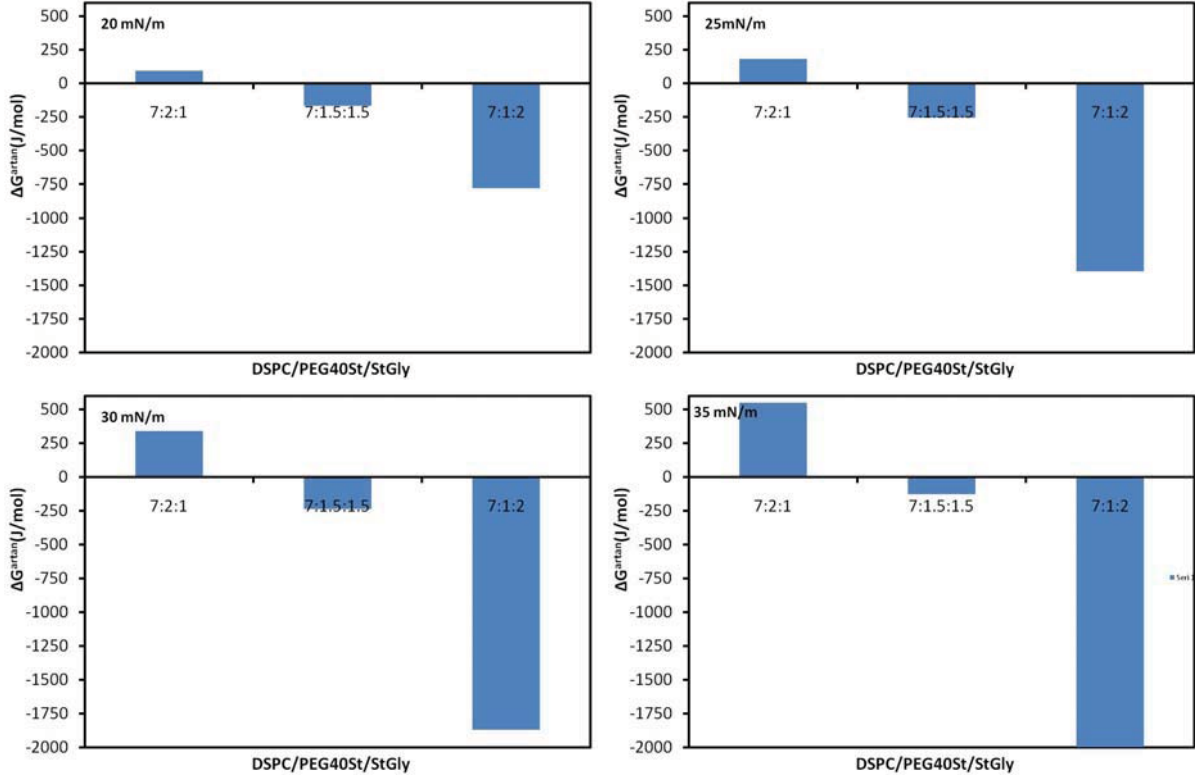




**Şekil 131.** Saf bileşenlerin ve 7:2:1, 7:1.5:1.5 ve 7:1:2 molar oranlarında DSPC:PEG40St:StGly karışımlarının yüzey basıncına karşılık ortalama moleküler alan izotermleri

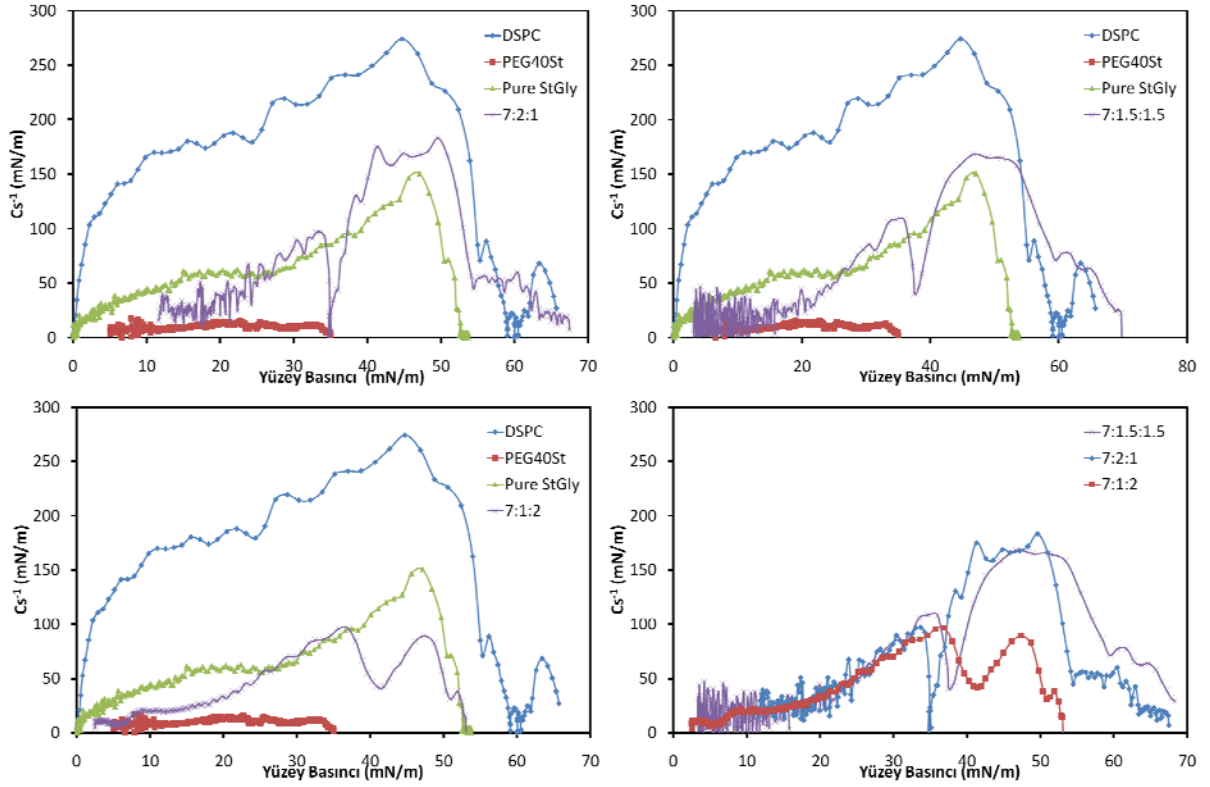
DSPC:PEG40St:StGly 7:2:1, 7:1.5:1.5 ve 7:2:1 molar oranlarındaki karışımların Gibbs serbest enerjilerinin yüzey basıncıyla değişimi Şekil 132’te görülmektedir. Şekilden görüldüğü gibi 20, 25, 30 ve 35 mN/m yüzey basınçlarının her birinde 7:1:2 karışımı diğer karışımlara kıyasla daha negatif artan Gibbs enerji değerleri vermiştir. 7:2:1 karışımında moleküller arası itme kuvvetlerinin dominant olduğu ve artan yüzey basıncıyla birlikte bu kuvvetlerinde arttığı görülmektedir. 7:1.5:1.5 karışımında PEG40St ve StGly molar oranlarının eşitlenmesi sonucu Gibbs serbest enerji değerleri negatif olmuştur. 20 ve 25

mN/m yüzey basınçlarında moleküller arası etkileşimin arttığı 30 mN/m yüzey basıncında bir değişim olmadığı görülmektedir. Ancak 35 mN/m yüzey basıncında Gibbs serbest enerji değerinin arttığı görülmektedir.



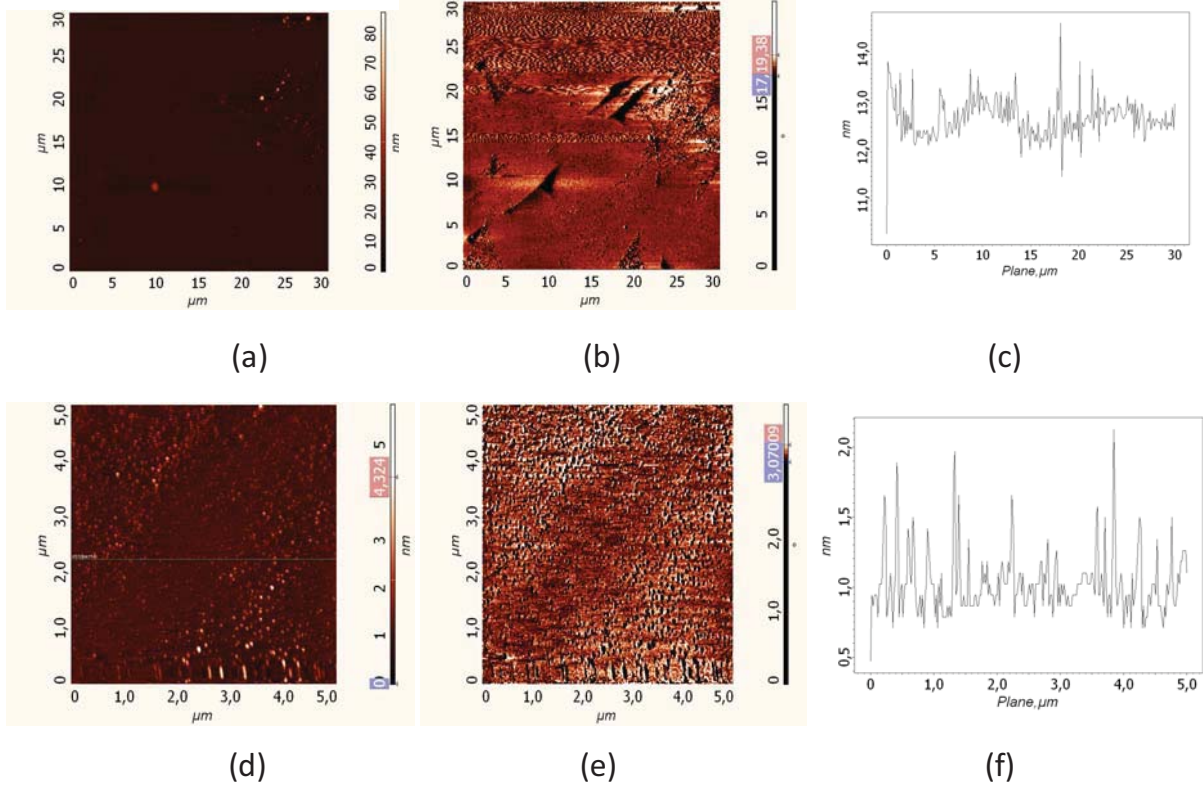
**Şekil 132.** Farklı yüzey basınçlarında DSPC:PEG40St:StGly karışımlarının artan Gibbs serbest enerjilerinin kıyaslanması

DSPC:PEG40St:StGly 7:2:1, 7:1.5:1.5 ve 7:1:2 molar oranlarındaki karışımlarının sıkıştırılabilirlik modülü değerinin yüzey basıncıyla değişimi Şekil 133'da görülmektedir. 7:1.5:1.5 ve 7:2:1 karışımlarının sıkıştırılabilirlik modülü değerleri birbirlerine çok benzerdir. Yapılarındaki PEG miktarı 7:1:2 karışımına kıyasla daha fazla olmasına rağmen yaklaşık 36 mN/m yüzey basıncından sonra 7:1:2 karışımına göre daha katı bir davranış göstermiştir. StGly tek hidrokarbon zincirine sahip olması, PEG ile de hidrojen yapabilmesine bağlı olarak monotabaka içinde nasıl bir davranış sergilediğini ortaya koymak oldukça güçtür. Zira, StGly'de PEG40St gibi monotabaka yapısından ayrılıp altfaza geçebilir. Bu amaçla, çalışmamızda karışımların faz davranışları ayrıca AFM ile de incelenmiştir.



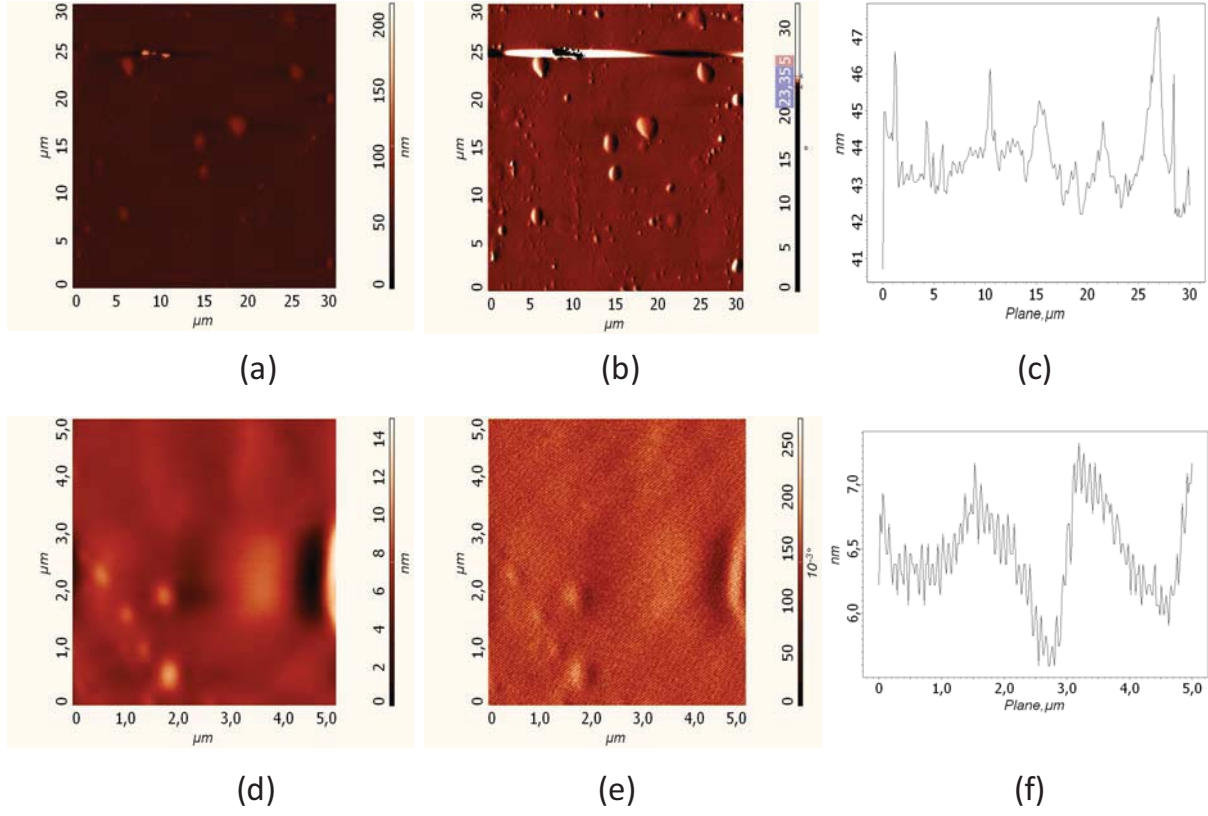
**Şekil 133.** DSPC:PEG40St:StGly karışımlarının sıkıştırılabilirlik değerlerinin yüzey basıncıyla değişimi

Saf StGly molekülünün 30 mN/m yüzey basıncında mika yüzeyine kaplanması sonrası elde edilen 30x30 ve 5x5 mikronluk alanlarının AFM görüntüleri ve yükseklik profilleri Şekil 134'te görülmektedir. StGly molekülünün topografyası tam olarak homojen olmayan bir görüntü verdiği söylenebilir. Ancak, bunun 30 mN/m de StGly'nin henüz katı faza geçmemiş, kondense olmuş sıvı fazında olduğundan kaynaklandığı unutulmamalıdır. Ancak, baş grubunun küçük olmasından dolayı StGly'nin PEG40St'ye kıyasla daha pürüzsüz bir yüzey görüntüsü verdiği görülmektedir.



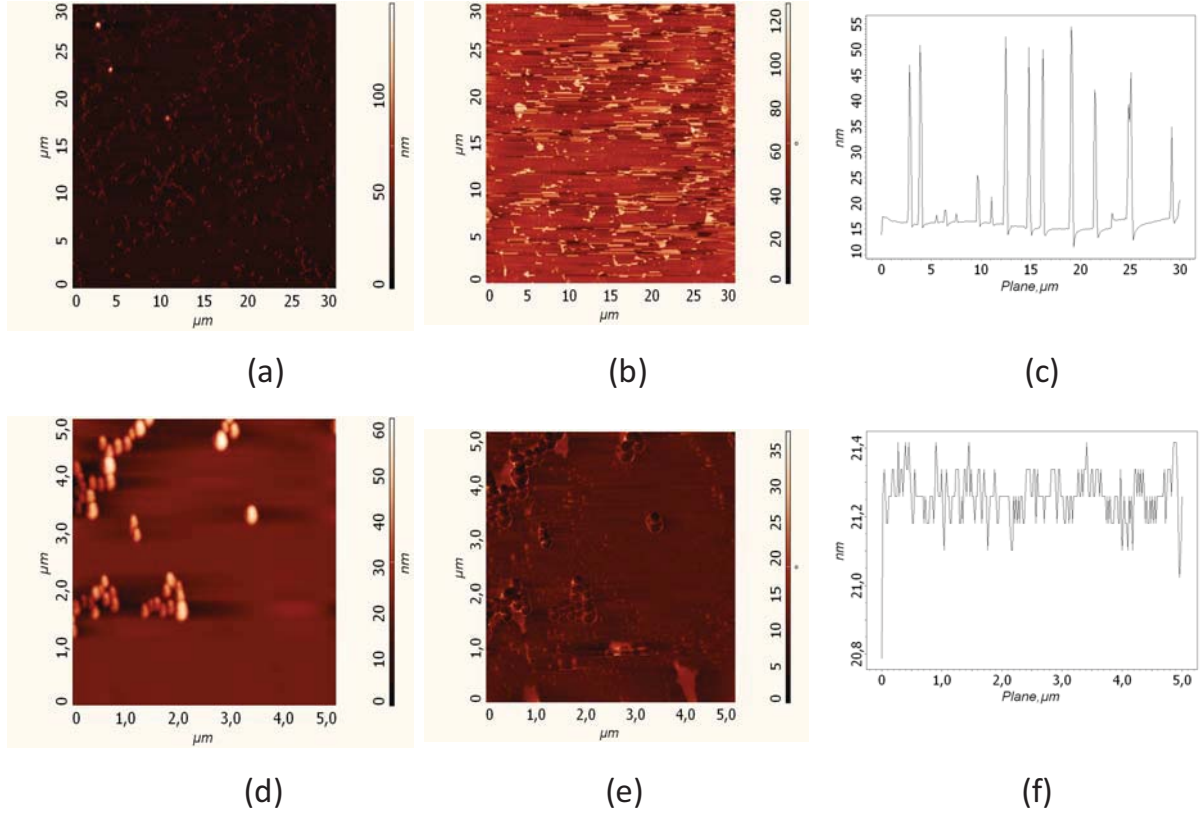
**Şekil 134.** 30 mN/m yüzey basıncında kaplanan saf StGly molekülünün 30x30 mikronluk alanda (a) topografi, (b)faz, (c) yükseklik profili ve 5x5 mikronluk alanda (d) topografi, (e)faz, (f) yükseklik profili

7:2:1 karışımında hem 30x30 mikronluk hem de 5x5 mikronluk alanlarda yapılan taramalarda yüzeyde aglomerasyonlar olduğu görülmektedir. Moleküller arası itme kuvvetlerinin dominant olduğu 7:2:1 karışımının homojen bir monotabaka yapısı oluşturamadığı Şekil 135’de görülen AFM görüntülerinden de anlaşılmaktadır.



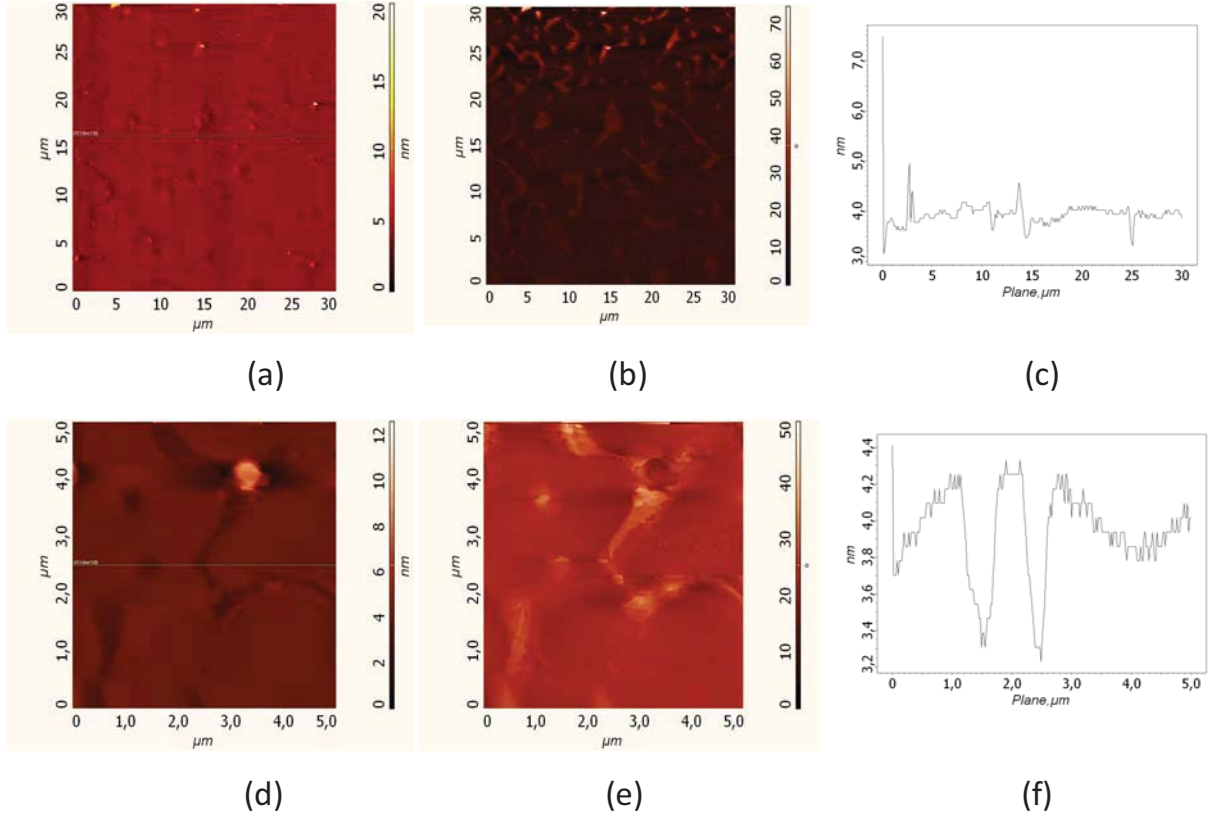
**Şekil 135.** 30 mN/m yüzey basıncında kaplanan DSPC:PEG40St:StGly'nin 7:2:1 karışımının 30x30 mikronluk alanda (a) topografi, (b)faz, (c) yükseklik profili ve 5x5 mikronluk alanda (d) topografi, (e)faz, (f) yükseklik profili

7:1.5:1.5 karışımının 30x30 mikronluk alanda alınan AFM faz ve topografya görüntülerinde belirgin faz ayrımları görülmektedir. Ancak, görüntü kendi içinde homojendir. Ve 5x5 mikronluk alanda alınan görüntülerde faz ayrımları daha belirgin görülmektedir. Faz görüntüsünde (Şekil 136 (e)) BAM ile alınan saf StGly görüntülerine (Şekil 120) benzeyen halka şeklinde domainler görülmektedir.



**Şekil 136.** 30mN/m yüzey basıncında kaplanan DSPC:PEG40St:StGly'nin 7:1.5:1.5 karışımının 30x30 mikronluk alanda (a) topografi, (b)faz, (c) yükseklik profili ve 5x5 mikronluk alanda (d) topografi, (e)faz, (f) yükseklik profili

7:1:2 karışımının 30x30 mikronluk ve 5x5 mikronluk alanlarda verdiği Şekil 137'da görülen görüntülerde de faz ayrımları görülmektedir. Ancak görüntüler 7:1:2 ve 7:1.5:1.5 karışımlarına kıyasla daha homojendir.



**Şekil 137.** 30mN/m yüzey basıncında kaplanan DSPC:PEG40St:StGly'nin 7:1:2 karışımının 30x30 mikronluk alanda (a) topografi, (b)faz, (c) yükseklik profili ve 5x5 mikronluk alanda (d) topografi, (e)faz, (f) yükseklik profili

DSPC, PEG40St ve StGly moleküllerinin üçlü kompozisyonlarıyla yapılan iki boyutlu analizlerde, DSPC ve StGly molar oranları birbirlerine yaklaştıkça moleküller arası çekme etkileşimlerinin arttığı görülmüştür. Bunun nedeni, van der waals kuvvetlerine ek olarak DSPC ve StGly arasında kurulan hidrojen bağı olabilir. DSPC molar oranının 0.7 olarak sabit tutulduğu kompozisyonlarda ise artan StGly molar oranıyla birlikte moleküller arası çekme kuvvetlerinin daha dominant olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, StGly üçüncü komponent olarak kullanıldığında molar oranının DSPC ile yakın tutulması daha stabil bir mikroköpükçük kabuğu oluşumu için gerekli olabilir. Fakat, yine de StGly, tıpkı PEG40St gibi tek hidrokarbon zincirli olmasından dolayı hava-su arayüzeyinde stabil kondens bir film oluşturmada etkin olamayabilir. Silindirik yapıda olduğu da düşünüldüğünde, mikroköpükçük üretiminde StGly'nin PEG40St ile birlikte çok miktarda kullanımın mikroköpükçük oluşumunu ve stabiliteyi olumsuz etkileyeceği sonucu ortaya çıkmaktadır.

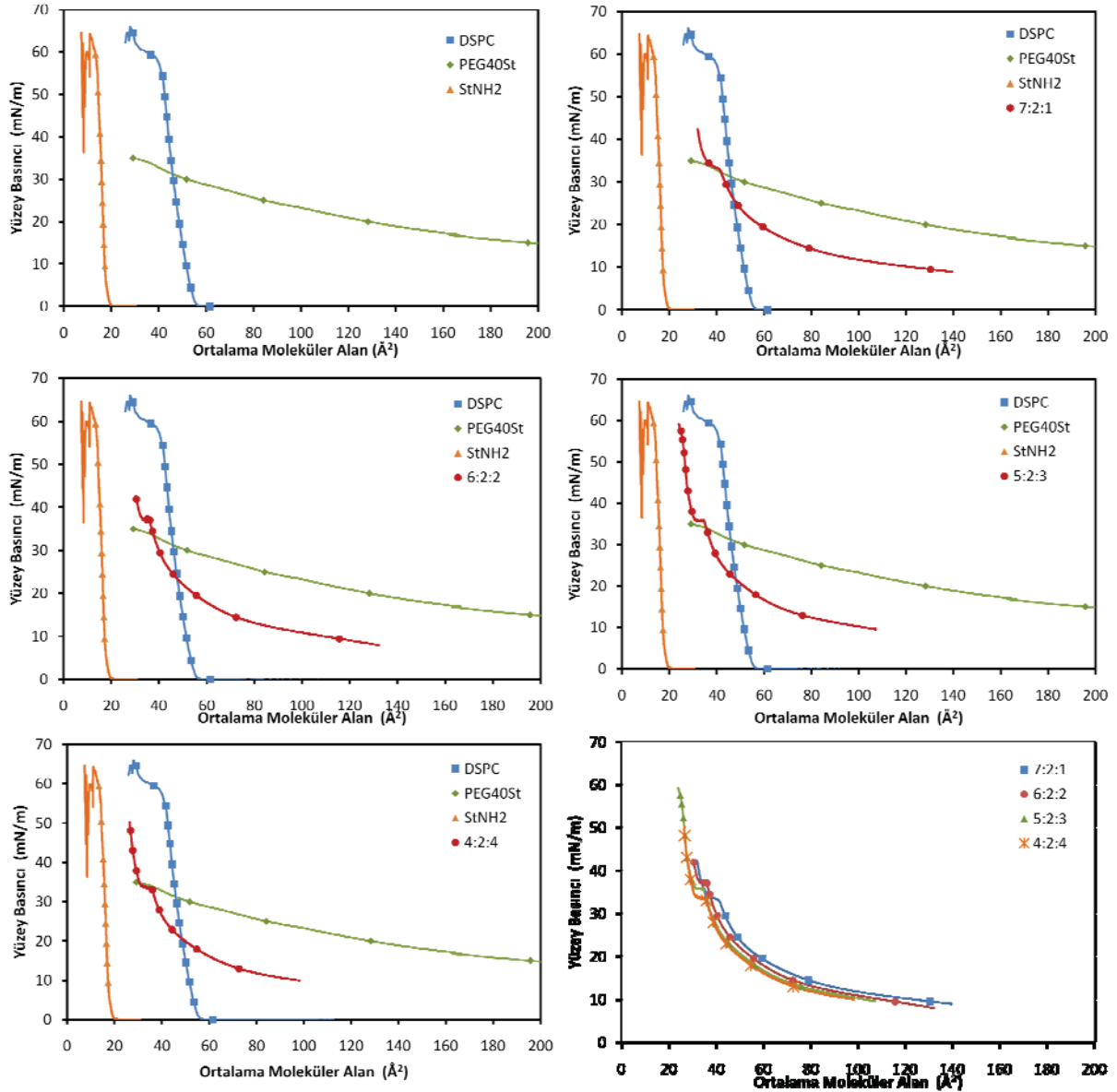
#### 4.1.4. DSPC:PEG40St ve İyonik Bağ Yapabilen Lipid Karışımları:

*DSPC:PEG40St:StNH<sub>2</sub> Üçlü Karışımlarının Yüzey Basıncı-Moleküler Alan İzotermi ve BAM Görüntüleri:*

StNH<sub>2</sub> , DSPC , PEG40St ve DSPC:PEG40St:StNH<sub>2</sub>'nin 7:2:1, 6:2:2, 5:2:3 ve 4:2:4 molar oranlarda karışımlarının yüzey basıncı–ortalama moleküler alan izotermi Şekil 138'de görülmektedir. Elde edilen saf StNH<sub>2</sub> izotermi literatürde yapılan çalışmalarla uyum içindedir (Wan ve ark., 2000). Şekilde görüldüğü gibi StNH<sub>2</sub>, DSPC ve PEG40St'a kıyasla daha yoğun (kondens) bir yapı göstermektedir. StNH<sub>2</sub> monotabakasının yüzey basıncı 20 Å<sup>2</sup>'lik bir alana kadar sıkıştırma uygulanana kadar 0 mN/m olarak ölçülmüştür. 20 Å<sup>2</sup>'lik alandan itibaren sıkıştırmanın devam etmesiyle birlikte yüzey basıncı hızla yükselmiştir ve monotabaka tam olarak kondens faza geçmiştir. Yaklaşık olarak 55 mN/m yüzey basıncından itibaren monotabaka kollaps olmaya başlamıştır.

PEG40St'ın mol oranı 0.2 olarak sabit tutularak, 7:2:1, 6:2:2, 5:2:3 ve 4:2:4 molar oranında hazırlanan DSPC:PEG40St:StNH<sub>2</sub> karışımlarının yüzey basıncı–ortalama moleküler alan izotermi Şekil 138'da görüldüğü gibi çok büyük farklılıklar göstermemekle beraber, artan StNH<sub>2</sub> mol oranıyla birlikte izotermi daha kondens bir yapı göstermektedir. Bunun nedeni pozitif yüklü StNH<sub>2</sub>'nin PC polar grubuyla güçlü bir etkileşim içerisinde olması olabilir. Bu etkileşim daha önce yapılan literatür çalışmalarında da gösterilmiştir (Teixeira ve ark., 2000). PEG40St'ın kollaps basıncı olan 35 mN/m yüzey basıncında 4 karışımında da plato bölgesi gözlemlenmiştir. PEG40St mol oranı her karışımında aynı olduğu için plato bölgesinin uzunlukları yaklaşık olarak aynıdır. Plato bölgesi boyunca, monotabakanın sıkıştırılmasıyla birlikte yüzey basıncı oldukça yavaş artmaktadır. Plato bölgesinde, PEG zincirlerinin sterik etkileşim altında konformasyon değişimine uğradığı, altfaza doğru uzadığı ve böylece karışabilir bir monotabaka oluşturduğu düşünülmektedir.

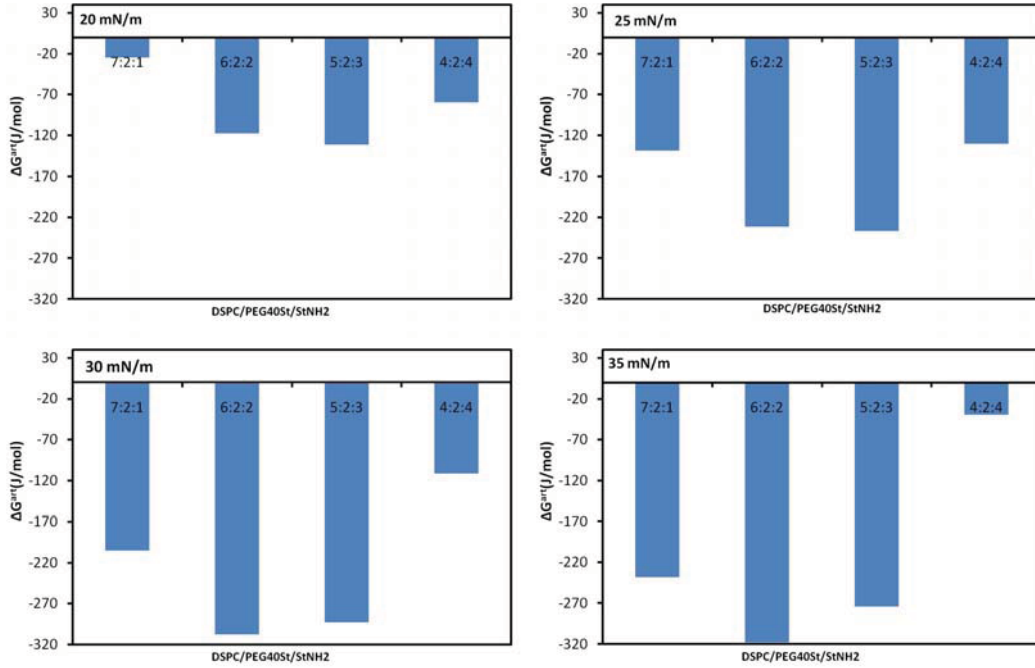




Şekil 138. Saf StNH<sub>2</sub>, DSPC, PEG40St ve DSPC:PEG40St:StNH<sub>2</sub>'nin 7:2:1, 6:2:2, 5:2:3 ve 4:2:4 molar oranlarda karışımlarının yüzey basıncı–ortalama moleküler alan izotermi

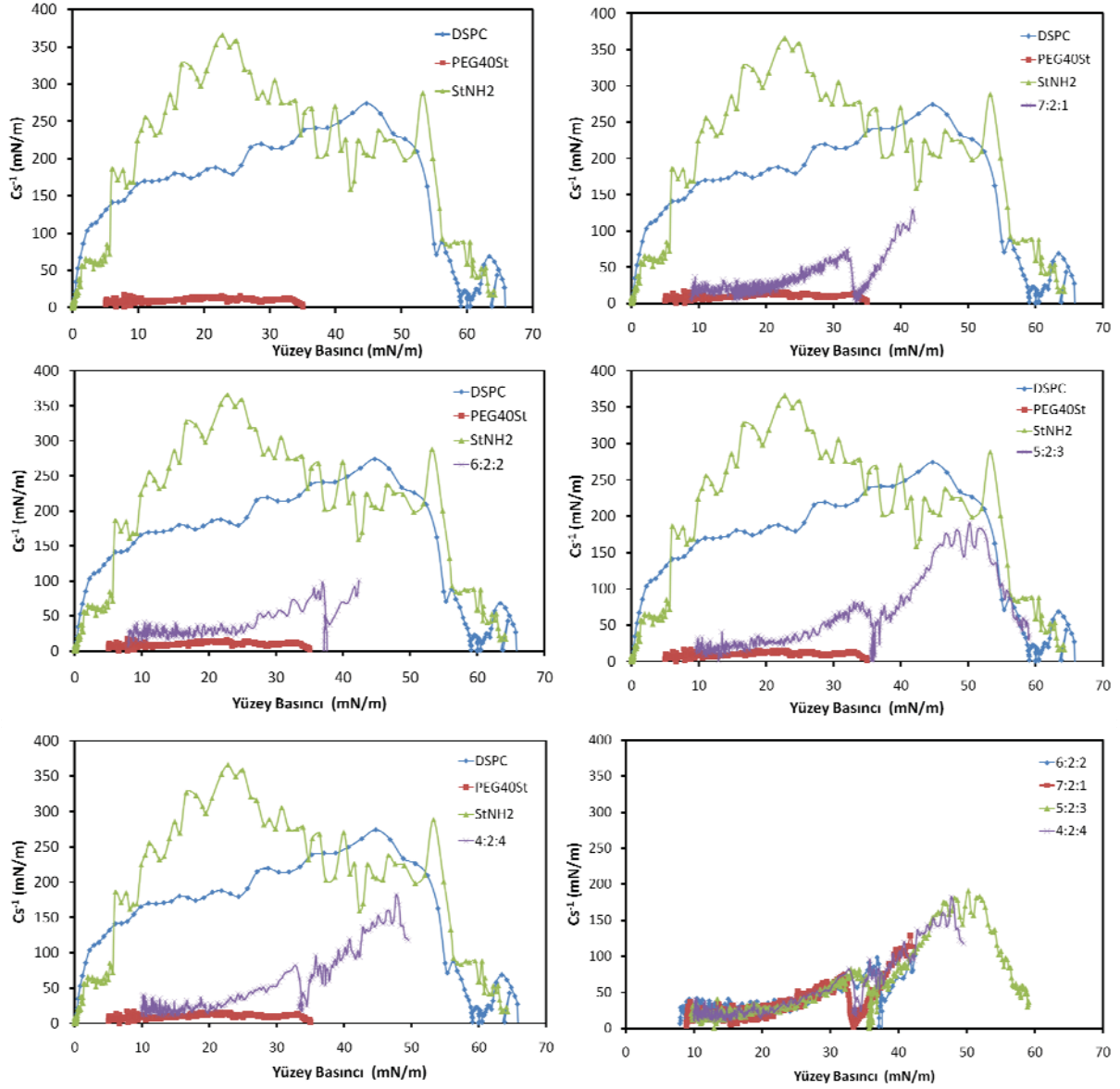
20, 25, 30 ve 35 mN/m yüzey basınçlarında DSPC:PEG40St:StNH<sub>2</sub> karışımlarının artan Gibbs enerjileri Şekil 139'da karşılaştırılmıştır. 20, 25, 30 ve mN/m yüzey basınçlarında bütün karışımlar için moleküller arası çekme kuvvetleri baskındır. Şekil 138'da görüldüğü gibi karışımların izotermi karşılaştırıldığında en kondens yapı 4:2:4 karışımında gözlenmektedir. Buna rağmen 25, 30 ve 35 mN/m yüzey basınçlarında karışımların artan Gibbs serbest enerjileri kıyaslandığında moleküller arası etkileşimin 4:2:4 karışımında diğer karışımlara oranla daha düşük olduğu görülmektedir. İdeal durum göz önünde bulundurulduğunda, DSPC ve StNH<sub>2</sub>'nin saf izotermi (Şekil 138) kondens yapı

göstermesi nedeniyle 4:2:4 karışımının izoterminin diğer karışımlara kıyasla daha kondens bir yapı göstermesi normaldir. Ancak katyonik yapıda olan StNH<sub>2</sub>, zwitterionic yapıda olan DSPC'nin yapısındaki negatif yüklerle etkileşip çekme kuvvetleriyle iki molekülü yaklaştırabileceği gibi pozitif yüklerle etkileşip itme kuvvetleriyle iki molekül arasındaki etkileşimi azaltabilir.



**Şekil 139.** Farklı yüzey basınçlarında DSPC:PEG40St:StNH<sub>2</sub> karışımlarının artan Gibbs serbest enerjilerinin karşılaştırılması

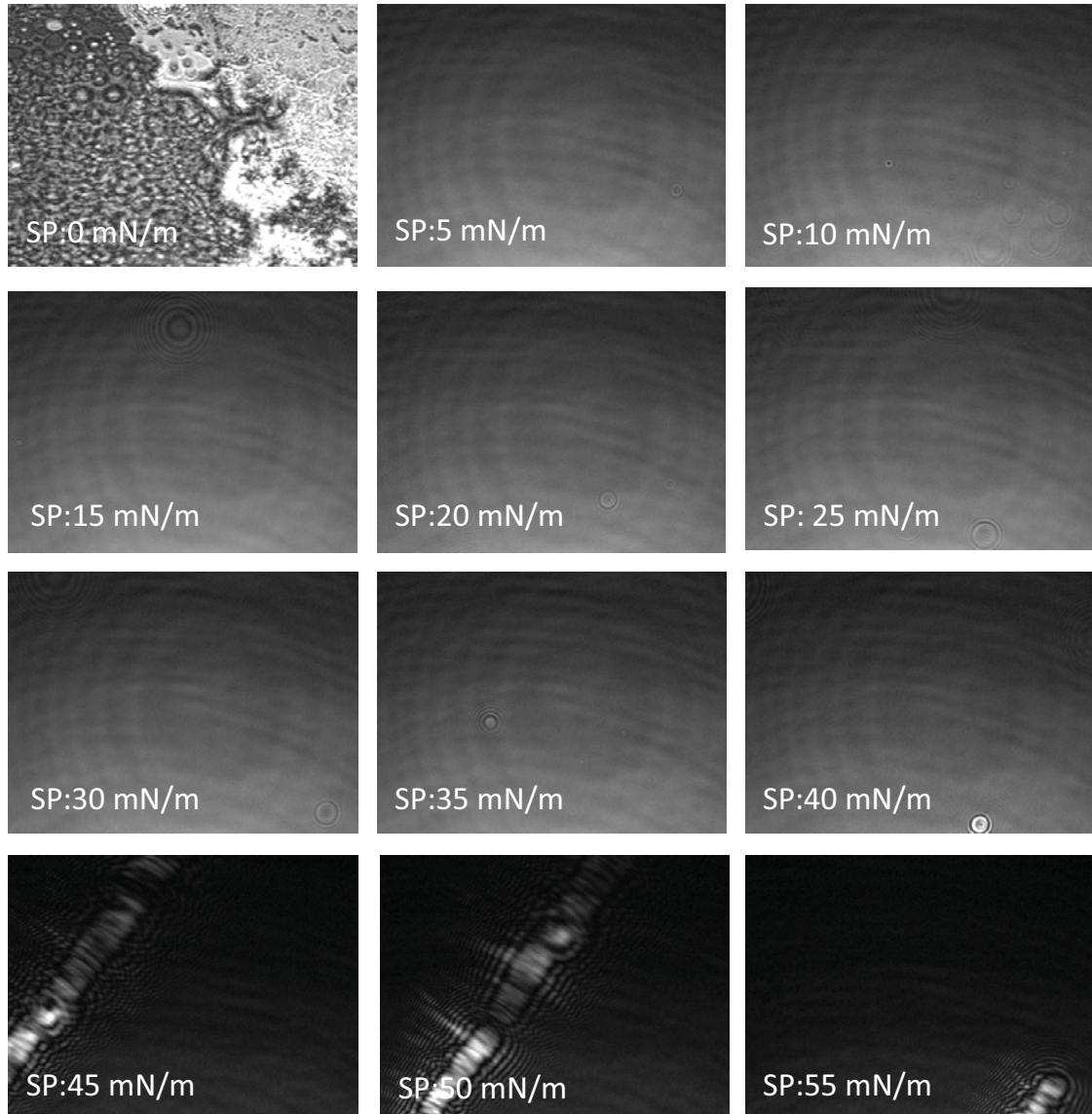
Karışımları oluşturan DSPC, PEG40St ve StNH<sub>2</sub>'nin saf hallerinin ve farklı molar oranlardaki karışımlarının sıkıştırılabilirlik değerlerinin yüzey basıncıyla değişimleri Şekil 140'te görülmektedir. Yaklaşık olarak 20 Å<sup>2</sup>'lik bir alana kadar 0 mN/m yüzey basıncı veren saf StNH<sub>2</sub> ( bkz. Şekil 138) başlangıçta polar grubunun yüzeyde düzgün bir şekilde organize olamamasından dolayı genişletilmiş faz davranışı göstermektedir. Dolayısıyla sıkıştırılabilirlik değeri başlangıçta çok düşüktür. Ancak monotabakanın sıkıştırılmaya devam edilmesi StNH<sub>2</sub>'nin daha kondens bir yapıya geçmesini sağlamıştır ve monotabakanın sıkıştırılabilirlik modülü değeri artmıştır. Kollaps basıncına yaklaşıldığında ise StNH<sub>2</sub> monotabakanının akışkanlığı tekrar arttığı ve sıkıştırılabilirlik değerinin düştüğü gözlenmektedir. DSPC:PEG40St:StNH<sub>2</sub> karışımlarının yüzey basıncına karşılık sıkıştırılabilirlik modülleri ise Şekil 140'te görüldüğü gibi benzer davranışlar göstermektedir.



**Şekil 140.** DSPC:PEG40St:StNH2 karışımlarının sıkıştırılabilirlik değerlerinin yüzey basıncıyla değişimi

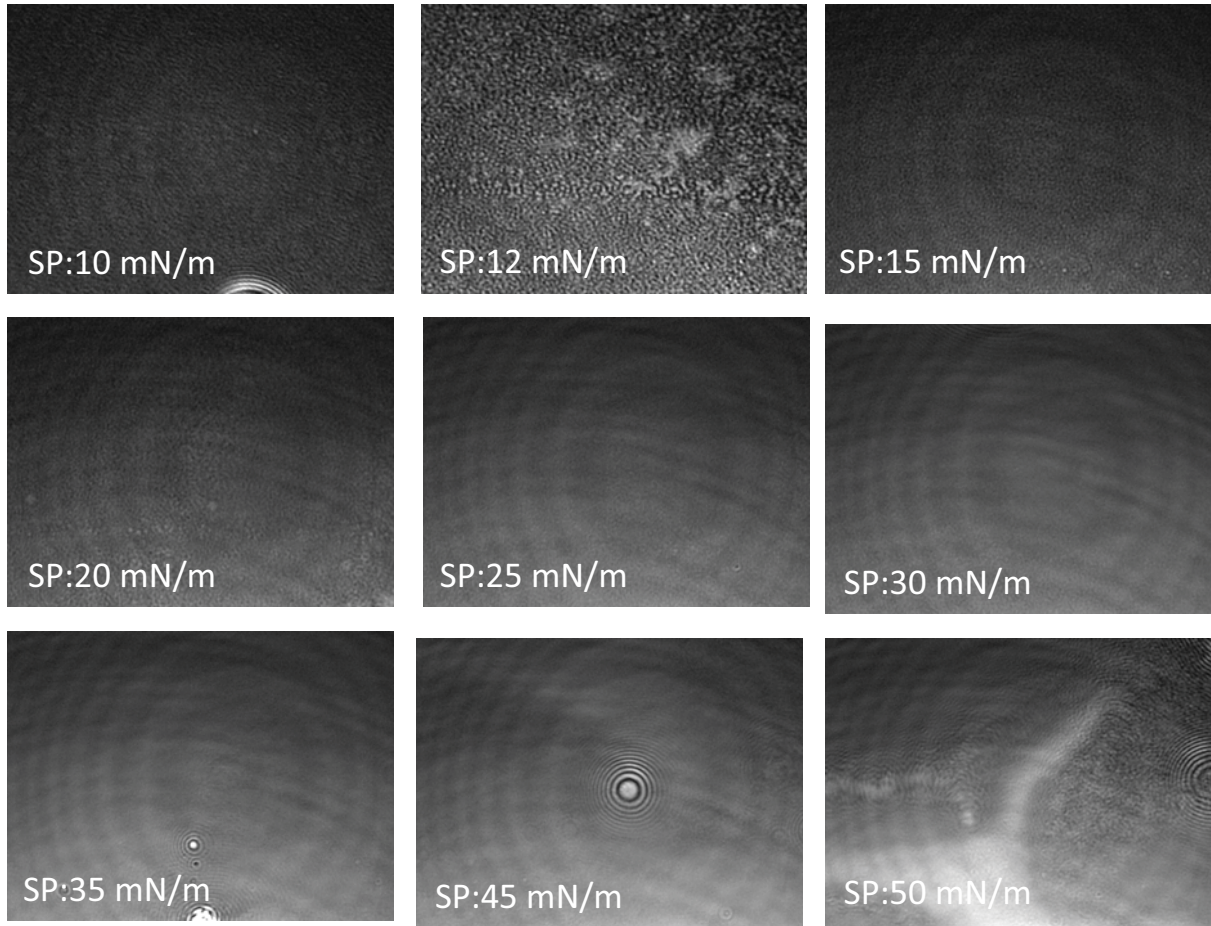
35-36 mN/m yüzey basınçlarında bütün karışımların sıkıştırılabilirlik modülü değerleri minimum değerini aldıkları görülmektedir. Bu yüzey basınçlarında sıkıştırılabilirlik modülü değerlerinin minimuma inmesinin nedeni karışımların izotermelerinde görülen (Şekil 138) plato bölgelerinde eğimin 0'a gitmesidir. Minimum noktasından sonra monotabakalar oldukça düzenli bir faz olan sıvı-kondens faza geçmektedir. Artan yüzey basıncıyla birlikte sıkıştırılabilirlik değeri 150-200 mN/m gibi yüksek değerlere ulaşır daha sonra monotabakanın kollapsına yaklaştıkça tekrar düşmeye başladığı görülmektedir.

Karışımların faz davranışları ve oluşturduları monotabakaların homojenlik derecesi hakkında bilgi moleküler düzeyde izotermlerin elde edildiği deney koşullarında Brewster açısı mikroskobu ile görüntü alınarak elde edildi. StNH<sub>2</sub> molekülünün saf halinin BAM görüntüleri Şekil 141’te görülmektedir. 0 mN/m yüzey basıncından 1 mN/m yüzey basıncına kadar faz ayrımları gözlenmiştir. Daha sonra 40 mN/m yüzey basıncına kadar homojen görüntüler alınmıştır. 45 mN/m sonrası faz ayrımları tekrar gözlemlenilmeye başlanmıştır. 55 mN/m yüzey basıncına kadar alınan görüntülerde yüzeyde parlak çubuklar halinde görüntüler elde edilmiştir. Kollaps yüzey basıncından itibaren ise alınan görüntüler tamamen siyahtır. Bu durum StNH<sub>2</sub> monotabakasının kollapsının alt fazın içine doğru olduğunu işaret etmektedir.



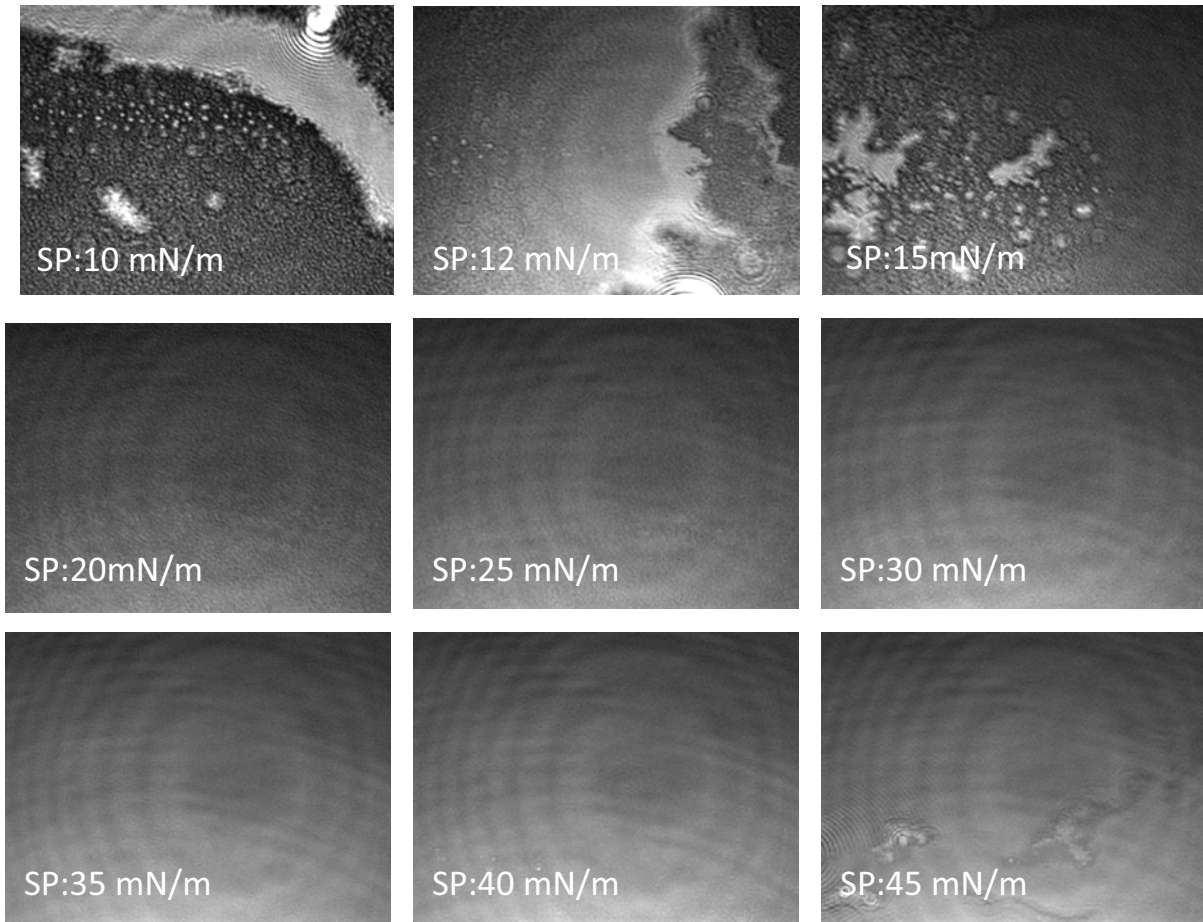
Şekil 141. Saf StNH<sub>2</sub> molekülünün BAM görüntüleri

DSPC:PEG40St:StNH<sub>2</sub>'nin 7:2:1 molar oranında karışımının faz davranışının BAM görüntüleri Şekil 142'de görülmektedir. Başlangıçta moleküler arası çekim kuvvetlerinin zayıf olmasına bağlı olarak 7:2:1 karışımı 2 boyutlu gaz fazını ifade eden koyu renkli görüntüler vermektedir. Ancak, sıkıştırma ile 12 mN/m yüzey basıncı civarında kondens yapıların ortaya çıktığı ve genişletilmiş faz içinde dağıldığı görülmektedir. Termodinamik analizlerle de uyumlu olarak, 20 mN/m yüzey basıncından itibaren moleküler arası etkileşim artmış ve homojen görüntüler gözlemlenmiştir. 45 mN/m yüzey basıncından sonra alınan görüntüler Şekil 142' de görülmekte olan 50 mN/m yüzey basıncındaki görüntüyle benzerdir. Bu görüntüler, Şekil 140'te görülmekte olan sıkıştırılamazlık analiziyle uyum göstermektedir. Sıkıştırılamazlık değerlerinin yüksek olduğu 40-50 mN/m yüzey basınçlarında alınan görüntülerde görülen beyazlıklar monotabakanın kalınlaştığını ve artık sıkıştırmayla birlikte kollapse doğru gittiğini göstermektedir.



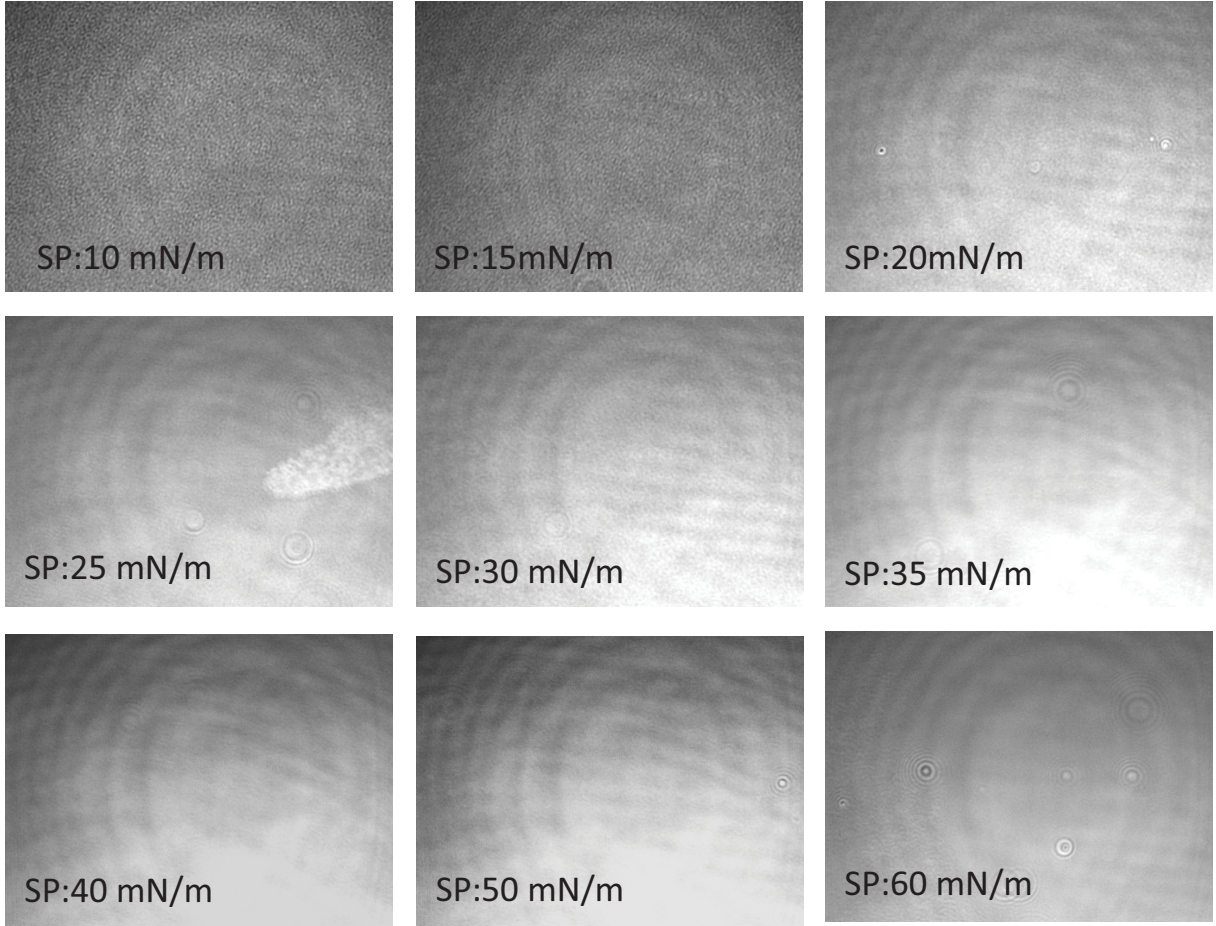
**Şekil 142.** DSPC:PEG40St:StNH<sub>2</sub> 7:2:1 karışımının BAM görüntüleri

DSPC:PEG40St:StNH<sub>2</sub>'nin 6:2:2 molar oranında karışımının farklı yüzey basınçlarındaki faz davranışları Şekil 143'de görülmektedir. Yüzey basıncı 20 mN/m'ye ulaşıncaya kadar Şekil 143'de görüldüğü gibi gaz, genişletilmiş-sıvı, kondens-sıvı fazlarının bir arada bulunduğu görüntüler elde edilmiştir. Ancak daha sonra alınan görüntüler homojendir. 45 mN/m yüzey basıncından itibaren az miktarda faz ayrımı görülmektedir. 50 mN/m'ye kadar alınan görüntüler 45 mN/m yüzey basıncındaki görüntüden farklı değildir.



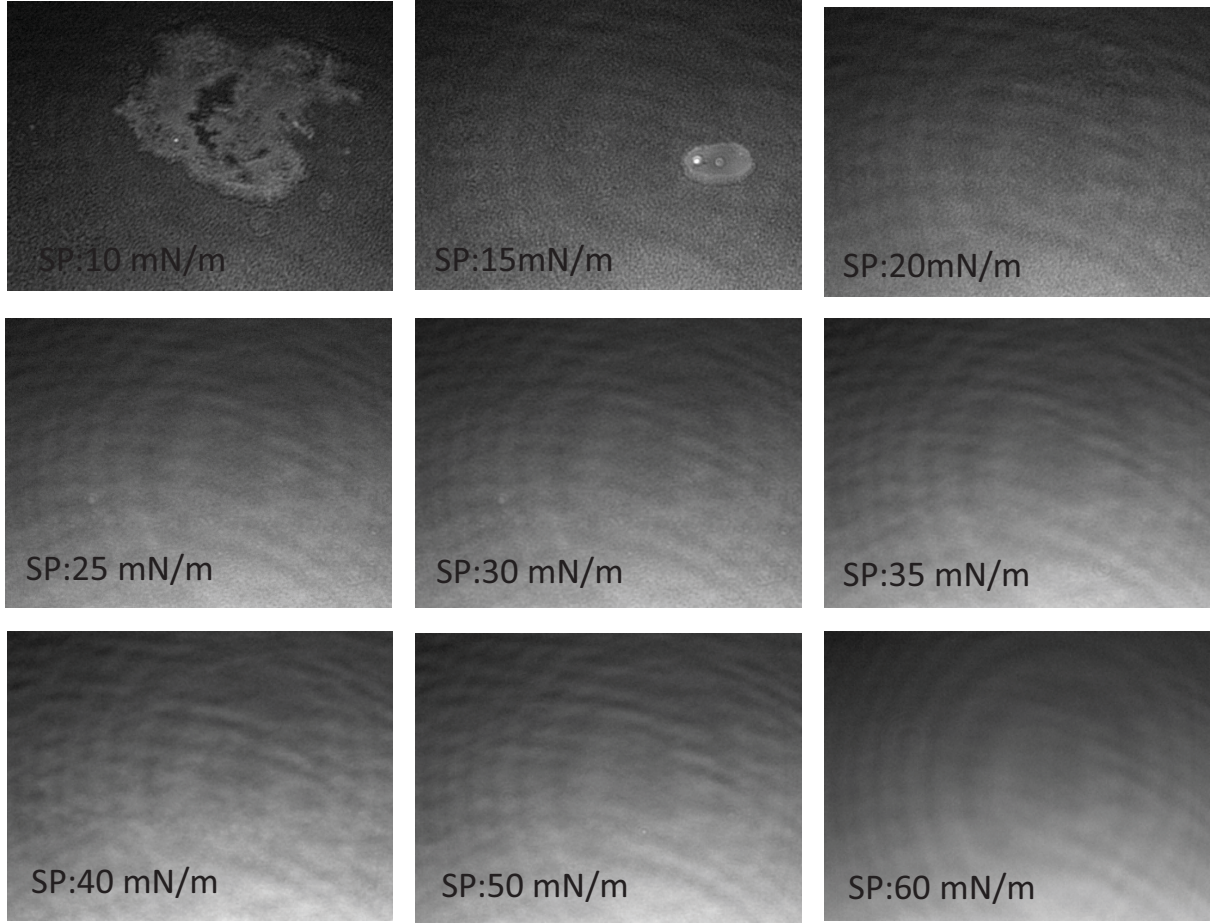
**Şekil 143.** DSPC:PEG40St:StNH<sub>2</sub>'nin 6:2:2 molar oranında karışımın BAM görüntüleri

DSPC:PEG40St:StNH<sub>2</sub>'nin 5:2:3 molar oranında karışımının BAM görüntüleri, diğer karışımlarla aynı ayarlarda çekilmesine rağmen diğer karışımlara kıyasla daha parlak görüntüler vermiştir. Şekil 144'de görüldüğü gibi alınan görüntüler homojendir. Yüzeydeki parlamaların daha sıkışık (kondens) bir filmin oluşmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. 60 mN/m yüzey basıncında monotabakanın kollapsında ise yüzeyde halkalar halinde parlamalar gözlemlenmiştir



**Şekil 144.** DSPC:PEG40St:StNH<sub>2</sub> 'nin 5:2:3 molar oranında karışımının BAM görüntüleri

Şekil 145'da görüldüğü gibi DSPC:PEG40St:StNH<sub>2</sub>'nin 4:2:4 molar oranında karışımının BAM görüntülerinde de başlangıçta faz ayrımları görülmektedir. Ancak homojenleşme diğer karışımlara kıyasla daha çabuk gerçekleşmektedir ve 20 mN/m yüzey basıncından sonra alınan hiçbir görüntüde faz ayrımı gözlenmemiştir.



**Şekil 145.** DSPC:PEG40St:StNH<sub>2</sub> 'nin 4:2:4 molar oranında karışımının BAM görüntüleri

Literatürde yapılan bir çalışmada yalnızca DSPC ve StNH<sub>2</sub>'den oluşan karışımların BAM görüntülerinde herhangi bir faz ayrımı görülmediği (Teixeira ve ark., 2000) belirtilmektedir. Bu durumda, Şekil 142, Şekil 143, Şekil 144 ve Şekil 145'da görülen faz ayrımlarının nedeninin DSPC ve StNH<sub>2</sub> karışımına eklenen PEG40St molekülünün yapısında bulunan hidrofilik zincirden kaynaklandığı düşünülebilir. StNH<sub>2</sub> pozitif yüklü bir moleküldür, hemde amin grubu nedeni ile hidrojen bağı yapabilir. Bu nedenle, DSPC'nin kolin grubu ile StNH<sub>2</sub>'nin amin grubu arasında itici kuvvetler olabileceği gibi, StNH<sub>2</sub>'nin amin grubu DSPC'nin fosfat grubu ile hidrojen bağı yapabilir. Literatürde itici kuvvetlerin baskın olduğu yönünde bazı bulgular mevcuttur (Sakai, 2008). Bu durumda, daha az eğime sahip büyük boyutlarda ve daha az stabil mikroköpükçük oluşumu beklenen bir durum olmaktadır.

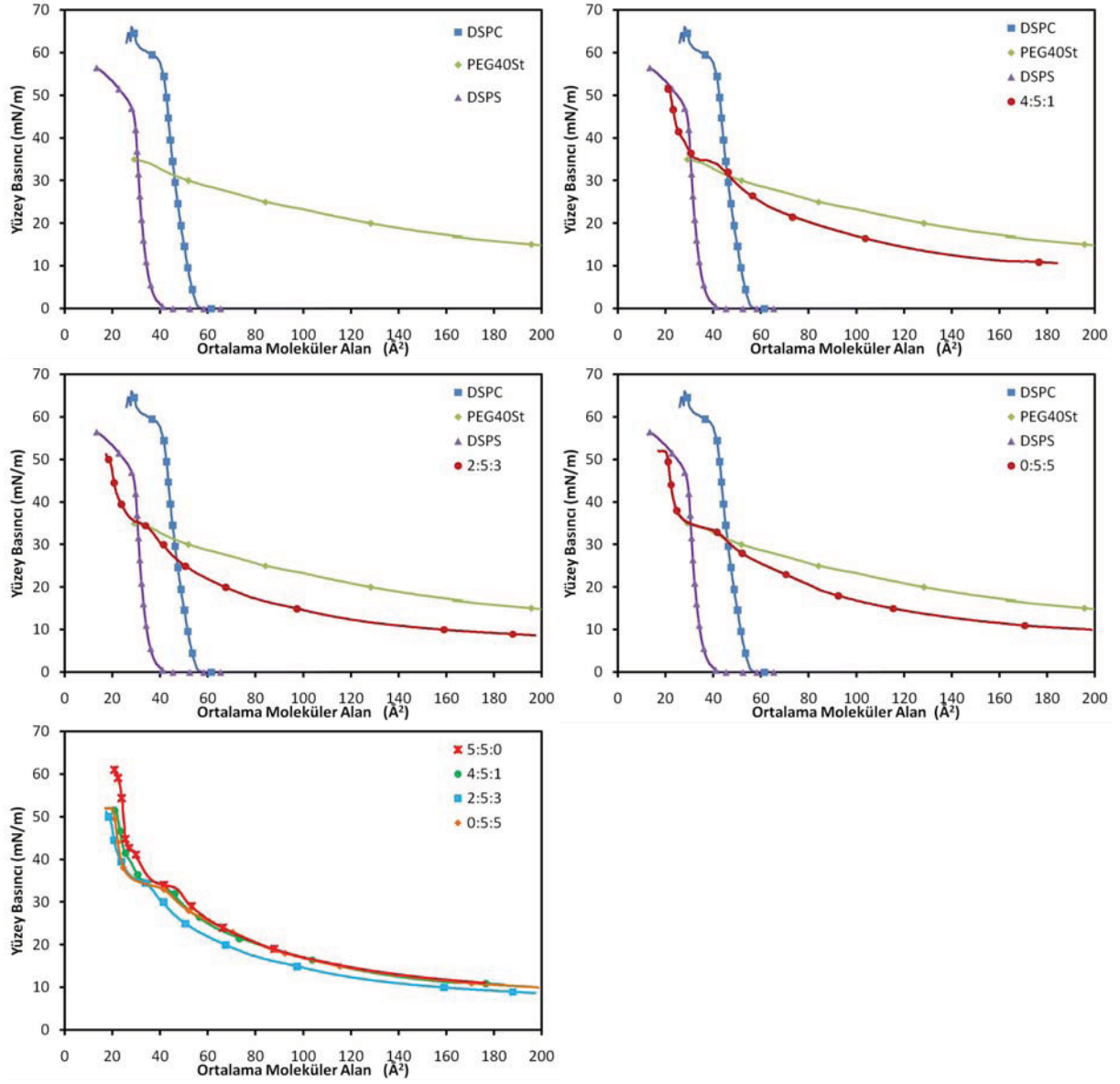


*DSPC:PEG40St:DSPS Üçlü Karışımlarının Yüzey Basıncı-Moleküler Alan İzotermeleri ve BAM Görüntüleri:*

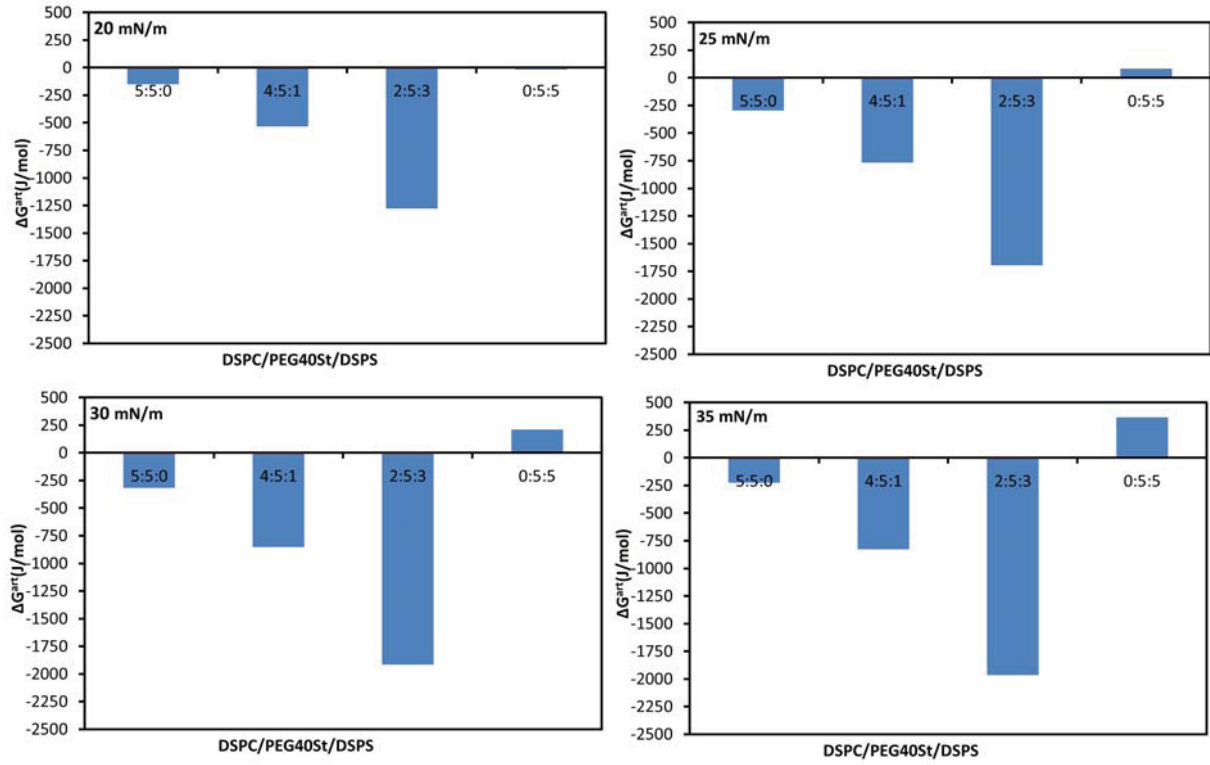
DSPS ökaryotik hücrenin plazma membranında bulunan negatif yüklü bir fosfolipittir (Ross ve ark., 2001). DSPS gibi negatif yüklü fosfolipitlerle DSPC gibi zwitterionic fosfolipitlerin karıştırılması membranın mekanik ve elektriksel özelliklerini değiştirdiği bilinmektedir (Luna ve ark., 2011). Bu çalışmada DSPC ve PEG40St karışımına üçüncü komponent olarak DSPS eklenilerek mikroköpükçük monotabakasının faz davranışına ve morfolojisine etkisi 2-D olarak incelenmiştir.

Saf bileşenlerin yanısıra 0:5:5, 2:5:3 ve 4:5:1 DSPC:PEG40St:DSPS karışımlarına ait yüzey basıncına karşılık ortalama moleküler alan izotermeleri Şekil 146'de verilmektedir. DSPS'nin yüzey basıncı, ortalama moleküler alan  $40 \text{ \AA}^2$ 'e düşene kadar 0 mN/m olarak kalmıştır. Daha sonra yüzey basıncı hızla artmıştır ve DSPS kondens yapıya geçmiştir. DSPS molekülünün DSPC'den daha kondens bir yapı gösterdiği görülmektedir. Karışımların izotermelerine bakıldığında, seçilen kompozisyonlarda DSPS'in çok büyük bir etki yaratmadığı ve diğer tüm karışımlarda olduğu gibi yaklaşık olarak PEG40St'nin kollaps basıncı olan 35mN/m'de plato bölgesinin ortaya çıktığı görülmektedir.

Yüzey basıncına karşılık ortalama moleküler alan izotermeleri birbirine oldukça yakın olmasına rağmen, Şekil 147'de görüldüğü gibi karışımların artan gibbs serbest enerjileri birbirinden oldukça farklıdır. 0:5:5 DSPC:PEG40St:DSPS karışımı sadece 20 mN/m yüzey basıncında negatif artan Gibbs enerji değeri vermektedir. Artan yüzey basıncı ile birlikte DSPS ve PEG40St molekülleri arasında itici kuvvetler giderek artmaktadır. PEG40St oranının 0.5 olarak sabit tutulduğu karışımlarda ise, DSPC:PEG40St karışımına artan oranlarda DSPS ilavesi ile artan Gibbs enerji değerlerinin negatif değerler aldığı görülmektedir. Bunun nedeni DSPS ve DSPC molekülleri arasındaki olası hidrojen bağları ve iyonik etkileşimler olabilir. 2:5:3 karışımının 0:5:5 ve 4:5:1 karışımlarına göre termodinamik olarak daha uygun bir kompozisyon olduğu dört farklı yüzey basıncındaki kıyaslamadan da görülmektedir.



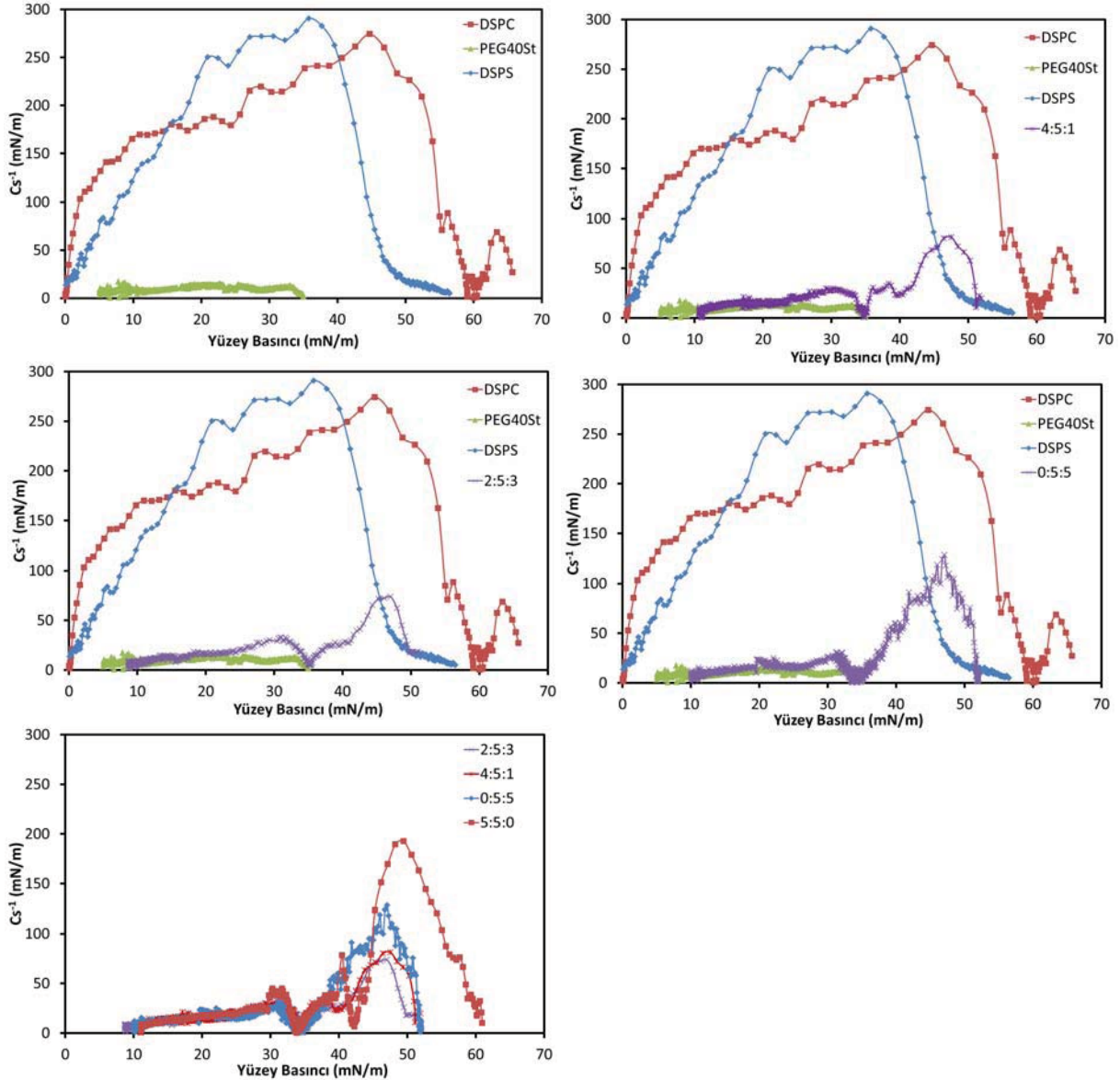
**Şekil 146.** Saf bileşenlerin ve 0:5:5, 2:5:3 ve 4:5:1 molar oranlarında DSPC:PEG40St:DSPS karışımlarının yüzey basıncına karşılık ortalama moleküler alan izotermi



**Şekil 147.** Farklı yüzey basınçlarında DSPC:PEG40St:DSPS karışımlarının artan Gibbs serbest enerjilerinin karşılaştırılması

DSPC:PEG40St:DSPS karışımlarının sıkıştırılabilirlik analizleri Şekil 148’te görülmektedir. Daha düşük yüzey basınçlarında DSPS molekülü DSPC molekülüne kıyasla daha kondens yapı göstermesi nedeniyle daha yüksek sıkıştırılabilirlik değerleri vermektedir. Yaklaşık 38mN/m yüzey basıncında DSPS molekülünün sıkıştırılabilirlik modülü yaklaşık 290 mN/m kadar bir sıkıştırılabilirlik modülü değeriyle tam bir katı faz göstermektedir. Daha sonra DSPS monotabakasının sıkıştırılabilirlik modülü değeri hızla düşmekte ve monotabaka elastik özellik kazanmaktadır. Karışımların oluşturduğu monotabakaların sıkıştırılabilirlik modüllerine bakıldığında yaklaşık 35 mN/m yüzey basıncında izotermelerinde (Şekil 146) görülen plato bölgelerinden dolayı minimum sıkıştırılabilirlik modülü görülmektedir. Minimum noktası öncesinde sıkıştırılabilirlik modülü değerleri yaklaşık olarak aynı olan karışımlar, minimum noktadan sonra farklılık göstermektedir. 2:5:3 ve 4:5:1 karışımları 0:5:5 karışımına kıyasla daha elastik yapı göstermektedir. Karışımların sıkıştırılabilirlik modülü değerleri yaklaşık 48 mN/m yüzey basıncında maksimum değerlerine ulaştıktan sonra hızla düşmeye başlamaktadır ve yaklaşık

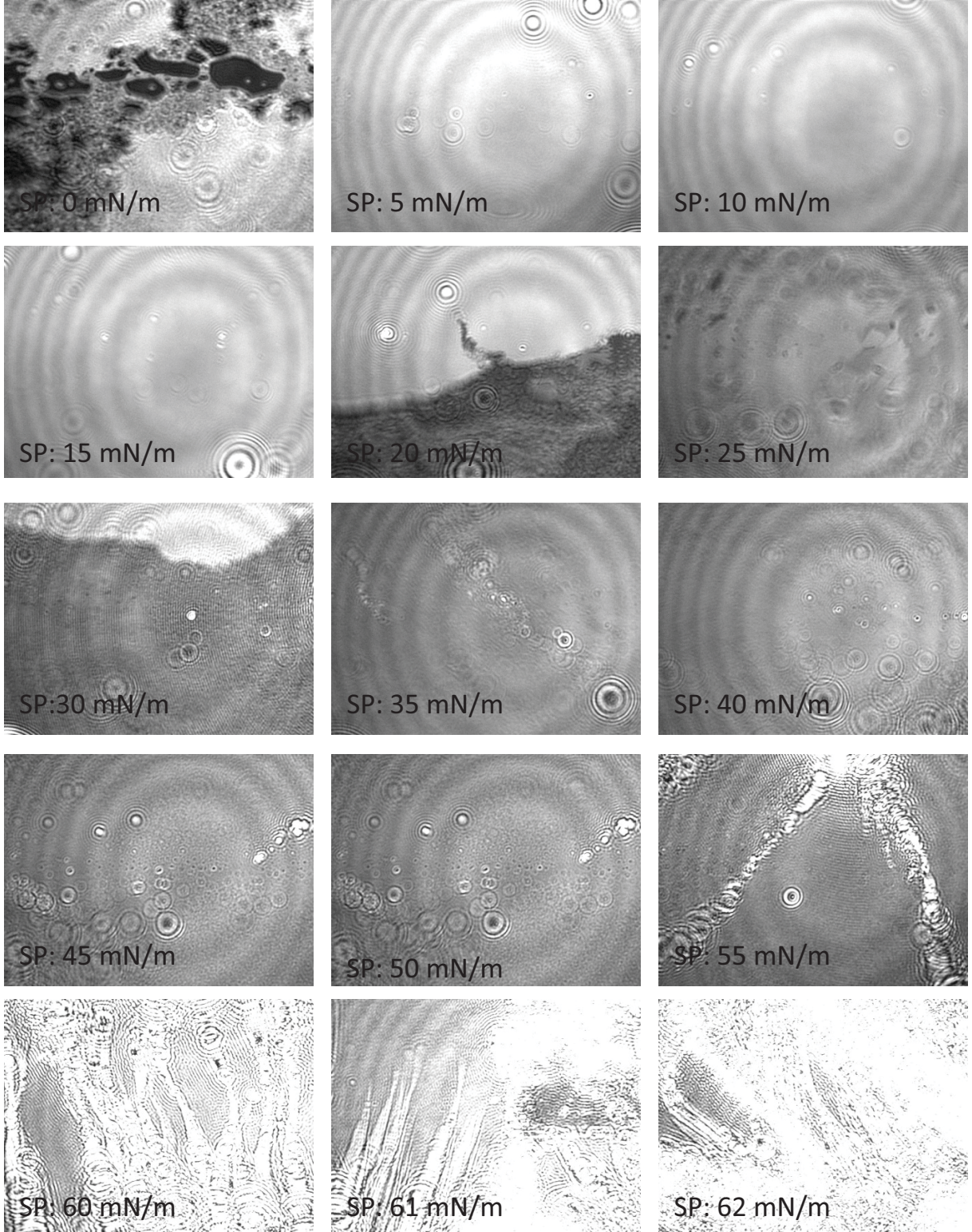
54 mN/m yüzey basıncında tekrar minimum değere inmektedir. Bunun nedeni karışımların kollaps basınçlarının 55 mN/m civarı olmasından kaynaklanmaktadır.



**Şekil 148.** DSPC:PEG40St:DSPS karışımlarının sıkıştırılabilirlik değerlerinin yüzey basıncıyla değişimi

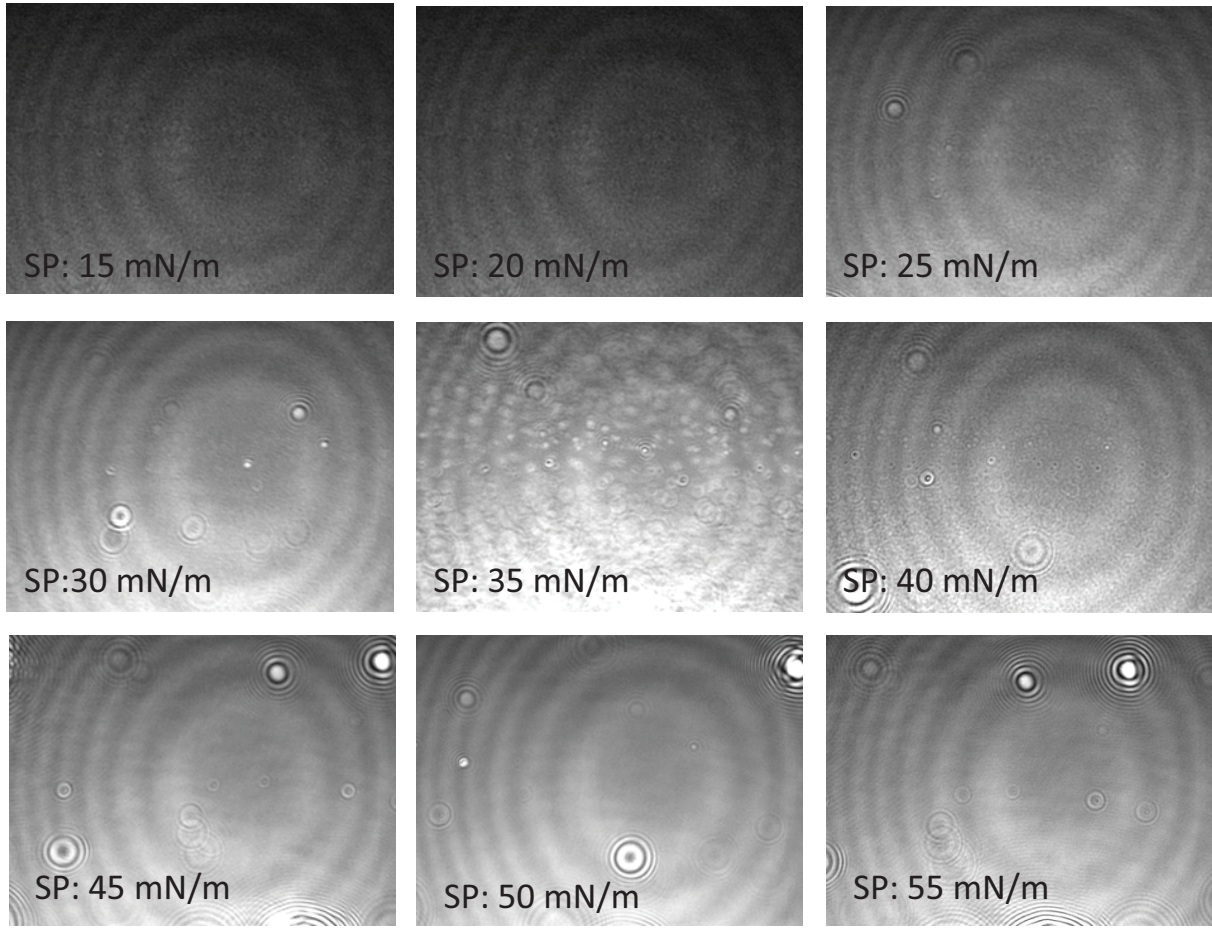
DSPS'nin saf halinin ve karışımların faz davranışlarını hakkında bilgi edinebilmek amacı ile 20 °C'de hava-su ara yüzeyinde Brewster açısı mikroskobu ile moleküler düzeyde görüntüler alınmıştır. Alınan görüntüler, DSPC, PEG40St ve DSPS moleküllerinin homojen yapıda bir monotabaka oluşturup oluşturmayacağı hakkında ve farklı yüzey basınçlarındaki faz davranışları hakkında bilgi vermektedir. Hava-su ara yüzeyinde 20 °C'de DS

molekölünün başlangıçtan kollapsına kadar alınan BAM görüntüleri Şekil 149'te görölmektedir. 0 mN/m'de iki boyutlu gaz ve genişletilmiş-sıvı fazları bir arada görölmektedir. Yüzey basıncının artmaya başlayıp molekülün kondens faza geçmesiyle birlikte görüntü homojenleşmiştir. Parlak yüzey, kondens ve kalın bir filmin oluştuğunu göstermektedir. Ancak 20 mN/m yüzey basıncından itibaren tekrar faz ayrımları gözlenmeye başlanmıştır. 30mN/m yüzey basıncında olduğu gibi yer yer kalın beyaz tabakalar halinde domainler görölmüştür. İzotermle uyumlu bir şekilde, 55mN/m yüzey basıncından itibaren DSPS'nin kollaps olduğu görölmektedir.



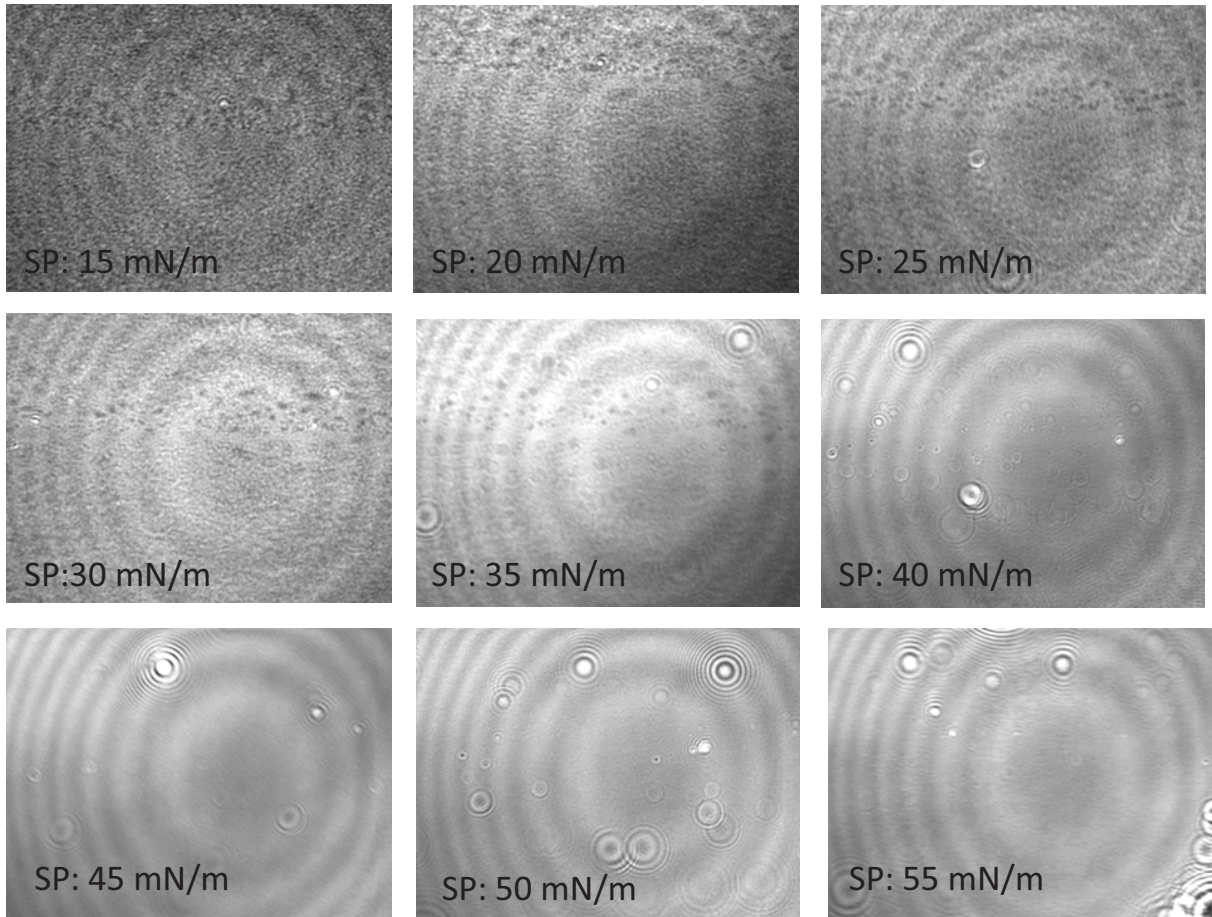
Şekil 149. Saf DSPS molekülünün hava – su ara yüzeyindeki BAM görüntüleri

DSPC:PEG40St:DSPS 0:5:5 Karışımının BAM Görüntüleri Şekil 150’de görüldüğü gibi genişletilmiş sıvı fazını temsil eden koyu renkli görüntüler vermiştir. Şekil 147’de görülmekte olan termodinamik analiz sonuçlarında da PEG40St ve DSPS molekülleri arasında itme kuvvetleri dominanttır. Dolayısıyla elde edilen görüntüler termodinamik analiz sonuçlarıyla uyumluluk göstermektedir. Yaklaşık 30-55 mN/m arası yüzey basınçlarında saf DSPS görüntülerine benzer görüntüler elde edildiği görülmektedir.



**Şekil 150.** DSPC:PEG40St:DSPS 0:5:5 karışımının hava – su ara yüzeyindeki BAM görüntüleri

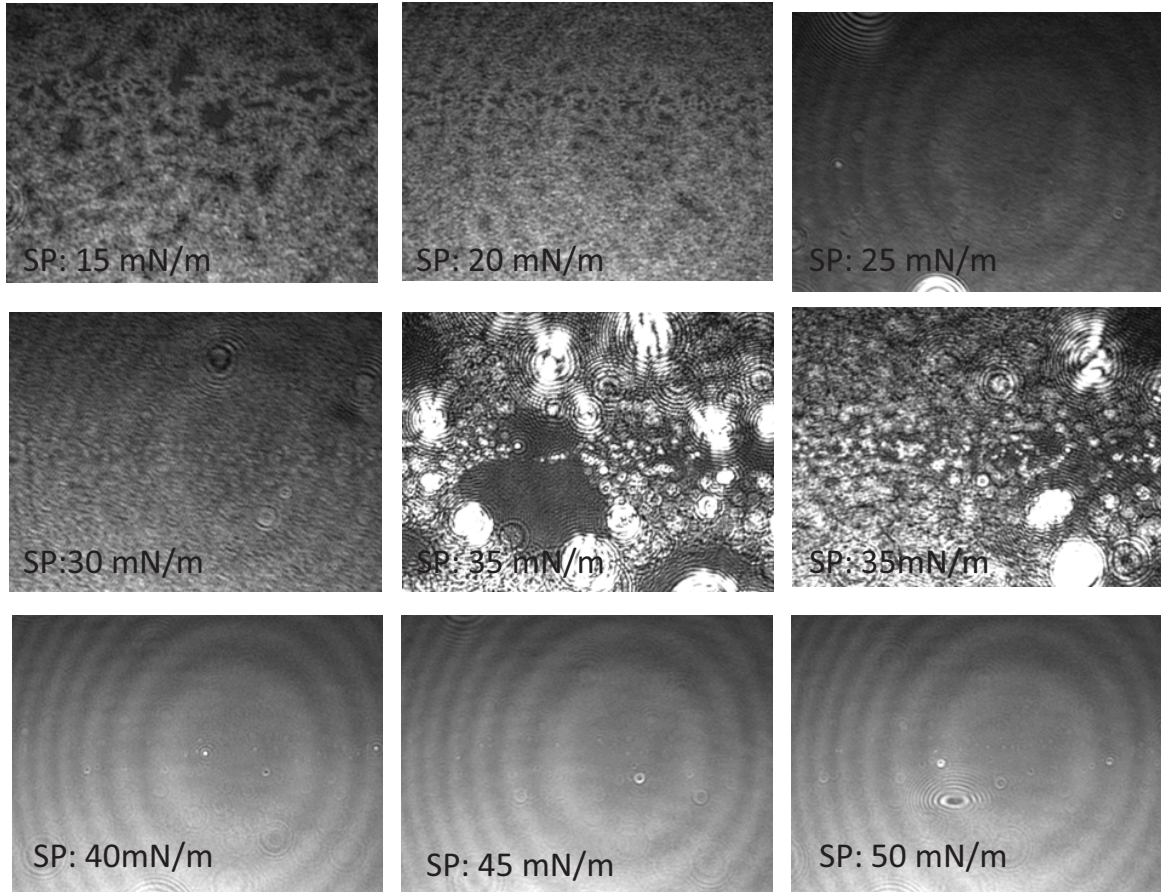
2:5:3 DSPC:PEG40St:DSPS karışımında Şekil 151’de görüldüğü gibi sıkışık fazın genişletilmiş faz içinde dağıldığı görülmektedir. 5:5 DSPC:PEG40St karışımının BAM görüntüsü ile karşılaştırıldığında (Şekil 26) düşük yüzey basınçlarında kısmen daha az faz farkı olduğu görülmektedir. DSPC ve DSPS arasında hem iyonik etkileşimlerin hem de hidrojen bağının bulunmasından dolayı, DSPC ve DSPS’den oluşacak karışımın BAM görüntülerinin homojen olması beklenmektedir. Bu nedenle Şekil 151’da görülen faz ayrımlarının DSPS ile karışmayan ve genişletilmiş yapıda olan PEG40St molekülünden kaynaklandığı düşünülmektedir. 35 mN/m yüzey basıncında alınan görüntüde, DSPC ve PEG40St’ın birbirleriyle etkileşmesi nedeniyle 0:5:5 karışımında olduğu kadar belirgin bir değişim olmamıştır. Ancak yüzey diğer görüntülere göre daha parlaktır ve daha sonra homojenleşmektedir. 50 mN/m yüzey basıncından sonra kollapşe yaklaşılması nedeniyle yüzeyde parlak domainler gözlemlenmiştir.



**Şekil 151.** 2:5:3 DSPC:PEG40St:DSPS karışımının hava-su ara yüzeyindeki BAM görüntüleri



Şekil 152’de görüldüğü gibi 4:5:1 DSPC:PEG40St:DSPS karışımı 25 mN/m yüzey basıncına kadar homojen bir görüntü vermemiştir. Ancak, yinede 5:5 DSPC:PEG40St karışımının BAM görüntüsü ile karşılaştırıldığında (Şekil 26) kısmen daha az faz farkı olduğu görülmektedir. Yüzey basıncının yaklaşık olarak 35 mN/m olarak bir süre sabit kaldığı plato bölgesinde Şekil 152’de görüldüğü gibi yüzeyde kollapsı andıran oldukça parlak, katı fazda domainler gözlemlenmiştir. Ancak yüzey basıncının 35.5 mN/m yükselmesinden itibaren alınan görüntülerin homojen olduğu görülmektedir. Burada, PEG zincirlerinin konformasyon değişimine uğraması nedeniyle daha sıkışık bir fazın oluşma durumu söz konusu olabileceği gibi, PEG40St’nin yüzeyden ayrılması söz konusu olabilir. Ancak, mikroköpükçüklerle elde edilen sonuçlar konformasyon değişiminin daha olası olduğunu göstermektedir. Zira, 5:5:0 ve 4:5:1 DSPC:PEG40St:DSPS mikroköpükçükleri karşılaştırıldığında DSPPS varlığında elde edilen mikroköpükçüklerin daha küçük boyut dağılımına sahip olduğunu göstermektedir ki, bu da PEG40St’in monotabakada kaldığına işaret etmektedir.



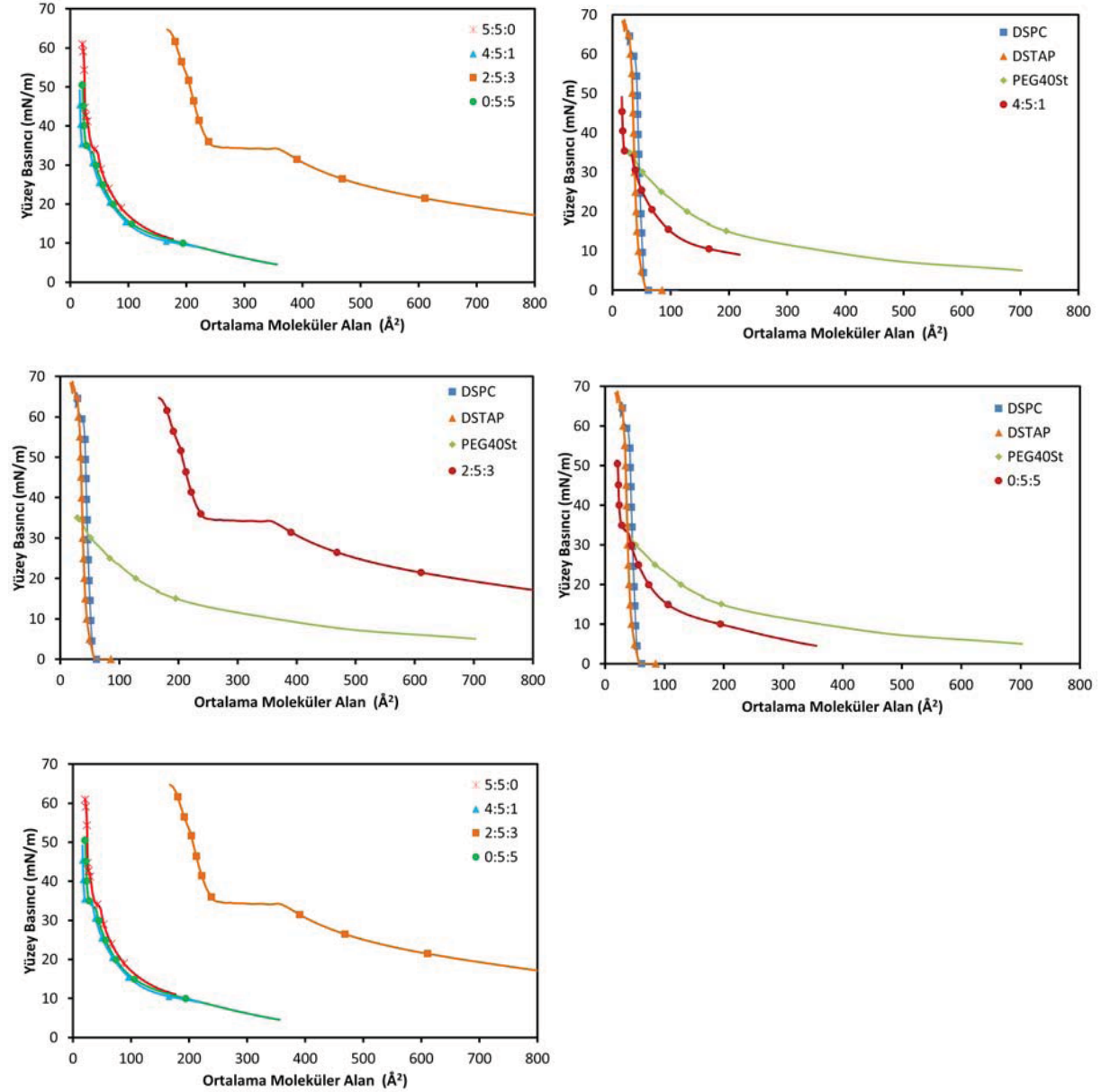
**Şekil 152.** 4:5:1 DSPC:PEG40St:DSPPS karışımının hava-su ara yüzeyindeki BAM görüntüleri

## *DSPC:PEG40St:DSTAP Üçlü Karışımlarının Yüzey Basıncı-Moleküler Alan İzotermi ve Brewster Açısı Mikroskop Görüntüleri*

DSTAP vücudun optimum bağışıklık sistemine yanıt verdiği katyonik bir lipittir. İyonik bir lipit olduğu için zwitteriyonik olan DSPC molekülüyle etkileşiminin mikroköpükçük zar yapısının stabilitesini etkileyeceği düşünülmektedir. DSPC ve DSTAP kimyasal yapısı oldukça benzerdir. DSTAP'da sadece fosfat grubu yoktur. Bu çalışmada, DSPC:PEG40St karışımına DSTAP ilavesi ile monotabakanın üzerinde oluşabilecek etkileri incelemek üzere, 0:5:5, 2:5:3 ve 4:5:1 molar oranlarındaki DSPC:PEG40St:DSTAP karışımları hazırlanarak, mikroköpükçük stabilitesine olabilecek etkileri araştırıldı. Şekil 153'de saf DSPC, PEG40St ve DSTAP ile DSPC:PEG40St:DSTAP karışımlarının izotermi görülmektedir. DSPC ile yalnızca polar grubu farklı olan DSTAP, polar grubundaki iyonik etkileşimlerden dolayı DSPC'ye kıyasla daha kondens bir yapı göstermektedir. Yaklaşık 50 Å<sup>2</sup>'lik alana kadar 0 mN/m yüzey basıncı veren DSTAP, daha sonra yüzey basıncının hızla artmasıyla birlikte kondens yapıya geçmektedir. Elde edilen izoterm aynı koşullarda yapılan literatür çalışmalarıyla uyumluluk göstermektedir (Moghaddam ve ark., 2011).

0:5:5 DSPC:PEG40St:DSTAP molar oranındaki karışımı yaklaşık 55 Å<sup>2</sup>'lik alana kadar yapısındaki PEG40St molekülünden dolayı iki boyutlu genişletilmiş-sıvı yapısı göstermiştir. Yaklaşık 35 mN/m yüzey basıncında ise kısa bir plato bölgesi gözlemlenmektedir. Daha sonra 0:5:5 karışımı kondens yapıya geçmiştir. 4:5:1 karışımının izotermi 0:5:5 karışımının izotermiyle yaklaşık olarak aynıdır. Bunun nedeni DSPC ve DSPS'nin saf izotermilerinin birbirlerine yakın olmasıdır. 2:5:3 karışımı, 0:5:5 ve 4:5:1 karışımlarına kıyasla oldukça farklı bir izoterm vermiştir. Şekil 153'de görüldüğü gibi 2:5:3 karışımı diğer karışımlara kıyasla daha büyük moleküler alanlarda yer almaktadır. Diğer üçlü karışımların incelenmesinden elde edilen tecrübelerle göre, izoterm sağı doğru kayması genel olarak daha az kondens bir filmin oluşması anlamında gelse, PEG40St gibi ara yüzeyde film oluşturması bir takım kriterlere bağlı olan moleküllerde, bu kanı doğru olmamaktadır. Bu nedenle izoterm ve analizlerinin dikkatli bir şekilde yapılması gerekmektedir. Bu nedenle, 2:5:3 karışımında izoterm sağı kayması daha az sıkışık bir fazın oluşması anlamına gelebileceği gibi, daha az miktarda PEG40St'ın yüzeyden ayrılmasının bir sonucu da olabilir. İzotermde gözlenen plato bölgesi, PEG zincirleri arasındaki konformasyon değişimine atfedilmektedir ve 2:5:3 karışımında daha uzun bir plato

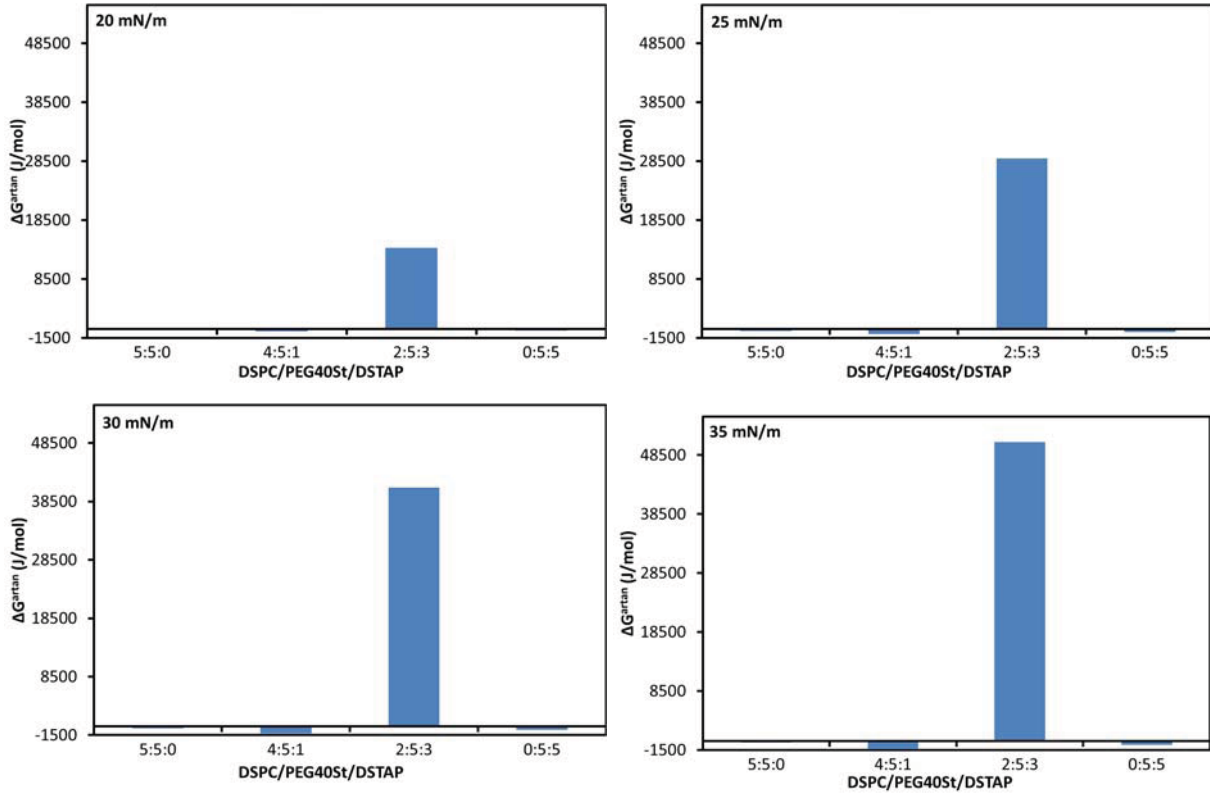
gözlenmesi daha çok PEG'li bileşenin monotabakada yer aldığını gösterebilir. Bu durumda, mikroköpükçük yüzeyinde eğimin artması, dolayısıyla daha küçük mikroköpükçük oluşumuna sebep olması beklenilmektedir.



**Şekil 153.** DSPC:PEG40St:DSTAP 'ın saf ve 0:5:5, 2:5:3 ve 4:5:1 molar oranlarında karışımlarının yüzey basıncına karşılık ortalama moleküler alan izotermi

Şekil 154'te DSPC:PEG40St:DSTAP karışımlarının 20, 25, 30, 35 mN/m yüzey basınçlarında artan Gibbs serbest enerjilerinin kıyaslanması görülmektedir. Artan yüzey basıncıyla birlikte 0:5:5 ve 4:5:1 karışımlarının Gibbs serbest enerji değerleri çekme

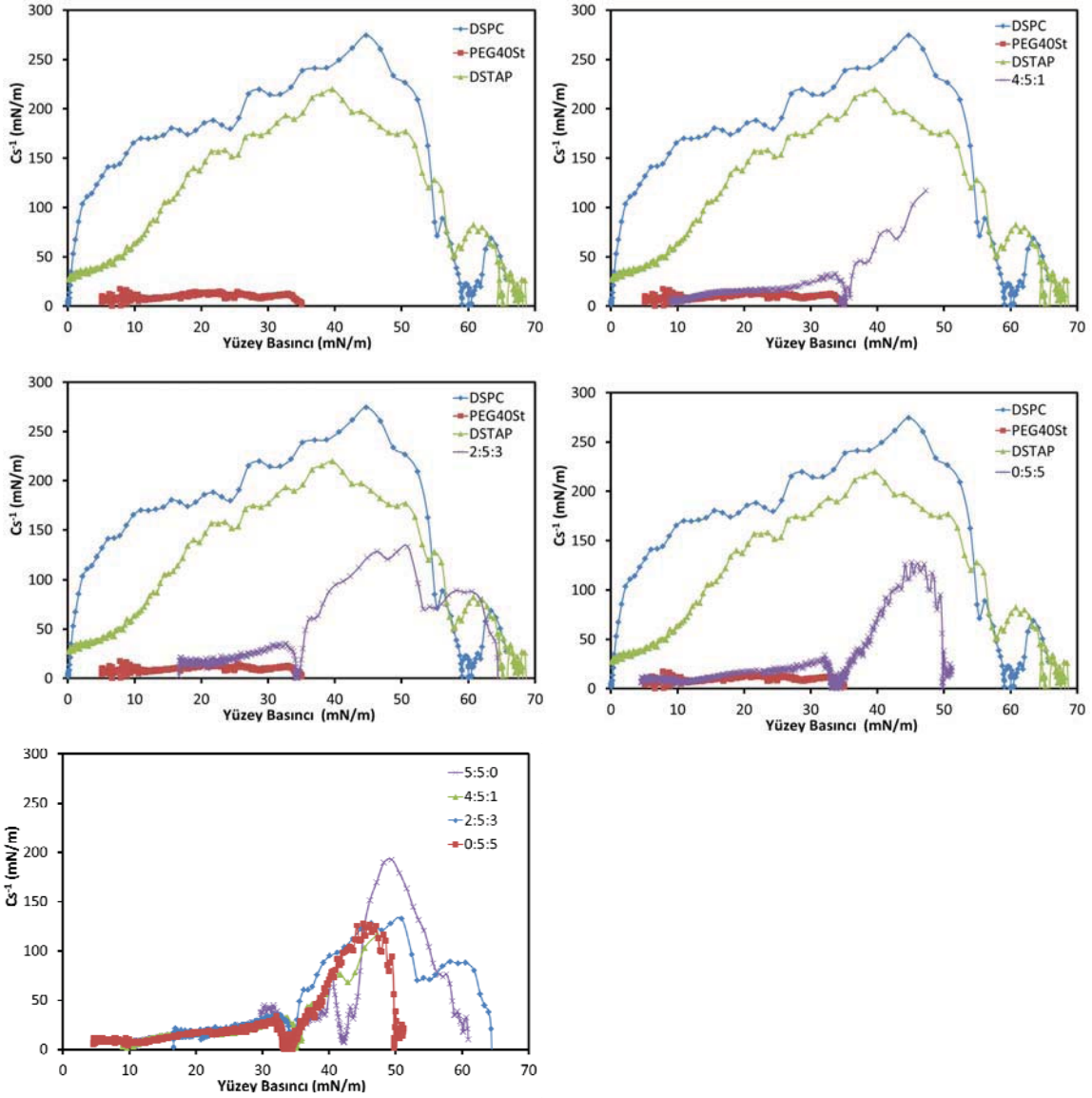
kuvvetlerinin de artması nedeniyle daha negatife giderken 2:5:3 karışımında moleküller arası itme kuvvetlerinin artması nedeniye artmıştır.



**Şekil 154.** Farklı yüzey basınçlarında DSPC:PEG40St:DSTAP karışımlarının artan Gibbs serbest enerjilerinin karşılaştırılması

Karışımların oluşturduğu monotabakaların sıkıştırılabilirlik modülü değerlerinin yüzey basıncıyla değişimi Şekil 155'te görülmektedir. DSTAP, Şekil 153'de görülen izoterminden de anlaşıldığı gibi DSPC'ye kıyasla daha kondens bir yapı göstermesine rağmen sıkıştırılabilirlik modülü değeri DSPC'den daha düşüktür. Bu, daha elastik bir film tabakası oluşturduğu anlamına gelmektedir. Karışımların sıkıştırılabilirlik modülü değerine karşılık yüzey basıncı grafiklerine bakıldığında üç karışımında da plato bölgelerinin görüldüğü 34-35mN/m civarı yüzey basınçlarında eğimin sıfıra gitmesi nedeniyle minimum değerler görülmüştür. Minimum noktalarına ulaşıncaya kadar üç karışımın da elastisiteleri benzerdir. Ancak daha sonraki yüzey basınçlarında farklılık göstermeye başlamıştır. 40-50 mN/m yüzey basınçları arasında üç karışımın da sıkıştırılabilirlik değerleri 120-125 mN/m değerlerine kadar artmıştır. Daha sonra 0:5:5 ve 4:5:1 karışımlarının sıkıştırılabilirlik modülü değerleri

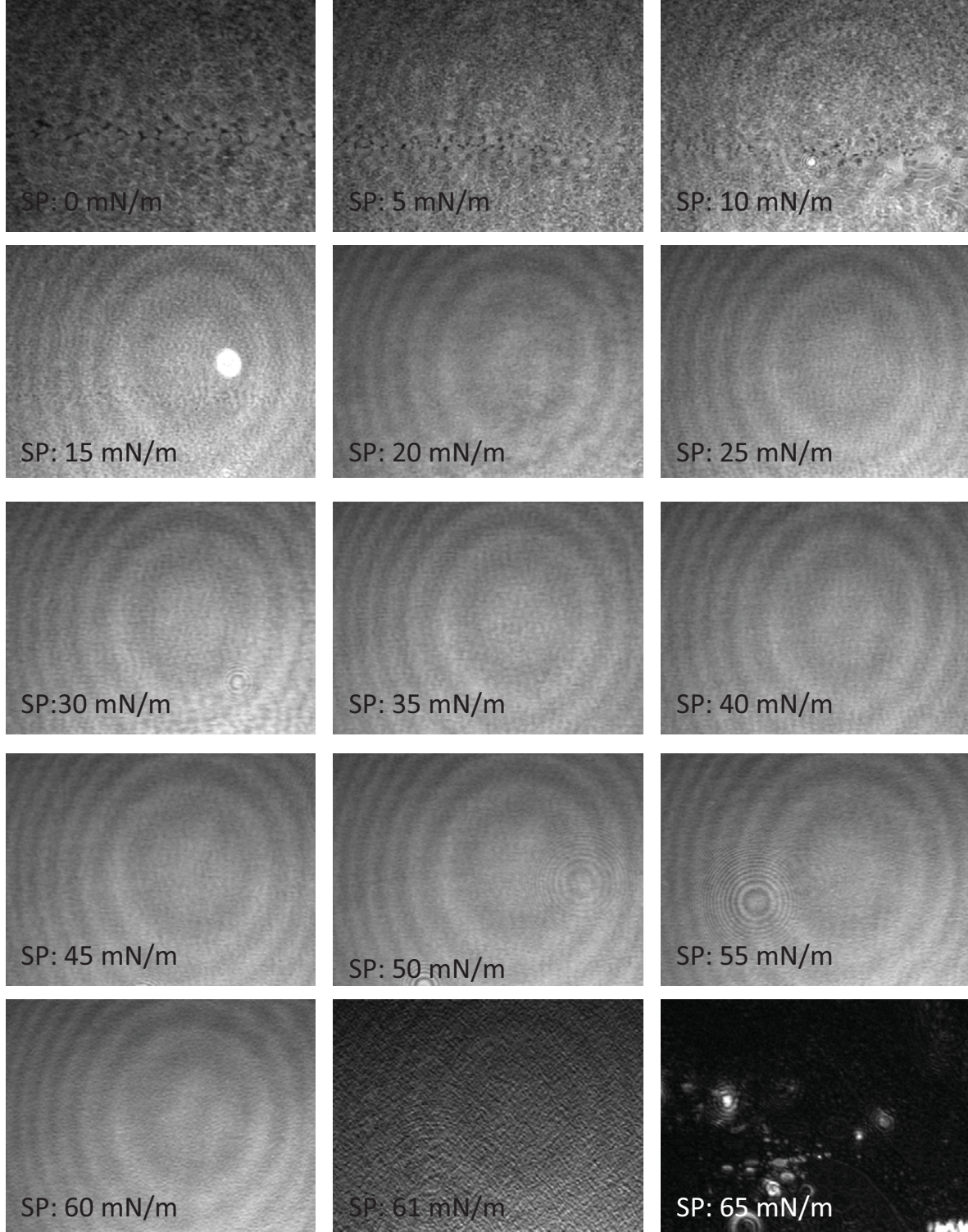
hızla düşerken, 2:5:3 karışımında sıkıştırılabilirlik değerinin daha yüksek yüzey basınçlarında düşmeye başladığı görülmektedir.



**Şekil 155.** DSPC:PEG40St:DSTAP karışımlarının sıkıştırılabilirlik değerlerinin yüzey basıncıyla değişimi

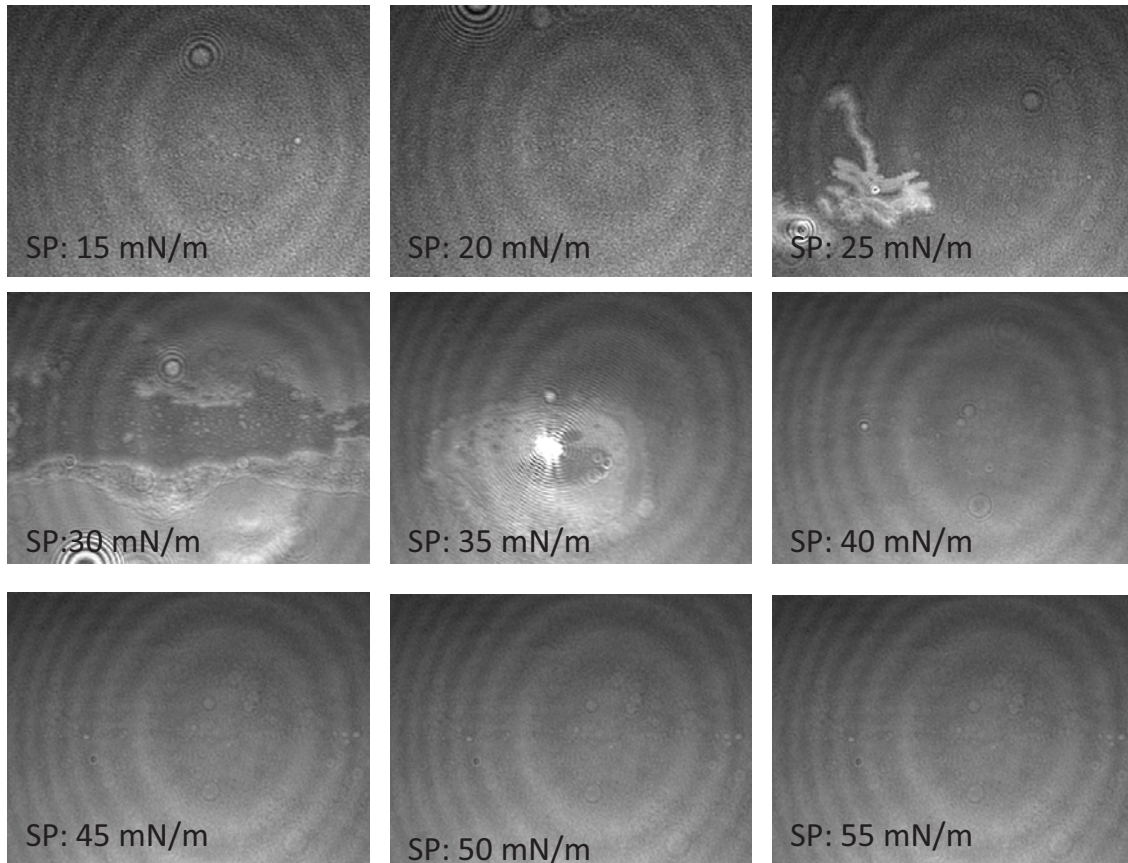
Şekil 156'te görüldüğü gibi DSTAP, DSPC'ye oldukça benzer görüntü vermektedir (Şekil 20). Ancak, DSPC ile elde edilen görüntünün daha parlak olması, oluşan filmin daha kalın bir tabaka olmasından kaynaklanabilir. DSPC'nin zwitterionik karakterde olmasından

dolayı hava-su arayüzeyinde zig-zag olarak organize olmaları ve bu nedenle daha kalın bir film tabakası oluşturması muhtemeldir.



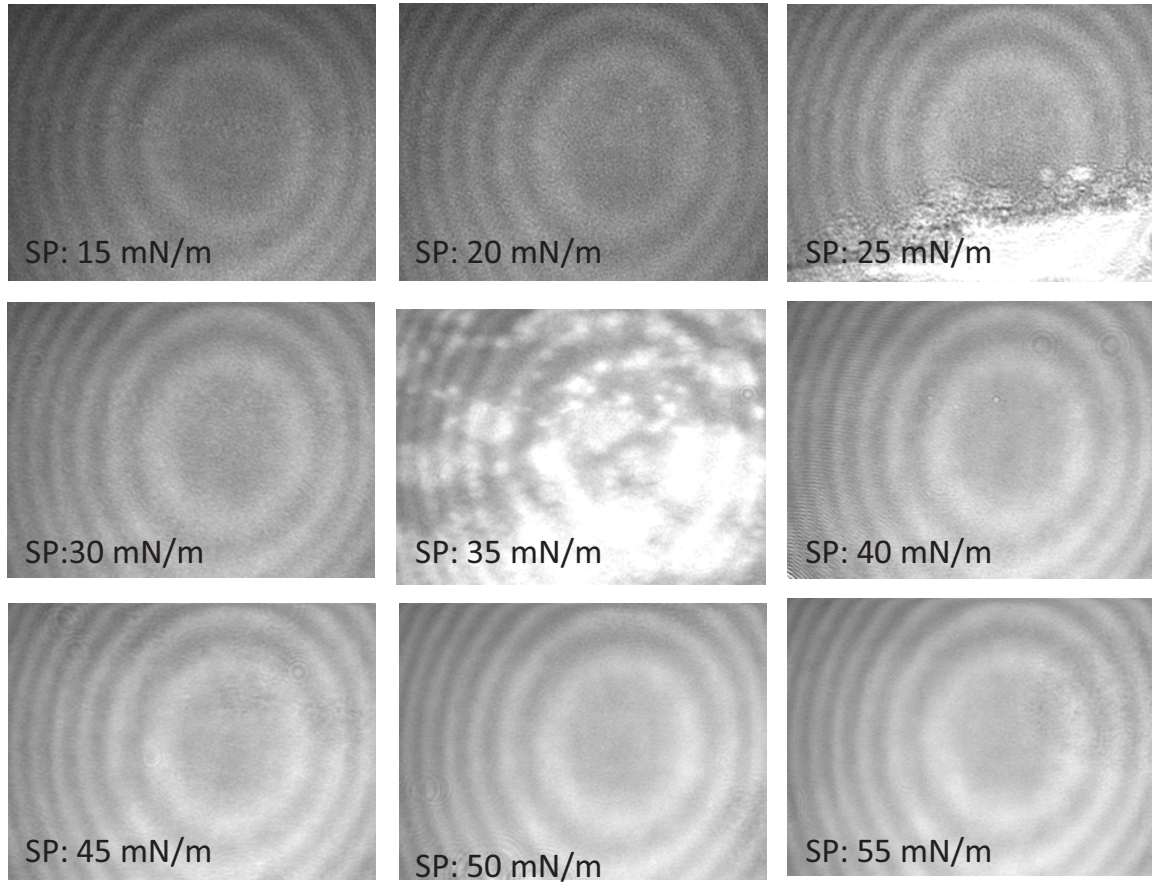
**Şekil 156.** Saf DSTAP molekülünün hava-su ara yüzeyindeki BAM görüntüleri

DSPC ve DSTAP çok benzer moleküller olmasına karşın, fosfat grubu farkı nedeniyle 5:5 DSPC:PEG40St (Şekil 26) ve Şekil 155'te verilen 5:5 DSTAP:PEG40St karışımları için elde edilen BAM görüntüleri aynı değildir. Bu durum, BAM'ın moleküler farklılıkları ve etkileşimleri test etmede etkin bir yöntem olduğunu göstermektedir. 40 mN/m'ye kadar alınan görüntülerde genişletilmiş-sıvı fazı ve kondens fazlar bir arada görülmektedir ve oluşan domainler daha büyüktür. 5:5 DSPC:PEG40St karışımında küçük domain oluşumları gözlemlenmesine karşın, 5:5 DSTAP:PEG40St karışımında 40 mN/m yüzey basıncından itibaren alınan görüntüler homojendir. Bu sonuç, 5:5 DSTAP:PEG40St izotermine 40-42 mN/m'de ikinci bir plato gözlemlenmemiş olması (5:5 DSPC:PEG40St karışımında olduğu gibi) ile uyum içindedir. Konformasyon değişimine tekabül eden faz geçişlerinde BAM görüntüsünde de bir değişim oluşmaktadır. Bu sonuçlardan, DSTAP ilavesinin DSPC:PEG40St filminin faz davranışlarını pozitif yönde etkilemediği ve mikroköpükçük stabilitesine pozitif katkı sağlayamayacağı çıkarımı yapılabilir.



**Şekil 157.** 0:5:5 DSPC:PEG40St:DSTAP karışımının hava-su ara yüzeyindeki BAM görüntüleri

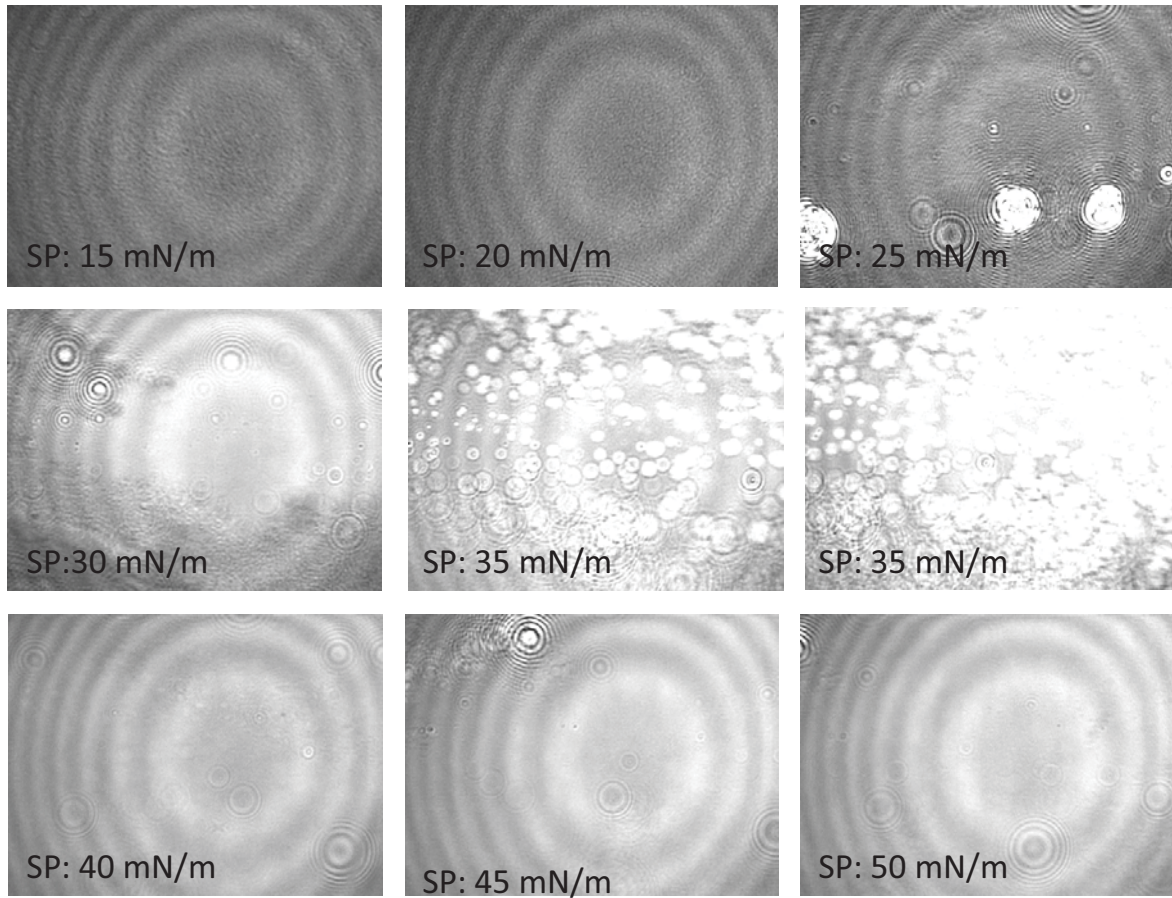
2:5:3 DSPC:PEG40St:DSTAP karışımının BAM görüntüleri Şekil 158'de görülmektedir. Şekil 153'deki izotermide 35 mN/m yüzey basıncında uzun bir plato bölgesi gösteren 2:5:3 karışımı, bu bölge boyunca farklı ortalama moleküler alanlarda Şekil 158'de 35mN/m yüzey basıncının görüntüsüne benzer görüntüler vermiştir. Plato bölgesi boyunca alınan görüntülerde yüzeyde kalın tabakalar halinde parlamalar görülmektedir. Daha öncede bahsedildiği gibi, 2:5:3 izotermine diğerlerine kıyasla daha sağda olması daha az sıkışık olduğu anlamına gelmemektedir. Plato bölgesinin de uzun olması, 35 mN/m yüzey basıncı civarında PEG zincirleri arasında sterik etkileşim nedeni ile konfigürasyon değişimi olduğunu göstermektedir. Bu durumda, DSPC:PEG40St:DSTAP karışımları içerisinde en az PEG40St kaybı 2:5:3 karışımında olmaktadır. Bunun mikroköpükçük stabilitesinde olumlu yönde etkilemesi beklenmektedir. 2:5:3 karışımının izotermide ikinci bir plato gözlemlenmemiş olması ile uyumlu olarak, yaklaşık 36mN/m yüzey basıncından itibaren parlak domainler kaybolmuştur ve görüntü homojenleşmiştir.



**Şekil 158.** 2:5:3 DSPC:PEG40St:DSTAP karışımının hava-su ara yüzeyindeki BAM görüntüleri



4:5:1 DSPC:PEG40St:DSTAP karışımının BAM görüntüleri, Şekil 159'de görüldüğü gibi, çoğunlukla homojen değildir. Her ne kadar 5:5 DSPC:PEG40St karışımına ait BAM görüntüsü ile kıyaslandığında (Şekil 26), %10 DSTAP ilavesi ile homojenlik artırılacağı kanaatine varılsada, 4:5:1 karışımına ait izotermde plato bölgesinin kısalması (Şekil 153), bir kısım PEG40St moleküllerinin yüzeyden ayrılmış olabileceğini akıllara getirmektedir. Zaten DSPC'ye göre daha elastik bir film oluşturan DSTAP'nin (Şekil 155), PEG40St'ın yüzeyde kalarak sıkışık bir monotabaka oluşturmasında pozitif bir rol oynamayabilir. Plato bölgesinin görüldüğü 35 mN/m yüzey basıncında kalın parlak tabakalar görülmektedir. Bu bölgelerde PEG40St'ın lokal kollapsı muhtemeldir. Bu sonuçlar, 4:5:1 karışımında PEG40St'nın monotabaka oluşumunda yer almadığı anlamına gelebilir. Bu durumda, daha az eğimli bir mikroköpükçük yüzeyinin oluşması ve dolayısıyla daha büyük boyutlarda mikroköpükçüklerin oluşması beklenen bir durum olmaktadır. Üstelik, %10 DSTAP ilavesi ile mikroköpükçük stabilitesinde olumsuz yönde etkilenmesi söz konusunun olabileceği değerlendirilebilir.

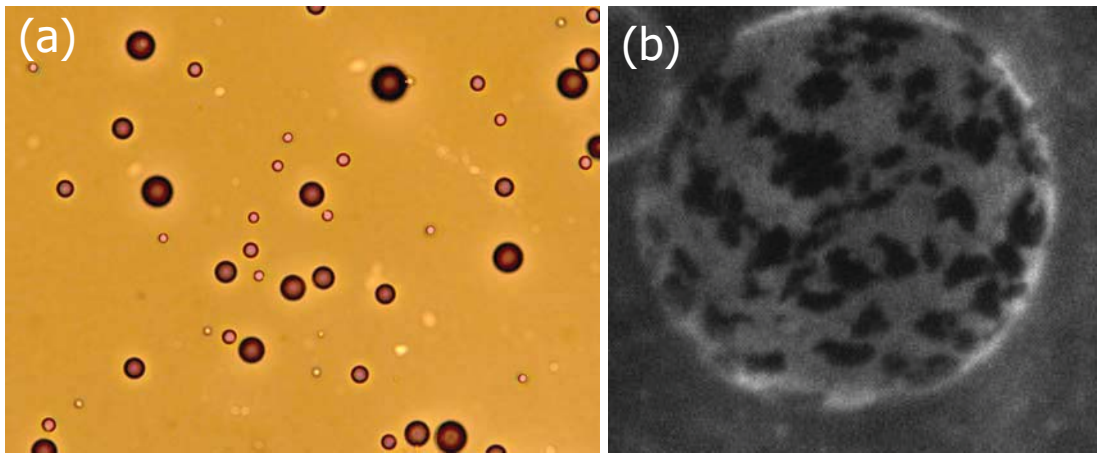


**Şekil 159.** 4:5:1 DSPC:PEG40St:DSTAP karışımının hava-su ara yüzeyindeki BAM görüntüleri

Nitekim, literatürde yapılan bir çalışmada, PEG40St molar oranı sabit 0.1 olarak sabit tutulurken DSPC ve DSTAP molar oranları değiştirilerek yapılan mikroköpükçüklerde, DSTAP molar oranı arttıkça mikroköpükçük boyutunun büyüdüğü ve mikroköpükçük üretim veriminin düştüğü görülmüştür (Borden ve ark., 2007). Bu sonuç, DSPC:PEG40St:DSTAP üçlü karışımları ile yapılan iki boyutlu çalışma sonuçlarını doğrulamaktadır. Proje kapsamında çalışılan lipid karışımları ile literatürde bilgimiz dahilinde mikroköpükçük üretimi ve karakterizasyonu mevcut değildir. Yukarıda bahsedilen %10 DSTAP içeren mikroköpükçüklerle yapılan çalışmanın sonuçları, LB izotermelerinden ve BAM görüntülerinden elde edilen sonuçlardan, mikroköpükçük stabilitesine ilişkin çıkarımlar yapılabileceğinin bir kanıtıdır.

#### 4.2. Mikroköpükçüklerin Üretimi ve Karakterizasyonu

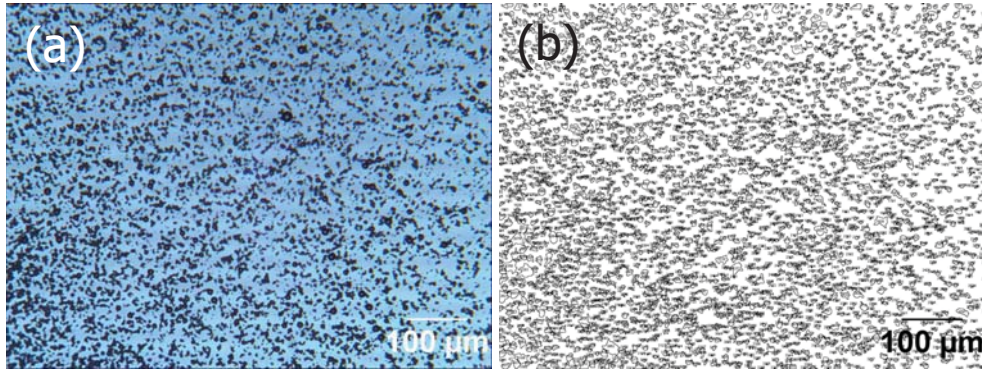
Mikroköpükçükler belli formulasyonlarda üretilmiş ve karakterizasyonları yapılmıştır. Mikroköpükçüklerin optik mikroskop ve konfokal mikroskop altında görüntüleri Şekil 160'da gösterilmektedir. Optik mikroskop ile yaklaşık 8 µm çapında küre formunda bulunan mikroköpükçükler, aslında konfokal mikroskop görüntülerinde belirlediği üzere, yapı itibari ile lipidçe yoğun ve emülsifiyerce yoğun bölgelerden oluşmaktadır.



**Şekil 160.** Üretilen mikroköpükçüklerin (a) optik mikroskop ve (b) konfokal mikroskop görüntüleri.

Mikroköpükçükler, Coulter Counter sayacı, Dinamik Işık Saçılması, ya da optik mikroskop yöntemleriyle sayıları ve boyut dağılımları belirlenebilir. Ancak,

mikroköpükçükler içleri gaz dolu lipid zar yapılarında küreciklerden oluştuğundan yoğunlukları çok düşüktür. Bu durumda, mikroköpükçükler sıvı içerisinde hemen yüzeye yükselerek homojen bir dağılım yapamamakta, dolayısıyla Coulter Counter ve Dinamik Işık Saçılması yöntemlerinde hatalara sebebiyet vermektedirler. Bu çalışmada, optik mikroskop yöntemi kullanılmış, mikroköpükçüklerin sayıca miktarları ve boyut dağılımları ImageJ programı ile analiz edilmiştir. Ancak, optik mikroskop yönteminde verilerin doğru ve tekrarlanabilir olması için yeniden optimize edilmesi gerekmiştir. Şekil 161’de mikroköpükçüklerin optik mikroskop altındaki dijital görüntüsü ve ImageJ programı ile analizi görülmektedir.

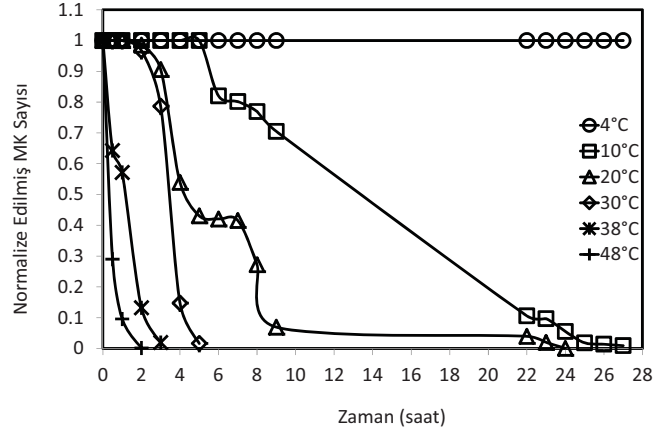


**Şekil 161.** Mikroköpükçüklerin (a) optik mikroskop görüntüleri ve (b) ImageJ yazılımı ile analizi

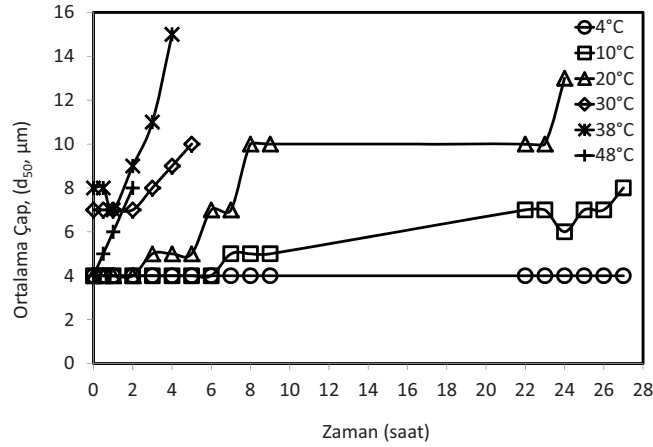
#### **4.2.1. Sıcaklığın Mikroköpükçük Stabilitesine Olan Etkisi:**

Bu bölümde sıcaklık etkisinin mikroköpükçük stabilitesine olan etkisi incelenmiştir. Bu amaçla 9:1 molar oranındaki DSPC:PEG40St karışımı ile üretilen mikroköpükçüklerin stabiliteyi 4°C, 10°C, 20°C, 30°C, 38°C ve 48°C’de test edilmiştir. Mikroköpükçük popülasyonunun bu sıcaklıklardaki davranışlarını anlamak için sayılarındaki ve boyutlarındaki değişimler zamana karşı incelenmiştir. Farklı sıcaklıklarda mikroköpükçük popülasyonundaki değişim Şekil 162’de verilmektedir. Mikroköpükçüklerin sayıları 4°C’de (saklama koşulu) günlerce sabit kalabilmiştir. Sıcaklık arttıkça mikroköpükçük sayısının sabit kaldığı süre de kısalmıştır. Bununla birlikte sıcaklığın artışı mikroköpükçük boyutunda büyümeye yol açmıştır (Şekil 163). Mikroköpükçük boyutundaki artış ve sayıdaki düşüş

48°C’de daha fazla görülmüştür. Bu hızlı değişimin mikroköpükçüklerin ani sıcaklık artışına maruz bırakılmasının monotabakada moleküler seviyede değişime sebep olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Aynı zamanda, sıcaklıkla birlikte ortamdaki küçük mikroköpükçükler daha çabuk bozunurken, geriye daha büyük mikroköpükçükler kalmış da olabilir.



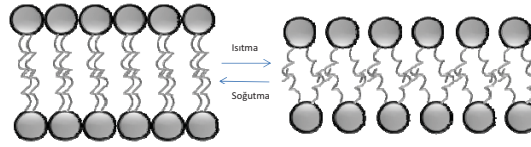
**Şekil 162.** Molar oranı 9:1 olan DSPC:PEG40St karışımları ile üretilmiş mikroköpükçüklerin farklı sıcaklıklardaki zamanla sayılarındaki değişimleri.



**Şekil 163.** Molar oranı 9:1 olan DSPC:PEG40St karışımları ile üretilmiş mikroköpükçüklerin farklı sıcaklıklardaki zamanla boyutlarındaki değişimler

Bir mikroköpükçüğün stabil kalması için lipidten oluşan tek katlı zarın tamamen sıkı bir yapı oluşturması ve bu yapının gaz geçirgenliğini engellemesi gerektiği düşünülmektedir (Borden ve Longo, 2002; Pu ve ark., 2005). Şekil 162 ve Şekil 163’de, mikroköpükçüklerin

sayı ve boyutlarını 20°C’de 2 saat koruduğunu görülmektedir. Fakat daha yüksek sıcaklıklarda özellikle 38 °C’de mikroköpükçükler sayılarını 30 dakikadan daha kısa sürede yitirmektedirler. Mikroköpükçük içerisindeki gazın etrafını saran tek katlı zarın gaz geçirgenliğini minimum seviyeye indirerek stabiliteyi sağladığı bilinmektedir. Literatürde yapılan bir çalışmalar, sıcaklık artışının fosfolipid tabakasının kalınlığını azalttığı ve lipid moleküllerinin daha geniş moleküler alanlara doğru kaydığını göstermiştir (Şekil 164) (Petrache ve ark., 2000).



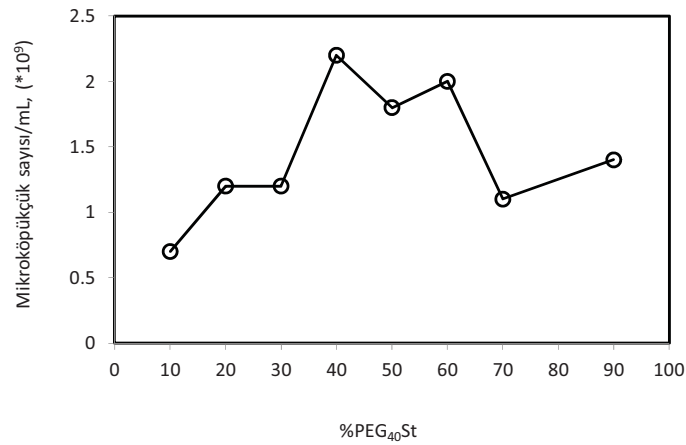
**Şekil 164.** Fosfolipidler arasındaki uzaklığın sıcaklık ile artışı gösteren şematik çizim.

Buradan, sıcaklık artışı ile mikroköpükçüklerin sayı ve boyutlarındaki değişimler mikroköpükçük zar yapısının sıcaklığa bağlı olarak düzensiz bir yapıya geçmesinden ve monotabakanın kalınlığının azalmasına bağlı olarak gaz geçirgenliğinin artmasından kaynaklandığı anlaşılmaktadır. Elde edilen sonuçlar, mikroköpükçüklerin sayı ve boyutlarının 4 °C’da hemen hemen sabit kaldığı, ancak sıcaklıkla orantılı olarak değiştiği anlaşılmaktadır. Mikroköpükçüklerin stabilitealarının 4 °C’da yapılması çalışmanın süresi de dikkate alındığında pek isabetli bir yaklaşım olmamıştır. Ancak, mikroköpükçüklerin stabilitesinin yüksek sıcaklıklarda, örneğin vücut sıcaklığı değerlerinde, 38 °C’de, yapılması, farklı özelliklerdeki mikroköpükçüklerin stabilitealarının test edilmesi daha uygun bulunmuştur. Ayrıca, mikroköpükçükler genellikle oda koşullarında, 22 °C’da, hazırlanmakta, 4 °C’de saklanmaktadır. Fakat bu mikroköpükçüklerin asıl kullanımını vücut sıcaklığı olan 36.5 °C’de olmaktadır. Bu nedenle, mikroköpükçüklerin performanslarının vücut sıcaklığına yakın sıcaklıklarda test edilmesi önem arz etmektedir.

#### **4.2.2. PEG40St Miktarının Mikroköpükçük Stabilitesine Olan Etkisi:**

Literatürde, lipid kaplı mikroköpükçükler genellikle 9:1 oranında değişik uzunluklarda ve doyumlukta hidrokarbon zincirine bağlı PC baş grubu içeren lipid ve PEG40St kullanılarak üretilmektedir. Farklı PEG40St konsantrasyonlarında hazırlanmış mikroköpükçükler ile ilgili herhangi bir çalışma bilginiz dahilinde mevcut değildir. Bu

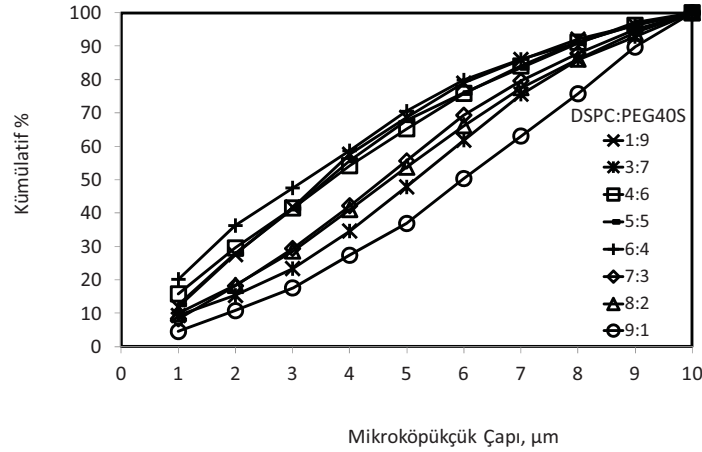
yüzden, bu çalışmada, PEG40St miktarının hava dolu mikroköpükçüklerin stabilitesine olan etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, mikroköpükçükler farklı molar oranlarında (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 1:9 and 0:10) DSPC ve PEG40St kullanılarak hazırlandı. Ancak, DSPC içermeyen sadece PEG40St içeren karışım ile (DSPC:PEG40St, 0:10) mikroköpükçük üretilmedi. Emülsifier miktarına bağlı olarak mikroköpükçük konsantrasyonundaki değişim Şekil 165’de verilmektedir. Şekilde görüldüğü gibi, mikroköpükçük verimliliği emulsifier konsantrasyonu arttıkça (%40’a kadar) artmıştır. PEG40St konsantrasyonundaki devam eden artış daha sonra 10  $\mu\text{m}$ ’den küçük mikroköpükçüklerin miktarında düşüşe sebep olmuştur. 10  $\mu\text{m}$ ’den küçük en yüksek mikroköpükçük sayısı %40 PEG40St ile elde edilmiştir. Kullanılan lipid miktarının azaltılması, ucuz olan emülsifier miktarının artırılması, ve verimliliğin artması aynı zamanda maliyetin de düşmesi anlamına gelmektedir.



**Şekil 165.** Emülsifier (PEG40St) miktarına bağlı olarak mikroköpükçük konsantrasyonundaki değişim.

Mikroköpükçük büyüklük dağılımları Şekil 166’te karşılaştırılmalı olarak verilmiştir. Bu dağılım PEG40St miktarının artması ile mikroköpükçük boyutunun kayda değer oranlarda küçüldüğünü göstermektedir. PEG40St molekülün hidrofilik kısmı hidrofobik kısmına göre daha büyüktür. Bu özellik PEG40St komponentine konik bir yapı kazandırmakta ve böylelikle sulu ortamda misel oluşumunu tetiklemektedir (Jebrail ve ark., 2008). Bu komponentin misel oluşumunu tetiklemesi tek katlı zardan oluşan yapıları (küçük boyuttaki mikroköpükçükler gibi) oluşturması anlamına gelmektedir (Dickey ve Faller, 2008). Bunun yanısıra, literatürlerde belirtildiği gibi, yüksek PEG40St konsantrasyonu ile mikroköpükçüklerin zar yapısındaki eğim en yüksek seviyeye çıkarılabilmekte, yani boyutları küçülmektedir (Hristova ve Needham, 1994; Jebrail ve ark., 2008; Kenworthy ve ark., 1995). Mikroköpükçükler

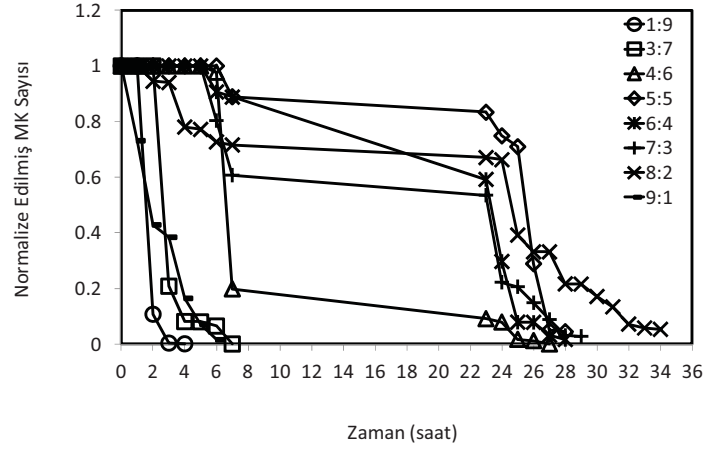
damar yolu ile kana enjekte edileceklerinden kapillerden geçebilecek büyüklüğe sahip olmaları gerekmektedir. Bu sebeplerden dolayı, küçük boyutlarda (8 µm ve altı) mikroköpükçük üretimi büyük önem taşımaktadır (Riess ve ark., 2003).



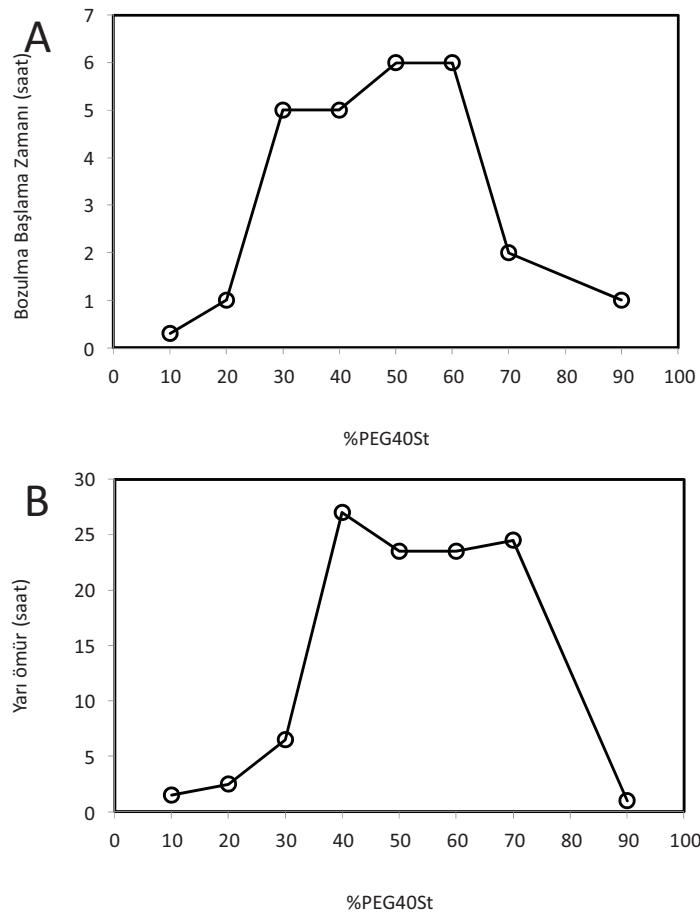
**Şekil 166.** Farklı molar oranlarındaki DSPC ve PEG40St karışımları ile üretilen mikroköpükçüklerin boyut dağılımları

Üretilen mikroköpükçük konsantrasyonlarının 38 °C’deki zamanla değişimleri Şekil 167’de verilmektedir. Sonuçlar normalize edilmiş sayılar olarak rapor edilmiştir. Normalize edilmiş mikroköpükçük sayıları, analiz anındaki mikroköpükçük sayısının ilk sayılan mikroköpükçük sayısına bölünmesi ile elde edilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi, mikroköpükçükler sayılarını kompozisyona bağlı olarak belirli bir zaman aralığında sabit tutabilmişlerdir. Bu zaman aralığı grafikte “Bozulma başlama zamanı” olarak belirtilmiştir. Belirtilen bu zaman aralığı sonrasında mikroköpükçük konsantrasyonları sürekli bir şekilde düşme göstermiştir. Mikroköpükçük sayılarının sabit kaldığı süreler karşılaştırmalı olarak Şekil 168-A’da gösterilmektedir. Grafikte belirtildiği gibi mikroköpükçük sayısının sabit kaldığı süre, PEG40St konsantrasyonunun %50-60’a kadar artırılması ile artış göstermiştir. PEG40St’nin daha fazla artırılması ise bu sürenin azalmasına yol açmıştır. PEG40St amfifilik bir molekül olduğundan hidrofobik ve hidrofilik uçlara sahiptir. PEG40St molekülü lipidlerden farklı olarak uzun hidrofilik uca sahiptir ve optimum miktarın üzerinde bulunmaları durumunda girintili-çıkıntılı (zig-zag) bir monotabakanın oluşumuna sebep olmaktadır ki, bu monotabakadan gaz geçirgenliğini artırıcı bir durum yaratmaktadır. Bu durumun şematik açıklaması Şekil 169’de gösterilmektedir. Bu çalışma, önceki yayınların aksine, %50 PEG40St kullanılmasının daha stabil mikroköpükçük üretilebileceğini ortaya koymuştur.

Şekil 168-B üretilen mikroköpükçüklerin yarı ömürlerinin PEG40St'in %50'ye kadar artırılması ile arttığını, PEG40St konsantrasyonunun bu yüzdenin üzerinde kullanıldığında yarı ömrü düşürdüğünü ortaya koymaktadır.

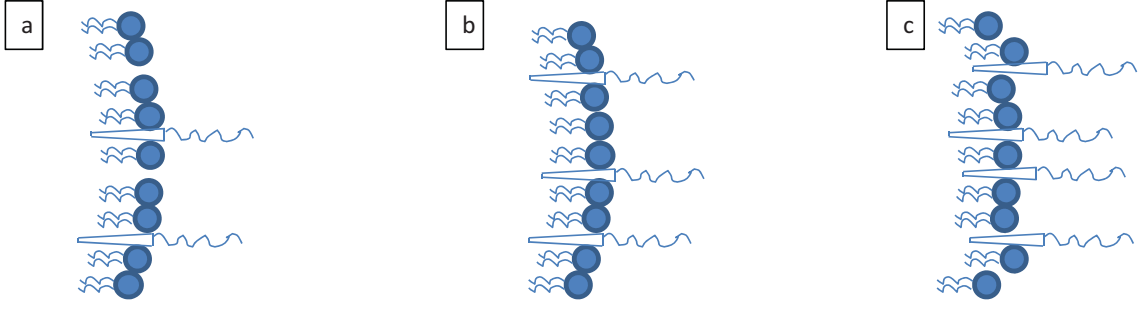


Şekil 167. DSPC:PEG40St karışımları ile üretilmiş mikroköpükçüklerin 38°C'deki zamanla sayılarındaki değişimler.



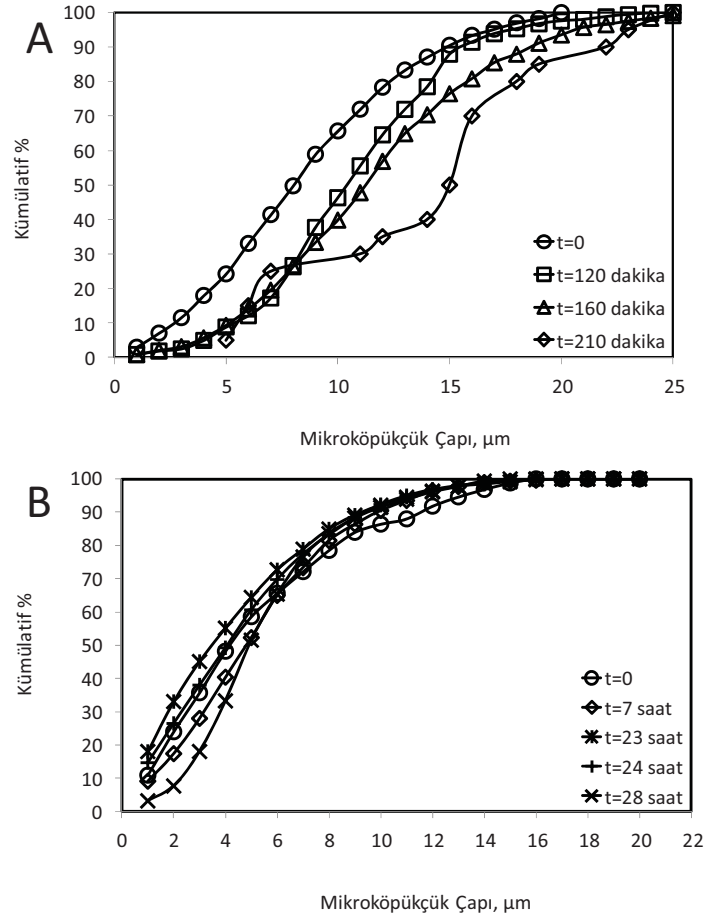
Şekil 168. Farklı molar oranlarındaki DSPC ve PEG40St karışımları ile üretilen mikroköpükçüklerin (A) sayısının sabit kaldığı süreler ve (B) yarı ömürleri.



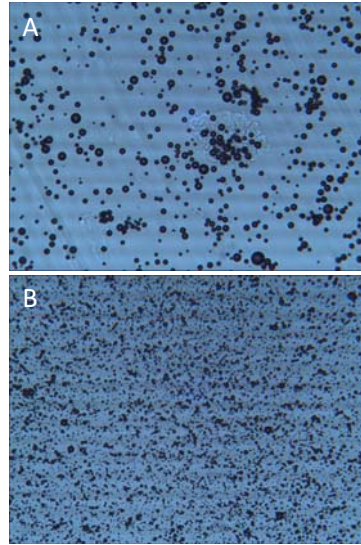


**Şekil 169.** Mikroköpükçük zar yapısında PEG<sub>40</sub>St miktarı (a) az olduğu (b) yeterli olduğu ve (c) fazla olduğu durumlar

Genellikle sonikasyonla çok geniş boyut dağılımında mikroköpükçükler üretilebilmektedir. Şekil 167 %50 PEG40St kullanımının stabil mikroköpükçük oluşumunu sağladığını göstermektedir. Bilindiği gibi PEG hidrofilik bir polimerdir ve suda çözünmesi hidrojen bağı sayesinde olmaktadır. Ancak, konvensiyel pek çok polimerin aksine, PEG'in suda çözünürlüğü sıcaklık arttıkça azalmaktadır. Bunun sebebi ise, çözünmeyi sağlayan hidrojen bağlarının sıcaklık etkisi ile zayıflamasıdır. İlk bölümdeki çalışmalarımızda da bahsettiğimiz gibi, PEG zincirleri sterik etkileşim sonucu “bazlama-mantar-fırça” şeklinde bir konfigürasyon değişimine gidebilmektedir (Glagola, 2012; Xie, 2009). %50 PEG40St içeren mikroköpükçüklerde lateral etkileşim sonucu PEG zincirlerinin konfigürasyon değişimine uğradığı ve böylece mikroköpükçük etrafında sterik bir bariyer oluşturarak mikroköpükçükler arası koagülasyonu engellediği ve stabiliteyi artırdığı düşünülmektedir. Mikroköpükçük boyutunun zamanla değişimine bakıldığında ise yine 5:5 mol oranında karıştırılan DSPC ve PEG40St komponentleri ile üretilen mikroköpükçüklerin boyutça konvensiyonel formulasyona göre (9:1) daha stabil mikroköpükçükler olduğu tespit edilmiştir (Şekil 170). Yapılan mikroskop incelemeleri ile, literatürde yaygın olarak kullanılan 9:1 formulasyonunun yüksek oranda mikroköpükçük aglomerasyonuna neden olduğu açıkça ortaya koyulmuştur (Şekil 171). Bu durumun düşük oranda kullanılan PEG40St miktarından dolayı PEG zincirlerinde konfigürasyon değişiminin mümkün olamamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.



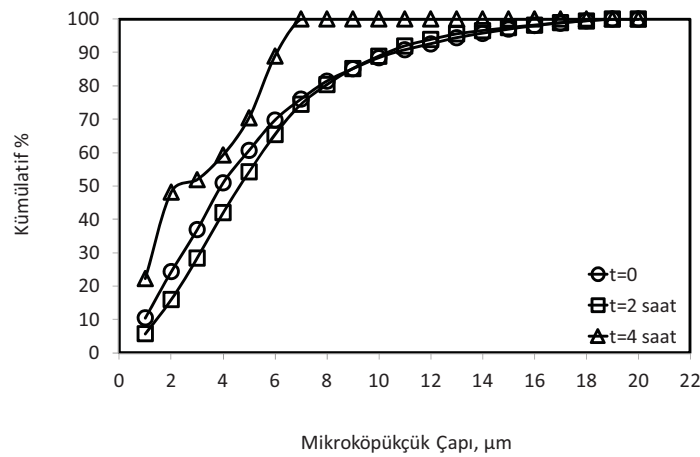
**Şekil 170.** (A) 9:1 ve (B) 5:5 DSPC:PEG40St karışımları ile üretilmiş mikroköpükçüklerin 38°C'deki zamanla büyüklüklerinin kümülatif yüzde değişimleri



**Şekil 171.** (A) 9:1 ve (B) 5:5 DSPC:PEG40St karışımları ile üretilmiş mikroköpükçüklerin mikroskop görüntüleri

PEG40St konsantrasyonunun faz davranışı üzerine etkisi *Borden ve ark.* tarafından daha önce rapor edilmişti (Borden, 2004). Yapılan çalışmada %5 mol oranında bile PEG40St'nin karışıma eklenmesi durumunda Langmuir-Blodgett film tekniğinde 35mN/m ve üzeri yüzey basınçlarında sıkıştırma ile (daha kondens bir film elde etmek üzere) yüzeyden ayrılmaların olduğu belirtilmiş ve PEG konsantrasyonunun artması ile yüzeyden ayrılmaların daha da arttığı savunulmuştur. Öyleki PEG 35 mN/m ve üzeri yüzey basınçlarında lipid-emülsifiyer karışımına rastlanmadığı ifade edilmiştir (Borden ve ark., 2004). Oysaki, proje kapsamında yürütülen LB çalışmalarımızda, artan PEG40St miktarı ile 35 mN/m ve üzeri yüzey basınçlarında daha kondens bir monotabakanın oluştuğu, ve buna paralel olarak mikroköpükçüklerde de stabilitenin arttığı gözlemlenmiştir.

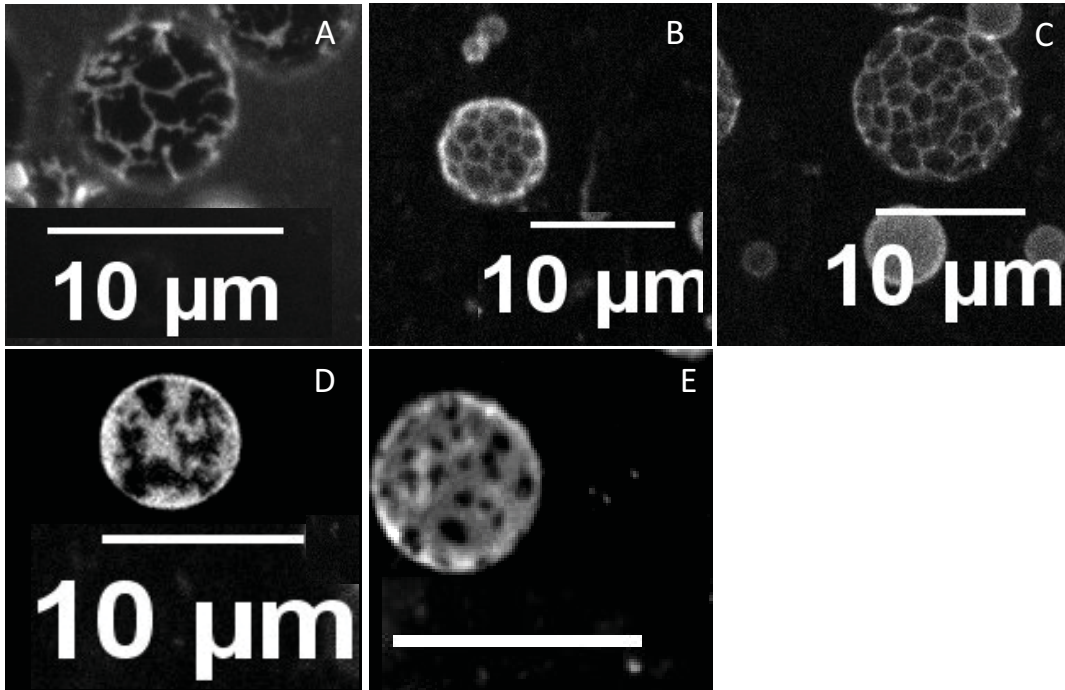
Bunların yanı sıra, %10 mol oranında PEG40St kullanımının stabiliteye (mikroköpükçüklerin zamanla sayıca değişimleri bakımından) olan etkisi %90 mol oranında PEG40St'nin kullanılması ile aynı olduğu (Şekil 167) fakat mikroköpükçük boyut dağılımı değişimin aynı olmadığı (Şekil 170-A ve Şekil 172) tespit edilmiştir. %90 oranda kullanılması ile üretilen mikroköpükçüklerin boyut dağılımı 4 saat boyunca sabit kalıp daha sonra düşerken (Şekil 172), %10 oranında PEG40St kullanılarak üretilen mikroköpükçüklerin büyüklüklerinde zamanla artış gözlemlenmiştir (Şekil 170-A).



**Şekil 172.** 1:9 molar oranlarındaki DSPC:PEG40St karışımları ile üretilmiş mikroköpükçüklerin 38°C'deki zamanla büyüklüklerinin kümülatif yüzde değişimleri

Mikroköpükçük yüzeyindeki lipid ve emülsifiyerin karışım karışılabilirliği hakkında bilgi edinmek için mikroköpükçük karışımına FITC içeren lipid eklenmiş ve mikroköpükçük

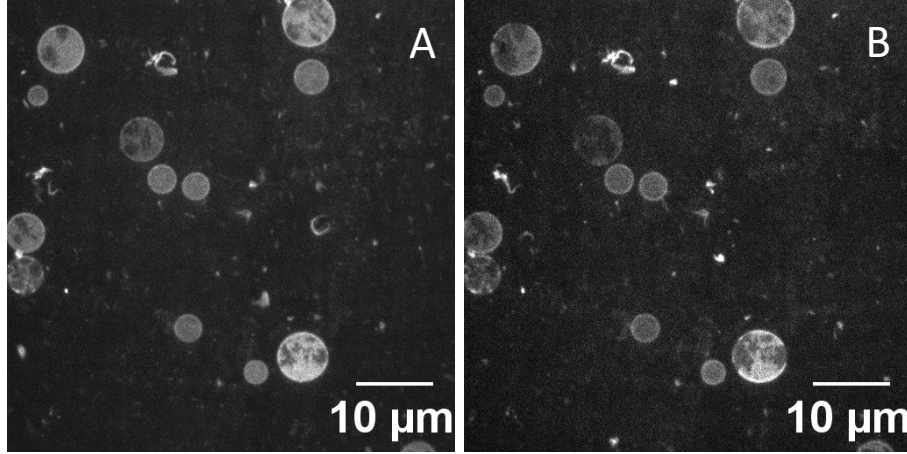
yüzeyi konfokal mikroskop ile incelenmiştir. İncelenen mikroköpükçükler %10 ile %50 mol arasında değişen PEG40St ile üretilmiştir. Mikroköpükçüklerin konfokal görüntüsü Şekil 173’de gösterilmektedir. Koyu bölgeler fosfolipidleri (DSPC), parlak bölgeler ise emülsifiyer ile kaplı bölümleri göstermektedir. Beklendiği gibi PEG40St komponentinin artması zar yapısındaki parlak bölgelerin genel olarak artmasına neden olmuştur. Öte yandan, belli bir mikroköpükçük formulasyonu için, tüm mikroköpükçüklerin aynı zar yapısında olmadıkları görülmüştür ve bu farklılığın mikroköpükçük boyutundaki farklılıktan kaynaklanmadığı gözlemlenmiştir. Örneğin %10 mol oranında PEG40St kullanılarak üretilen mikroköpükçüklerin hepsi benzer görüntü vermemektedir. Bu sonuç literatür ile de bağdaşmaktadır (Borden ve ark., 2004). Fakat konfokal mikroskobunda geniş bir tarama yapıldığında mikroköpükçüklerin büyük bir kısmının ortama eklenen PEG miktarı kadar ışığa verdiği görülmüştür.



**Şekil 173.** (A) 9:1, (B) 8:2, (C) 7:3, (D) 6:4 ve (E) 5:5 DSPC:PEG40St mikroköpükçüklerinin konfokal mikroskop görüntüleri.

PEG40St komponentinin köpükçük yüzeyinde zamanla davranışını anlamak için 6:4 formulasyonuna sahip mikroköpükçüklerin fotoğrafları 15’er dakikalık aralıklarla çekilmiştir. Görüntüler Şekil 174’de verilmiştir. 15 dakika içerisinde mikroköpükçük yüzeyindeki

karanlık bölgelerin arttığı belirlenmiştir. Bu artış PEG40St komponentinin mikroköpükçük yüzeyinden ayrıldığına göstergesi olarak nitelendirilebilir. Ayrıca, FITC molekülünün ışık altında floransını yitirmesi olarak da değerlendirilebilir. Zira bu formülasyona sahip mikroköpükçüklerin 38°C'deki yarı ömürleri 24,5 saat, bozulmaya başlama zamanı 6 saat olarak tespit edilmiştir.



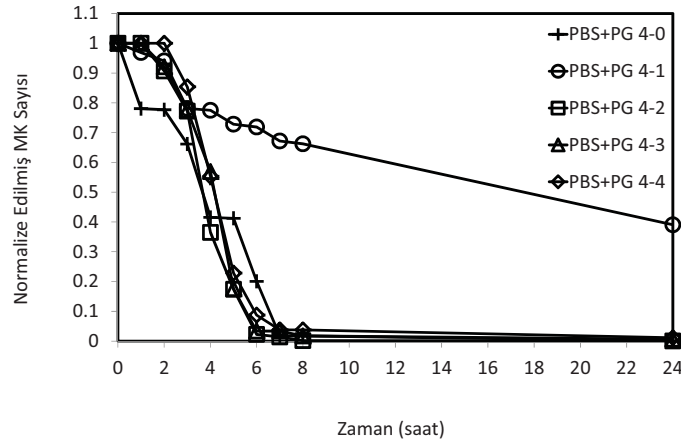
**Şekil 174.** 6:4 DSPC:PEG40St karışımları ile üretilen mikroköpükçüklerin (A) başlangıç ve (B) 15 dakika sonunda konfokal mikroskop görüntüleri

#### 4.2.3. Saklama Çözeltisinin Mikroköpükçük Stabilitesine Olan Etkisi:

Saklama çözeltisinin mikroköpükçük stabilitesi üzerine etkisini incelemek için molar oranı 8:2 olan DSPC:PEG40St karışımı ile üretilmiş mikroköpükçükler değişik oranlarda propilen glikol içeren PBS içerisinde saklanmıştır. Sonuçlar Şekil 175'de karşılaştırmalı olarak verilmektedir. Şekilde görüldüğü gibi PBB:PG oranının 4:1 olduğu durumda mikroköpükçüklerin daha uzun süreler stabil kalabildikleri gözlemlenmiştir.

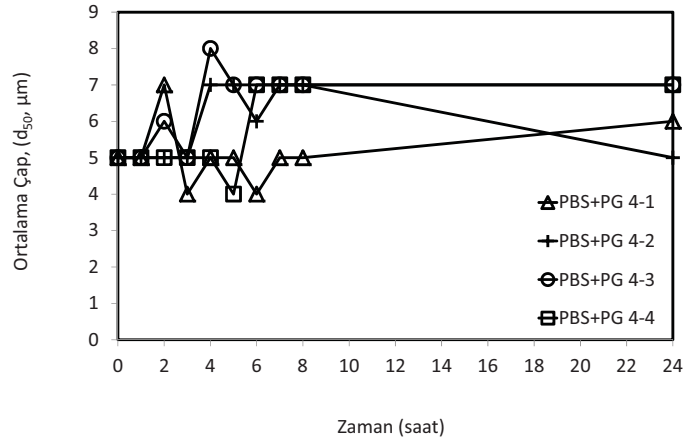
Propilen glikol suya göre oldukça yüksek bir viskoziteye sahiptir. İçerdiği hidroksil (OH) grubu nedeni ile fosfolipid ve su gibi serbest uçlu oksijene sahip moleküller ile hidrojen bağı yapabilir. Literatürde %10 propilen glikol, %10 gliserin ve %80 su içeren solusyon içinde mikroköpükçük stabilitesinin arttığı, bunun da saklama çözeltisinin yüksek viskozitesinden kaynaklandığı belirtilmiştir (Talu ve ark., 2006). Bizim çalışmamızda ise mikroköpükçük stabilitesinin sadece viskoziteden değil mikroköpükçük zar yapısını oluşturan

fosfolipidler ile saklama solusyonundaki PG arasındaki hidrojen bağından kaynaklandığı ve optimum düzeyde olması gerektiği ortaya çıkmıştır. Zira saklama solusyonuna gliserin ilavesi ile vizkosite daha da artmasına rağmen, stabilitede bir artış gözlemlenmemiştir. Mikroköpükçük zar yapısındaki komponentler ve PG arasında oluşturulan hidrojen bağı mikroköpükçükler etrafındaki sıvının kuruma oranını düşürerek mikroköpükçüklerin yok olmasını geçiktirdiği düşünülmektedir.



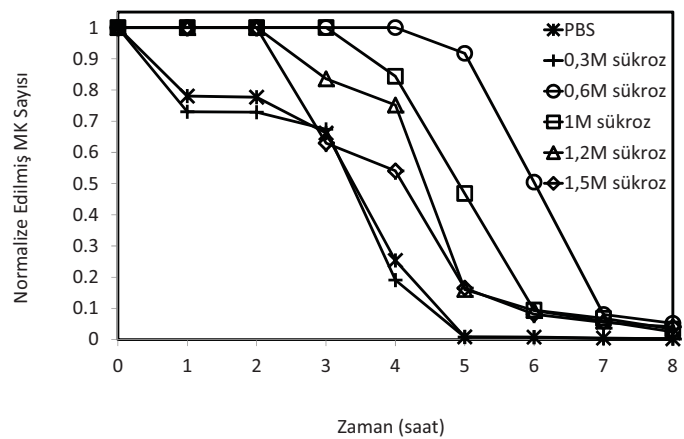
**Şekil 175.** 8:2 DSPC:PEG40St mikroköpükçüklerinin farklı hacim oranlarında karıştırılmış PBS:PG çözeltisi içerisinde 38 °C'deki zamanla sayılarındaki değişimleri

Farklı hacim oranlarındaki PBS:PG karışımlarında saklanan mikroköpükçüklerin 38 °C'de zamanla boyutlarındaki değişimleri de incelenmiştir. Şekil 176 mikroköpükçüklerin ortalama çaplarındaki zamanla değişimini göstermektedir. Hacim oranı 4:4 olan karışım hariç kullanılan tüm saklama solusyonlarındaki mikroköpükçüklerin boyutlarında büyüme ile birlikte sayılarında düşme gözlemlenmiştir. Bu iki şekilde yorumlanabilir; ya ilk olarak küçük boyutlu mikroköpükçükler ortamdan kaybolmuştur ya da büyük mikroköpükçükler ilk önce ortamdan kaybolup diğer ortamda kalan büyük boyutlu mikroköpükçükler sıcaklığın etkisi ile büyüme göstermiştir. En az büyüme gösteren mikroköpükçükler ise 4:1 oranında karıştırılan PBS:PG solusyonu içerisinde muhafaza edilenler olmuştur. Dolayısıyla 4:1 oranında karıştırılan PBS:PG solusyonu mikroköpükçükler için hem sayıca hem de boyutça en stabil ortamı sağlamaktadır.

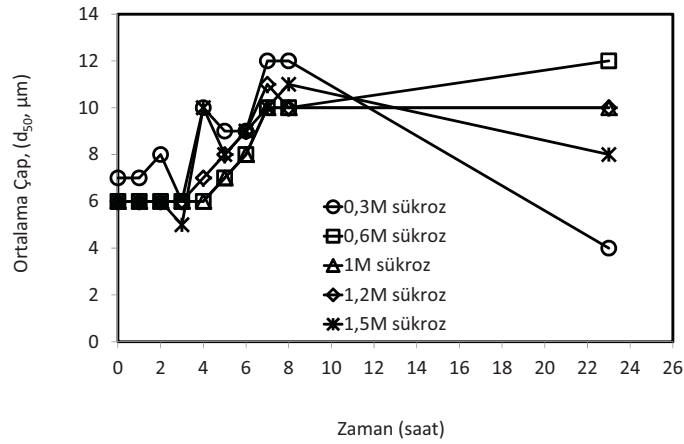


**Şekil 176.** 8:2 DSPC:PEG40St mikroköpükçüklerinin farklı hacim oranlarında karıştırılmış PBS:PG çözeltisi içerisinde 38 °C’de zamanla boyutlarındaki değişimleri.

*Craig ve ark.* 0.3 M sükröz konsantrasyonun mikroköpükçüklerin birbirine yapışmasını engellediğini ortaya koymuştur (Craig ve Henry, 2009). Bu çalışma göz önüne alınarak sükröz konsantrasyonun mikroköpükçük stabilitesine olan etkisi incelenmiştir. Mikroköpükçüklerin sayıca ve boyutça 38°C’de zamanla değişimleri Şekil 177 ve Şekil 178’de gösterilmiştir. Şekil 177 0.3M sukrozun çözeltisinin (Sükroz PBS içerisinde çözülmüştür) saklama solüsyonu olarak kullanılmasının stabiliteye katkı sağlamadığını göstermektedir. Sükröz konsantrasyonunun daha da arttırılması mikroköpükçük stabilitesini arttırmış fakat konsantrasyondaki devam eden artış stabiliteyi olumsuz yönde etkilemiştir.

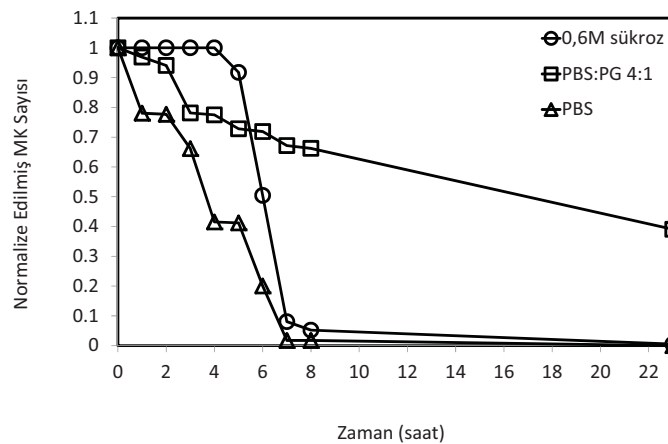


**Şekil 177.** 8:2 DSPC:PEG40St mikroköpükçüklerinin farklı molaritelerdeki sükröz çözeltisi içerisinde 38°C’de zamanla sayılarındaki değişimleri.



**Şekil 178.** 8:2 DSPC:PEG40St mikroköpükçüklerinin farklı molaritelerdeki sükröz çözeltilisi içerisinde 38°C'de zamanla boyutlarındaki değişimleri.

Saklama solüyonlarının mikroköpükçüklere sağladıkları stabilitelere göre karşılaştırma yapıldığında, PBS:PG karışımı için 4:1 hacim oranı, sükröz çözeltilisi için ise 0.6M'lık solüsyonun en uygun saklama çözeltilisi olduğu görülmüştür. Bu solüsyonların PBS ile karşılaştırmalı grafiği Şekil 179'de gösterilmektedir. Grafik incelendiğinde mikroköpükçüklerin sayıca sabit kaldığı süre en yüksek 0.6M'lık sükröz çözeltilisi içerisinde gözlemlenmesine rağmen bu köpükçükler sonraki 4 saatin sonunda bozunmaya uğramıştır. Mikroköpükçüklerin stabilitesi yarı ömür olarak karşılaştırıldığında ise en iyi saklama solüsyonunun hacim oranı 4:1 olan PBS:PG karışımı olduğu anlaşılmaktadır. Sadece PBS'te saklanan mikroköpükçüklerin stabilitesi ise en düşük olarak tespit edilmiştir.



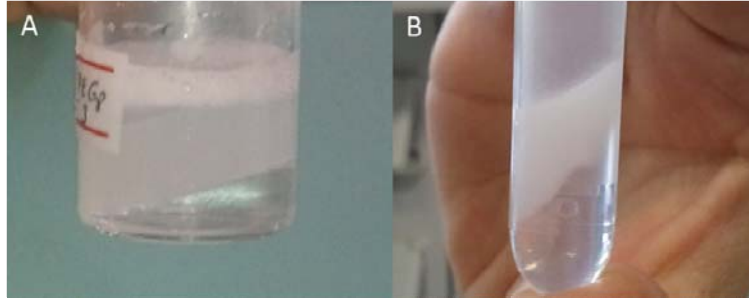
**Şekil 179.** 8:2 DSPC:PEG40St mikroköpükçüklerinin farklı solüsyonlarda 38°C'deki zamanla sayılarındaki değişimleri.



Özetle, mikroköpükçük stabiliteyi farklı saklama soluyonları kullanılarak vücut sıcaklığında test edilmiştir. İlk olarak kullanılan çözeltilerdeki eklentilerin optimum miktarları bulunmuş daha sonra bu optimum oranlar birbiri ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak PBS:PG karışımının stabilizeye etkisinin daha fazla olduğu dolayısıyla saklama soluyonu olarak bu çözeltinin kullanılabilmesi sonucuna varılmıştır. Bunun nedeni de propilen glikolün mikroköpükçük zarı ile hidrojen bağı yaparak mikroköpükçüklerin kurumasını geçiktirdiği olabilir.

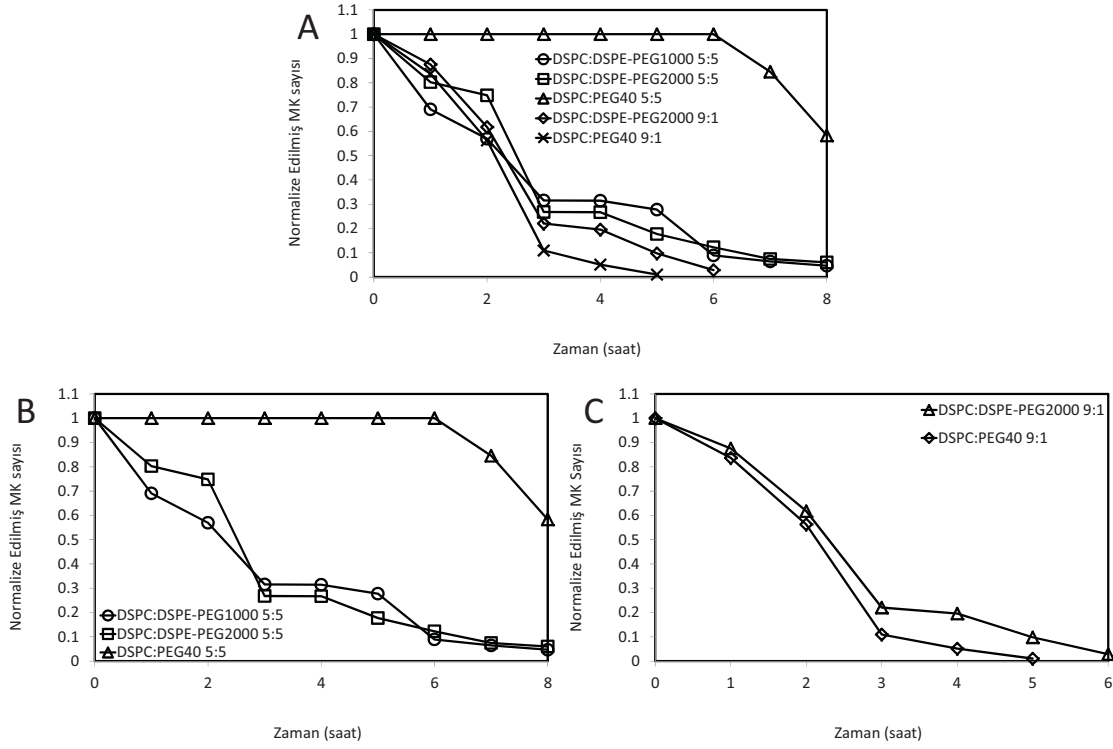
#### **4.2.4. Emülsifier Türünün Mikroköpükçük Stabilitesine Olan Etkisi:**

Bilindiği gibi fosfolipidler tek başlarına mikroköpükçük üretememektedir. Stabil mikroköpükçük üretimi fosfolipid gibi amfifilik bir molekül olan emülsifier eklenerek sağlanabilmektedir. Amfifilik moleküllerinin gaz etrafında sıkı paketlenmiş monotabaka oluşturmasında emülsifierin yapısı önem taşımaktadır (Shen ve ark., 2008). Günümüzde stabil mikroköpükçükler üretmek için polietilen glikol (PEG) bazlı emülsifierler kullanılmaktadır. PEG molekülünün vücuda enjekte edilen ilaç taşıyıcı sistemlerin damar içerisinde hareket ederken damar yüzeyine yapışmasını engellediği ve sirkülasyon süresini artırdığı yaygın olarak bilinmektedir (Kim ve ark., 2000). Yapılan bu çalışmada, mikroköpükçük yapımında farklı tür ve PEG zincir uzunluklarına sahip farklı emülsifierler kullanılmış (PEG8St ve DSPE-PEG<sub>n</sub>, n=350, 1000, 2000) ve bunların mikroköpükçük stabilitesine olan etkisi araştırılmıştır. PEG8 St, PEG40St ye oldukça benzer bir emülsifierdir. Sadece PEG zincirinde 8 etilen oksit grubu içermektedir. DSPE-PEG<sub>n</sub>, PEG40St gibi PEG zinciri içeren bir emülsifierdir. Bu molekül PEG40St'den farklı olarak hidrokarbon tarafında 18 karbonlu fosfolipide (DSPE) bağlıdır. Bu şekildeki komponentlere lipopolimer adı verilmektedir. "n" PEG zincirindeki etilen oksit grubu sayısını göstermektedir. Bu çalışmada mikroköpükçükler 9:1 ve 5:5 molar oranlarındaki DSPC:DSPE-PEG<sub>n</sub> karışımları ve DSPC:PEG8St karışımları ile üretilmiştir. 9:1 molar oranındaki DSPC:PEG8St, DSPC:DSPE-PEG<sub>350</sub> ve DSPC: DSPE-PEG<sub>1000</sub> karışımları ile mikroköpükçük üretilmemiştir. Bu karışımlardan DSPC:PEG8St ve DSPC:DSPE-PEG<sub>350</sub> tüp içerisinde viskoz bir süspansiyon oluştuğu görülmüştür (Şekil 180).

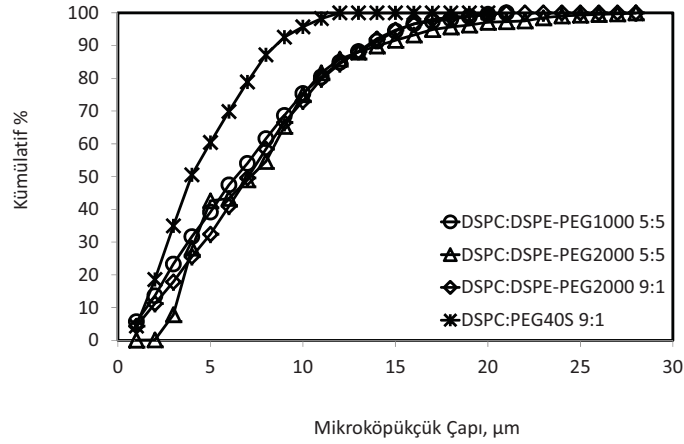


**Şekil 180.** (A) DSPC:PEG8St ve (B) DSPC:DSPE-PEG350 karışımlarının ürettikleri viskoz süspansiyon.

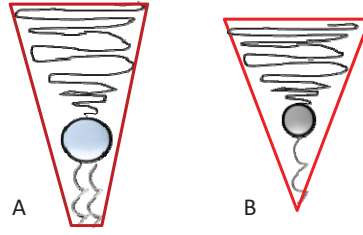
DSPC ve DSPE-PEG<sub>n</sub> ile üretilen mikroköpükçüklerin stabiliteyi ile DSPC ve PEG40St ile üretilen mikroköpükçüklerin stabiliteyi Şekil 181’te karşılaştırılmalı olarak verilmiştir. Grafiklerden de anlaşılacağı gibi PEG40St yerine lipopolimer kullanımı mikroköpükçük stabilitesinde önemli ölçüde düşüşe neden olmuş ve daha büyük mikroköpükçüklerin oluşmasına sebep olmuştur (Şekil 182). %50 oranında PEG40St yerine lipopolimer kullanılması stabilitede önemli düşüşlere sebep olurken, %10 luk emülsifier içeren mikroköpükçüklerin stabiliteyi önemli bir değişiklik yaratmadığı tespit edilmiştir (Şekil 181). Lipopolimerin emülsifier olarak kullanıldığı mikroköpükçük stabiliteyi incelendiğinde lipopolimerlerin mol fraksiyonlarının stabilitede etkili olmadığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, stabilitedeki düşüş farklı emülsifierlerin yapısı ile yakından ilintilidir. Daha önce de belirtildiği gibi PEG moleküllerinin hidrofilik kısımları hidrofobik kısmından daha büyük olduğu için ve buna bağlı olarak konik şekle sahip olduklarından bu moleküllerin küçük boyuttaki mikroköpükçüklerin oluşumunu sağlamaları beklenmektedir (Dickey ve Faller, 2008). Başka bir deyişle, bu moleküller konik yapılarından dolayı mikroköpükçük zarında daha kavisli bir yapının oluşmasına katkıda bulunmaktadır. DSPE-PEG<sub>n</sub> hidrofilik ve hidrofobik grubun büyüklükleri birbirine yakın olduğundan konik yapıyı tam olarak sağlayamamaktadır (Şekil 183). Bu sebepten dolayı lipopolimerler (DSPE-PEG<sub>n</sub>), PEG40St komponentine göre daha büyük mikroköpükçük oluşuma neden olmaktadır (Şekil 182).



**Şekil 181.** DSPC:DSPE-PEGn mikroköpükçüklerinin 38°C'deki zamanla sayılarındaki değişimleri



**Şekil 182.** Değişik molar oranlarda hazırlanan DSPC:PEG40St ve DSPC:DSPE-PEGn mikroköpükçüklerinin boyut dağılımları.



**Şekil 183.** (A) DSPE-PEG<sub>2000</sub> ve (B) PEG40St komponentlerinin şematik gösterimleri.

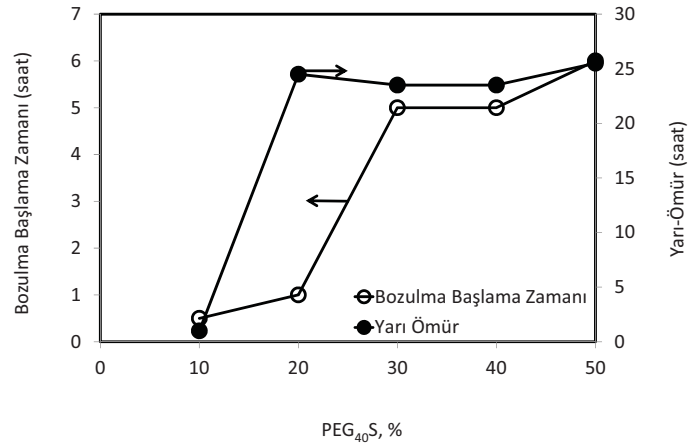
Günümüze kadar yapılan çalışmalarda mikroköpükçük üretiminde PEG40St dışında monostearin/monopalmitin bazlı gıda emülsifiyeri (MYVATEX) ve PEG-lipid (DSPE-PEG<sub>2000</sub>) kullanılmıştır (Lozano ve Longo, 2009; Shen ve ark., 2008). *Lozano ve ark.* yaptıkları çalışmada DSPC ve %10 DSPE-PEG<sub>2000</sub>'den oluşan mikroköpükçükler üretmiş ve çapı 15µm olan tek bir mikroköpükçüğün zaman içerisinde davranışını incelemişlerdir. Sonuç olarak molar oranı 9:1 olan DSPC:DSPE-PEG<sub>2000</sub> karışımı ile üretilen mikroköpükçüğün DSPC:PEG40St ile üretilenden 4 kat daha fazla zar dirençliliğine sahip olduğu rapor edilmiştir (Lozano ve Longo, 2009). Ancak, *Lozano ve ark.*'nin bu gözlemi tek bir mikroköpükçük üzerinde yapılan gaz geçirgenlik testine dayanmaktadır. Yaptıkları çalışmada mikroköpükçük popülasyonunun genel stabilitesi değerlendirilmemiştir. Bu projede ise, stabilite testleri tek bir mikroköpükçük üzerinde değil, genel popülasyon davranışı ele alınmıştır. Dolayısı ile burada belirttiğimiz çalışmamız medikal anlamda daha fazla güvenilirlik taşımaktadır, zira damara enjekte edilen mikroköpükçükler tek değil, popülasyon olarak damar içerisinde hareket etmektedir. Dolayısıyla stabilitenin vücut sıcaklığında ve popülasyon olarak incelenmesinin daha sağlıklı bir yöntem olduğu düşünülmektedir. Mikroköpükçüklerin stabiliteyi incelendiğinde, özellikle 5:5 DSPC:DSPE-PEG<sub>2000</sub> karışımı ile üretilen mikroköpükçüklerin vücut sıcaklığında sayıca daha hızlı düşüş gösterdiği buna bağlı olarak popülasyonda daha dayanıksız oldukları tespit edilmiştir. Bu karışım ile üretilen köpükçükler intravasküler olarak vücuda verildiğinde etkin bir ultrason görüntülemesinin mümkün olamayacağı değerlendirilmektedir. Zira, sağlıklı bir ultrason görüntülemesi için yeterli olan süre 10 ila 40 dakika arasında değişim göstermektedir (Williams ve ark., 2011). Dolayısıyla DSPC:DSPE-PEG<sub>2000</sub> karışımı ile üretilen mikroköpükçüklerin hem boyut hem de stabilite bakımından hastalıkların teşhisinde kullanılmasının uygun olamayacağı düşünülmektedir.

#### 4.2.5. İlave Bir Fosfolipidin Mikroköpükçük Stabilitesine Olan Etkisi:

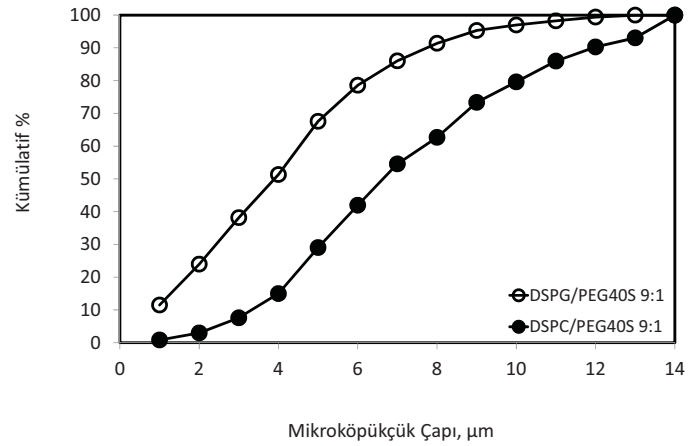
##### 4.2.5.1. Hidrojen Bağı Yapabilen Fosfolipid Etkisi:

###### DSPG:

Fosfotidilgliserol (PG) bazlı fosfolipidler bitkilerin, alglerin ve bakterilerin hücre membranlarında temel lipid olarak bulunmasının yanı sıra memelilerin hücre zarlarında az miktarda bulunan bir komponenttir (Garidel ve ark., 1997; Macfarlane, 1964). Ayrıca bu molekülün, bakteri membranında stabiliteyi sağladığı bilinmektedir (Garidel ve ark., 1997). DSPG'nin hem canlı yapısında bulunması hem de membranda stabiliteyi sağladığı bilindiğinden, bu molekülün mikroköpükçük yapısında üçüncü bir molekül olarak kullanılması uygun görülmüştür. İlk olarak, emülsifiyer miktarının DSPG kaplı mikroköpükçüklerin stabilitesine olan etkisi araştırılmıştır. Bu araştırma PEG40St'nin mol fraksiyonunu DSPC, PEG40St ve DSPG ile yapılacak olan mikroköpükçükler için optimize etmek için yürütülmüştür. Bu amaçla, mikroköpükçükler farklı mol oranlarındaki (9:1, 8:2, 7:3, 6:4 ve 5:5) DSPG:PEG40St karışımlar ile üretilmiş, mikroköpükçüklerin stabilitelelerini belirlemek için sayıca ve boyutça değişim 38°C'de incelenmiştir. PEG40St'nin DSPG kaplı mikroköpükçükler üzerinde etkisini gösteren grafik Şekil 184'te verilmektedir. Elde edilen sonuçlar DSPC kaplı mikroköpükçüklerin sonuçları ile benzer sonuçlar vermiştir. Dolayısıyla, PEG40St molar fraksiyonu 0.5'te sabitlenmiştir. Buna ek olarak, DSPG içeren mikroköpükçüklerin boyutları 9:1 oranında DSPC:PEG40St ile üretilmiş mikroköpükçüklere göre önemli oranda azalmıştır (Şekil 185). DSPG içeren mikroköpükçüklerin bu davranışı nötral bir lipid olan DSPC kaplı mikroköpükçüklerin davranışı ile ters düşmektedir ve sonuçlar literatür ile uyuşmaktadır (Lentz ve ark., 1982). Şekil 185'te de gösterildiği gibi DSPG içeren mikroköpükçüklerin %97'si 10µm'den küçük iken bu yüzde DSPC kaplı mikroköpükçüklerde %80'e gerilemiştir. Bu durum, mikroköpükçüklerin boyutunun kullanılan fosfolipidlerin hidrofilik kısmının yapısına bağlı olduğuna işaret etmektedir.

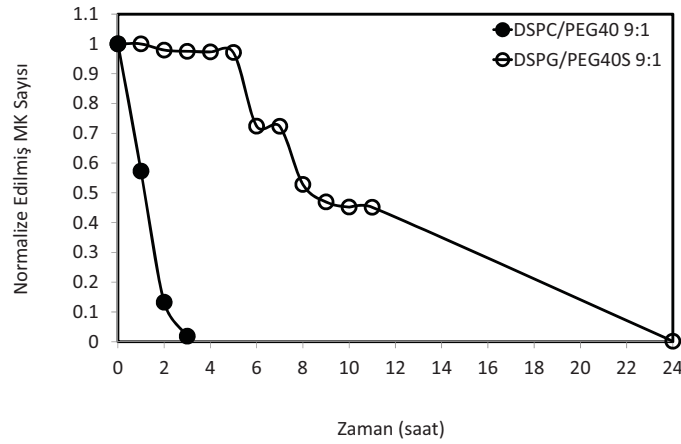


**Şekil 184.** Farklı molar oranlarındaki DSPG ve PEG40St karışımları ile üretilen mikroköpükçük sayısının sabit kaldığı süreler ve bu mikroköpükçüklerin yarı ömürleri.



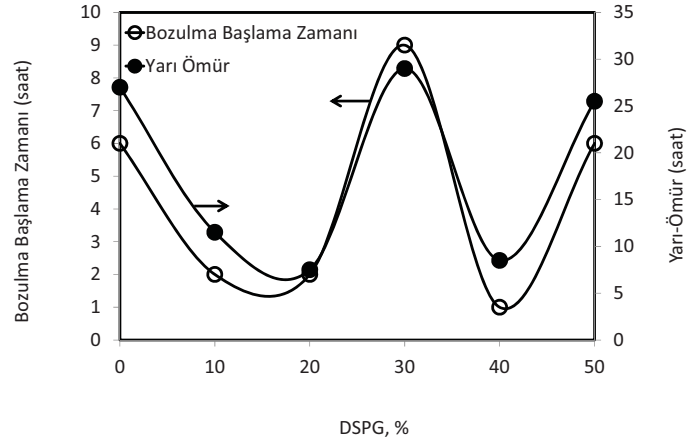
**Şekil 185.** DSPC ve DSPG ile üretilen mikroköpükçüklerin boyut dağılımlarının karşılaştırmalı grafiği

Çalışmamızda elde edilen bir diğer sonuç ise, DSPG kaplı mikroköpükçüklerin DSPC kaplı mikroköpükçüklerden daha dayanıklı olmasıdır (Şekil 186). Bu sonuç DSPG varlığında mikroköpükçüklerin daha kondens bir monotabaka oluşturduğunu ve gaz geçirgenliğini minimize ettiğini ve dolayısıyla medikal uygulamalarda DSPG'nin mikroköpükçük yapımında kullanılabileceğini göstermektedir.



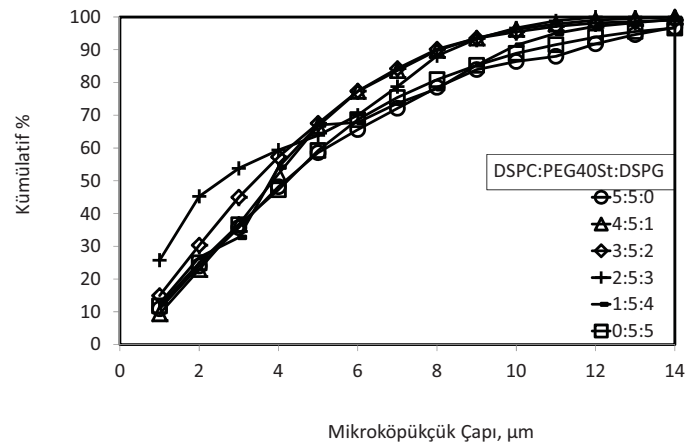
**Şekil 186.** DSPC:PEG40St ve DSPG:PEG40St karışımları ile üretilmiş mikroköpükçüklerin 38°C’de zamanla sayılarındaki değişimleri.

Çalışmamızda, DSPG aynı zamanda DSPC ve PEG40St karışımına üçüncü bir komponent olarak eklenerek mikroköpükçük yapımında kullanılmıştır. Komponentlerden emülsifier (PEG40St) molar oranı 0.5’te sabit tutulmuş ve DSPG yüzdesi 10’dan 50’ye kadar değiştirilmiştir. Başka bir deyişle, 0:5:5, 1:5:4, 2:5:3, 3:5:4 ve 4:5:1 molar oranlarında DSPC:PEG40St:DSPG’den oluşan mikroköpükçükler üretilmiştir. Üretilen bu mikroköpükçüklerin stabiliteleri Şekil 187’de karşılaştırmalı olarak verilmektedir. Vücut sıcaklığında en yüksek stabiliteye sahip olan mikroköpükçük 2:5:3 (DSPC:PEG40St:DSPG) formülasyonu olarak tespit edilmiştir. DSPG’nin üçüncü komponent olarak %10 oranında zar yapısına eklenmesi stabiliteyi olumsuz yönde etkilemesine rağmen sonraki artışlar stabiliteyi arttırmıştır. Fakat artışın %30’ların üzerine çıkarılması stabiliteyi tekrar düşürmüştür. DSPG mol yüzdesinin %30 olduğu formülasyonu ile üretilen mikroköpükçüklerin vücut sıcaklığında 9 saat boyunca sayıca sabit kaldığı görülmüştür. Gerek literatürde gerekse ilk bölümde yapılan çalışmalar DSPG’nin hidroksil gruplarının fosfolipidin fosfat grupları ile hidrojen bağı oluşturduğu, ancak DSPG’nin negatif yüklü olması sebebi ile miktarının optimize edilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Mikroköpük stabilitesinin kuruma oranı ile bağlantılı olduğu ve kuruma oranının düşürülmesi mikroköpük stabilitesini arttırdığı bilinmektedir (Askvik ve ark., 1999; Hédreul ve Frens, 2001; Koczo ve ark., 1992; Shah ve ark., 1978). DSPG’nin diğer lipidlerin yanı sıra ortamdaki sıvı (PBS:PG) ile hidrojen bağı yapabileceği de ve böylece mikroköpükçük yüzeyinde ince bir su fazı film tabakası oluşacağı göz önünde bulundurulduğunda, DSPG içeren mikroköpükçüklerde stabilite artışı beklenen bir durum olmaktadır.



**Şekil 187.** DSPC:PEG40St:DSPG mikroköpükçüklerinin DSPG miktarına bağlı olarak bozulma başlama zamanları ve yarı ömürleri

DSPG'nin daha küçük mikroköpükçük oluşumuna sebep olduğu Şekil 188'de görülmektedir. Örneğin, DSPC ve PEG40St karışımı ile üretilmiş mikroköpükçüklerin %80'i 8  $\mu\text{m}$ 'den küçükken; bu karışıma %10 DSPG ilavesi bu büyüklükteki mikroköpükçüklerin %90'a ulaşmasını sağlamıştır. Fakat DSPG miktarının %40 olduğunda mikroköpükçük boyutunda artış gözlemlenmiştir. *Lentz ve ark.* tarafından yapılan çalışmalarda da (PC ve PG içeren lipozomlar) yüksek miktarda DSPG komponentinin büyük vesiküllerin oluşumuna sebebiyet verdiği görülmüştür. Bu davranışın nedeni olarak da PG'nin PC ile homojen bir şekilde karışmadığı gösterilmiştir (*Lentz ve ark.*, 1982).



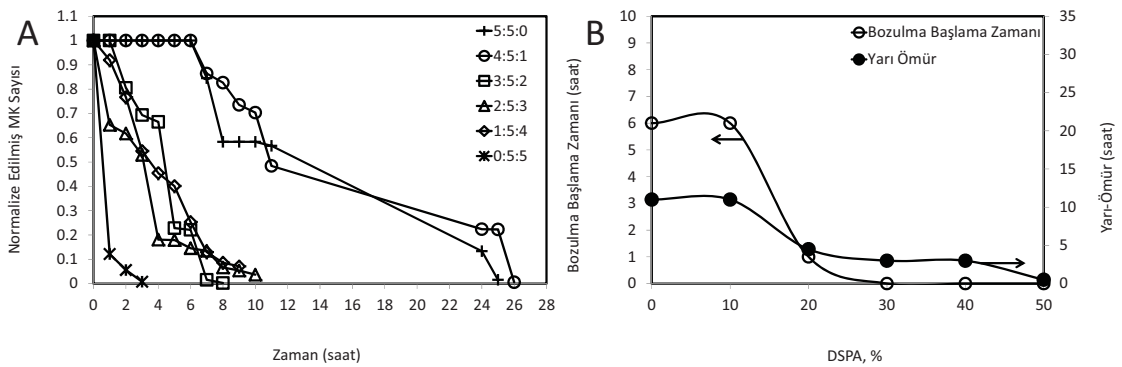
**Şekil 188.** Mikroköpüklerin karşılaştırmalı boyut dağılımları



Bizim çalışmalarımızda, DSPG'nin mikroköpükçük boyutunu azalttığı tespit edilmiştir. Bunun nedeni DSPG'nin barındırdığı hidroksil grubunun DSPC'nin serbest oksijenleri ile hidrojen bağı yapması olarak değerlendirilmektedir.

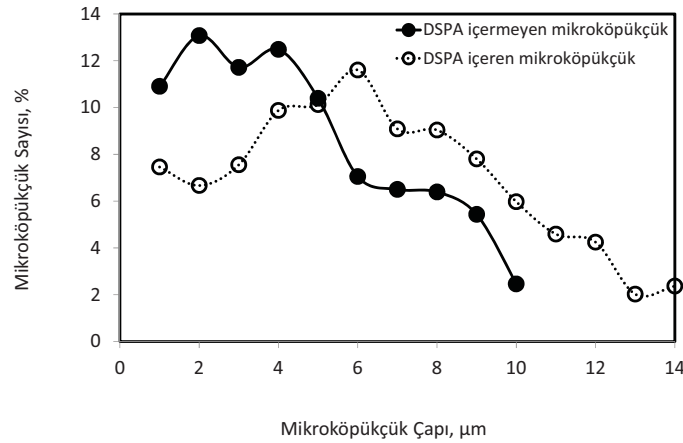
### DSPA:

Fosfatidik asit (PA) fiziksel özelliğinden dolayı canlı organizmalarda membran eğimliliğini kontrol eden bir fosfolipiddir. Bu yüzden bu lipidin vesikül oluşumuna yol açtığı düşünülmektedir (Kooijman ve ark., 2005). PA'nın hem canlı organizmada bulunması hem de membran eğimliliğine yardımcı olması nedeni ile çalışmamızda 18 karbonlu DSPA mikroköpükçük yapımında üçüncü bir komponent olarak kullanılmıştır. DSPA komponentinin stabiliteye etkisini incelemek amacıyla molar oranları 4:5:1, 3:5:2, 2:5:3, 1:5:4 ve 0:5:5 olan DSPC:PEG40St:DSPA mikroköpükçükleri üretilmiş ve 38°C'deki stabiliteleri incelenmiştir. Karşılaştırmalı sonuçlar Şekil 189'da gösterilmektedir. Şekilde gösterildiği gibi DSPA'nın %10 mol oranında zar yapısına eklenmesi stabilitede önemli bir değişime sebep olmamıştır. Ancak, artan DSPA miktarı ile stabilitede önemli ölçüde düşmeler gözlemlenmiştir. Şekil 189-B'den artan DSPA miktarı ile "bozulma başlama zamanı" ve "yarı ömür" de kayda değer düşmelerin olduğu görülmektedir.



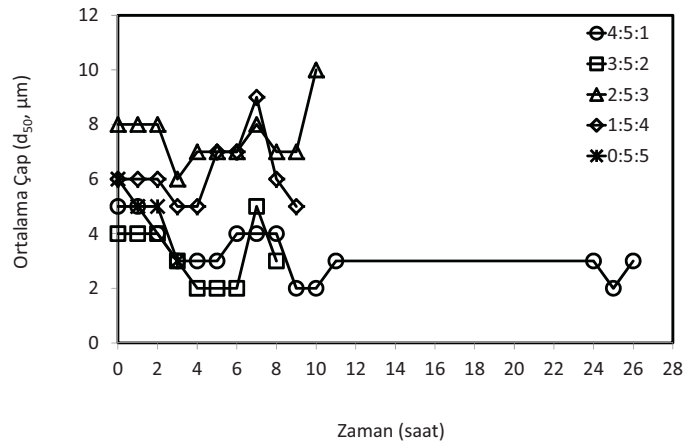
**Şekil 189.** Değişik oranlardaki DSPC:PEG40St:DSPA mikroköpükçüklerinin 38°C'de (A) zamanla sayılarındaki değişimleri, (B) DSPA miktarının mikroköpükçük ömrüne etkisi

Stabilitenin yanı sıra DSPA'nın mikroköpükçük boyutuna etkisi de incelenmiş ve bu komponentin mikroköpükçük boyutunu arttırdığı tespit edilmiştir (Şekil 190). 4:5:1 DSPC:PEG40St:DSPA mikroköpükçüklerinin 5:5 DSPC:PEG40St mikroköpükçüklerine kıyasla daha geniş bir boyut dağılımında oldukları gözlemlenmiştir. İlk bölümde yapılan LB çalışmalarında görüldüğü gibi, DSPA, DSPC'ye kıyasla daha küçük baş gruba sahip olmasına karşın, 5:5 DSPA:PEG40St ve 5:5 DSPC:PEG40St karışımlarına ait izotermler çok yakın moleküler alanlarda yer almaktadır (Şekil 111). Her ne kadar gerek izotermlerden, gerekse termodinamik analizlerden (Şekil 112) 2:5:3 karışımına ait artan serbest Gibbs enerji değeri daha negatif değerler göstere, daha öncede bahsedildiği gibi, artan DSPA miktarı ile PEG40St molekülünün hava-su arayüzeyinden ayrılması daha olası görünmektedir. Daha önceki çalışmalarımızdan da görüleceği gibi, DSPC:PEG40St karışımı ile elde edilen mikroköpükçüklerde artan PEG40St miktarı ile daha küçük ve daha stabil mikroköpükçükler elde edilmiş idi. Buradan, karışıma DSPA ilave edildiğinde PEG40St'ın zar yapısından daha çok ayrıldığı, dolayısıyla daha büyük ve daha az stabil mikroköpükçük oluşumuna sebebiyet verdiği sonucu ortaya çıkmaktadır. DSPA, DSPG gibi hidrojen bağı yapabilen negatif yüklü bir fosfolipiddir. Ancak, DSPG'den farklı olarak DSPA'da tek bir hidroksil grubu vardır ve fosfat grubuna daha yakındır. Dolayısıyla karışımındaki diğer komponentlerle uygun bir konfigürasyonda hidrojen bağı oluşturma olasılıkları düşebilir. Öte yandan, DSPA lipidleri arasındaki itici kuvvetler sebebi ile yeterince kondens bir monotabaka gaz etrafında oluşmamasının sonucu olarak gaz difüzyonu kaçınılmaz olabilir. Nitekim, artan DSPA oranlarında, daha büyük mikroköpükçüklerin oluşması ve stabilitedeki düşüş, daha az miktardaki PEG40St'ın zar yapısına girdiğinin bir kanıtı olarak düşünülebilir.



**Şekil 190.** 5:5:0 ve 4:5:1 DSPC:PEG40St:DSPA mikroköpükçüklerinin karşılaştırmalı boyut dağılımı.

Mikroköpükçüklerin 38°C'deki zamana karşı çap değişimleri Şekil 191'te gösterilmiştir. Şekilden anlaşılacağı gibi 4:5:1 DSPC:PEG40St:DSPE formülasyonuna sahip mikroköpükçüklerin sayıca sabit kaldığı süre içerisinde boyutta azalma gözlemlenmiştir. Bu da mikroköpükçüklerden bir gaz difüzyonu olduğunu göstermektedir. Gaz difüzyonu mikroköpükçüklerin bozunma mekanizmalarından biri olarak bilinmektedir (Borden ve Longo, 2002). Tüm bu sonuçlardan, DSPE'nin gaz etrafında kondens bir monotabaka oluşumuna pozitif bir etki sağlamadığı, aksine PEG40St'nin mikroköpükçük yüzeyine katılmasını inhibe ettiği sonucu çıkmaktadır.

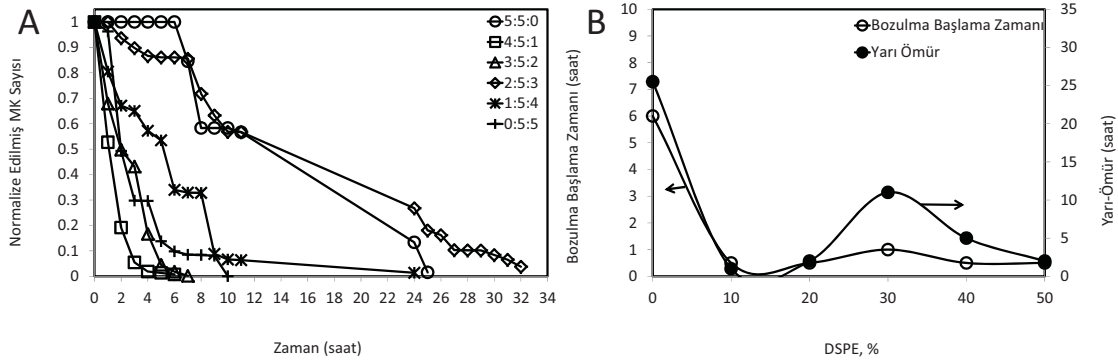


**Şekil 191.** Değişik oranlardaki DSPC:PEG40St:DSPE mikroköpükçüklerinin zamanla boyutlarındaki değişimleri.

#### DSPE:

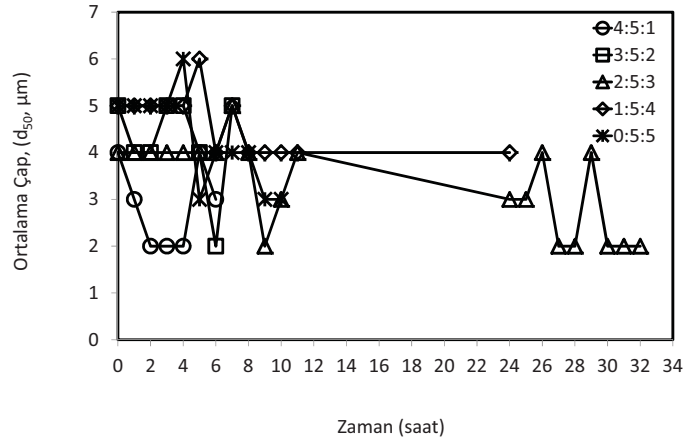
Mikroköpükçük zar yapısında üçüncü komponent olarak kullanılan bir diğer molekül ise DSPE'dir. Fosfatidiletanolamin (PE) ve fosfotidilkolin'in (PC) birlikte ökaryotik hücre membranında yer aldığı bilinmektedir (Bagatolli ve Gratton, 2000; Silvius ve ark., 1986) ve PE çift katlı yapıya sahip olan hücre zarının iç kısmında yer almaktadır (Polozov ve Gawrisch, 2004). Bu bölümde DSPE fosfolipidinin mikroköpükçük stabilitesine olan etkisi incelenmiştir. Bu amaçla mikroköpükçükler çeşitli molar oranlarda DSPE ile üretilmiş (DSPC:PEG40St:DSPE karışımlarının molar oranları: 4:5:1, 3:5:2, 2:5:3, 1:5:4 and 0:5:5) ve 38°C'deki stabiliteleri incelenmiştir. Mikroköpükçük konsantrasyonlarının zamana göre değişimi gösteren grafik Şekil 192'da sunulmuştur. Görüldüğü gibi DSPE molekülün az

miktarda (%10) zar yapısına eklenmesi mikroköpükçüklerin stabilitesini önemli ölçüde azaltmıştır. Fakat artan DSPE miktarı ile birlikte mikroköpükçük stabilitesinde kademeleli olarak bir artış gözlemlenmiştir. Başka bir deyişle DSPE yüzdesi %10-%30 arasıdayken DSPE'nin artışı orantılı olarak stabiliteyi yükseltmiştir. DSPE'nin daha da artırılması (%40-50) stabilitenin tekrar düşmesine neden olmuştur. Sayıca stabilite incelendiğinde DSPE içeren mikroköpükçükler arasında en stabil formülasyonun %30 DSPE içeren formülasyon olduğu bulunmuştur. Ancak, yinede 2:5:3 DSPC:PEG40St:DSPE karışımı ile elde edilen mikroköpükçüklerin, 5:5 DSPC:PEG40St mikroköpükçüklerinden daha stabil oldukları söylenemez. Artan DSPE miktarı ile “bozulma başlama zamanı” ve “yarı ömür” de önemli düşüşler kaydedilmiştir(Şekil 192-B).



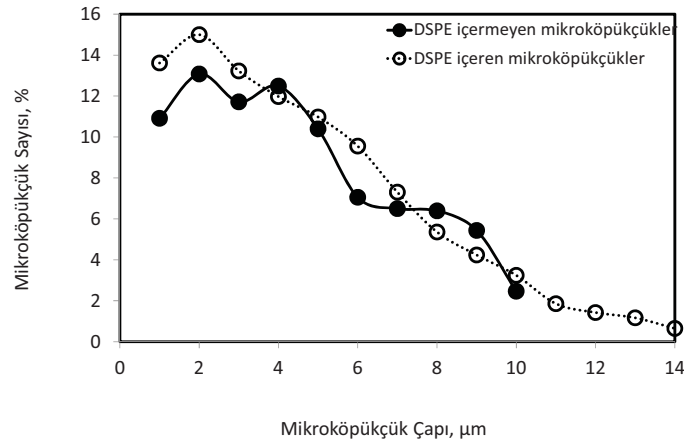
**Şekil 192.** Değişik oranlardaki DSPC:PEG40St:DSPE mikroköpükçüklerinin 38°C’de (A) zamanla sayılarındaki değişimleri (B) DSPE miktarının mikroköpükçük ömrüne etkisi

Sayıca stabilitenin yanı sıra zamanla mikroköpükçüklerin boyut dağılımındaki değişimler de incelenmiştir. Sonuçlar Şekil 193’te gösterilmektedir. %30 DSPE içeren mikroköpükçükler hem sayıca hem de boyut açısından 6 saat boyunca daha stabil kaldıklarından bu mikroköpükçüklerin DSPE’li mikroköpükçükler arasında en stabil oldukları görülmektedir.



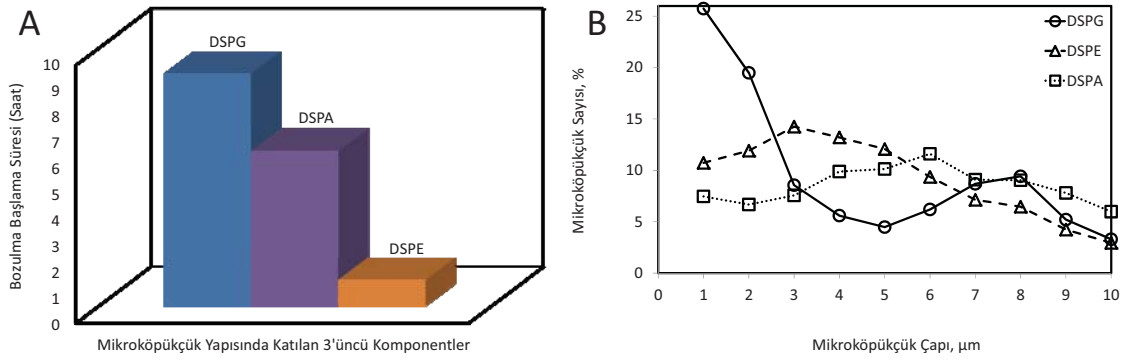
**Şekil 193.** Değişik oranlardaki DSPC:PEG40St:DSPE mikroköpükçüklerinin zamanla boyutlarındaki değişimleri.

Zamana karşı boyut değişimine ek olarak DSPE'nin köpükçük büyüklüğüne etkisi de araştırılmıştır. 2:5:3 DSPC:PEG40St:DSPE ve 5:5 DSPC:PEG40St mikroköpükçüklerinin boyut dağılımının karşılaştırması Şekil 194'de sunulmuştur. Grafikten de görüldüğü gibi DSPE'nin zar yapısına dahil olması boyut dağılımını hemen hemen etkilememiştir, fakat mikroköpükçük verimliliği açısından düşüşe neden olmuştur. DSPE, DSPC gibi nötr bir fosfolipiddir. Ancak, DSPE'nin head grubu DSPC'ninkinden daha küçüktür ve hidrojen bağ yapma kapasitesine sahiptir. Buna ek olarak, su moleküllerinin ilişkileri de lipid polar grubunun boyutunu etkilemektedir. PC lipidleri 25 su molekülünü hidrasyon zarında barındırırken, bu sayı PE'de 11'e düşmektedir. O halde, PC polar grubunun PE'den büyük olması sadece fiziksel değildir, bu farklılık aynı zamanda polar grupların hidrasyonu ile alakalıdır (Langner ve Kubica, 1999). Şekil 98'dan görüleceği gibi, formülasyonda DSPC yerine DSPE kullanılması izotermilerin konumunda fazla bir değişiklik yaratmamıştır. Termodinamik analizler 2:5:3 DSPC:PEG40St:DSPE mikroköpükçükleri ile elde edilen artan gibbs serbest enerjileride en negatif değerleri vermiştir (Şekil 99). DSPC'nin pozitif yüklü kolin grubu ile DSPE'nin pozitif yüklü amin grubu arasındaki itici kuvvetler DSPE'nin DSPC'nin fosfat grubu ile hidrojen bağ yapma olasılığını inhibe edebilir (Cong, 2009). Bütün bu sebeplerden dolayı, DSPC ve DSPE'nin karışım içinde bir optimumu olması söz konusu olabilir.



**Şekil 194.** 5:5 DSPC:PEG40St ve 2:5:3 DSPC:PEG40St:DSPE mikroköpükçüklerinin karşılaştırmalı boyut dağılımı.

Hidrojen bağı yapma kabiliyetine sahip olan ve mikroköpükçük yapısında kullanılan üçüncü bir komponent olarak kullanılan 3 fosfolipidin (DSPG, DSPA, DSPE) mikroköpükçük stabilitesine olan etkisi Şekil 195’de karşılaştırmalı olarak verilmektedir. Karşılaştırması yapılan mikroköpükçükler maksimum stabilitenin elde edildiği kompozisyonları temsil etmektedir. Başka bir deyişle karşılaştırılması yapılan mikroköpükçük tipleri şunlardır: 2:5:3 DSPC:PEG40St:DSPG, 4:5:1 DSPC:PEG40St:DSPA ve 2:5:3 DSPC:PEG40St:DSPE. Bu mikroköpükçüklerin boyut dağılımını gösteren grafikler Şekil 195-B’de verilmektedir. Görüldüğü gibi, %30 DSPG içeren mikroköpükler medikal uygulamalar için uygun boyut dağılımında olup en stabil kontrast ajanı olarak tespit edilmiştir. Her ne kadar 3 tip fosfolipide hidrojen bağı yapabilme özelliğine sahip olsada, baş grubun büyüklüğü ve türü, karışımın kompozisyonu, moleküler etkileşimleri, dolayısıyla da mikroköpükçük stabilitelelerini önemli ölçüde etkilemektedir.

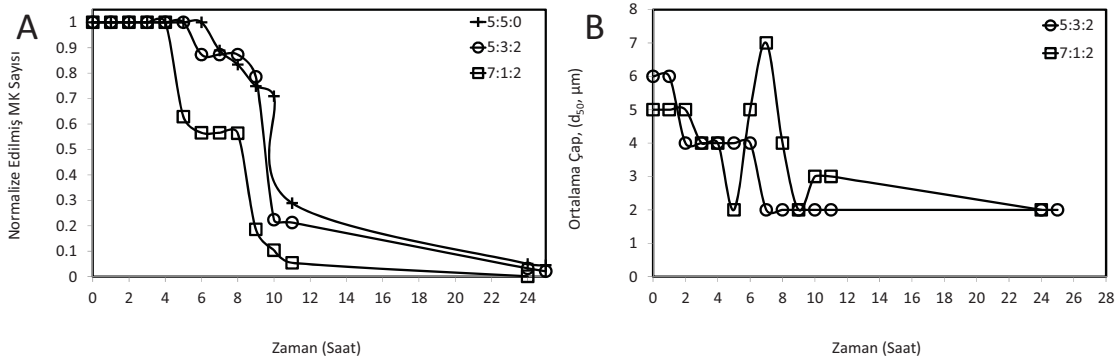


**Şekil 195.** 2:5:3 DSPC:PEG40St:DSPG, 4:5:1 DSPC:PEG40St:DSPA ve 2:5:3 DSPC:PEG40St:DSPE mikroköpüklerinin (A) stabilite ve (B) boyut dağılımı karşılaştırması.

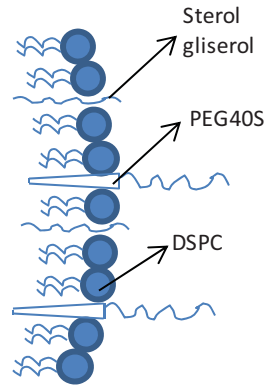
### St-Gly:

Stearil gliserol (StGly) DSPG'ye oldukça benzer bir yağ asitidir. Baş grupları aynıdır, ancak stearil gliserol'de fosfat grubu yoktur ve tek hidrokarbon zinciri içermektedir. DSPG'ye kıyasla daha ekonomik olduğu için maliyeti düşürebilmek ümidi ile molar oranları 4:5:1, 2:5:3, 5:3:2 ve 7:1:2 olan DSPC:PEG<sub>40</sub>St:StGly mikroköpükçükleri üretildi. Mikroköpükçüklerin bozunma süreleri ve büyüklük dağılım değişimleri Şekil 196'te karşılaştırmalı olarak verilmektedir. Stearil Gliserol'lü karışımlar için PEG<sub>40</sub>St oranının %50 olarak sabit tutulduğu karışımlarla mikroköpükçük üretilememiştir. Bu yüzden grafiklerde sonuçları bulunmamaktadır. Bunun nedeni Stearol Gliserolün, fosfolipidlerden farklı olarak, tek hidrokarbon zincirine sahip olmasıdır (Tablo 2). StGly, pek çok fosfolipid gibi silindirik yapıya sahiptir. Daha önce belirtildiği gibi fosfolipidler tek başına mikroköpükçük oluşturamamaktadır. PEG<sub>40</sub>St gibi konik yapıdaki moleküllerin mikroköpükçük yapısına eklenmesi gerekmektedir. Bu nedenle silindirik yapıdaki StGly'nin fazla miktarda mikroköpükçük karışımına ilave edilmesi durumunda mikroköpükçük oluşmamış olması hipotezimizi desteklemektedir. Bu tek hidrokarbon zincirli molekülün mikroköpükçük oluşumu için gereken eğimi sağlamadığı düşünülmektedir (Şekil 197). Ayrıca, LB izoterm sonuçlarından edindiğimiz bilgiler ışığında, StGly'nin tek hidrokarbon zincirine sahip olması nedeni ile hidrofobik etkileşimlerin azalmasına sebep olduğu, PEG<sub>40</sub>St moleküllerinin yüzeyde kalmalarında StGly'nin miktarının önemli olduğu sonucu ortaya çıkmış idi.

PEG40S yüzdesi farklı olmasına rağmen Stearol Gliserol içeren mikroköpükçüklerin sayıca stabil kalma süreleri, mol oranı 5:5 olan DSPC:PEG40St karışımları ile üretilenler ile hemen hemen aynı olarak bulunmuştur (Şekil 196-A). Ortaya çıkan bir diğer sonuç ise DSPC ve PEG40St karışımı ile üretilen mikroköpükçüklerde %10 PEG40St ile stabilitede iyi sonuç elde edilemezken (9:1 DSPC:PEG40St) formulasyona %20 oranında Stearol Gliserol'ün katılması sayıca stabil kalma süresini 10 dakikadan 4 saate çıkarmıştır (Şekil 196-A). Stearol Gliserol tıpkı DSPG gibi yapısında 2 adet -OH grubu barındırmaktadır ve bu -OH grupları DSPC ile hidrojen bağı yapabilme özelliğine sahiptir. Üstelik, bu formulasyonda üretilen mikroköpükçüklerin büyüklükleri 3 saat boyunca sabit kalabilmişlerdir (Şekil 196-B).



**Şekil 196.** Değişik oranlarda DSPC:PEG40St:StGly mikroköpükçüklerinin 38°C'deki (A) zamanla sayılarındaki değişimler (B) boyutlarındaki değişimler



**Şekil 197.** Stearol Gliserol'ün zar yapısına tahmin edilen konfigürasyonu

PEG40S oranı %10'dan %30'a çıkarıldığında ise üretilen mikroköpükçüklerin büyüklükleri artarken 2 saat sonunda büyük mikroköpükçükler gaz difzyonu ile %10 oranında küçülmüşlerdir. Bunun nedeninin daha önce bahsedildiği Stearol Gliserol'ün tek



zincirli bir hidrokarbon zincirine sahip olması nedeni ile silindirik yapıda olması ve mikroköpükçüklerin eğimli yapısı ile uyum gösterememesi olduğu düşünülmektedir (Şekil 197). Şekilsel bu farklılığın, gaz etrafında daha az eğim oluşturarak büyük mikroköpükçüklerin oluşmasına ve daha az kondens bir zarın gaz etrafında var olmasına sebebiyet verdiği ve böylece mikroköpükçük içindeki gazın difüze olduğu düşünülmektedir.

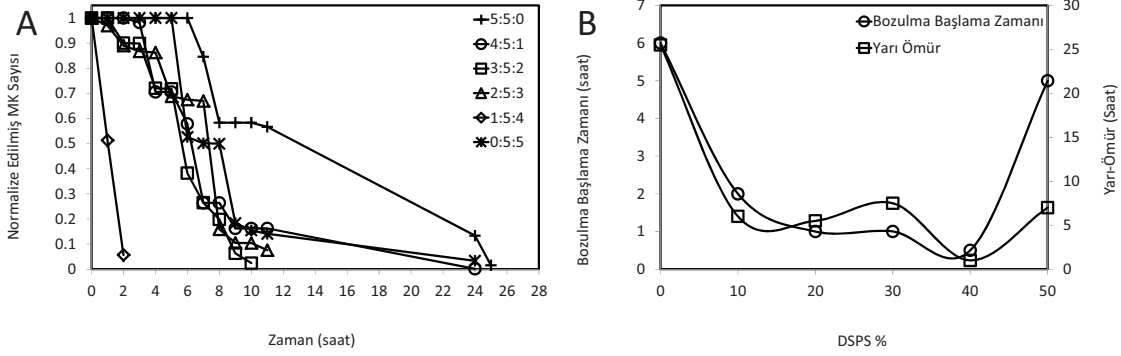
#### 4.2.5.2. İyonik Bağ Yapabilen Fosfolipidlerin Mikroköpükçük Stabilitesine Etkisi

Mikroköpükçük zar yapısında bulunan komponentlerin iyonik etkileşimlerinin mikroköpükçük stabilitesine olan etkisinin incelenmesi için üç farklı iyonik lipid (DSPS, DSTAP, Stearil amin) mikroköpükçük üretiminde üçüncü bir komponent olarak kullanılmıştır.

##### DSPS:

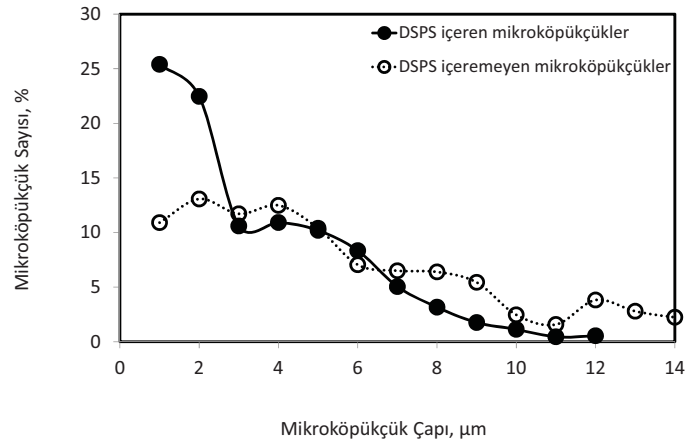
Fosfotidilserin (PS) ökaryotik hücre membranında bulunan iyonik bir fosfolipittir. PS-lipidlerinin büyük bir çoğunluğu çift katlı hücre membranının iç kısmında yani sitotik kısmında bulunmaktadır. Hücre apoptosis yapacağı zaman bu lipidler zarın dış kısmında yer almaktadır (Ross ve ark., 2001). Aniyonik olan PS-lipidlerinin canlı organizmanın yapısında da bulunması nedeni ile bu lipidin (18 karbonlu, DSPS) mikroköpükçük stabilitesine olan etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla mikroköpükçükler farklı molar oranlarındaki (4:5:1, 3:5:2, 2:5:3, 1:5:4 ve 0:5:5) DSPC, PEG40St ve DSPS karışımları ile üretilmiş ve 38°C'deki stabiliteyi incelenmiştir. Diğer stabilite çalışmalarına benzer olarak emülsifier molar oranı 0.5'te sabit tutulmuştur. Bu köpükçüklerin stabilitelerinin karşılaştırılması Şekil 198'de verilmektedir. Görüldüğü gibi DSPS'nin üçüncü komponent olarak köpükçük yapısına eklenmesi stabilitede etkili olmamış, aksine sayıca azalışın daha hızlı oluşmasına yol açmıştır. Fakat DSPS'nin DSPC yerine kullanılması bozulma başlama zamanında daha az bir düşüşe neden olmuştur. Buradan PC ve PS lipidlerinin etkileşiminin pozitif bir sinerji oluşturmadığı düşünülmektedir. Dolayısıyla bu iki lipidin zar yapısında bulunması stabiliteyi olumsuz yönde etkilemektedir. Bu varsayım *Silvius ve ark. 'nın* yaptığı çalışma ile uyumluluk göstermektedir. Yapısında %70'den daha az PS lipidi içeren PC-PS karışımı ile üretilmiş lipozomlarda zar yapısındaki faz ayrımı açıkça görülmüş ve lipozomların füzyonuna yol açtıkları rapor edilmiştir (Silvius ve Gagne, 1984). DSPS molekülleri negatif yüklü olduklarından

etkileşimleri intermoleküler boyutta olmaktadır. Dolayısıyla DSPC ve DSPS lipidleri birbirleri ile iyi bir karışım oluşturamamaktadır. Artan DSPS yüzdesi ile “bozulma başlama zamanı” ve “yarı ömür” sürelerinin azaldığı Şekil 198-B’de açıkça görülmektedir.



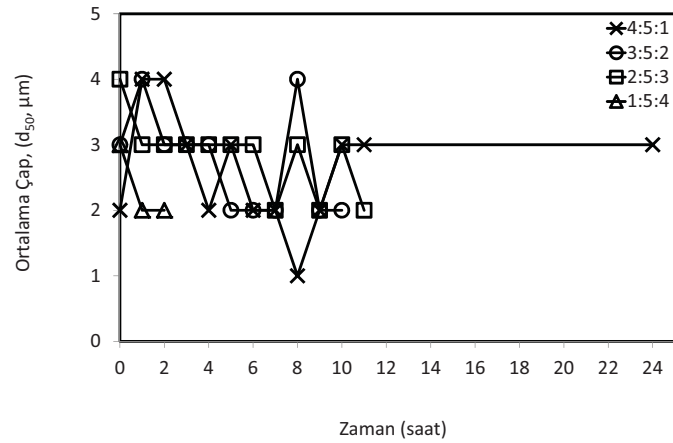
**Şekil 198.** Değişik oranlarda DSPC:PEG40St:DSPS mikroköpükçüklerinin 38°C’de (A) zamanla sayılarındaki değişimleri (B) DSPS miktarının mikroköpükçük ömrüne etkisi

DSPS lipidinin mikroköpükçük üzerine bir diğer etkisi de küçük köpükçükleri oluşturduğu yönündedir. Boyut dağılımı Şekil 199’da karşılaştırmalı olarak verilmektedir. Yukarıda belirtildiği gibi DSPS içeren mikroköpükçüklerin stabiliteyi düşüktür; fakat boyut dağılımı üzerine etkisi olumlu yönde olmuştur. Daha öncede bahsedildiği gibi, mikroköpükçüklerin kılcal damar sisteminden geçebilmesi için 8 µm’den küçük olması gerekmektedir. Diğer yandanda çok küçük mikroköpükçükler ultrasonda tercih edilmemektedir; zira ultrasonda elde edilen kontrast mikroköpükçüklerin boyutlarının altıncı kuvveti ile doğru orantılıdır (Riess ve ark., 2003).



**Şekil 199.** 5:5:0 ve 5:4:1 DSPC:PEG40St:DSPS mikroköpükçüklerinin karşılaştırmalı boyut dağılımı.

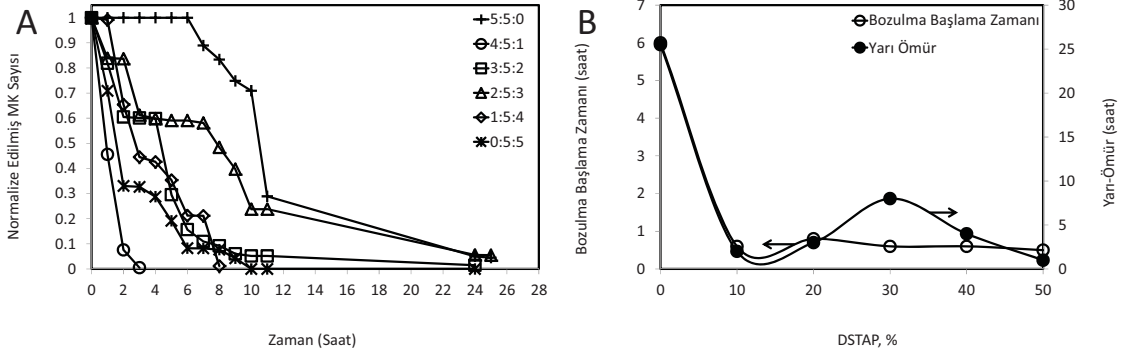
Sayıcı stabilitenin yanı sıra mikroköpükçüklerin boyut değişimi zamana karşı 38°C’de incelenmiş ve sonuçlar Şekil 200’de karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir. Grafikte ifade edildiği gibi zamanla mikroköpükçük boyutunda önemli bir büyüme gözlemlenmemiştir. Bu sonuç klinik açıdan önemlidir; çünkü boyutta büyüme canlıda embolizm problemlerine yol açmaktadır.



**Şekil 200.** DSPC:PEG40St:DSPS karışımları ile üretilmiş mikroköpükçüklerin zamanla boyutlarındaki değişimleri.

## DSTAP:

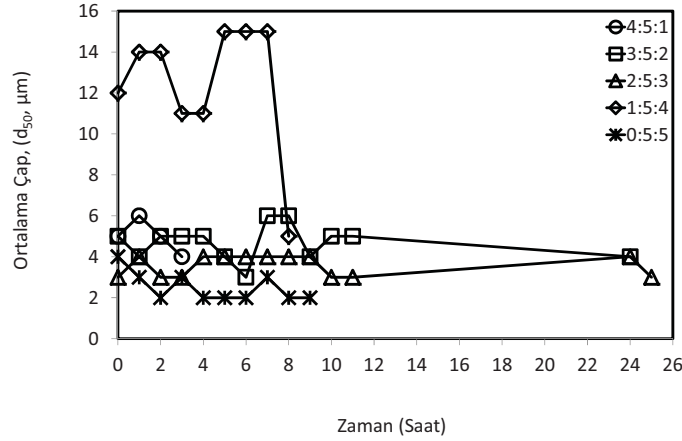
Stabil mikroköpükçük üretimine yönelik yapılan çalışmalarda kullanılan diğer bir iyonik komponent DSTAP'tır. Literatürde, yüklü bileşiklerin mikroköpükçük zarına eklenmesinin mikroköpükçük stabilitesi için önemli olan lipid paketlenmesini inhibe ettiğine dair bazı görüşler mevcuttur (Borden ve ark., 2007; Borden ve Longo, 2002). Bu çalışmada, mikroköpükçükler farklı molar oranlarındaki DSPC:PEG40St:DSTAP karışımları ile üretilmiş ve 38°C'deki stabiliteleri incelenmiştir (Şekil 201). Görüldüğü gibi DSTAP'ın zar yapısına eklenmesi stabilitenin düşmesine neden olmuştur. İki-boyutlu incelemelerden, 2:5:3 karışımında daha çok PEG40St'nin monotabakanın yapısına girdiği anlaşılmaktadır. Dolayısıyla, DSTAP ile hazırlanan karışımlar arasında en stabil karışımın 2:5:3 molar oranındaki DSPC:PEG40St:DSTAP karışımı olduğu beklenen bir sonuç olmaktadır. Şekil 201'den, diğer karışımlarla hazırlanan mikroköpükçüklerin daha hızlı bir şekilde sayılarının düştüğü görülmektedir. Bu sonuç, bu karışımlarda PEG40St oranının daha az olmasına atfedilmektedir.



**Şekil 201.** Değişik oranlarda DSPC:PEG40St:DSTAP mikroköpükçüklerinin 38°C'de (A) zamanla sayılarındaki değişimleri (B) DSTAP miktarının mikroköpükçük ömrüne etkisi

DSTAP içeren mikroköpükçüklerin zamana karşılık boyut değişimleri incelendiğinde (Şekil 202), %40 oranında DSTAP içeren karışımla çok büyük mikroköpükçükler elde edildiği, büyük boyutlardaki mikroköpükçüklerin ortamda en hızlı bozulan mikroköpükçükler olduğu görülmektedir. Bu sonucun, negatif yüklü fosfat grubu ile pozitif yüklü DSTAP baş grubu arasında elektrostatik etkileşim sonucu PEG40St'in homojen olarak monotabaka yapısına girememesinden ve faz ayırılmalarından dolayı stabil mikroköpükçük

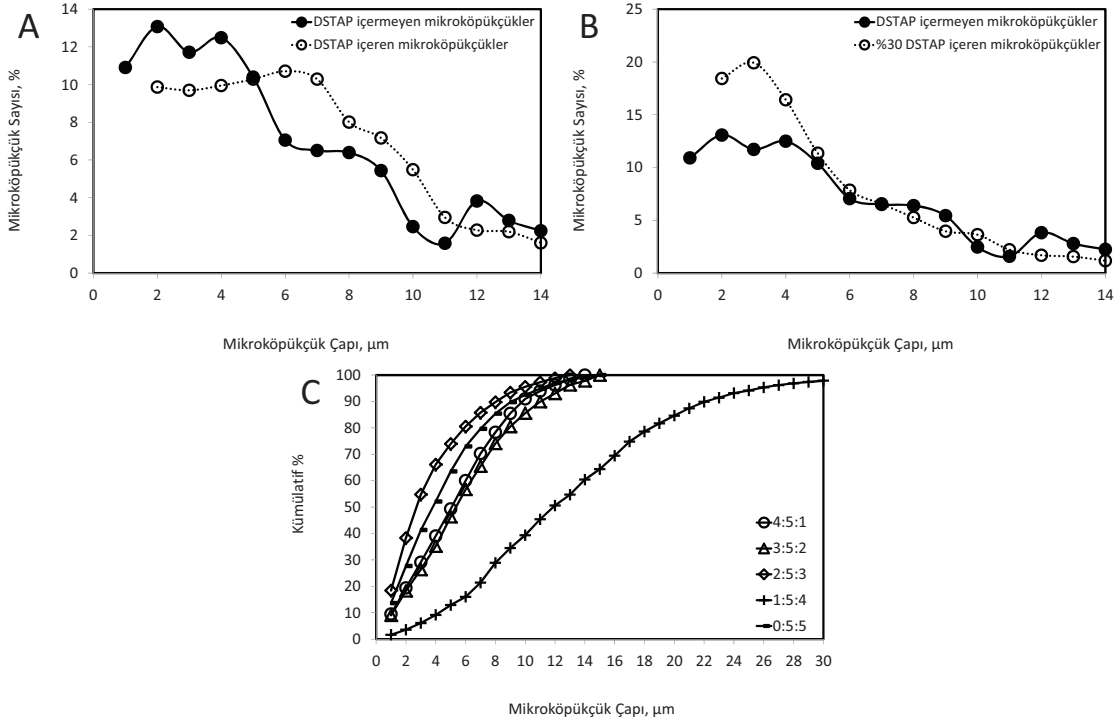
oluşumunun gerçekleşmemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Nitekim, DSPC:PEG40St karışımlarında da, artan PEG40St miktarı ile stabilitenin artması, bu hipotezi desteklemektedir. Diğer karışımlarda ise, eklenen DSTAP oranının daha düşük olması nedeniyle etkinin daha az olduğu görülmektedir.



**Şekil 202.** DSPC:PEG40St:DSTAP karışımları ile üretilmiş mikroköpükçüklerin zamanla boyutlarındaki değişimleri.

Yapılan çalışmalardan elde edilen diğer bir sonuç ise, mikroköpükçük yapısına %10 DSTAP eklenmesi mikroköpükçüklerin önemli bir şekilde büyümelerine yol açmıştır (Şekil 203-A). Buna karşın, %30 oranında karşıma ilave edildiğinde boyut dağılımının azaldığı (Şekil 203-B) ve en küçük mikroköpükçüklerin 2:5:3 karışımı ile elde edildiği görülmektedir (Şekil 203-C). Literatürde %10 DOTAP'ın (DSTAP ile aynı polar gruba sahiptir) lipozom boyutunu azalttığı aynı zamanda membran heterojenitesini azalttığı rapor edilmiştir (Kwan ve Borden, 2012). DSTAP'ın kullanılması lipozomda ve mikroköpükçüklerde farklı sonuçlar vermiştir. Bunun nedeni, lipozomlar bilindiği üzere çift katlı bir zara sahiptir. Mikroköpükçüklerdeki tek katlı zarın elde edilmesi, konik yapıdaki komponentlerin kullanılması ile mümkündür. Monotabaka yapısında bu konik yapı miktarı azaldığında zarın eğimi azalır ki, buda mikroköpükçüklerin büyük ve dayanıksız olmasına neden olmaktadır. DSTAP katyonik bir lipid olup küçük bir polar gruba sahiptir. Daha önce de belirtildiği gibi küçük polar alanına sahip lipidler heksagonal II fazında paketlenme gösterirler. Bu faz misel oluşumunu inhibe edici etkisi yaratmaktadır. Dolayısıyla DSTAP miktarı yüksek olduğunda küçük mikroköpükçük üretimi mümkün olamamaktadır. *Borden ve ark.* tarafından yapılan bir çalışmada da, PEG40St oranının %10 olarak sabit tutulduğu mikroköpükçüklerde,

DSTAP/DSPC oranının artması ile mikroköpükçük boyutlarının büyüdüğünün ve verimliliğin düştüğünün gözlemlenmesi elde edilen sonuçları destekler niteliktedir (Borden, 2007).

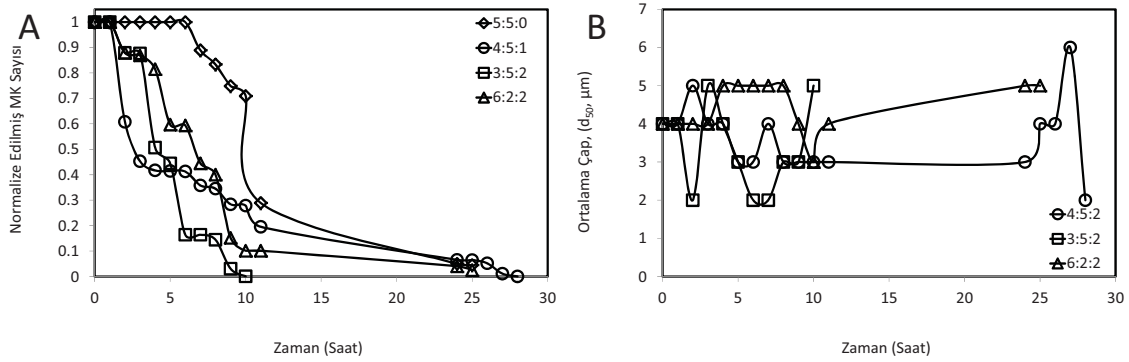


**Şekil 203.** (A) 5:5:0 ve 4:5:1 DSPC:PEG40St:DSTAP (B) 5:5:0 ve 2:5:3 DSPC:PEG40St:DSTAP mikroköpükçüklerin boyut dağılımları (C) farklı miktarlarda DSTAP içeren mikroköpükçüklerin boyut dağılımlarının karşılaştırılması

### St-Amin:

Molar oranları 4:5:1, 3:5:2, 2:5:3, 1:5:4, 0:5:5 ve 6:2:2 olan DSPC:PEG<sub>40</sub>St:StNH<sub>2</sub> karışımları ile üretilen mikroköpükçüklerin bozunma süreleri ve büyüklük dağılım değişimleri Şekil 204'de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. PEG40St'in molar oranının 0.2 olarak sabit tutularak hazırlanan DSPC:PEG40St:StNH<sub>2</sub> karışımlarında, %20'den fazla stearyl amin içeren kompozisyonlarda mikroköpükçük elde edilemediği için, grafiklerde sonuçları bulunmamaktadır. Bunun nedeninin, daha önce stearyl gliserol'de belirtildiği gibi stearyl aminin, fosfolipidlerden farklı olarak, tek hidrokarbon zincirine sahip olması ve bu nedenle mikroköpükçüklerdeki eğimli yapıya uyum sağlayacak bir moleküler yapıda olmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Stearyl amin'in stearyl gliserol'den diğer bir farkı ise hidrofilik kısmında yük içermesidir. Bu sebepten dolayı, bu molekülün stearyl gliserol'e göre daha stabil bir mikroköpükçük zar yapısı oluşturacağı beklenmiş; fakat, molar oranı 5:5 olan

DSPC:PEG40St karışımına %10 oranında eklenen stearyl aminin molekülünün stabiliteyi düşürdüğü gözlemlenmiştir (Şekil 204-A). PEG40St miktarı sabit tutulup, StNH<sub>2</sub> miktarı artırıldığında çok fazla bir değişim kaydedilmemiştir. Mikroköpükçük zar yapısındaki stearyl amin molekülünün artırılması aynı zamanda büyük mikroköpükçük oluşumuna neden olmuştur (Şekil 204-B). Bunun nedeni stearyl amin molekülünün sıkışık bir zar yapısı oluşturmaması olarak açıklanabilir. Stearyl Amin içeren formülasyonlarda PEG40St yüzdesinin düşürülmesi stabilitede kısmen olumlu etki yaratmıştır. 6:2:2 mikroköpükçüklerinin 3 saat boyunca aynı boyutta kalabildiği görülmüştür (Şekil 204-D). Buradan, stearyl tipi moleküllerin mikroköpükçükler üzerine olumlu etkisini görmek için PEG40St molekülünün miktarının %20 oranlarında tutulması gerektiği; ancak, yine de stabil mikroköpükçük üretiminde etkili olmadıkları sonucu çıkmaktadır.



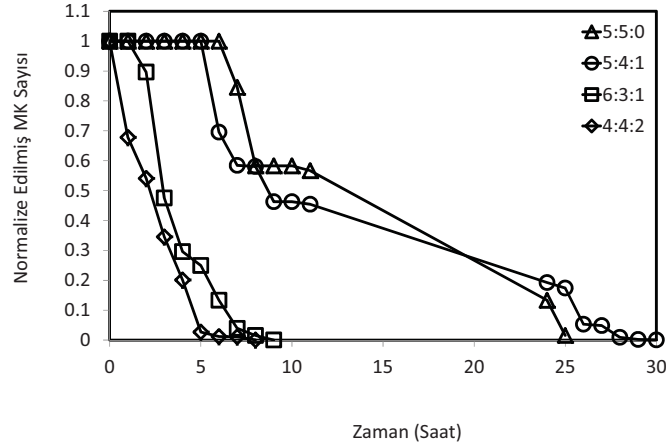
**Şekil 204.** DSPC:PEG40St:StNH<sub>2</sub> karışımları ile üretilmiş mikroköpükçüklerin 38°C'deki (A) sayılarındaki değişimler (B) zamanla büyüklüklerinin kümülatif yüzde değişimleri

### Kolesterol:

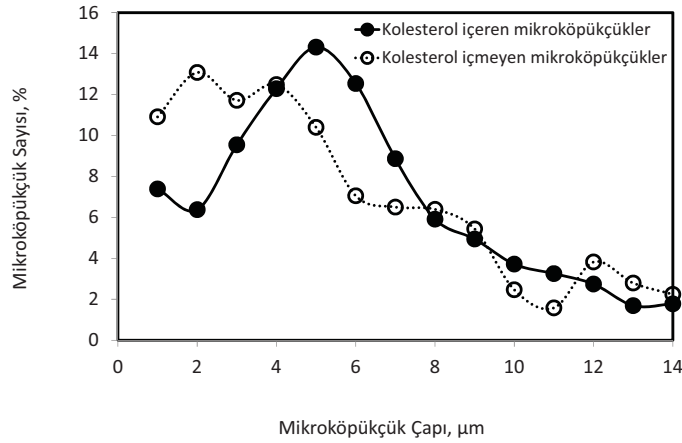
Canlı sistemlerde hücrelerin yapısında bulunan kolesterolün çift katlı zarda lateral organizasyonu sağladıkları ve membrana akışkanlık özelliği kazandırdığı bilinmektedir (Wydro, 2011). Günümüze kadar kolesterolün diğer lipidlerin organizasyonu üzerine etkisini araştırmak üzere model sistemler üzerine birçok çalışma yürütülmüştür (Chomas ve ark., 2001; Christiansen ve ark., 1994; Kirby ve ark., 1980; Petrache ve ark., 2000; Wydro, 2011). Buna rağmen kolesterol mikroköpükçükler üzerine etkisini konu alan çalışma bilginiz dahilinde mevcut değildir. Bu amaçla kolesterolün mikroköpükçük stabilitesine olan etkisini araştırmak üzere mikroköpükçükler molar oranları 5:4:1, 6:3:1 ve 4:4:2 olan DSPC:PEG40St:Kolesterol karışımları ile üretilmiş ve vücut sıcaklığındaki stabiliteyi

incelenmiştir. İlk karışımında %10 kolesterol molekülü mikroköpükçük yapısına eklenmiş, emülsifier miktarı %50'den %40'a düşürülmüştür. İkinci karışımında ise yine %10 kolesterol kullanılmış fakat bu sefer DSPC miktarı %60'a çıkarılmıştır. Son olarak kolesterol miktarı %20'e çıkarılmış DSPC ve emülsifier miktarı azaltılmıştır. Oluşturulan karışımlar ile üretilen mikroköpükçüklerin zamanla sayıca değişimleri Şekil 205'de gösterilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi %10'luk emülsifierin (PEG40St) yerine koyulan kolesterol mikroköpükçüklerin stabilitesine etki etmemiştir. Mikroköpükçüklerin sayıları 5 saat boyunca sabit kalmış ilerleyen süre zarfında ise konsantrasyonda ani bir düşüş görülmüştür. Bu mikroköpükçüklerin yarı-ömrü 11 saat olarak belirlenmiştir. PEG40St miktarının düşürülmesi mikroköpükçük stabilitesini olumsuz yönde etkilemiştir. Bunun nedeninin sterik bariyer etkisinin azalmasının olduğu düşünülmektedir. PEG40St oranı 0.4 olarak sabit tutulup, kolesterol miktarı artırıldığında sayıca düşme daha hızlı olmuştur. Bu davranış lipozom davranışı ile zıt düşmektedir. Literatürdeki çalışmalar, kolesterolce zengin lipozomların 90 dakika boyunca damar içinde stabil kaldıklarını rapor etmektedir (Lozano ve Longo, 2009). Bu farklılık mikroköpükçük yapısının, daha önceki deney sonuçlarında da belirtildiği gibi, lipozomlardan farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Bu iki yapının zar yapısının farklılığının yanı sıra içerdikleri komponentler de farklılık göstermektedir. Mikroköpükçükler lipozomlardan farklı olarak lipidlerin yanı sıra zar yapılarında emülsifier içermektedirler. Lipozomların stabilitesindeki düşüş kolesterol miktarındaki azlık ile alakalı olmasına (kolesterolün azlığı lipozomların lipidleri kaybetmesine neden olmaktadır) rağmen (Kirby ve ark., 1980) mikroköpükçüklerde gözlenen durum tam tersi olmuştur. Plazma zarının (çift katlı zar yapısındadır) hidrofobik kısmının iç kısmında bulunan kolesterol, çift katlı zarın amfifilik maddelere geçirgenliğini azalttığı bilinmektedir. Öte yandan mikroköpükçüklerin zar yapısı tek katlı zardan meydana gelmekte ve zar yapısını oluşturan tüm komponentlerin polar grupları ortamda bulunan sıvı faz ile temas halindedir. Dolayısıyla, kolesterol molekülünün mikroköpükçük zarında düzensizliğe neden olduğu ve bu düzensiz zar yapısının mikroköpükçüklerin içerisinde barındırdığı gazın difüzyonuna sebebiyet verdiği değerlendirilmektedir. Mikroköpükçük karışımına kolesterol ilavesinin mikroköpükçük boyutunu da olumsuz etkilediği gözlemlenmiştir (Şekil 206).





Şekil 205. DSPC:PEG40St:Kolesterol karışımları ile üretilmiş mikroköpükçüklerin 38°C'de zamanla sayılarındaki değişimleri



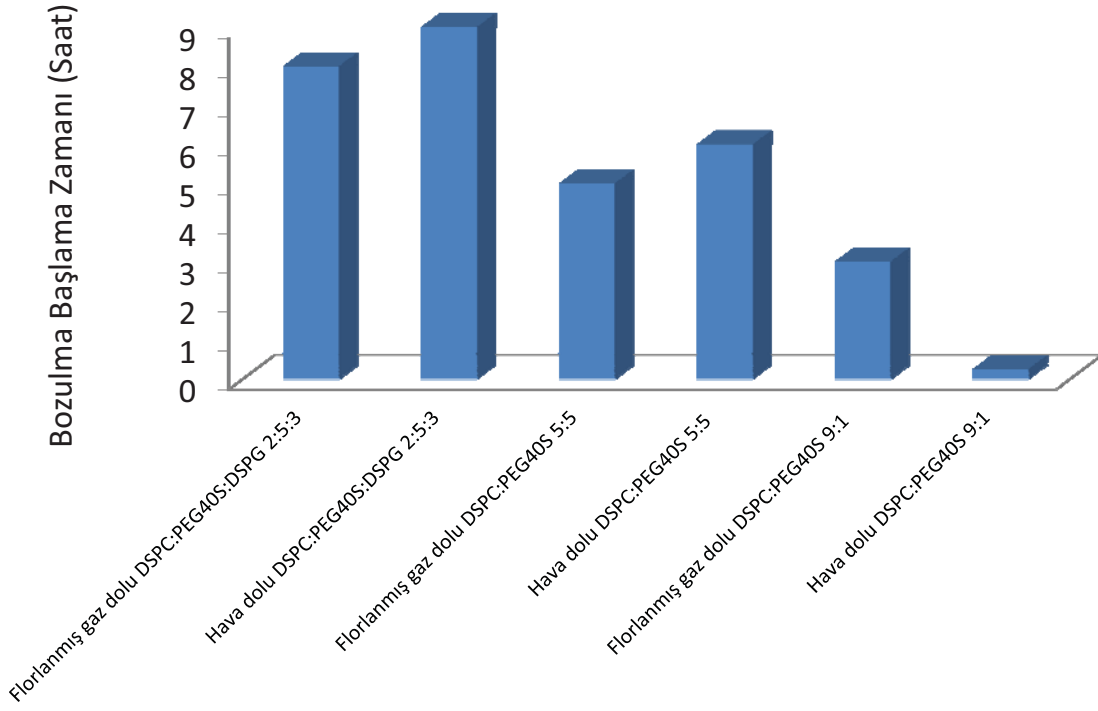
Şekil 206. Kolesterol içeren ve içermeyen mikroköpükçüklerin karşılaştırmalı boyut dağılımı.

#### 4.2.6. Farklı Gaz Kullanımının Mikroköpükçük Stabilitesine Olan Etkisi:

Ultrason uygulamalarında mikroköpükçüklerin gaz ile dolu boşluğu akustik bir uyarıcı görevindedir (Hoff ve Sontum, 1998; Kwan ve Borden, 2012). Başka bir deyişle, ultrason dalgalarının yayılımı sırasındaki mikroköpükçüklerin gaz boşluğunun mikron boyuttaki dairesel titreşimleri ultrason görüntüleme uygulamalarında güçlü sinyal yayılımını sağlamaktadır. Bu özelliğine ek olarak, gaz tipi mikroköpükçük stabilitesi için büyük önem taşımaktadır. Gazın kanda kolay çözünebilir bir gaz olması, bu titreşimler sırasında kana difüzyonunu kolaylaştırmaktadır. Literatürde, genel olarak florlanmış gaz kullanımının

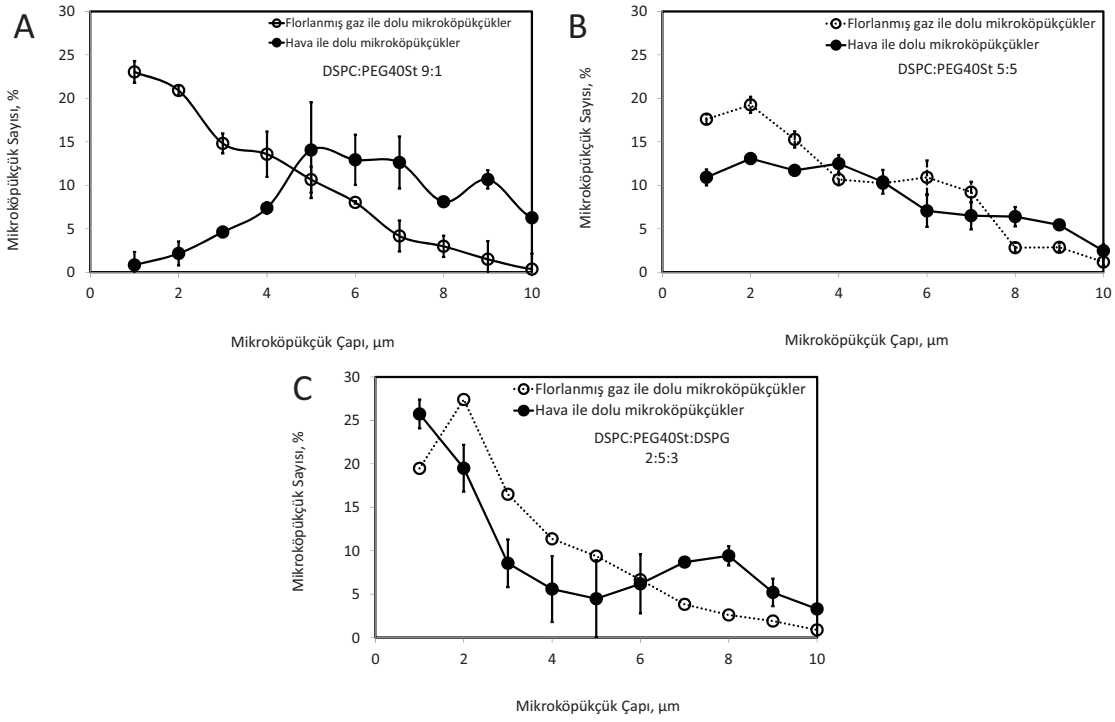
mikroköpükçük stabilitesini önemli ölçüde artırdığı bilinmektedir. Bu nedenle, önceki çalışmalarımızdan seçtiğimiz bazı mikroköpükçükler hava yerine florlanmış bir gaz olan C<sub>4</sub>F<sub>10</sub> (PFC) gazı kullanılarak üretildi ve gazın stabilitesine etkisi araştırıldı. Çalışmamızda kullanılan mikroköpükçük formülasyonları ise şöyledir: DSPC:PEG40St 9:1, DSPC:PEG40St 5:5 ve DSPC:PEG40St:DSPG 2:5:3. PFC ile dolu mikroköpükçüklerin vücut sıcaklığında stabiliteyi Şekil 207’de gösterilmiştir.

Şekilde belirtildiği gibi, bu üç mikroköpükçük formülasyonunun stabilite karşılaştırması hava köpükçükleri ile aynı eğilimi göstermiş yani PEG40St miktarının artması stabiliteyi arttırmıştır. Yine hava köpükçüklerinde olduğu gibi, zar yapısına DSPG’nin eklenmesi stabilitenin daha da artmasına neden olmuştur. Görüldüğü gibi florlanmış gaz sadece %10 oranında PEG40St içeren mikroköpükçüklerin stabilitesini arttırmıştır. 9:1 DSPC:PEG40St karışımı ile üretilen hava mikroköpükçükleri 10 dk. sonunda bozunmaya başlamasına rağmen, florlanmış gaz mikroköpükçükleri yaklaşık 3 saat sonra bozunmaya başlamıştır. Beklenenin tersine 5:5:0 ve 2:5:3 mikroköpükçükleri ile hava yerine florlanmış gaz kullanımı ile stabilitede artış kaydedilememesinden, elde edilen zar yapısı ile gaz geçirgenliğinin zaten minimize edildiği, düşük çözünürlükteki bir gaz kullanmanın sonucu değiştirmediği anlaşılmaktadır. Bu sonuç, mikroköpükçük maliyetinin düşmesi açısından önem arz etmektedir. Zira, florlanmış gaz havaya kıyasla maliyeti artırıcı olacaktır. Böylece, hem hava kullanılarak hem de maliyeti artıran lipidlerin mikroköpükçük formülasyonundaki oranlarını azaltarak, düşük maliyetli mikroköpükçükler elde edilmiş oldu.



**Şekil 207.** Hava ve florlanmış gaz dolu olan farklı mikroköpükçüklerin 38°C’de bozulma başlama zamanları

Farklı gaz kullanımı ile ilgili olarak elde edilen diğer bir sonuç ise, florlanmış gaz ile üretilen mikroköpükçüklerin kısmen daha küçük boyut dağılımına sahip olmasıdır (Şekil 208). Buna ek olarak, mikroköpükçük verimliliği 2 kat artmıştır. Boyut değişikliği en fazla konvensiyonel formülasyon olan 9:1 DSPC:PEG40St mikroköpükçüklerinde fark edilebilir derecede kendini göstermiştir. 9:1 karışımı için elde edilen bu sonuçların literatür ile uyum içinde olduğu görülmektedir. Ancak, daha öncede belirtildiği gibi 5:5:0 ve 2:5:3 mikroköpükçüklerinde florlanmış gaz kullanımının, hem boyut dağılımı hemde stabilite olarak bir avantaj sağlamadığı anlaşılmaktadır.

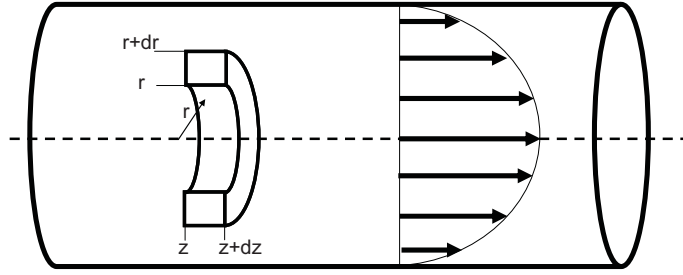


**Şekil 208.** Florlanmış gaz ve hava içeren mikroköpüküklerin karşılaştırmalı boyut dağılımı.

#### 4.2.7. Mikroköpüküklerin Dinamik Stabilitesi

Mikroköpüküklerin *in-vivo* uygulamalarında görüntü kalitesi, mikroköpüküklerin boyutlarına ve konsantrasyonuna bağlıdır. Aynı şekilde, mikroköpükükler ilaç, gen, ve DNA taşınımında kullanıldığında hastaya enjekte edilecek doz, mikroköpüküklerin sayılarıyla ve büyüklükleriyle orantılıdır. Mikroköpükükler vücuda enjekte edildiklerinde, kanın damarlarda akışı esnasında damar içerisinde bir hız farkı olduğundan, kayma gerilimi adı verilen bir kuvvete maruz kalırlar. Bu kuvvetin etkisiyle mikroköpüküklerin boyutlarında ve stabilitelerinde bir değişim olabilir. Bu kısım çalışmada, kayma geriliminin mikroköpükük stabiliteleri üzerine etkileri incelenmiştir.

Kayma gerilimine sebebiyet veren boru içerisindeki akış ile oluşan hız profili Şekil 209'de gösterilmektedir. Bu aynı zamanda, kanın damarlardaki akışını da sembolize etmektedir. Şekilde gösterilen bir diferansiyel zar üzerinde kütle ve kuvvet denklileri yapıldığında, hız profili, ortalama hız, ve kayma gerilimini veren matematiksel ifadeler türetilir (Welty ve ark., 1969).



**Şekil 209.** Kayma gerilimine sebebiyet veren boru içerisindeki akış ile oluşan hız profili

Kısaca, borulu bir akışta hız profili Denklem (7) ile verilebilir.

$$v_z = v_{\max} \left[ 1 - \left( \frac{r}{R} \right)^2 \right] \quad (7)$$

Genelde borunun merkezinden geçen akışkanın sahip olduğu hız, maksimum hızı ( $v_{\max}$ ) verir ve değeri boru içerisindeki basınç düşmesi ( $\Delta P/L$ ), borunun iç çapı ( $R$ ), ve akışkanın vizkozitesi ( $\mu$ ) ile orantılıdır.

$$v_{\max} = \frac{\Delta P R^2}{4\mu L} \quad (8)$$

Bu durumda ortalama hız, maksimum hızın yarısı olarak hesaplanmaktadır. Öte yandan, akışkanın hacimsel akış hızı ( $Q$ ), boru içerisinden akan akışkanın ortalama akış hızı ve borunun kesit alanı ile orantılıdır. Akışkanın hacimsel akış hızı Denklem (9) ile verilebilir.

$$Q = \frac{\pi R^4}{8\mu(\Delta P/L)} \quad (9)$$

Kayma gerilimi ( $\tau$ ) akışkanın boru içerisinde akışı esnasında borunun kesit alanı boyunca hızdaki değişim ile orantılıdır. Bu oran, akışkanın vizkozitesi ile birlikte eşitlik olarak yazılabilir.

$$\tau = -\mu \frac{dv}{dr} \quad (10)$$

Böylece, bir boru içerisinde mikroköpükçükler üzerine etki eden toplam kayma gerilimi Denklem (11) ile verilebilir.

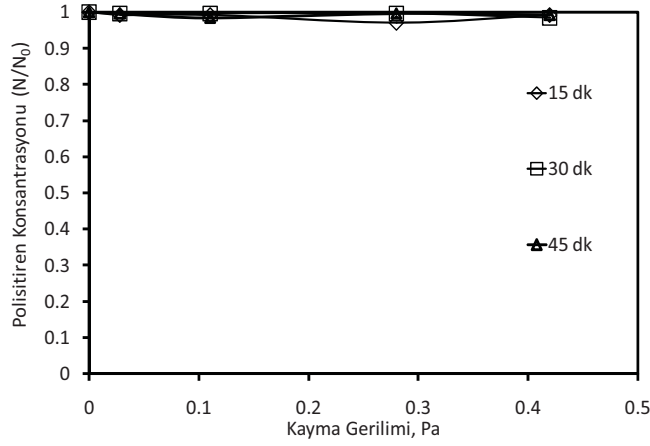
$$\tau = \frac{4\mu Q}{\pi R^2} \quad (11)$$

Üretilen mikroköpükçüklerin dinamik stabiliteleri farklı kayma gerilimi değerlerinde test edildi. Bu amaçla, Şekil 7’de gösterilen sabit sıcaklıkta 1.5 mm çapında şeffaf bir polietilen borudan, kapalı sistemde peristaltik pompa yardımı ile farklı hacimsel akış hızlarından fosfat tampon çözeltisi (PBS) geçirilerek Tablo 3’de verilen kayma gerilimi değerleri elde edildi. Bu değerler, vucutta kan akışı esnasında var olan fizyolojik kayma gerilimi değerlerine yakın değerler olarak seçildi (Wiese ve ark., 2009).

**Tablo 3.** Kullanılan hacimsel debilerde elde edilen kayma gerilimi değerleri (D=1.5 mm için )

Hacimsel Akış Hızı (Q) (ml/dk)	Kayma gerilimi ( $\tau$ ) (Pa)
0.56	0.028
2.19	0.11
5.57	0.28
8.35	0.42

İlk olarak, sistemde yapısının bozunmadığını düşündüğümüz yaklaşık 3  $\mu$ m boyutlarında polisitiren tanecikleri (Sigma-Aldrich) kullanılmıştır. Polisitiren tanecikleri sisteme enjekte edilmiş ve belirlenen kayma gerilimlerinde belli sürelerde sistemde kayma gerilimine maruz bırakılmış ve sistemden alınarak boyut dağılımı ve sayıca konsantrasyonları belirlenmiştir. Şekil 210’de görüleceği üzere, 45 dakikaya kadar devridaim edilen polisitiren kürecikleri, 0.42 Pa kayma gerilimi değerine kadar kayma gerilimlerine maruz bırakıldığında, ne boyutlarında bir değişme olmuş, ne de tanecik sayılarında bir azalma olmuştur. Daha kararlı polisitiren taneciklerine göre sistemin çalışabilirliği test edildikten sonra, mikroköpükçük deneylerine geçilmiştir.



**Şekil 210.** Kayma gerilimi ile birlikte 15, 30 ve 45 dakikalık sirkülasyon sonrası polistiren küreciklerinin konsantrasyon değişimi

Mikroköpükçükler DSPC:PEG40St'nin 9:1, 8:2, 7:3, 6:4 ve 5:5 mol oranlarında karışımlarından, daha önce belirtilen teknikle, hazırlandı. Mikroköpükçüklerin konsantrasyonu ve boyut dağılımı kayma gerilimine maruz kalmadan önce optik mikroskopta görüntü alınarak Image J yazılımı ile belirlendi.

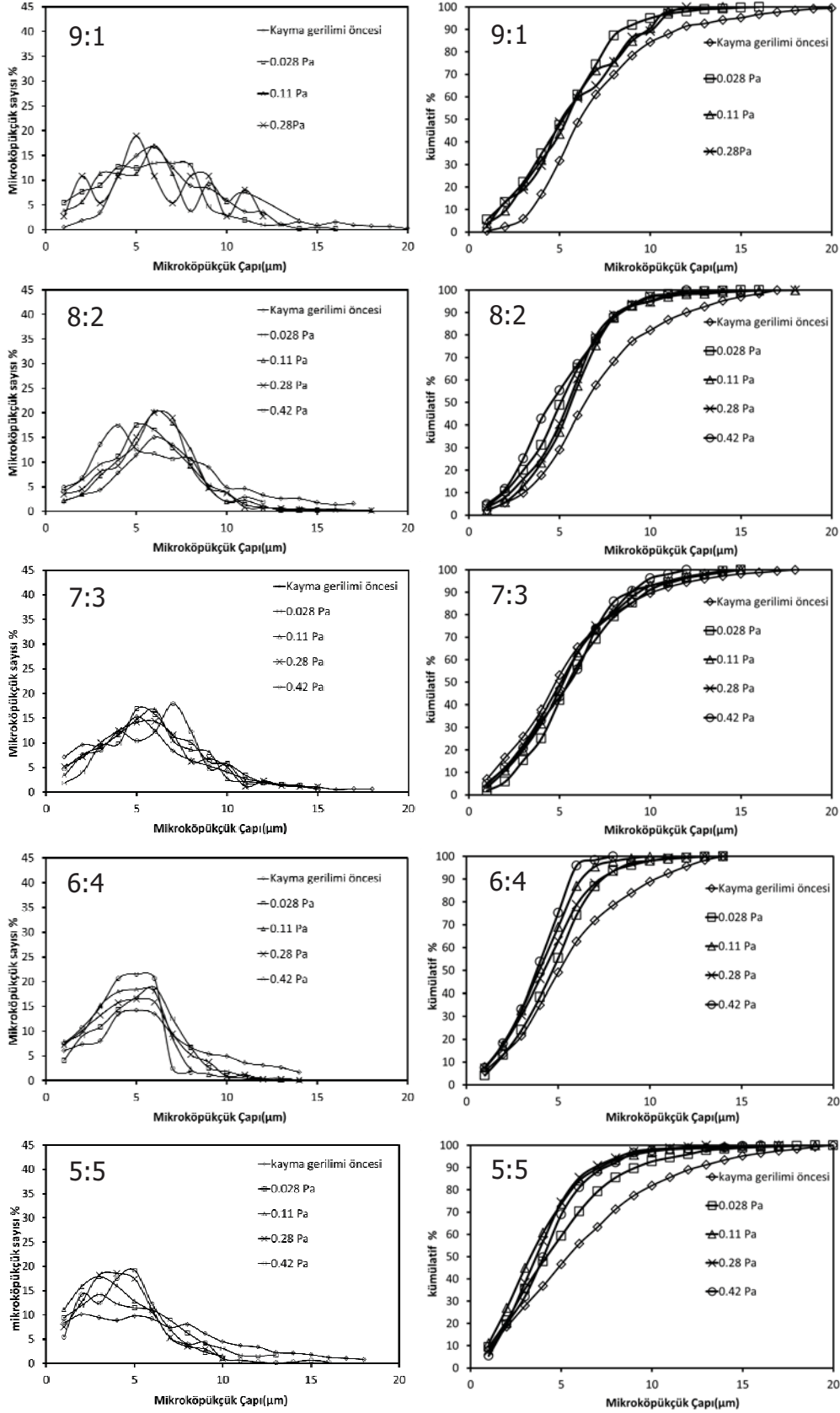
Mikroköpükçüklerin belirlenen kayma gerilimlerinde dinamik stabilitelerinin belirlenebilmesi için, 1.5 mm çapındaki şeffaf polietilen boru içerisine 16 gauge'lik (1.29mm) şırınga ile enjekte edilerek PBS (pH 7.2) çözeltisi içerisinde kapalı sistemde peristaltik pompa yardımı ile sirküle edildi. Literatürde yapılan bir çalışmada tavşanlarla yapılan deneylerde görüntü alabilmek için kullanılan doz yaklaşık olarak  $10^9$ /ml (Kaya ve ark., 2009) olarak belirlendiğinden mikroköpükçüklerin başlangıç konsantrasyonunun  $10^9$ /ml olmasına dikkat edildi. Kapalı sistem kullanılmasının sebebi, mikroköpükçük konsantrasyonunun seyrelmeye karşı düşmesini minimize etmektir.

Mikroköpükçükler, vücuttaki fizyolojik kayma gerilimi değerlerinden olan 0.028, 0.11, 0.28 ve 0.42 Pa (Wiese ve ark., 2009) kayma gerilmelerine tabi tutuldu. Boru çapı sabit tutulurken, hacimsel debiyi değiştirerek farklı kayma gerilimi değerleri sağlandı. Deney her bir mikroköpükçük kompozisyonu ve kayma gerilimi için 15 ve 30 dakikalık sirkülasyon zamanları için tekrarlandı.

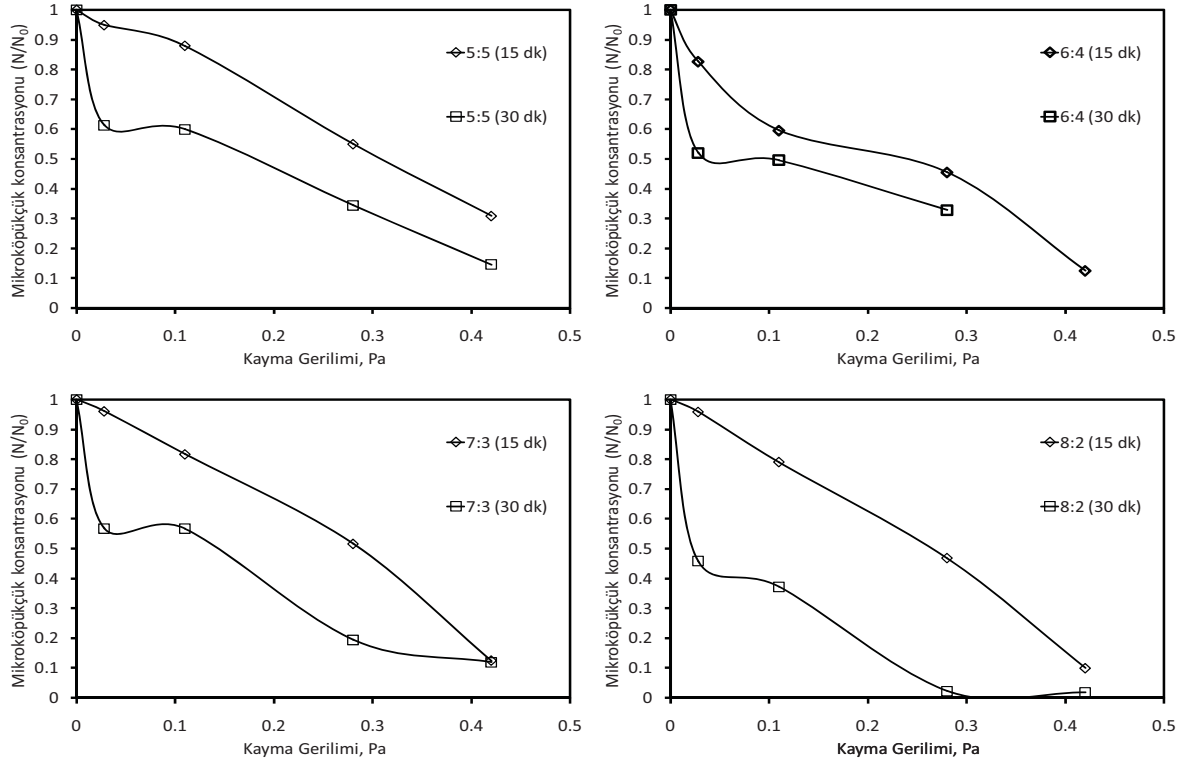
*DSPC:PEG40St Molar Oranı Etkisi:*

DSPC:PEG40St mikroköpükçüklerinin sirkülasyon öncesi ve 15 dakika sirkülasyon sonrası sayıca yüzde ve kümülatif yüzde dağılımları Şekil 211’de verilmektedir. Şekilde görüleceği üzere mikroköpükçüklerinin boyutları kayma gerilimine maruz kalmadan önceki haline göre küçülmektedir. Öte yandan, kayma gerilimi ile birlikte, mikroköpükçüklerin sayılarında bir azalma da olmaktadır. Farklı kayma gerilimleri altında 15 dakika ve 30 dakika sirküle edilen mikroköpükçüklerin konsantrasyonlarındaki değişim Şekil 212’de verilmektedir. Şekil 211 ve Şekil 212’de görüldüğü üzere, kayma gerilimi artışı ile birlikte mikroköpükçükler bozulmaya başlamakta ve boyutlarında bir azalma olurken mikroköpükçük konsantrasyonunda da bir düşüş olmaktadır. Bu düşüş sirkülasyon zamanının artışıyla artmaktadır.



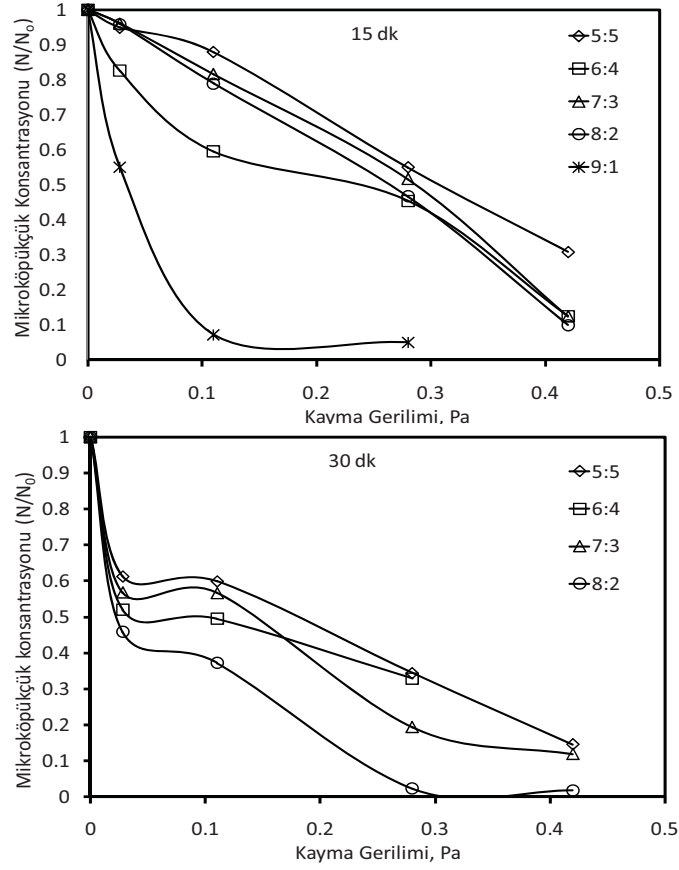


Şekil 211. 15 dakika sirkülasyon sonrası DSPC:PEG40St mikroköpükçüklerinin sayıca yüzde ve kümülatif yüzde dağılımları



**Şekil 212.** DSPC:PEG40St mikroköpükçüklerinin farklı kayma gerilmelerine karşılık 15 ve 30 dakikalık sirkülasyon sonucu konsantrasyon değişimi

DSPC:PEG40St mikroköpükçüklerinin 15 dakika süresince farklı kayma gerilmelerinde sirkülasyona tabii tutulduğunda, Şekil 213'da görüldüğü üzere, konsantrasyonları düşmektedir. Bu literatürde yaygın olarak çalışılan 9:1 mikroköpükçükleri ile karşılaştırıldığında, PEG40St mol oranı arttıkça, mikroköpükçüklerin daha stabil oldukları anlaşılmaktadır. 15 dakikalık sirkülasyon sonucundaki konsantrasyon düşüşünün bu kadar hızlı olması nedeniyle 9:1 mikroköpükçükleri 30 dakikalık sirkülasyona maruz bırakılmamıştır. 15 ve 30 dakikalık sirkülasyon sürelerinde farklı kayma gerilmelerine maruz bırakılan DSPC:PEG40St mikroköpükçükleri kıyaslandığında, DSPC:PEG40St 5:5 kompozisyonundaki mikroköpükçüklerin kayma gerilimine karşı stabilitesi diğer mikroköpükçüklere oranla daha yüksektir. Mikroköpükçüklerin maliyetinin düşürülmesi de göz önüne alındığında, bundan sonraki diğer testlerde, 5:5 mikroköpükçükleri araştırılmıştır.



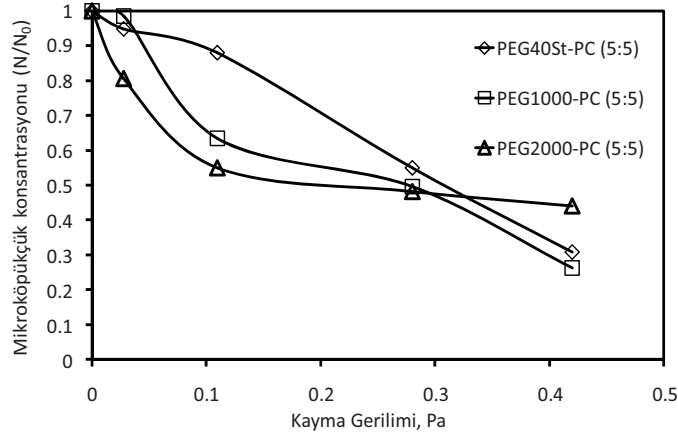
**Şekil 213.** DSPC:PEG40St mikroköpükçüklerinin kayma gerilimine karşılık konsantrasyon değişimlerinin karşılaştırılması

#### *Emülsifier Etkisi:*

Bu çalışmada, emülsifiyer etkisini görmek için, 5:5 molar oranında DSPC:PEG40St, DSPC:DSPE-PEG1000, ve DSPC:DSPE-PEG2000 ile yapılan mikroköpükçüklerin kayma gerilimi altında konsantrasyon ve boyut dağılımları değişimi incelenmiştir. Her üç mikroköpükçük çeşidinde de artan kayma gerilimi ile birlikte boyutlarda küçülme eğilimi vardır.

Farklı kayma gerilimi değerlerinde sirkülasyona tabii tutulan 5:5 molar kompozisyonundaki DSPC:PEG40St, DSPC:DSPE-PEG1000, ve DSPC:DSPE-PEG2000 mikro köpükçüklerinin 25 °C'de kayma sonrası konsantrasyon değişimleri Şekil 214'de verilmektedir. Şekilde görüleceği üzere, kayma gerilimine maruz kalan 5:5

mikroköpükçüklerinin %50'si stabil olarak kalabilmişlerdir. Ancak, DSPC:DSPE-PEG2000 mikroköpükçüklerinin statik stabilite deney sonuçlarında DSPC:PEG40St 5:5 mikroköpükçüklerine kıyasla ömürünün daha kısa olduğu görülmüştür.



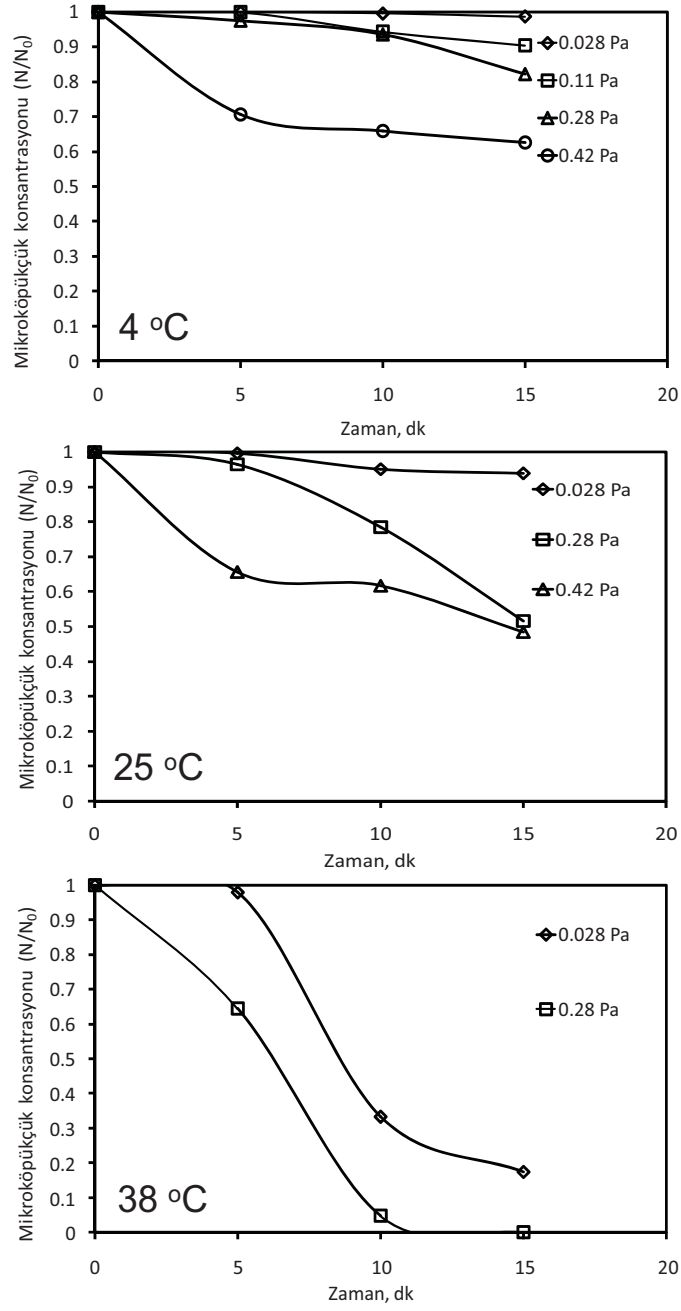
**Şekil 214.** 5:5 molar kompozisyonundaki DSPC:PEG40St, DSPC:DSPE-PEG1000, ve DSPC:DSPE-PEG2000 mikro köpükçüklerinin 25 °C'de kayma sonrası konsantrasyon değişiminin kıyaslanması

*DSPC:PEG40St 5:5 Mikroköpükçüklerinin Kayma Gerilimi, Sıcaklık ve Zamanla Konsantrasyon ve Boyut Dağılımının Değişimi:*

DSPC:PEG40St ikili kompozisyonları olan 5:5, 6:4, 7:3, 8:2 ve 9:1 ile yapılan deneylerde kayma gerilimine karşı stabilitesini en iyi koruyabilen kompozisyonun 5:5 kompozisyonundaki mikroköpükçük olduğu görülmüştür. Bu çalışmada DSPC:PEG40St 5:5 kompozisyonundaki mikroköpükçüğün kayma gerilimine altında sıcaklık ve sirkülasyon zamanına karşı değişimi incelenmiştir. Fizyolojik kayma gerilmeleri olan 0.028 Pa , 0.11Pa, 0.28 Pa ve 0.42 Pa altında, mikroköpükçükler 4 °C, 25 °C ve 38 °C sıcaklıklarında 5, 10 ve 15 dakika sirküle edilerek konsantrasyon ve boyut dağılımdaki değişim incelendi.

Daha önce yapılan statik stabilite deneylerinde DSPC:PEG40St 5:5 molar kompozisyonundaki mikroköpükçüklerin 4 °C 'de günlerce konsantrasyonunu ve boyut dağılımını koruduğu görülmüştür. Bu nedenle, 4 °C 'de yapılan kayma gerilimi deneylerinde mikroköpükçük stabilitesindeki değişimlerin yalnızca kayma geriliminden kaynaklanacağı düşünülmektedir. Şekil 215'de görüldüğü üzere artan kayma gerilimiyle birlikte

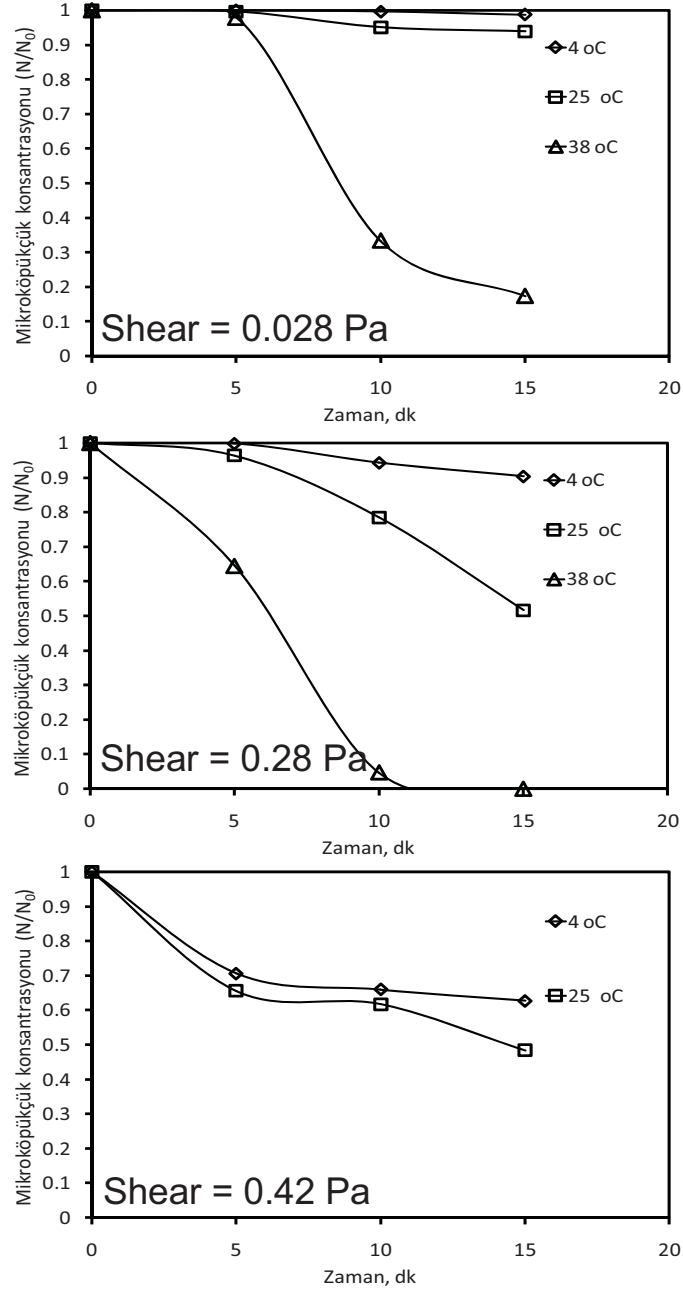
konsantrasyonun zamana karşı düşüşü 4 °C'da genelde azdır. 5:5 mikroköpükçüklerinin 0.028 Pa kayma gerilimi altında 15 dakikalık sirkülasyon sonrası konsantrasyon kaybı yalnızca %3'tür. Kayma gerilimi 0.42 Pa gibi yüksek değerlerde mikroköpükçük stabilitesi üzerine etkisi olmaktadır. Şekilden görüleceği üzere, sirkülasyonun ilk 5 dakikadan itibaren konsantrasyon kaybı %40 olmaktadır. Sıcaklık arttıkça, mikroköpükçüklerin stabilitelerinde de gözle görülür bir değişim olmaktadır. 38 °C'deki mikroköpükçük konsantrasyonu, kayma gerilimi altında, 4 ve 25 °C'deki konsantrasyona göre daha hızlı azalmıştır. 38 °C'de 0.42 Pa kayma geriliminde ilk dakikadan itibaren mikroköpükçükler ortamdan tamamen kaybolmuştur.



**Şekil 215.** DSPC:PEG40St 5:5 mikroköpükçüklerinin farklı sıcaklık ve farklı kayma gerilmeleri sonrası zamana karşılık konsantrasyon değişimlerinin kıyaslanması

Farklı kayma gerilmelerinde, 4 °C, 25 °C ve 38 °C sıcaklıklarda, 15 dakika kayma gerilimine maruz bırakılan mikroköpükçüklerin stabiliteyi Şekil 216'da verilmektedir. Şekilde görüldüğü üzere, sıcaklığın artışı mikroköpükçüklerin stabilitesini azaltmaktadır. Mikroköpükçüklerin kayma gerilimine maruz kalması, mikroköpükçük stabilitesini daha da etkilemektedir. Mikroköpükçüklerin düşük sıcaklıklarda daha stabil davranmasının nedeni

alkil zincirleri arasındaki van der Waals etkileşimlerinin artması sonucu mikroköpükçük zarının esneme geriliminin ve viskozitesinin artmasından kaynaklanmaktadır. Sıcaklığın artmasıyla moleküller arasındaki van der Waals kuvvetleri zayıflamaktadır ve mikroköpükçük zar yapısı daha kolay deforme olmaktadır (Kwan ve Borden, 2012).

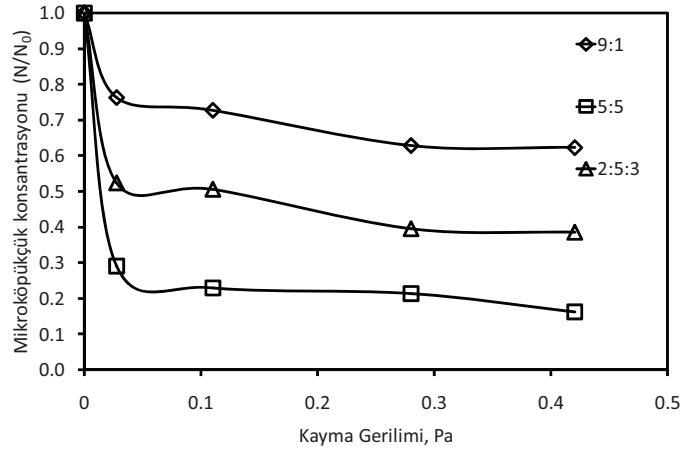


**Şekil 216.** (a) 0.028 Pa, (b) 0.28 Pa, (c) 0.42 Pa'da 4 °C, 25 °C ve 38 °C'de 15 dakika kayma gerilmeleri sonrası mikroköpükçük konsantrasyon değişiminin kıyaslanması

*Perflorokarbon Gazı (PFC) İhtiva Eden Mikroköpükçüklerin Kayma Gerilimi Altında İncelenmesi:*

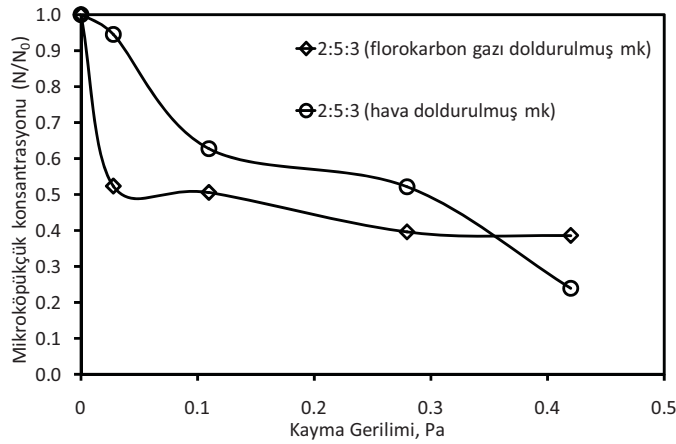
Daha önce yapılan hava mikroköpükçüklerinde hem statik hem de dinamik stabilite testlerinde iyi sonuçlar veren 5:5 mol oranında DSPC:PEG40St ve 2:5:3 mol oranında DSPC:PEG40St:DSPG mikroköpükçükleri, ve bunlara ek olarak, 9:1 mol oranında DSPC:PEG40St mikroköpükçükleri, perflorokarbon gazı ile üretilerek 38 °C’de 15 dakika kayma gerilimi altında stabilitelerine bakılmıştır. Kayma gerilimi deneyleri hava dolu mikroköpükçüklerin test edildiği sistemle aynı sistemde test edildi. Yine optik mikroskopta kayma gerilimi testi öncesi ve sonrası çekilen fotoğrafların ImageJ programıyla analiz edilmesi sonucu boyut dağılımı ve konsantrasyon değişimi belirlendi. Şekil 217’de, 9:1 ve 5:5 DSPC:PEG40St PFC mikroköpükçükleri ile 2:5:3 DSPC:PEG40St:DSPG PFC mikroköpükçüklerinin konsantrasyon değişimlerinin karşılaştırılması görülmektedir. Üç mikroköpükçük türü için konsantrasyon düşüşü en fazla mikroköpükçüklerin ilk kayma gerilimine maruz kaldıkları durumda olmaktadır. Kayma geriliminin artması, mikroköpükçüklerdeki konsantrasyon kaybını önemli ölçüde etkilememektedir. DSPC:PEG40St mikroköpükçükleri için artan DSPC molar oranının mikroköpükçüklerin kayma gerilimi altında stabilitelerini daha iyi koruyabildiklerini göstermektedir. DSPC:PEG40St 5:5 mikroköpükçüklerinde son üç kayma gerilimi sonrası konsantrasyon düşüşleri yakın olmasına rağmen boyut dağılımında görülen bariz küçülme, mikroköpükçüklerin “Ostwald ripening” presibine göre bozulduklarını göstermektedir. Ostwald ripening, küçük mikroköpükçüklerin yüksek Laplas basıncından dolayı küçülmeye devam etmeleri ve büyük mikroköpükçüklerin de lokal olarak aşırı doymun alanlar yaratmaları sonucu büyümeye devam ederek bozulduğunu ifade eder. Talu ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada da (Talu ve ark., 2006), DSPC ve PEG40St’tan oluşan mikroköpükçüklerin bozulma deneylerinde “Ostwald ripening” etkisi gözlemlenmişlerdir.





**Şekil 217.** T=38 °C'de DSPC:PEG40St ve DSPC:PEG40St:DSPG PFC mikroköpükçüklerinin kayma gerilimi sonrası konsantrasyon düşüşlerinin karşılaştırılması

Öte yandan, 2:5:3 mol oranında DSPC:PEG40St:DSPG hava mikroköpükçükleri ve 2:5:3 mol oranında DSPC:PEG40St:DSPG PFC mikroköpükçükleri karşılaştırıldığında, Şekil 218'de görüldüğü üzere, hava mikroköpükçüklerinin daha stabil oldukları görülmektedir. Bu sonuç, statik deneylerde elde edilen bulgularla uyum içindedir.



**Şekil 218.** 2:5:3 DSPC:PEG40St:DSPG hava ve PFC mikroköpükçüklerinin 38 °C'de kayma gerilimi sonrası stabilitelerinin kıyaslanması

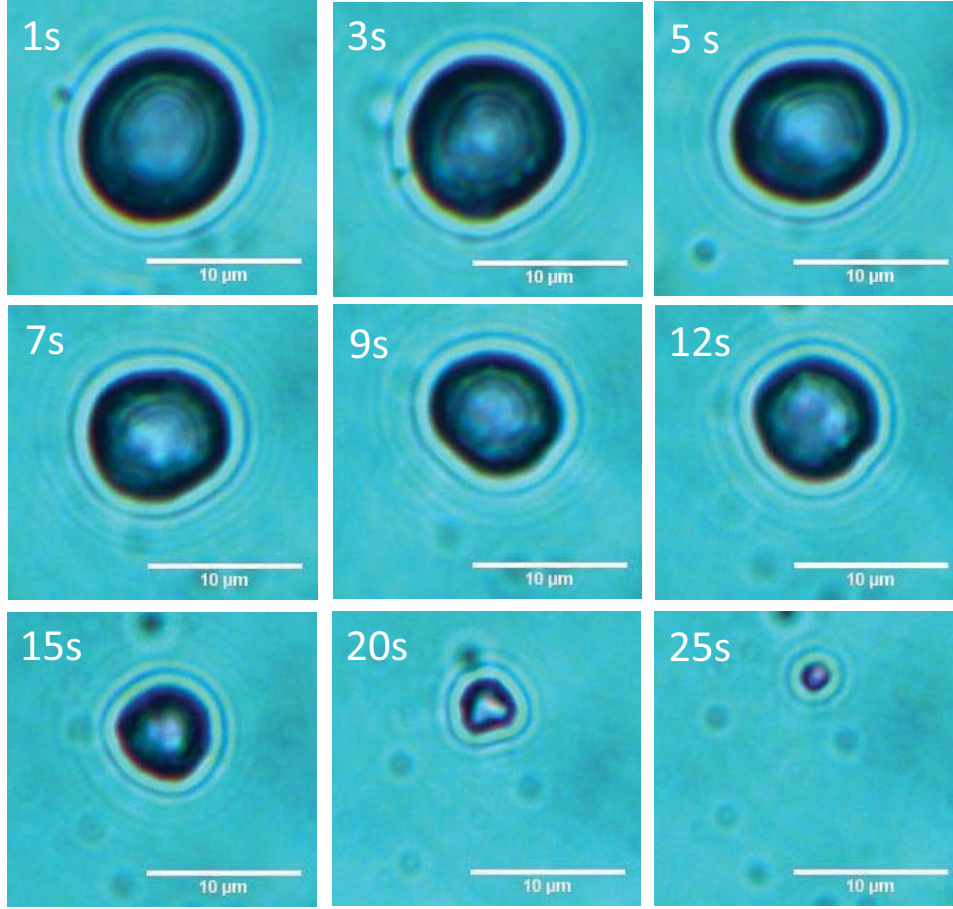
#### 4.2.8. Mikroköpükçükler'in Çözünme Davranışının İncelenmesi

Bir hava kabarcığının, ki mikroköpükçüklerde olduğu gibi etrafında bir resistans yoktur, doymun olmayan bir sıvı içerisinde çözünmesi Epstein-Plesset (EP) modeli ile

verilebilir. Hava kabarcığının çözünmesine neden olan iki itici güç vardır. Bunlar, yüzey gerilimi ve konsantrasyonlar arasındaki farktır. Ancak, kaplanmış bir mikroköpükçük için gaz fazını kaplayan monotabakanın oluşturacağı kütle transferi direnci göz ardı edilemez. Borden ve arkadaşları hava kabarcığı için türetilen Epstein-Plesset (EP) modeli kütle transfer rezistansı ekleyerek mikroköpükçükler için modifiye etmişlerdir (Borden ve Longo, 2002). Yapılan deneylerde, tek bir mikroköpükçüğün bozunması anını beklemişler; mikroköpükçük belli bir büyüklüğe ulaştığı andan itibaren ise, zamana bağlı olarak boyutlarında meydana gelen değişmeden, mikroköpükçüklerin zar (shell) dirençlerini hesaplamışlardır.

Hava kabarcıkları, etrafında bir zar (shell) olmadığından dolayı çözünmeleri oldukça hızlıdır. Yüzey gerilimi arttıkça ve mikroköpükçüğün içinde bulunduğu çözeltinin gaz doygunluğu arttıkça çözünme zamanının arttığı görülmektedir. Ancak, mikroköpükçükler için durum böyle değildir. Mikroköpükçüklerin etrafında bulunan zar, gazın difüzyonu için bir direnç oluşturur.

Şekil 219'de DSPC:PEG40St 9:1 mikroköpükçüğünün 100X objektifle çekilmiş, oksijen doygunluğu 70% olan bir çözelti içerisinde,  $f=0.7$ , bozulma mekanizması görülmektedir. Başlangıçta küresel görünen mikroköpükçüğün zamanla zar kısmında bükülmeler gözlemlenmiştir ve içindeki gazın dışarıya difüzyonu nedeniyle mikroköpükçük küçülmüştür. Daha sonra mikroköpükçüğün tekrar küresel yapısına geri döndüğü gözlemlenmiştir. DSPC gibi uzun zincirli lipit içeren monotabakalar düzlemsel olarak kohesif ve katı yapıdadır (Borden ve Longo, 2002). Bu nedenle monotabaka gaz difüzyonuna karşı direnç gösterir. Mikroköpükçük yüzeyindeki bükülmenin fazla olması, yüzeydeki mikrotabakanın yapısının enerjik olarak olumsuz yapıda olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, zar yapısındaki bükülme, birbirlerine yaklaşan hidrofobik zincirlerin birbirlerine temas etmelerine neden olur. Hidrofobik zincirler arasındaki güçlü etkileşim, yüzeydeki lipid fazlalığının uzaklaşmasını sağlar ve yüzeyde fazlalık olan lipit miktarının uzaklaşmasıyla birlikte mikroköpükçük tekrar eski haline döner. Mikroköpükçükten tekrar gaz difüzyon olmasıyla birlikte tekrar bükülmeler gözlemlenir. Aynı proses, mikroköpükçüğün çözünmesi tam olarak tamamlanana kadar devam eder.

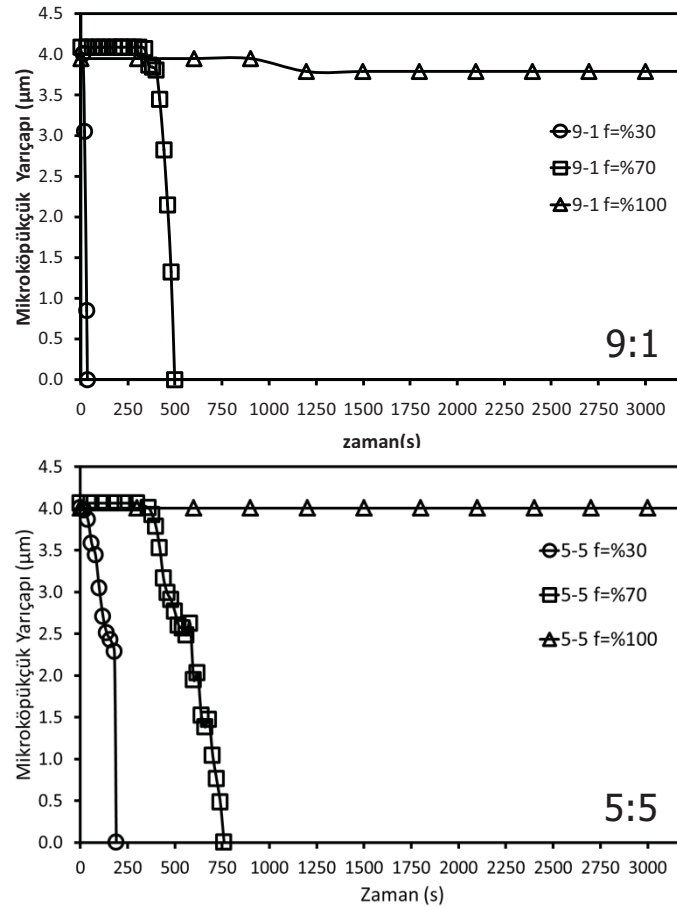


**Şekil 219.** Bir 9:1 DSPC:PEG40St mikroköpükçüğün optik mikroskop altında çözünmesinin izlenmesi

Yaklaşık 8 µm yarıçapındaki 9:1 ve 5:5 DSPC:PEG40St mikroköpükçüklerinin farklı oksijen doygunluğundaki PBS tampon çözelti içerisindeki çözünmelerinin deneysel sonuçları, Şekil 220’te görülmektedir. Oksijen doygunluk değeri %30, ( $f=0.3$ ), olduğunda, 8 µm boyutundaki 9:1 DSPC:PEG40St mikroköpükçüklerin çözünme zamanı yaklaşık olarak 30-35 saniyedir. Çözeltinin oksijen doygunluğu %70, ( $f=0.7$ ), olduğunda, 9:1 DSPC:PEG40St mikroköpükçük boyutunun yaklaşık 400 saniye boyunca sabit kaldığı ve daha sonra çözünmenin tamamladığı gözlemlenmiştir. Tamamen çözeltinin oksijence doygun olduğu durumda ise, ( $f=1$ ), mikroköpükçük yarıçapı 15 dakika boyunca sabit kalmıştır ve 15 dakika sonrasında mikroköpükçük çapında 0.16 µm’lik bir düşüş olmuştur. Daha sonra iki saat boyunca izlenen mikroköpükçük boyutunda bir değişiklik gözlemlenmemiştir.

Deneyler aynı koşullarda 5:5 DSPC:PEG40St mikroköpükçükleri için de yapılmıştır. 9:1 ve 5:5 DSPC:PEG40St mikroköpükçükleri kıyaslandığında, mikroköpükçüklerin

çözünmesinde 5:5 mikroköpükçüklerin 9:1 mikroköpükçüklerine göre daha uzun sürede çözülmeye gittiği görülmektedir. 5:5 mikroköpükçüğünde farklı oksijen doygunluğu için yapılan deneylerde çözünme trendinin benzer olduğu görülmüştür. Ancak, toplam bozunma zamanları yakın olsa da, aynı zaman aralıklarında mikroköpükçük yarıçaplarındaki düşüş 9:1 DSPC:PEG40St mikroköpükçüklerinde daha kısadır. Bu da 9:1 DSPC:PEG40St mikroköpükçüklerinin zar dirençlerinin 5:5 DSPC:PEG40St mikroköpükçüklerine kıyasla daha düşük olması beklentisini getirmektedir.



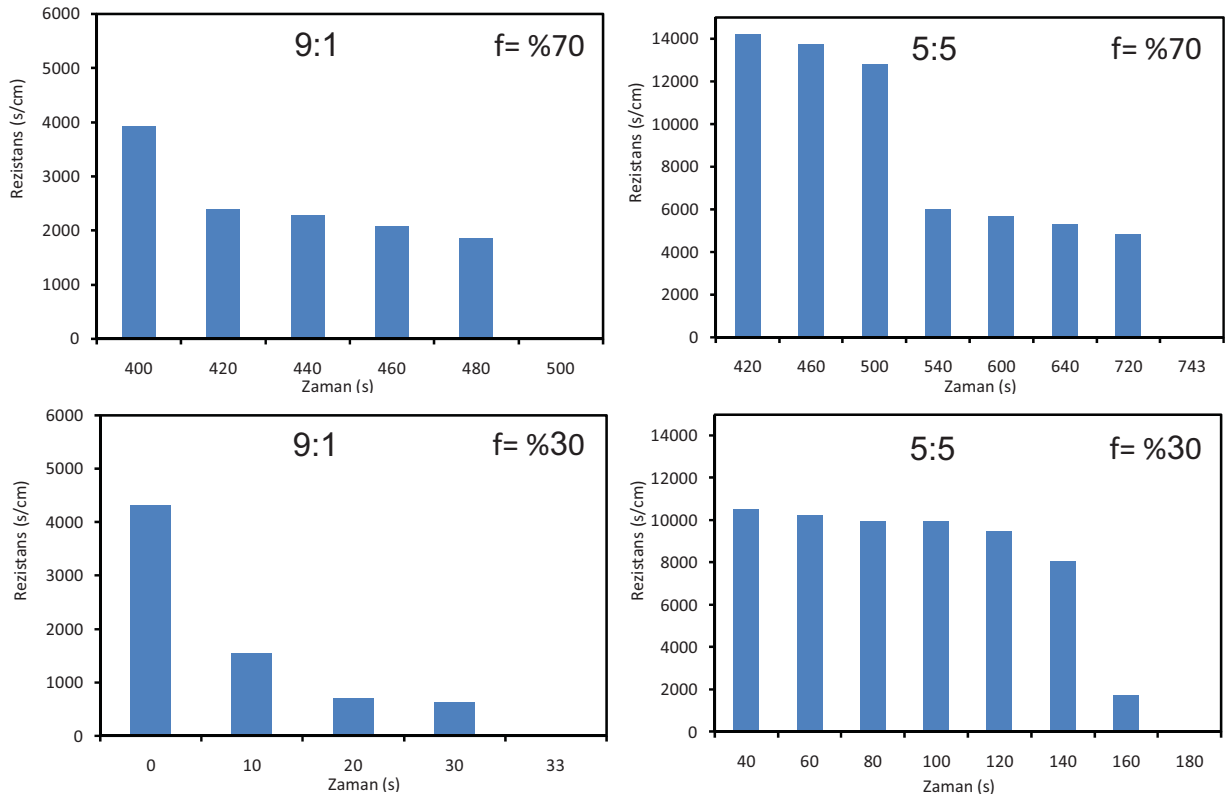
**Şekil 220.** 8 µm çapındaki 9:1 ve 5:5 DSPC:PEG40St mikroköpükçüklerinin f=0.3, f=0.7 ve f=1.0 oksijen doygunluğunda boyutlarındaki değişme

Mikroköpükçüklerin zar dirençleri, elde edilen deneysel verilerin modifiye edilmiş transport denkleminde (Borden ve Longo, 2002) yerine konularak Polymath yazılımı ile hesaplanmıştır. Hesaplamalarda, difüzyon katsayısı  $2.7 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ , basınç  $10 \text{ N}/\text{cm}^2$ , ve Henry sabiti 0.02 olarak alınmıştır. Ayrıca, literatürde olduğu gibi (Borden ve Longo, 2002) bozunma sürecinde mikroköpükçük yüzeyindeki monotabakanın maksimum yüzey

yoğunluğunda olduğu kabulü yapılmıştır. Bu nedenle mikroköpükçük yüzey gerilimi Langmuir-Blodgett deneylerinden elde edilen kollaps basıncından yola çıkarak hesaplanmıştır. Langmuir-Blodgett sonuçlarına göre 9:1 ve 5:5 DSPC:PEG40St karışımlarının kollaps basınçları 57-60 mN/m aralığındadır. Bu nedenle yüzey gerilimi 15 mN/m olarak alınmıştır. Bu durumda, modele uyarılma parametresi yalnızca zar direnci olarak alınmıştır.

Borden ve arkadaşları tarafından modifiye edilen Epstein-Plesset (EP) modeli ile mikroköpükçüklerinin zar dirençleri hesaplanmıştır (Borden ve Longo, 2002). Şekil 221’de farklı oksijen doygunluğu değerleri için 8 µm çapındaki 9:1 ve 5:5 DSPC:PEG40St mikroköpükçüklerinin zar dirençleri görülmektedir. Zar direnci hesaplamaları, mikroköpükçük yarıçapının düşmeye başladığı andan itibaren yapılmıştır. Şekil 220’ten net olarak görüldüğü üzere, her bir mikroköpükçüğün stabil kalma ve bozulmaya başlama zamanı farklıdır. Dolayısıyla yarıçap ve zamanın aynı tutularak bir karşılaştırma yapılması mümkün değildir. Bu nedenle, zar dirençleri mikroköpükçüklerin bozunmaya başladığı anda, yarıçaplardaki değişimlerden hesaplanmıştır. Buna göre, 9:1 DSPC:PEG40St mikroköpükçüklerinin zar direnci  $f=0.7$  koşulunda yaklaşık 4000 s/cm iken, 5:5 DSPC:PEG40St mikroköpükçüklerinin zar dirençleri yaklaşık 14000 s/cm değerindedir. 5:5 DSPC:PEG40St mikroköpükçükleri  $f=0.3$  oksijen doygunluğunda başlangıçta 10000 s/cm’in üzerinde bir zar direncine sahiptir. Bu değer 100 saniye boyunca neredeyse sabit kalmıştır ve daha sonra düşmeye başlamıştır. Oksijen doygunluğu %70 olduğunda, ( $f=0.7$ ) zar direncinin maksimum değeri 14000 s/cm’nin üzerindedir ve yaklaşık 500 saniye boyunca değişmemiştir. Daha sonra zar direnci zamanla düşmüştür.

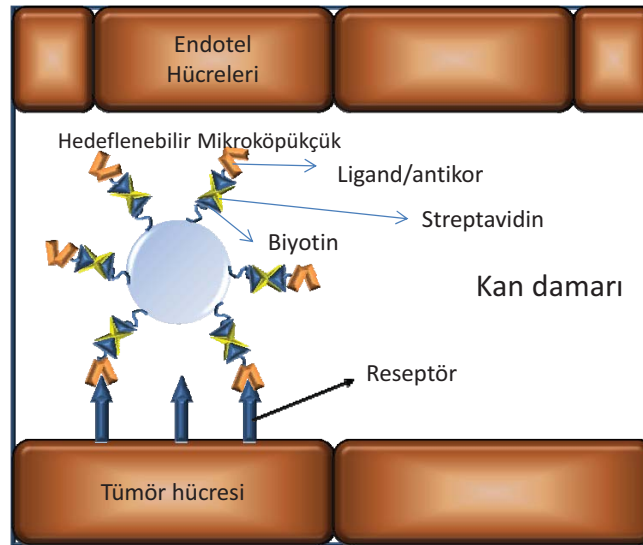
5:5 DSPC:PEG40St mikroköpükçüklerinin zar direnci, 9:1 mikroköpükçüklerinin zar dirençleriyle kıyaslandığında, 5:5 DSPC:PEG40St mikroköpükçüklerinin zar direnci çoğunlukla  $10^4$  mertebesindeyken, 9:1 DSPC:PEG40St mikroköpükçüklerinin zar direnci genellikle  $10^3$  mertebesinde olduğu görülmüştür. Bu sonuç, DSPC ve PEG40St’in 5:5 molar oranının karıştırılmasıyla mikroköpükçük üzerinde oluşan zarın, 9:1 oranındaki karışımından oluşan zara göre moleküller arası etkileşimin daha yüksek olduğu ve daha kondens bir monotabakanın oluştuğu, dolayısıyla bozunmaya karşı daha dirençli olduğunu göstermektedir.



**Şekil 221.** Oksijen doygunluğu %70 ( $f=0.7$ ) ve %30 ( $f=0.3$ ) olduğunda 9:1 ve 5:5 DSPC:PEG40St mikroköpükçüklerinin zar dirençlerinin zamanla değişimi

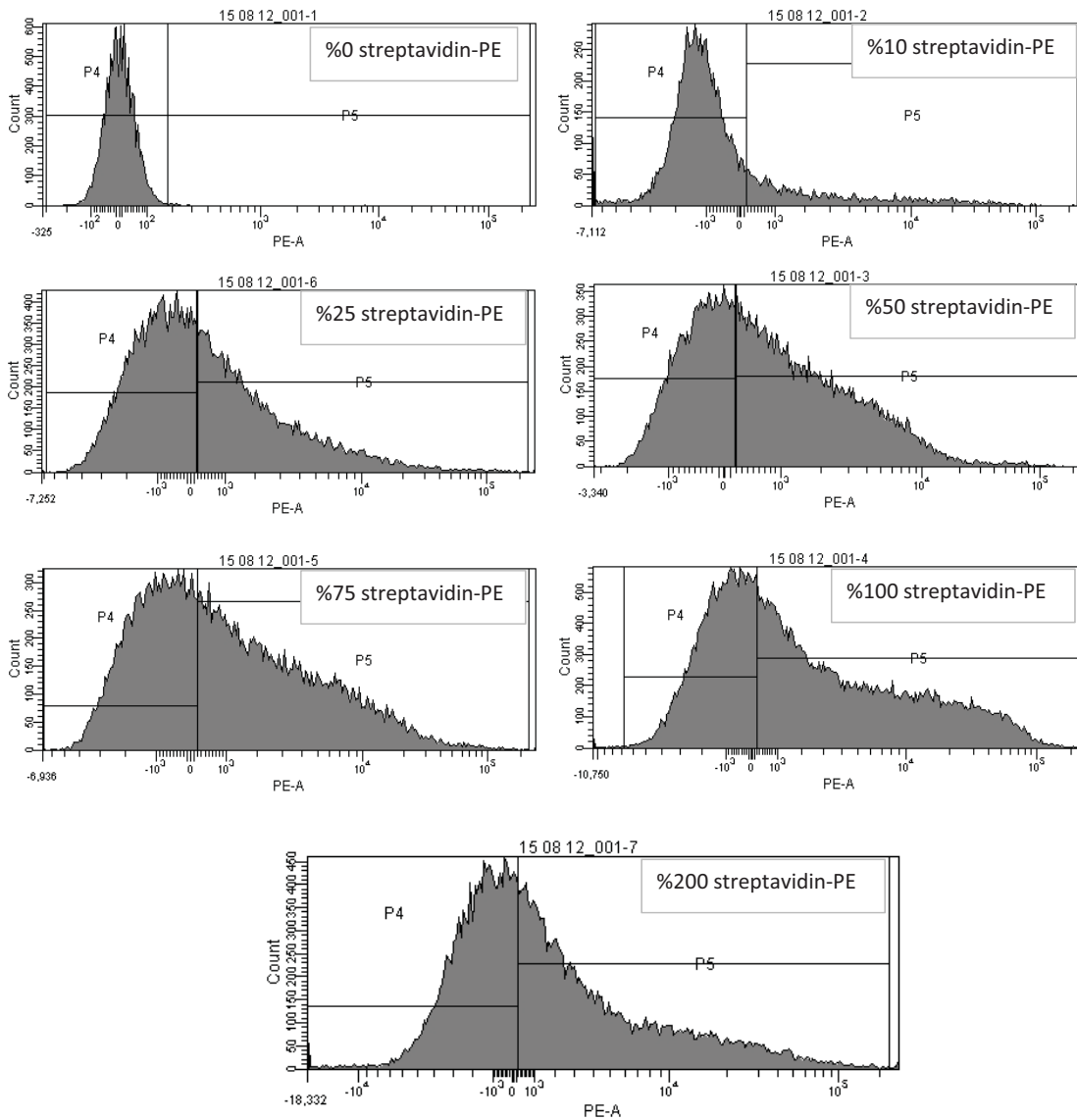
### 4.3. Hedeflendirilebilir Mikroköpükçüklerin Üretilmesi ve Karakterizasyonu

Bilindiği gibi hedeflendirilmiş mikroköpükçükler belirli bir hücrenin veya dokunun görüntülenmesi için klinik uygulamalarda büyük önem taşımaktadır. Örneğin, tümörlü bir dokunun ultrason kullanılarak kontrast ajanları (mikroköpükçükler) ile görüntülenmesi erken tanıda çok etkilidir. Hastalık tespitinin yanı sıra hedeflenebilir mikroköpükçükler ilaç taşınımında ve doğrudan hastalıklı dokuya aktarımında önemli rol oynayabilmektedirler. Mikroköpükçüklerin hedefe yönelik olması ilaç taşınımında artı bir avantajdır; çünkü, bilindiği üzere özellikle kansere yönelik ilaçlar sağlıklı hücrelerde zarar verebilmektedir. Mikroköpükçüklerin belirli bir hedefe göre tasarlanması zar yapısına ligand veya antikor eklenmesi ile sağlanmaktadır (Coester ve ark., 2009). Ligand veya antikorun zar yüzeyine bağlanması streptavidin-biyotin kompleksi ile olmaktadır (Şekil 222). Ligand veya antikor seçimi mikroköpükçüklerin hangi hücreye hedefleneceğine göre yapılmaktadır. Bilindiği gibi, hastalık sırasında hücre yüzeyinde spesifik reseptörler oluşmaktadır. Mikroköpükçükler, üzerinde taşıdıkları biyotin sayesinde bu reseptörlere spesifik ligand veya antikor ile kolayca işaretlenebilmektedir. Proje kapsamında, MDA-MB-231 hücre hattı (meme kanseri hücre hattı) ve bu reseptörü tanıyan ligand olarak da EGF (epidermal growth factor) kullanılmıştır. Bu amaçla, stabilite bakımından en iyi sonuç alınan mikroköpükçük tipleri ligand ile işaretlenip MDA-MB-231 hücreleri üzerine yapışmaları (yapışmaları) test edilmiştir.



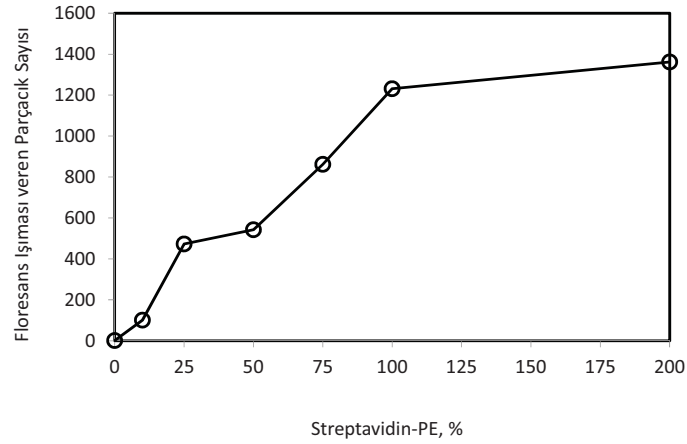
Şekil 222. Hedeflenebilir mikroköpükçüğün ligand yardımı ile tümör hücresine bağlanması

İlk olarak, mikroköpükçük yüzeyindeki biyotin yoğunluğu streptavidin-PE konjugasyonu kullanılarak belirlenmiştir. Mikroköpükçükler değişik oranlarda streptavidin-PE ile inkübe edilerek akış sitometrisinde floresan yoğunlukları ölçülmüş, doygunluk noktası belirlenmiştir. Farklı oranlarda (%0, %10, %25, %50, %75, %100, %200) streptavidin-PE içeren mikroköpükçüklerdeki floresan yoğunluğu Şekil 223 ve Şekil 224'da gösterilmiştir. Görüldüğü gibi PE yoğunluğu %100'e kadar artış göstermiş %100-%200 arasında ise floresan yoğunluğunda çok az bir artış olmuştur. Dolayısıyla %200 streptavidin, mikroköpükçüklerdeki maksimum biyotin seviyesi olarak kabul edilmiştir.



**Şekil 223.** Çeşitli yoğunluklardaki streptavidin-PE taşıyan mikroköpükçüklerin (DSPC:PEG40St 5:5) akış sitometri sonuçları.

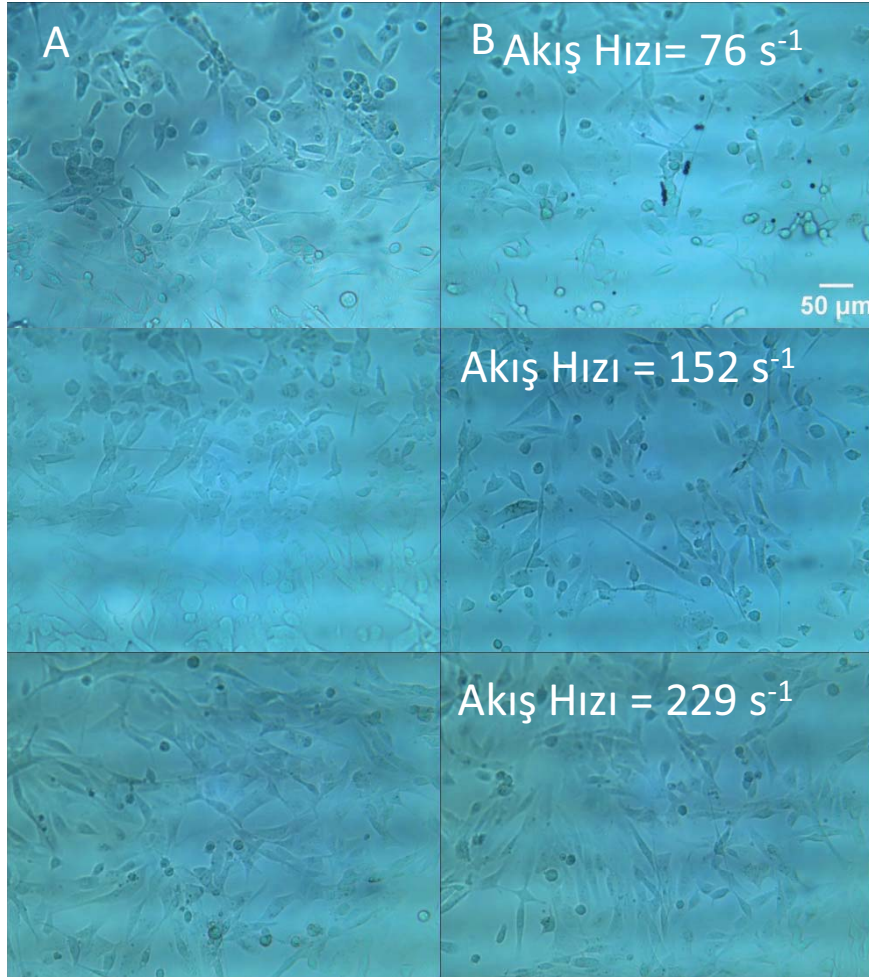




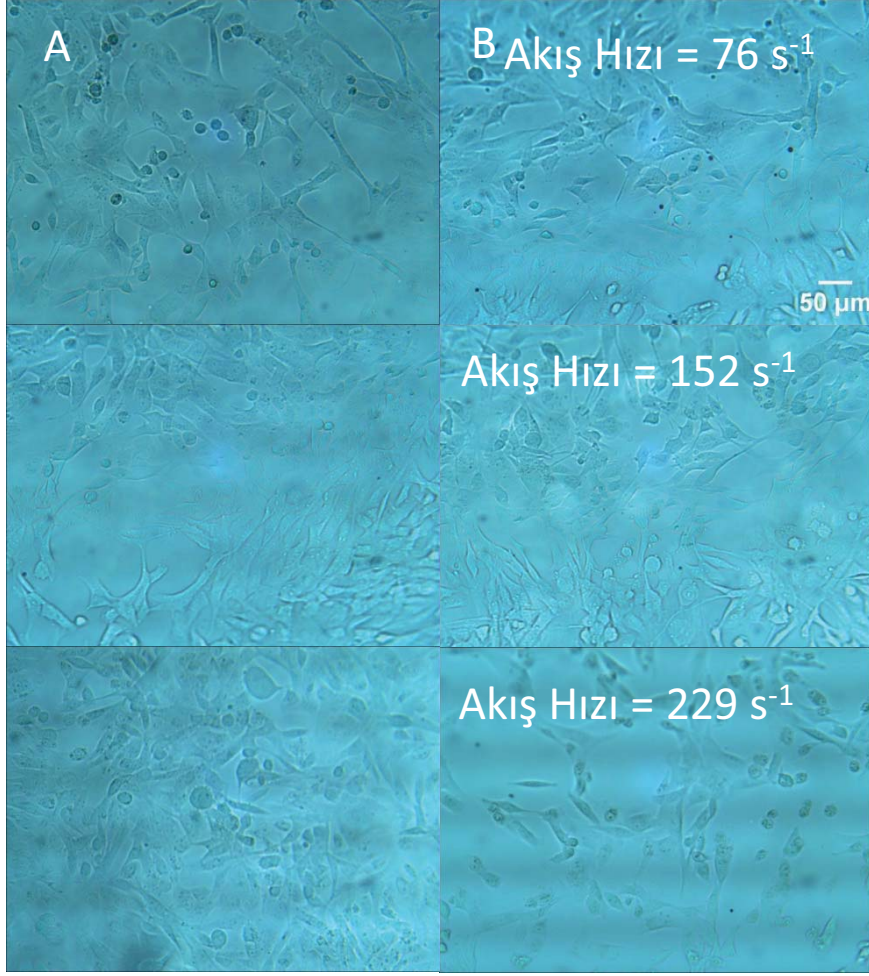
**Şekil 224.** Çeşitli yoğunluklardaki streptavidin-PE taşıyan mikroköpükçüklerin (5:5 DSPC:PEG40St) akış sitometri sonuçları.

MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattına spesifik hava dolu mikroköpükçükler 9:0.2:0.8 ve 5:4,2:0.8 DSPC:PEG40St:DSPE-PEG2000-biyotin ve 2:4,2:0.8:3 DSPC:PEG40St:DSPE-PEG2000-biyotin:DSPG ile üretildikten sonra biyotinlenmiş-EGF ile işaretlenmiştir. Çalışmada 2 farklı kontrol grubu kullanılmıştır. Birinci kontrol grubundaki mikroköpükçükler ligand yerine BSA (protein) ile işaretlenmiştir. İkinci kontrol grubundaki mikroköpükçükler ise hiç bir şekilde işaretlenmemiş mikroköpükçüklerden oluşmaktadır. Gerek kontrol grubu deneylerinde, gerekse hedeflendirilmiş mikroköpükçük deneylerinde 3 farklı akış hızı denenmiş ve bu akış hızlarında mikroköpükçük yapışmaları karşılaştırılmıştır. Kontrol gruplarının görüntüleri Şekil 225, Şekil 226, Şekil 227, Şekil 228, Şekil 229 ve Şekil 230'de sunulmuştur. Şekillerden görüldüğü üzere, EGF bağlı olmayan mikroköpükçüklerin hücrelere hiç bir akış hızında hemen hemen hiç bağlanmadıkları görülmektedir. Sadece 9:1 DSPC:PEG40St formülasyonuna sahip mikroköpükçüklerde en düşük akış hızında bağlanma tespit edilmiştir. Bu durum spesifik olmayan yapışma olarak adlandırılmaktadır ve istenen bir durum değildir. 9:1 DSPC:PEG40St formülasyonu ile üretilen mikroköpükçüklerin spesifik olmayan bağlantı gerçekleştirmelerinin az miktarda emülsifier içerdiklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Daha önce de belirtildiği gibi, PEG40St mikroköpükçük yüzeyinde sterik bir bariyer oluşturmaktadır. Bu sterik bariyer, diğer vücuda enjekte edilen sistemlerde olduğu gibi (lipozom, misel, nanopartikül vs) mikroköpükçüklerin damarlara yapışmasını ve damar içerisindeki makrofaj eritrosit gibi diğer hareketli hücrelerle etkileşimini de engellemektedir.

Bu sebepten dolayı sterik bariyerin arttırılması diğer bir deyişle emülsifier yüzdesinin arttırılması bu spesifik olmayan yapışmaları minimum seviyeye indirmiştir.



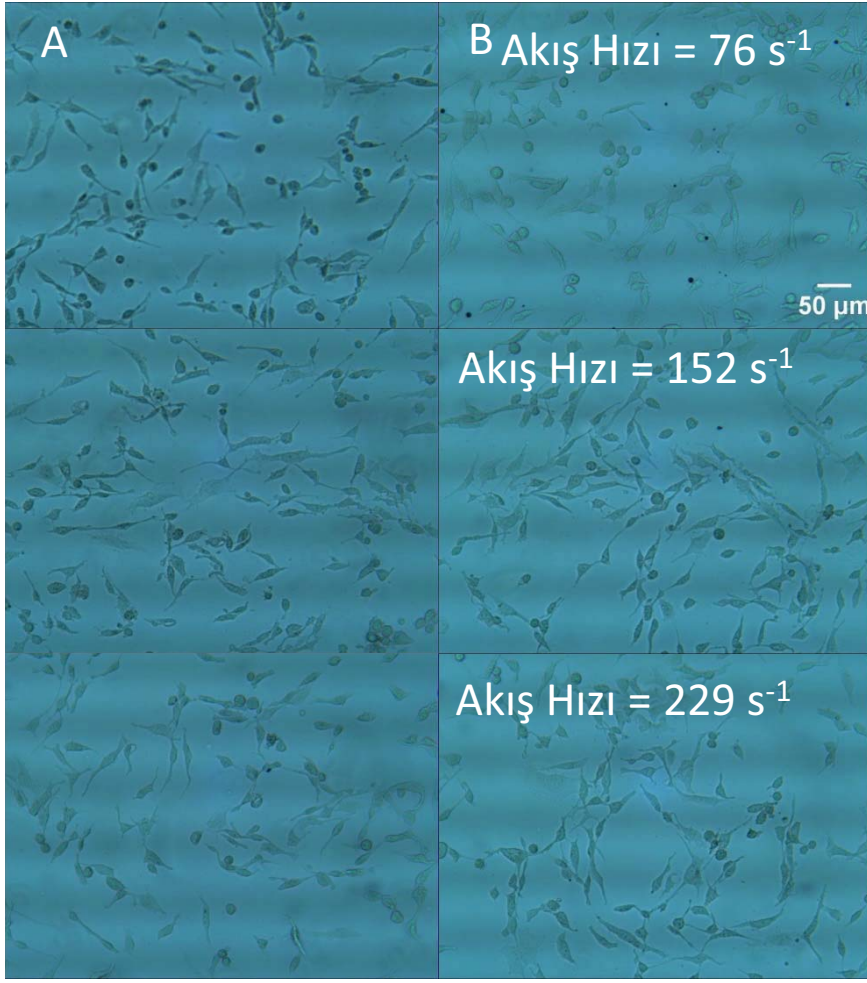
**Şekil 225.** (A) Hücrelerin yapışma deneyindeki önceki ilk görüntüleri ve (B) 9:1 DSPC:PEG40St formulasyonu ile üretilen mikroköpükçüklerin farklı akış hızlarında hücre yüzeyine bağlanma görüntüleri



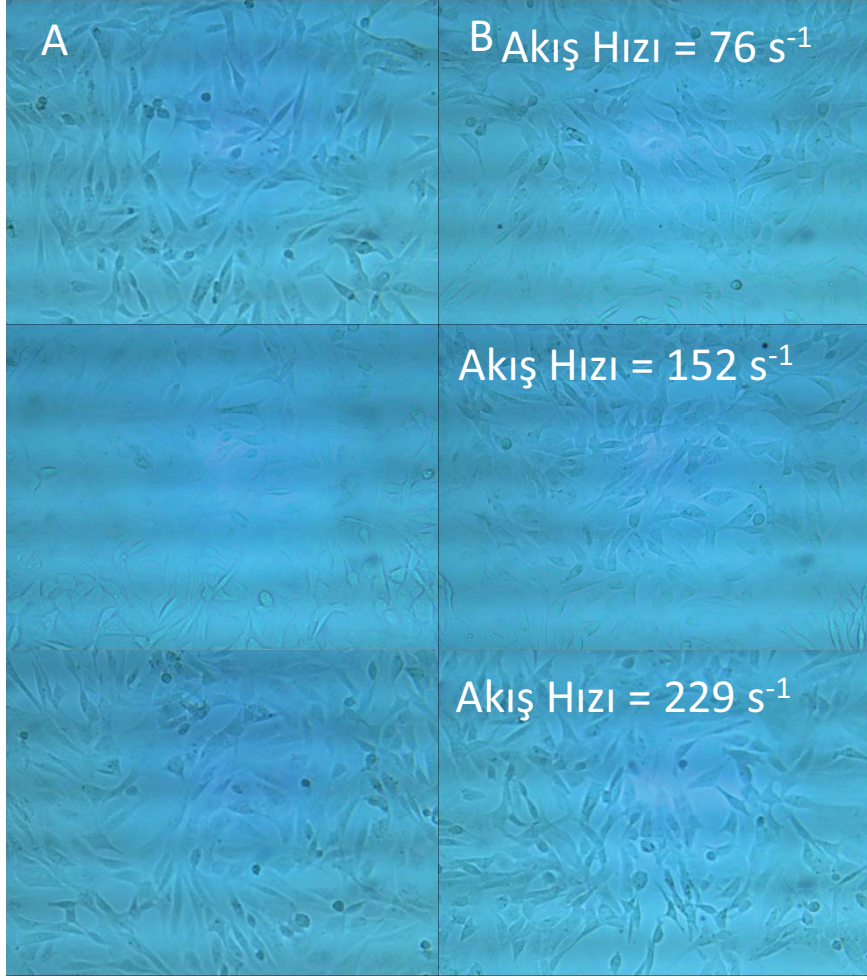
**Şekil 226.** (A) Hücrelerin yapışma deneyindeki önceki ilk görüntüleri ve (B) 5:5 DSPC:PEG40St formülasyonu ile üretilen mikroköpükçüklerin farklı akış hızlarında hücre yüzeyine bağlanma görüntüleri



**Şekil 227.** (A) Hücrelerin yapışma deneyindeki önceki ilk görüntüleri ve (B) 2:5:3 DSPC:PEG40St:DSPG formülasyonu ile üretilen mikroköpükçüklerin farklı akış hızlarında hücre yüzeyine bağlanma görüntüleri



**Şekil 228.** (A) Hücrelerin yapışma deneyindeki önceki ilk görüntüleri ve (B) DSPC:PEG40St 9:1 formülasyonu ile üretilen BSA içeren mikroköpükçüklerin farklı akış hızlarında hücre yüzeyine bağlanma görüntüleri



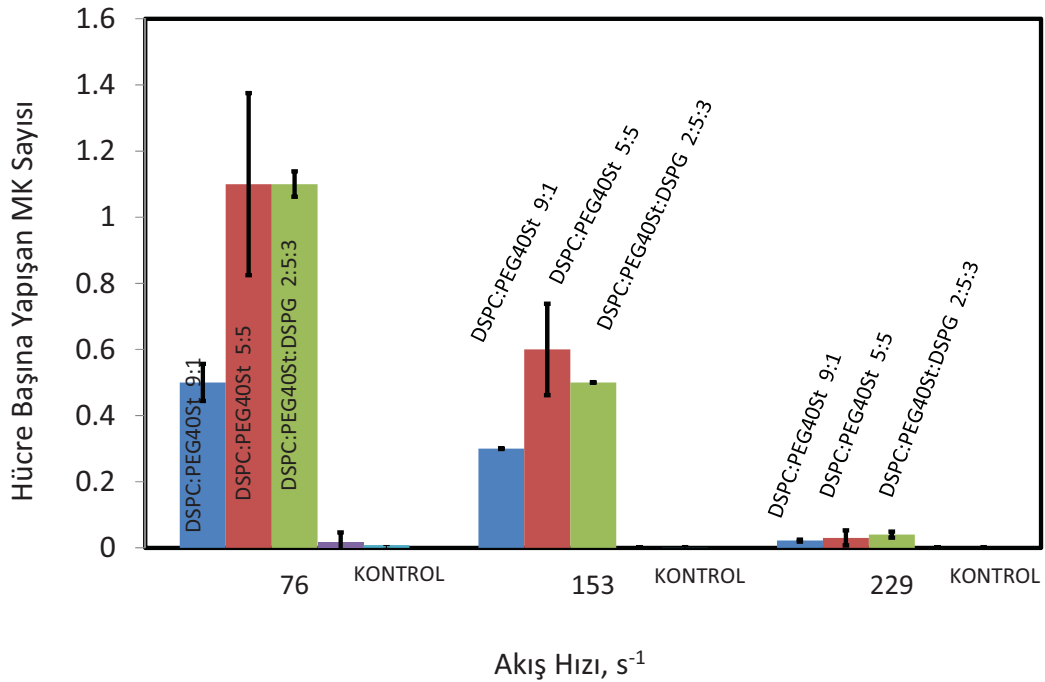
**Şekil 229.** (A) Hücrelerin yapışma deneyindeki önceki ilk görüntüleri ve (B) 5:5 DSPC:PEG40St formulasyonu ile üretilen BSA içeren mikroköpükçüklerin farklı akış hızlarında hücre yüzeyine bağlanma görüntüleri



**Şekil 230.** (A) Hücrelerin yapışma deneyindeki önceki ilk görüntüleri ve (B) 2:5:3 DSPC:PEG40St:DSPG formülasyonu ile üretilen BSA içeren mikroköpükçüklerin farklı akış hızlarında hücre yüzeyine bağlanma görüntüleri

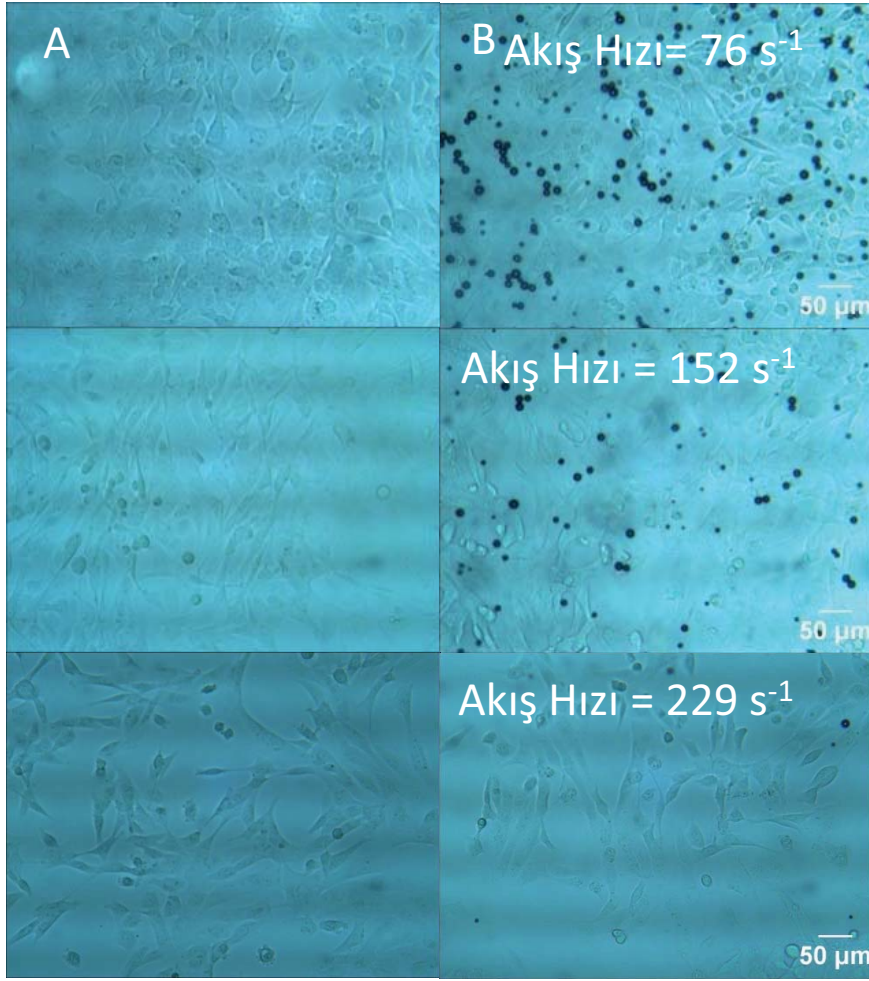
Benzer şekilde, ligand bağlı mikroköpükçüklerin değişik akış hızlarında hücre yüzeyine yapışmaları (yapışmaları) incelenmiştir. Her bir akış hızı ve mikroköpükçük tipi için 5 ayrı bölgeden mikroskop görüntüleri kaydedilmiştir. Daha sonra bu görüntüler ImageJ (NIH) programındaki “cell counter” seçeneği ile analiz edilmiş, hücre başına yapışan mikroköpükçük sayısı hesaplanmıştır. Son olarak 5 bölgenin ortalaması alınarak grafiğe aktarılmıştır (Şekil 231). Şekil 232, Şekil 233 ve Şekil 234’da ise bu deneylerin mikroskop görüntüleri verilmiştir. Görüntüler ve grafikten de anlaşılacağı gibi akış hızı arttıkça mikroköpükçüklerin hücre yüzeyine yapışma oranları da orantılı olarak düşüş göstermiştir. Elde edilen diğer bir sonuç ise, tüm mikroköpükçük formülasyonlarında biyotin yoğunluğu aynı tutulmuş, dolayısıyla aynı oranda ligand içermesine karşın, 9:1 DSPC:PEG40St

formulasyonu ile üretilen mikroköpükçüklerin yapışma oranının daha az olmasıdır. Bu durum iki şekilde açıklanabilir. Birincisi DSPC:PEG40St 9:1 formulasyonu ile üretilen mikroköpükçüklerin daha az stabiliteye sahip olması ile birlikte akış hızından etkilenecek konsantrasyonlarını kaybetmeleridir. Diğer bir neden ise PEG40St yüzdesinin yüksek olduğu mikroköpükçüklerin boyutları daha küçük olduğundan yüzeylerinde bulunan ligandın reseptöre bağlanma ihtimali daha yüksektir. Kontrol grupları ve ligand bağlı mikroköpükçüklerle yapılan hücre deneyleri birlikte incelendiğinde günümüzde literatürde yaygın olarak kullanılan mikroköpükçük formülasyonunun spesifik olmayan bağlanma davranışı gösterdiği tespit edilmiştir. Buna ek olarak, ligand içeren (işaretlenmiş) mikroköpükçüklerde PEG oranının artırılması hücrelere yapışma oranını azalttığı sonucu elde edilmiştir. Kullanılan en yüksek akış hızında, işaretlenmiş mikroköpükçüklerin hücrelere yapışma oranının düştüğü gözlemlenmiştir. Damar içerisindeki ortalama akış hızı  $100 \text{ s}^{-1}$  civarında olduğu düşünüldüğünde (Willmann ve ark., 2010), projede üretilen mikroköpükçüklerin hedeflendirilmiş görüntüleme içinde uygun oldukları anlaşılmaktadır.

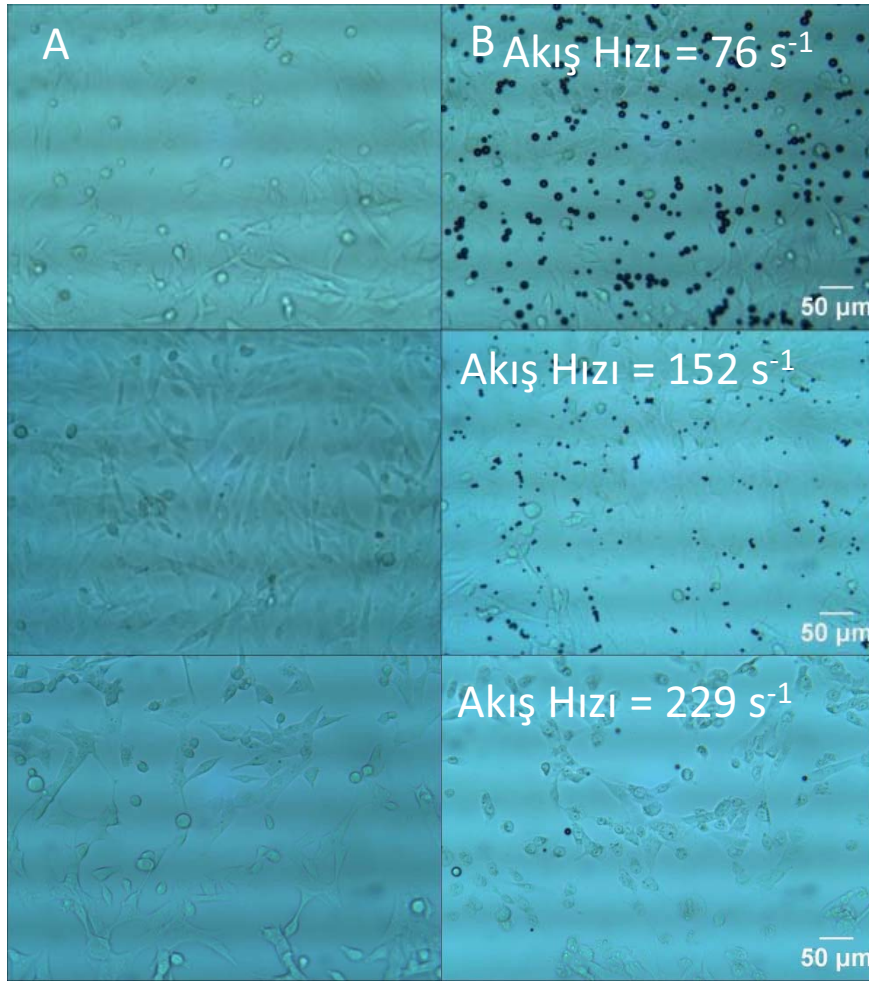


**Şekil 231.** Farklı mikroköpükçüklerin farklı akış hızlarındaki hücrelere bağlanma oranları.





**Şekil 232.** (A) Hücrelerin yapışma deneyindeki önceki ilk görüntüleri ve (B) 9:1 DSPC:PEG40St formulasyonu ile üretilen EGF içeren mikroköpükçüklerin farklı akış hızlarında hücre yüzeyine bağlanma görüntüleri



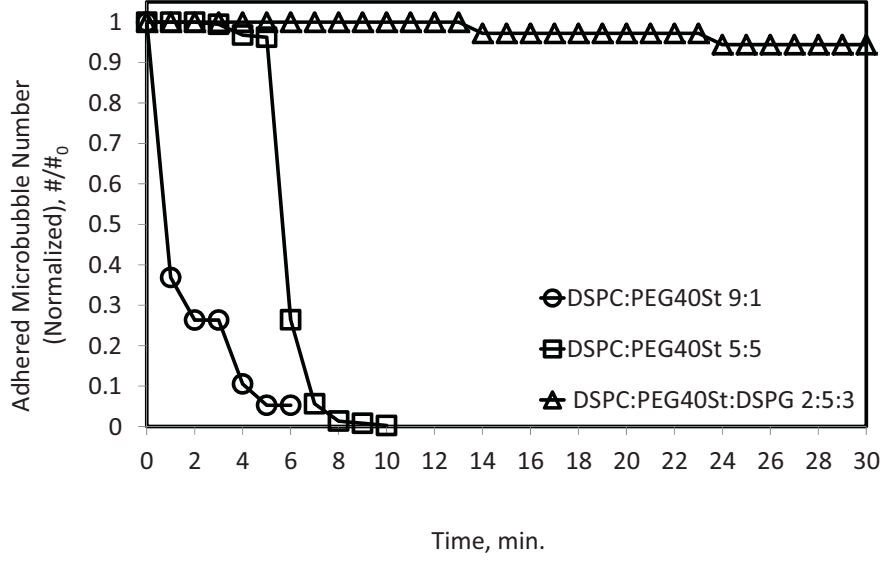
**Şekil 233.** (A) Hücrelerin yapışma deneyindeki önceki ilk görüntüleri ve (B) 5:5 DSPC:PEG40St formulasyonu ile üretilen EGF içeren mikroköpükçüklerin farklı akış hızlarında hücre yüzeyine bağlanma görüntüleri



**Şekil 234.** (A) Hücrelerin yapışma deneyindeki önceki ilk görüntüleri ve (B) 2:5:3 DSPC:PEG40St:DSPG formülasyonu ile üretilen EGF içeren mikroköpükçüklerin farklı akış hızlarında hücre yüzeyine bağlanma görüntüleri

Hedeflendirilmiş mikroköpükçüklerin, aynı zamanda hedef hücrede tanınımın konması için yeterli süre bağlı kalmaları, sürekli olarak yeni doz mikroköpükçük enjeksiyonunu gerektirmemesi bakımından da önemlidir. Bu amaçla, hedeflendirilmiş mikroköpükçüklerin, yapışma sağlandıktan sonra  $153 \text{ s}^{-1}$  kayma hızında sürekli akış altında bağlanma davranışları da incelendi. Şekil 235'den, konvensiyonel mikroköpükçüklerin (9:1 DSPC:PEG40St) sürekli akış altında sayılarının hızla azaldığı, 5:5 DSPC:PEG40St mikroköpükçüklerinin ise beşinci dk.'dan sonra azalmaya başladığı, 2:5:3 DSPC:PEG40St:DSPG mikroköpükçüklerinin ise bu yüksek kayma gerilimi altında bile bozunmadan hücreye yapışmış bir şekilde kalabildiği görülmelidir. Bu sonuçlar, medikal

alanda hem hedeflendirilmiş görüntüleme hem de ilaç/DNA/gen taşınımı için geliştirilen mikroköpükçüklerin bir ümit ihtiva ettiğini göstermektedir.



Şekil 235. 9:1 ve 5:5 DSPC:PEG40St ile 2:5:3 DSPC:PEG40St:DSPG mikroköpükçüklerinin  $153 \text{ s}^{-1}$  sürekli kayma gerilimi altında hücelere yapışma süreleri

## 5. SONUÇLAR

Literatürde, genellikle fosfolipid ve emülsifierin 9:1 oranında karıştırılarak mikroköpükçükler üretildiği görülmektedir. Proje kapsamında, konvensiyonel formülasyonların dışında farklı formülasyonlar kullanarak, mikroköpükçükleri oluşturan monotabakanın tasarımı yeniden yapılmıştır. Monotabakanın mikro yapısı ve özellikleri incelenerek, mikroköpükçüklerin stabiliteleindeki değişimler araştırılmıştır. Mikroköpükçüklerin stabilitesinin monotabakayı oluşturan komponentlerin birbiri ile etkileşimi ile yakından ilgili olduğu düşüncesiyle, hidrojen bağı, iyonik etkileşimler, van der Waals kuvvetleri, elektrostatik etkileşimler, hidrofobik-hidrofobik etkileşimler gibi, ikincil kuvvetlerin etkin olduğu bir zar (monotabaka) oluşturulmaya çalışılmıştır. Bu kapsamda, aynı hidrokarbon zincir uzunluğuna sahip, fakat farklı baş grubu içeren fosfolipidler ve yağ molekülleri kullanılmıştır. Zar yapıyı oluşturan bileşenler arasındaki etkileşimler ve faz davranışları Langmuir-Blodgett (LB) film tekniği kullanılarak incelenmiştir. Bu metoda ilaveten, oluşan monotabakanın morfolojisi ve faz davranışları Brewster Açısı Mikroskobu (BAM) ve Atomik Kuvver Mikroskobu (AFM) kullanılarak araştırılmıştır. İki-boyutlu (2D) elde edilen bulgular ışığında mikroköpükçükler sentezlenerek karakterizasyonları yapılmıştır.

Mikroköpükçükleri oluşturan monotabakanın üç boyutlu (3D) ortamda moleküler düzeyde incelenmesi ve mikro yapısını ortaya çıkarılması genellikle mümkün olmamasına rağmen, 2D de elde edilen sonuçların mikroköpükçüklerin stabilite davranışları ile paralellik gösterdiği görülmüştür. Buradan, LB tekniğinin ve mikroskobik tekniklerin bu amaçla kullanılabilceği sonucuna varılmıştır. Gerek 2D deneylerinde ve gerekse mikroköpükçüklerde yapılan çalışmalarda monotabakada emülsifier oranının artması ile moleküler etkileşimlerin arttığı ve dolayısıyla daha stabil ve daha küçük boyut dağılımına sahip mikroköpükçüklerin elde edilebildiği görülmüştür. Bu sonuç, daha düşük maaliyetli mikroköpükçüklerin üretilmiş olması bakımından önem arz etmektedir. Artan emülsifier oranıyla elde edilen bu etki, silindirik yapıda olan sıkışık faz gösteren fosfolipid ile PEG zincirlerinden dolayı genişletilmiş faz gösteren emülsifierin kısmen daha az yoğun (kondens) bir monotabaka oluşturmaya, ancak artan emülsifier miktarı ile PEG zincirlerinin sıkıştırma altında konfigürasyon değişimine giderek daha sıkışık (kondens) bir monotabaka oluşturabilmelerine bağlanmıştır. Ayrıca, bilindiği gibi fosfolipidler silindirik yapıdadır ve

mikroköpükçüklerde olduğu gibi küresel monotabaka oluşturmaları beklenemez. Fakat, karışıma ilave edilen emülsifierin konik yapıda olması eğimli yapıyı dolayısıyla mikroköpükçük oluşumunu desteklemektedir. Bu nedenle, artan emülsifier oranı ile sadece stabil değil, aynı zamanda daha küçük boyut dağılımına sahip mikroköpükçükler üretilmiştir. Ancak, PEG molekülleri hidrofilik olduklarından çok fazla miktarda karışıma ilave edilmeleri durumunda monotabakanın düzensiz bir form almasına sebep olarak, monotabakanın stabilitesini düşürdüğü görülmüştür. 2D çalışmalarında bu oran %30 olarak bulunurken, mikroköpükçük çalışmalarında %50 olarak bulunmuştur. İkili karışımlar için de en yüksek stabiliteye ve en uygun boyut dağılımına, 5:5 DSPC:PEG40St karışımından elde edilen mikroköpükçüklerin sahip olduğu görülmüştür. Sonuçlardaki bu farklılık, 2D-3D farkına bağlanmaktadır. Ayrıca, termodinamik analizler LB izotermelerinden moleküler etkileşimlere ait bilgilerin çıkarılmasında sıkça kullanılmasına rağmen, karışımında monotabaka yapısına katılamayan moleküller olduğunda dikkatli kullanılmaları gerektiği görülmüştür.

Tek hidrokarbonlu emülsifier (PEG40St) yerine, çift hidrokarbon zincirli lipopolimerlerin kullanılmasının daha az kondens monotabaka oluşumuna sebep olduğu, dolayısıyla elde edilen mikroköpükçüklerinde daha az stabil oldukları görülmüştür. Bu sonucun, lipopolimerlerin yine eğimli (küresel) yapı ile uyumlu uygun bir düzende olmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ancak, hem tek hem de çift hidrokarbonlu emülsifierde genel olarak, artan emülsifier oranı ile monotabakanın daha elastik bir özellik kazandığı görülmüştür. Bu sonucun mikroköpükçüklerin ultrason altında ekojenitesini artırması bakımından önemli olacağı değerlendirilmektedir.

Genel olarak, fosfolipidlerin baş gruplarının monotabakanın faz davranışlarını önemli derecede etkilediği görülmüş, ancak etkileşimin derecesinin monotabakayı oluşturan bileşenlerin kompozisyonu, fosfolipidlerin baş grubunun büyüklüğü, şekli, ve ikincil bağ oluşumuna yatkınlığının önemli olduğu, ve çok iyi optimize edilmesi gerektiği ortaya çıkmıştır. Hazırlanan karışımlar arasında en yüksek stabiliteye ve en uygun boyut dağılımına 2:5:3 DSPC:PEG40St:DSPG karışımından elde edilen mikroköpükçüklerin sahip olduğu görülmüştür.

Genel olarak, literatürde florlanmış gaz kullanımının (sudaki çözünürlüğü düşük olmasından dolayı) stabiliteyi artırdığı ve mikroköpükçük boyut dağılımını olumlu yönde

etkilediği yönünde görüşler mevcuttur. Konvensiyonel formülasyonla (9:1 DSPC:PEG40St) elde edilen sonuçlarla bu görüş uyum içinde olmasına rağmen, bu proje kapsamında elde edilen stabil mikroköpükçükler için bu görüşün geçerli olmadığı görülmüştür. Spesifik olarak belirtmek gerekirse, florlanmış gaz kullanımının 5:5 DSPC:PEG40St ve 2:5:3 DSPC:PEG40St:DSPG mikroköpükçüklerinin stabilitesini ve boyut dağılımını etkilemedikleri sonucu ortaya çıkmıştır. Buradan, bu formülasyonlarla yeterince kohezif bir zar yapısının elde edildiği ve gaz geçirgenliğinin minimize edildiği sonucuna varılabilir. Buradan çıkarılacak diğer bir önemli sonuç ise, bu proje kapsamında, stabil mikroköpükçüklerin florlanmış gaz gibi pahalı gazlar kullanımına gerek kalmadan üretilebilmiş olmalarıdır. Bu sonuç, yine mikroköpükçük maliyetinin düşmesi bakımından önem arz etmektedir.

Bu proje kapsamında, bundan sonra yazılması planlanan bir projenin ön denemelerini oluşturacak, *in-vitro* denemeler meme kanseri üzerinde denenmiş, gerek statik gerekse dinamik koşullar altında, 5:5 DSPC:PEG40St ve 2:5:3 DSPC:PEG40St:DSPG mikroköpükçüklerinin, konvensiyonel 9:1 DSPC:PEG40St mikroköpükçüklerine kıyasla, kanserli hücrelere bağlanma davranışlarının daha etkin oldukları görülmüştür.

Mikroköpükçüklerle yapılan deney sonuçlarından, LB izotermelerinden, BAM ve AFM görüntülerinden elde edilen sonuçlardan mikroköpükçük stabilitesine ilişkin çıkarımlar yapılabileceği görülmektedir. Çalışmalarımız, optimum miktarlarda emülsifier ve DSPG ilavesinin, mikroköpükçük yapısında DSPC ve PEG40St'ye ek olarak kullanılmasının stabilite ve boyut açısından etkili olduğunu ortaya koymuştur. Bu proje kapsamında, daha düşük maliyetli, daha yüksek stabilite ve uygun boyut dağılımına sahip hedeflendirilebilir/hedeflendirilmiş mikroköpükçükler yüksek verimlilikte başarı ile üretilebilmişlerdir. Bu araştırma sonuçlarının, ülkemizde medikal uygulamalar için ışık tutacağı ve *in-vivo* çalışmalar ile birlikte genişletilebileceği değerlendirilmektedir.

## KAYNAKLAR

- Albrecht, T., and J. Hohmann, Contrast agents in sonography, *Toshiba VISIONS* 6, 3-25, (2004).
- Anglin, T.C., and J.C. Conboy, Kinetics and thermodynamics of flip-flop in binary phospholipid membranes measured by sum-frequency vibrational spectroscopy, *Biochemistry* 48, 10220-10234, (2009).
- Arnold, A., I. Cloutier, A.M. Ritcey, and M. Auger, Temperature and pressure dependent growth and morphology of dmpc/dspc domains studied by brewster angle microscopy, *Chemistry and physics of lipids* 133, 165-179, (2005).
- Asch, F. M., and N. J. Weissman, Overview of the 2008 food and drug administration advisory committee on safety considerations in the development of ultrasound contrast agents, *Circulation* 119, 1956-1961, (2009).
- Askvik, K.M., S. Are Gundersen, J. Sjöblom, J. Merta, and P. Stenius, Complexation between lignosulfonates and cationic surfactants and its influence on emulsion and foam stability, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 159, 89-101, (1999).
- Baekmark, T.R., G. Elender, D.D. Lasic, and E. Sackmann, Conformational transitions of mixed monolayers of phospholipids and polyethylene oxide lipopolymers and interaction forces with solid surfaces, *Langmuir* 11, 3975-3987, (1995).
- Baekmark, T.R., T. Wiesenthal, P. Kuhn, A. Albersdörfer, O. Nuyken, and R. Merkel, A systematic infrared reflection-absorption spectroscopy and film balance study of the phase behavior of lipopolymer monolayers at the air-water interface, *Langmuir* 15, 3616-3626, (1999).
- Bagatolli, LA, and E. Gratton, Two photon fluorescence microscopy of coexisting lipid domains in giant unilamellar vesicles of binary phospholipid mixtures, *Biophysical journal* 78, 290-305, (2000).
- BAM300, Instruction Manual KSV Optrel, (2005).
- Bloch, S.H., M. Wan, P.A. Dayton, and K.W. Ferrara, Optical observation of lipid-and polymer-shelled ultrasound microbubble contrast agents, *Applied Physics Letters* 84, 631, (2004).
- Borden, M. A., D. E. Kruse, C. F. Caskey, S. K. Zhao, P. A. Dayton, and K. W. Ferrara, Influence of lipid shell physicochemical properties on ultrasound-induced microbubble destruction, *Ieee Transactions on Ultrasonics Ferroelectrics and Frequency Control* 52, 1992-2002, (2005).
- Borden, M. A., G. V. Martinez, J. Ricker, N. Tsvetkova, M. Longo, R. J. Gillies, P. A. Dayton, and K. W. Ferrara, Lateral phase separation in lipid-coated microbubbles, *Langmuir* 22, 4291-4297, (2006).
- Borden, M. A., M. R. Sarantos, S. M. Stieger, S. I. Simon, K. W. Ferrara, and P. A. Dayton, Ultrasound radiation force modulates ligand availability on targeted contrast agents, *Molecular Imaging* 5, 139-147, (2006).
- Borden, M.A., C.F. Caskey, E. Little, R.J. Gillies, and K.W. Ferrara, DNA and polylysine adsorption and multilayer construction onto cationic lipid-coated microbubbles, *Langmuir* 23, 9401-9408, (2007).



- Borden, M.A., D.E. Kruse, C.F. Caskey, S. Zhao, P.A. Dayton, and K.W. Ferrara, Influence of lipid shell physicochemical properties on ultrasound-induced microbubble destruction, *Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control, IEEE Transactions on* 52, 1992-2002, (2005).
- Borden, M.A., and M.L. Longo, Dissolution behavior of lipid monolayer-coated, air-filled microbubbles: Effect of lipid hydrophobic chain length, *Langmuir* 18, 9225-9233, (2002).
- Borden, M.A., G. Pu, G.J. Runner, and M.L. Longo, Surface phase behavior and microstructure of lipid/peg-emulsifier monolayer-coated microbubbles, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 35, 209-223, (2004).
- Borden, M.A., S. Qin, and K.W. Ferrara, Ultrasound contrast agents, *Molecular imaging (ed. Weissleder R.)* 425-444, (2010).
- Bos, M.A., and T. Nylander, Interaction between  $\beta$ -lactoglobulin and phospholipids at the air/water interface, *Langmuir* 12, 2791-2797, (1996).
- Brandal, Ø., T. Viitala, and Prof. Johan Sjöblom, Compression isotherms and morphological characteristics of pure and mixed langmuir monolayers of c80 isoprenoid tetraacids and a c18 monoacid, *Journal of dispersion science and technology* 28, 95-106, (2007).
- C.PETTY, Michael *Langmuir-blodgett films: An introduction* (Cambridge University Press), (1996).
- Cambrea, L.R., F. Haque, J.L. Schieler, J.C. Rochet, and J.S. Hovis, Effect of ions on the organization of phosphatidylcholine/phosphatidic acid bilayers, *Biophysical journal* 93, 1630-1638, (2007).
- Cannan, S., J. Zhang, F. Grunfeld, and P.R. Unwin, Scanning electrochemical microscopy (secm) studies of oxygen transfer across phospholipid monolayers under surface pressure control: Comparison of monolayers at air/water and oil/water interfaces, *Langmuir* 20, 701-707, (2004).
- Chatterji, D., and P. Rajdev, Macromolecular recognition at the air—water interface: Application of langmuir—blodgett, *Current Science* 95, 10, (2008).
- Chomas, J. E., P. A. Dayton, D. May, J. Allen, A. Klibanov, and K. Ferrara, Optical observation of contrast agent destruction, *Applied Physics Letters* 77, 1056-1058, (2000).
- Chomas, J. E., P. Dayton, J. Allen, K. Morgan, and K. W. Ferrara, Mechanisms of contrast agent destruction, *IEEE Transactions on Ultrasonics Ferroelectrics and Frequency Control* 48, 232-248, (2001).
- Chomas, J.E., P. Dayton, J. Allen, K. Morgan, and K.W. Ferrara, Mechanisms of contrast agent destruction, *Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control, IEEE Transactions on* 48, 232-248, (2001).
- Chou, T.H., and I. Chu, Behavior of dspc/dspe-peg2000 mixed monolayers at the air/water interface, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 211, 267-274, (2002).
- Chou, T.H., and I. Chu, Thermodynamic characteristics of dspc/dspe-peg2000 mixed monolayers on the water subphase at different temperatures, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 27, 333-344, (2003).
- Christiansen, C., H. Kryvi, P. Sontum, and T. Skotland, Physical and biochemical characterization of albumex, a new ultrasound contrast agent consisting of air-filled albumin microspheres

- suspended in a solution of human albumin, *Biotechnology and applied biochemistry* 19, 307-320, (1994).
- Coester, C., S. Tinkov, R. Bekeredjian, and G. Winter, Microbubbles as ultrasound triggered drug carriers, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 98, 1935-1961, (2009).
- Connell, S.D., and D.A. Smith, The atomic force microscope as a tool for studying phase separation in lipid membranes (review), *Molecular membrane biology* 23, 17-28, (2006).
- Craig, V. S. J., and C. L. Henry, Inhibition of bubble coalescence by osmolytes: Sucrose, other sugars, and urea, *Langmuir* 25, 11406-11412, (2009).
- De Jong, N., L. Hoff, T. Skotland, and N. Bom, Absorption and scatter of encapsulated gas filled microspheres: Theoretical considerations and some measurements, *Ultrasonics* 30, 95-103, (1992).
- Degen, P., H. Rehage, F.G. Klärner, and J. Polkowska, Characterization of langmuir-monolayers of molecular clips by means of brewster-angle-microscopy, *Colloid & Polymer Science* 284, 44-50, (2005).
- Deleu, M., K. Nott, R. Brasseur, P. Jacques, P. Thonart, and Y.F. Dufrêne, Imaging mixed lipid monolayers by dynamic atomic force microscopy, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1513, 55-62, (2001).
- Deleu, M., M. Paquot, P. Jacques, P. Thonart, Y. Adriaensen, and Y.F. Dufrêne, Nanometer scale organization of mixed surfactin/phosphatidylcholine monolayers, *Biophysical journal* 77, 2304-2310, (1999).
- Dickey, A., and R. Faller, Examining the contributions of lipid shape and headgroup charge on bilayer behavior, *Biophysical journal* 95, 2636-2646, (2008).
- Dijkmans, PA, LJM Juffermans, RJP Musters, A. Van Wamel, FJ Ten Cate, W. Van Gilst, CA Visser, N. De Jong, and O. Kamp, Microbubbles and ultrasound: From diagnosis to therapy, *European Journal of Echocardiography* 5, 245-246, (2004).
- Doménech, Ò., J. Torrent-Burgues, S. Merino, F. Sanz, M.T. Montero, and J. Hernández-Borrell, Surface thermodynamics study of monolayers formed with heteroacid phospholipids of biological interest, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 41, 233-238, (2005).
- Dori, Y., H. Bianco-Peled, S.K. Satija, G.B. Fields, J.B. McCarthy, and M. Tirrell, Ligand accessibility as means to control cell response to bioactive bilayer membranes, *Journal of biomedical materials research* 50, 75-81, (2000).
- Dufrêne, Y.F., W.R. Barger, J.B.D. Green, and G.U. Lee, Nanometer-scale surface properties of mixed phospholipid monolayers and bilayers, *Langmuir* 13, 4779-4784, (1997).
- Duncan, P.B., and D. Needham, Test of the Epstein-Plesset model for gas microparticle dissolution in aqueous media: Effect of surface tension and gas undersaturation in solution, *Langmuir* 20, 2567-2578, (2004).
- Estrela-Lopis, I., G. Brezesinski, and H. Möhwald, Miscibility of DPPC and DPPA in monolayers at the air/water interface, *Chemistry and physics of lipids* 131, 71-80, (2004).

- Ferrara, K., R. Pollard, and M. Borden, Ultrasound microbubble contrast agents: Fundamentals and application to gene and drug delivery, *Annual Review of Biomedical Engineering* 9, 415-447, (2007).
- Fuller, G.G., Rheology of mobile interfaces, *Rheology Reviews* 77-124, (2003).
- Gaines, G.L. *Insoluble monolayers at liquid/gas interface* (Wiley-Interscience, New York), (1966).
- Gaines, G.L. *Insoluble monolayers at the liquid-gas interface* (Wiley-Interscience, New York), (1966).
- Garidel, P., and A. Blume, Miscibility of phospholipids with identical headgroups and acyl chain lengths differing by two methylene units: Effects of headgroup structure and headgroup charge, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1371, 83-95, (1998).
- Garidel, P., and A. Blume, Miscibility of phosphatidylethanolamine-phosphatidylglycerol mixtures as a function of pH and acyl chain length, *European Biophysics Journal* 28, 629-638, (2000).
- Garidel, P., C. Johann, and A. Blume, Nonideal mixing and phase separation in phosphatidylcholine-phosphatidic acid mixtures as a function of acyl chain length and pH, *Biophysical journal* 72, 2196-2210, (1997).
- Garidel, P., C. Johann, L. Mennicke, and A. Blume, The mixing behavior of pseudobinary phosphatidylcholine-phosphatidylglycerol mixtures as a function of pH and chain length, *European biophysics journal* 26, 447-459, (1997).
- Gamiak, R., and P.M. Shah, Echocardiography of the aortic root, *Investigative radiology* 3, 356-366, (1968).
- Greenough, K.P., and GJ Blanchard, Lipid headgroups mediate organization and dynamics in bilayers, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 71, 2050-2056, (2009).
- Hać-Wydro, K., M. Flasiński, P. Wydro, and P. Dynarowicz-Łątka, Towards the understanding of the behavior of single-chained ether phospholipids in model biomembranes. Interactions with phosphatidylethanolamines in langmuir monolayers, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* (2012).
- Hac-Wydro, K., J. Kapusta, A. Jagoda, P. Wydro, and P. Dynarowicz-Latka, The influence of phospholipid structure on the interactions with nystatin, a polyene antifungal antibiotic:: A langmuir monolayer study, *Chemistry and physics of lipids* 150, 125-135, (2007).
- Hédreul, C., and G. Frens, Foam stability, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 186, 73-82, (2001).
- Hernández, M.R.S., Spectroscopic studies of atmospheric relevant air-aqueous interfaces, (The Ohio State University), (2010).
- Hernot, S., and A.L. Klibanov, Microbubbles in ultrasound-triggered drug and gene delivery, *Advanced drug delivery reviews* 60, 1153-1166, (2008).
- Hettiarachchi, K., E. Talu, M. L. Longo, P. A. Dayton, and A. P. Lee, On-chip generation of microbubbles as a practical technology for manufacturing contrast agents for ultrasonic imaging, *Lab on a Chip* 7, 463-468, (2007).
- Hoff, L., and P.C. Sontum, Acoustic characterization of contrast agents for medical ultrasound imaging, *The Journal of the Acoustical Society of America* 103, 2960-2960, (1998).

- Hollinshead, C.M., R.D. Harvey, D.J. Barlow, J.R.P. Webster, A.V. Hughes, A. Weston, and M.J. Lawrence, Effects of surface pressure on the structure of distearoylphosphatidylcholine monolayers formed at the air/water interface†, *Langmuir* 25, 4070-4077, (2009).
- Hristova, K., A. Kenworthy, and T. J. McIntosh, Effect of bilayer composition on the phase-behavior of liposomal suspensions containing poly(ethylene glycol)-lipids, *Macromolecules* 28, 7693-7699, (1995).
- Hristova, K., and D. Needham, The influence of polymer-grafted lipids on the physical properties of lipid bilayers: A theoretical study, *Journal of colloid and interface science* 168, 302-314, (1994).
- Inoue, T., and Y. Nibu, Phase behavior of hydrated lipid bilayer composed of binary mixture of phospholipids with different head groups, *Chemistry and physics of lipids* 100, 139-150, (1999).
- Jebrail, M., R. Schmidt, CE DeWolf, and V. Tsoukanova, Effect of aliphatic chain length on stability of poly (ethylene glycol)-grafted phospholipid monolayers at the air/water interface, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 321, 168-174, (2008).
- Kaneko, O.F., and J.K. Willmann, Ultrasound for molecular imaging and therapy in cancer, *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery* 2, 87-97, (2012).
- Kaya, M., T.S. Gregory V, and P.A. Dayton, Changes in lipid-encapsulated microbubble population during continuous infusion and methods to maintain consistency, *Ultrasound in medicine & biology* 35, 1748-1755, (2009).
- Keller, S.L., Miscibility transitions and lateral compressibility in liquid phases of lipid monolayers, *Langmuir* 19, 1451-1456, (2003).
- Kenworthy, A.K., K. Hristova, D. Needham, and T.J. McIntosh, Range and magnitude of the steric pressure between bilayers containing phospholipids with covalently attached poly (ethylene glycol), *Biophysical journal* 68, 1921-1936, (1995).
- Kim, D.H., M.J. Costello, P.B. Duncan, and D. Needham, Mechanical properties and microstructure of polycrystalline phospholipid monolayer shells: Novel solid microparticles, *Langmuir* 19, 8455-8466, (2003).
- Kim, K., C. Kim, and Y. Byun, Preparation of a peg-grafted phospholipid langmuir-blodgett monolayer for blood-compatible material, *Journal of biomedical materials research* 52, 836-840, (2000).
- Kim, K., C. Kim, and Y. Byun, Biostability and biocompatibility of a surface-grafted phospholipid monolayer on a solid substrate, *Biomaterials* 25, 33-41, (2004).
- Kirby, C., J. Clarke, and G. Gregoriadis, Effect of the cholesterol content of small unilamellar liposomes on their stability in vivo and in vitro, *Biochemical Journal* 186, 591, (1980).
- Klibanov, A. L., Ultrasound contrast agents: Development of the field and current status, *Contrast Agents li* 222, 73-106, (2002).
- Klibanov, A. L., K. W. Ferrara, M. S. Hughes, J. H. Wible, J. K. Wojdyla, P. A. Dayton, K. E. Morgan, and G. H. Brandenburger, Direct video microscopic observation of the dynamic effects of medical ultrasound on ultrasound contrast microspheres, *Investigative Radiology* 33, 863-870, (1998).

- Klibanov, A. L., T. I. Shevchenko, B. I. Raju, R. Seip, and C. T. Chin, Ultrasound-triggered release of materials entrapped in microbubble-liposome constructs: A tool for targeted drug delivery, *Journal of Controlled Release* 148, 13-17, (2010).
- Klibanov, A.L., Targeted delivery of gas-filled microspheres, contrast agents for ultrasound imaging, *Advanced drug delivery reviews* 37, 139-157, (1999).
- Koczo, K., LA Lobo, and DT Wasan, Effect of oil on foam stability: Aqueous foams stabilized by emulsions, *Journal of colloid and interface science* 150, 492-506, (1992).
- Kooijman, E.E., V. Chupin, N.L. Fuller, M.M. Kozlov, B. de Kruijff, K.N.J. Burger, and R. Peter, Spontaneous curvature of phosphatidic acid and lysophosphatidic acid, *Biochemistry* 44, 2097-2102, (2005).
- Kubo, I., S. Adachi, H. Maeda, and A. Seki, Phosphatidylcholine monolayers observed with brewster angle microscopy and  $\pi$ -a isotherms, *Thin Solid Films* 393, 80-85, (2001).
- Kwan, J., and M. Borden, Microbubble shell break-up and collapse during gas exchange, (IEEE), (2010).
- Kwan, J.J., and M.A. Borden, Lipid monolayer collapse and microbubble stability, *Advances in Colloid and Interface Science* (2012).
- Kwan, J.J., and M.A. Borden, Lipid monolayer dilatational mechanics during microbubble gas exchange, *Soft Matter* 8, 4756-4766, (2012).
- Langner, M., and K. Kubica, The electrostatics of lipid surfaces, *Chemistry and physics of lipids* 101, 3-35, (1999).
- Lee, K.Y.C., Collapse mechanisms of langmuir monolayers, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 59, 771-791, (2008).
- Lee, Y.L., J.Y. Lin, and C.H. Chang, Thermodynamic characteristics and langmuir–blodgett deposition behavior of mixed dppa/dppc monolayers at air/liquid interfaces, *Journal of colloid and interface science* 296, 647-654, (2006).
- Lentacker, I., S.C. De Smedt, and N.N. Sanders, Drug loaded microbubble design for ultrasound triggered delivery, *Soft Matter* 5, 2161-2170, (2009).
- Lentz, B.R., D.R. Alford, M. Hoehli, and F.A. Dombrose, Phase behavior of mixed phosphatidylglycerol/phosphatidylcholine multilamellar and unilamellar vesicles, *Biochemistry* 21, 4212-4219, (1982).
- Leong-Poi, H., J. Song, S. J. Rim, J. Christiansen, S. Kaul, and J. R. Lindner, Influence of microbubble shell properties on ultrasound signal: Implications for low-power perfusion imaging, *Journal of the American Society of Echocardiography* 15, 1269-1276, (2002).
- Lindner, J. R., Molecular imaging of cardiovascular disease with contrast-enhanced ultrasonography, *Nature Reviews Cardiology* 6, 475-481, (2009).
- Lipp, MM, KYC Lee, DY Takamoto, JA Zasadzinski, and AJ Waring, Coexistence of buckled and flat monolayers, *Physical review letters* 81, 1650-1653, (1998).
- Liu, Y., H. Miyoshi, and M. Nakamura, Encapsulated ultrasound microbubbles: Therapeutic application in drug/gene delivery, *Journal of controlled release* 114, 89-99, (2006).

- Lozano, M.M., and M.L. Longo, Complex formation and other phase transformations mapped in saturated phosphatidylcholine/dspe-peg2000 monolayers, *Soft Matter* 5, 1822-1834, (2009).
- Lozano, M.M., and M.L. Longo, Microbubbles coated with disaturated lipids and dspe-peg2000: Phase behavior, collapse transitions, and permeability, *Langmuir* 25, 3705-3712, (2009).
- Lucero, A., MR Rodríguez Nino, AP Gunning, VJ Morris, PJ Wilde, and JM Rodríguez Patino, Effect of hydrocarbon chain and ph on structural and topographical characteristics of phospholipid monolayers, *The Journal of Physical Chemistry B* 112, 7651-7661, (2008).
- Luna, C., K.M. Stroka, H. Bermudez, and H. Aranda-Espinoza, Thermodynamics of monolayers formed by mixtures of phosphatidylcholine/phosphatidylserine, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 85, 293-300, (2011).
- Luna, DMN, EPS Falcão, SJ Melo, and CAS Andrade, Interfacial properties of a novel pyrimidine derivative and poly (ethylene glycol)-grafted phospholipid floating monolayers, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 373, 22-28, (2011).
- Macfarlane, M.G., Phosphatidylglycerols and lipoamino acids, *Advances in lipid research* 2, 91, (1964).
- Majewski, J., T. L. Kuhl, K. Kjaer, M. C. Gerstenberg, J. Als-Nielsen, J. N. Israelachvili, and G. S. Smith, X-ray synchrotron study of packing and protrusions of polymer-lipid monolayers at the air-water interface, *Journal of the American Chemical Society* 120, 1469-1473, (1998).
- Majewski, J., TL Kuhl, MC Gerstenberg, JN Israelachvili, and GS Smith, Structure of phospholipid monolayers containing poly (ethylene glycol) lipids at the air-water interface, *The Journal of Physical Chemistry B* 101, 3122-3129, (1997).
- Maniti, O., M. Cheniour, O. Marcillat, C. Vial, and T. Granjon, Morphology modifications in negatively charged lipid monolayers upon mitochondrial creatine kinase binding, *Molecular membrane biology* 26, 171-185, (2009).
- Mansour, H.M., and G. Zografí, Relationships between equilibrium spreading pressure and phase equilibria of phospholipid bilayers and monolayers at the air-water interface, *Langmuir* 23, 3809-3819, (2007).
- Mathe, G., C. Gege, K.R. Neumaier, R.R. Schmidt, and E. Sackmann, Equilibrium swelling behavior of solid supported poly (ethylene glycol) lipid monolayers. Effects of short chain lengths, *Langmuir* 16, 3835-3845, (2000).
- Meunier, J., Why a brewster angle microscope?, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 171, 33-40, (2000).
- Minones, J., JM Rodríguez Patino, O. Conde, C. Carrera, and R. Seoane, The effect of polar groups on structural characteristics of phospholipid monolayers spread at the air-water interface, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 203, 273-286, (2002).
- Moghaddam, B., M.H. Ali, J. Wilkhu, D.J. Kirby, A.R. Mohammed, Q. Zheng, and Y. Perrie, The application of monolayer studies in the understanding of liposomal formulations, *International journal of pharmaceuticals* (2011).

- Moghaddam, B., S.E. McNeil, Q. Zheng, A.R. Mohammed, and Y. Perrie, Exploring the correlation between lipid packaging in lipoplexes and their transfection efficacy, *Pharmaceutics* 3, 848-864, (2011).
- Moriyasu, F., and K. Itoh, Efficacy of perflubutane microbubble-enhanced ultrasound in the characterization and detection of focal liver lesions: Phase 3 multicenter clinical trial, *American Journal of Roentgenology* 193, 86-95, (2009).
- Nakahara, H., M.P. Krafft, A. Shibata, and O. Shibata, Interaction of a partially fluorinated alcohol (f8h11oh) with biomembrane constituents in two-component monolayers, *Soft Matter* 7, 7325-7333, (2011).
- Nakamura, S., H. Nakahara, M.P. Krafft, and O. Shibata, Two-component langmuir monolayers of single-chain partially fluorinated amphiphiles with dipalmitoylphosphatidylcholine (dppc), *Langmuir* 23, 12634-12644, (2007).
- Naumann, CA, CF Brooks, GG Fuller, W. Knoll, and CW Frank, Viscoelastic properties of lipopolymers at the air-water interface: A combined interfacial stress rheometer and film balance study, *Langmuir* 15, 7752-7761, (1999).
- Nettesheim, S., D. Zeisel, M. Handschuh, and R. Zenobi, Self-assembly and desorption behavior of poly (ethylene glycol) monolayers on silica, *Langmuir* 14, 3101-3106, (1998).
- Oguchi, T., K. Sakai, H. Sakai, and M. Abe, Afm surface morphology and friction force studies of microscale domain structures of binary phospholipids, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 79, 205-209, (2010).
- Pavinatto, F.J., L. Caseli, A. Pavinatto, D.S. dos Santos Jr, T.M. Nobre, M.E.D. Zaniquelli, H.S. Silva, P.B. Miranda, and O.N. de Oliveira Jr, Probing chitosan and phospholipid interactions using langmuir and langmuir-blodgett films as cell membrane models, *Langmuir* 23, 7666-7671, (2007).
- Petrache, H.I., S.W. Dodd, and M.F. Brown, Area per lipid and acyl length distributions in fluid phosphatidylcholines determined by  $^2\text{H}$  nmr spectroscopy, *Biophysical journal* 79, 3172, (2000).
- Plesset, M. S., and S. S. Sadhal, On the stability of gas-bubbles in liquid-gas solutions, *Applied Scientific Research* 38, 133-141, (1982).
- Polozov, I.V., and K. Gawrisch, Domains in binary soap/lipid mixtures studied by pulsed field gradient  $^1\text{H}$  mas nmr, *Biophysical journal* 87, 1741-1751, (2004).
- Porter, T. R., The utilization of ultrasound and microbubbles for therapy in acute coronary syndromes, *Cardiovascular Research* 83, 636-642, (2009).
- Pu, G., M.A. Borden, and M.L. Longo, Collapse and shedding transitions in binary lipid monolayers coating microbubbles, *Langmuir* 22, 2993-2999, (2006).
- Pu, G., M.L. Longo, and M.A. Borden, Effect of microstructure on molecular oxygen permeation through condensed phospholipid monolayers, *Journal of the American Chemical Society* 127, 6524-6525, (2005).

- Quiroga, C., LMA Monzón, and LM Yudi, Voltammetric study and surface pressure isotherms describing flunitrazepam incorporation into a distearoylphosphatidic acid film adsorbed at air/water and water/1, 2-dichloroethane interfaces, *Electrochimica Acta* (2011).
- Riess, J. G., E. G. Schutt, D. H. Klein, and R. M. Mattrey, Injectable microbubbles as contrast agents for diagnostic ultrasound imaging: The key role of perfluorochemicals, *Angewandte Chemie-International Edition* 42, 3218-3235, (2003).
- Risovic, D., S. Frka, and Z. Kozarac, Application of brewster angle microscopy and fractal analysis in investigations of compressibility of langmuir monolayers, *Journal of Chemical Physics* 134, 24701, (2011).
- Ross, M., C. Steinem, H.J. Galla, and A. Janshoff, Visualization of chemical and physical properties of calcium-induced domains in dppc/dpps langmuir-blodgett layers, *Langmuir* 17, 2437-2445, (2001).
- Saad, S.M.I., Z. Policova, E.J. Acosta, M.L. Hair, and A.W. Neumann, Mixed dppc/dppg monolayers at very high film compression, *Langmuir* 25, 10907-10912, (2009).
- Sánchez-González, J., MA Cabrerizo-Vilchez, and MJ Gálvez-Ruiz, Chain dependence in phospholipid interactions: A thermodynamic study of mixed monolayers, *Colloid & Polymer Science* 276, 239-246, (1998).
- Sanchez, J., and A. Badia, Spatial variation in the molecular tilt orientational order within the solid domains of phase-separated, mixed dialkylphosphatidylcholine monolayers, *Chemistry and physics of lipids* 152, 24-37, (2008).
- Schneider, J., Y.F. Dufrene, W.R. Barger Jr, and G.U. Lee, Atomic force microscope image contrast mechanisms on supported lipid bilayers, *Biophysical journal* 79, 1107-1118, (2000).
- Schutt, E.G., D.H. Klein, R.M. Mattrey, and J.G. Riess, Injectable microbubbles as contrast agents for diagnostic ultrasound imaging: The key role of perfluorochemicals, *Angewandte Chemie International Edition* 42, 3218-3235, (2003).
- Shah, DO, NF Djabbarah, and DT Wasan, A correlation of foam stability with surface shear viscosity and area per molecule in mixed surfactant systems, *Colloid & Polymer Science* 256, 1002-1008, (1978).
- Shen, Y., R.L. Powell, and M.L. Longo, Interfacial and stability study of microbubbles coated with a monostearin/monopalmitin-rich food emulsifier and peg40 stearate, *Journal of colloid and interface science* 321, 186-194, (2008).
- Silvius, J.R., P.M. Brown, and T.J. O'Leary, Role of head group structure in the phase behavior of amino phospholipids. 1. Hydrated and dehydrated lamellar phases of saturated phosphatidylethanolamine analogs, *Biochemistry* 25, 4249-4258, (1986).
- Silvius, J.R., and J. Gagne, Calcium-induced fusion and lateral phase separations in phosphatidylcholine-phosphatidylserine vesicles. Correlation by calorimetric and fusion measurements, *Biochemistry* 23, 3241-3247, (1984).
- Sirsi, S., and M. Borden, Microbubble compositions, properties and biomedical applications, *Bubble science engineering and technology* 1, 3, (2009).



- Sirsi, S., J. Feshitan, J. Kwan, S. Homma, and M. Borden, Effect of microbubble size on fundamental mode high frequency ultrasound imaging in mice, *Ultrasound in medicine & biology* 36, 935-948, (2010).
- Stepniewski, M., M. Pasenkiewicz-Gierula, T. Róg, R. Danne, A. Orlowski, M. Karttunen, A. Urtti, M. Yliperttula, E. Vuorimaa, and A. Bunker, Study of pegylated lipid layers as a model for pegylated liposome surfaces: Molecular dynamics simulation and langmuir monolayer studies, *Langmuir* (2011).
- Su, H., S. Liu, Z. G. Wang, W. Y. Xie, B. Jiang, and H. B. Xiong, In vivo transfection of enhanced green fluorescent protein in rat retinal ganglion cells mediated by ultrasound-induced microbubbles, *Neural Regeneration Research* 4, 413-417, (2009).
- Swanson, E.J., V. Mohan, J. Kheir, and M.A. Borden, Phospholipid-stabilized microbubble foam for injectable oxygen delivery, *Langmuir* (2010).
- Takamoto, DY, MM Lipp, A. Von Nahmen, K.Y.C. Lee, AJ Waring, and JA Zasadzinski, Interaction of lung surfactant proteins with anionic phospholipids, *Biophysical journal* 81, 153-169, (2001).
- Talu, E., M. M. Lozano, R. L. Powell, P. A. Dayton, and M. L. Longo, Long-term stability by lipid coating monodisperse microbubbles formed by a flow-focusing device, *Langmuir* 22, 9487-9490, (2006).
- Tanwir, K., and V. Tsoukanova, Lateral distribution of a poly (ethylene glycol)-grafted phospholipid in phosphocholine monolayers studied by epifluorescence microscopy, *Langmuir* 24, 14078-14087, (2008).
- Teixeira, H., C. Dubernet, V. Rosilio, S. Benita, J. Lepault, I. Erk, and P. Couvreur, New bicompartmental structures are observed when stearylamine is mixed with triglyceride emulsions, *Pharmaceutical research* 17, 1329-1332, (2000).
- Thurmond, R.L., S.W. Dodd, and M.F. Brown, Molecular areas of phospholipids as determined by 2h nmr spectroscopy. Comparison of phosphatidylethanolamines and phosphatidylcholines, *Biophysical journal* 59, 108-113, (1991).
- Tinkov, S., R. Bekeredjian, G. Winter, and C. Coester, Microbubbles as ultrasound triggered drug carriers, *Journal of pharmaceutical sciences* 98, 1935-1961, (2009).
- Tsukanova, V., and C. Salessse, High-pressure transition of a poly (ethylene glycol)-grafted phospholipid monolayer at the air/water interface, *Macromolecules* 36, 7227-7235, (2003).
- Unger, E.C., T. Porter, W. Culp, R. Labell, T. Matsunaga, and R. Zutshi, Therapeutic applications of lipid-coated microbubbles, *Advanced drug delivery reviews* 56, 1291-1314, (2004).
- Villanueva, F. S., E. X. Lu, S. Bowry, S. Kilic, E. Tom, J. J. Wang, J. Gretton, J. J. Pacella, and W. R. Wagner, Myocardial ischemic memory imaging with molecular echocardiography, *Circulation* 115, 345-352, (2007).
- Wan, K., JM Chovelon, and N. Jaffrezic-Renault, Enzyme-octadecylamine langmuir-blodgett membranes for enft biosensors, *Talanta* 52, 663-670, (2000).
- Wang, J. F., C. J. Wu, C. M. Zhang, Q. Y. Qiu, and M. A. Zheng, Ultrasound-mediated microbubble destruction facilitates gene transfection in rat c6 glioma cells, *Molecular Biology Reports* 36, 1263-1267, (2009).

- Wang, W. H., C. C. Moser, and M. A. Wheatley, Langmuir trough study of surfactant mixtures used in the production of a new ultrasound contrast agent consisting of stabilized microbubbles, *Journal of Physical Chemistry* 100, 13815-13821, (1996).
- Wang, W., C.C. Moser, and M.A. Wheatley, Langmuir trough study of surfactant mixtures used in the production of a new ultrasound contrast agent consisting of stabilized microbubbles, *The Journal of Physical Chemistry* 100, 13815-13821, (1996).
- Watry, M.R., T.L. Tarbuck, and G.L. Richmond, Vibrational sum-frequency studies of a series of phospholipid monolayers and the associated water structure at the vapor/water interface, *The Journal of Physical Chemistry B* 107, 512-518, (2003).
- Welty, James R., Charles E. Wicks, and Robert E. Wilson *Fundamentals of momentum, heat, and mass transfer* (John Wiley & Sons, New Yprk), (1969).
- Wiese, G., S.R. Barthel, and C.J. Dimitroff, Analysis of physiologic e-selectin-mediated leukocyte rolling on microvascular endothelium, *Journal of visualized experiments: JoVE* (2009).
- Williams, R., J.M. Hudson, B.A. Lloyd, A.R. Sureshkumar, G. Lueck, L. Milot, M. Atri, G.A. Bjarnason, and P.N. Burns, Dynamic microbubble contrast-enhanced us to measure tumor response to targeted therapy: A proposed clinical protocol with results from renal cell carcinoma patients receiving antiangiogenic therapy, *Radiology* 260, 581-590, (2011).
- Willmann, J.K., R.H. Kimura, N. Deshpande, A.M. Lutz, J.R. Cochran, and S.S. Gambhir, Targeted contrast-enhanced ultrasound imaging of tumor angiogenesis with contrast microbubbles conjugated to integrin-binding knottin peptides, *Journal of Nuclear Medicine* 51, 433-440, (2010).
- Wydro, P., The interactions between cholesterol and phospholipids located in the inner leaflet of humane erythrocytes membrane (dppe and dpps) in binary and ternary films—the effect of sodium and calcium ions, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 82, 209-216, (2011).
- Wydro, P., S. Knapczyk, and M. Łapczyńska, Variations in the condensing effect of cholesterol on saturated versus unsaturated phosphatidylcholines at low and high sterol concentration, *Langmuir* (2011).
- Wydro, P., and K. Witkowska, The interactions between phosphatidylglycerol and phosphatidylethanolamines in model bacterial membranes:: The effect of the acyl chain length and saturation, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 72, 32-39, (2009).
- Xing, Z., H. Ke, J. Wang, B. Zhao, X. Yue, Z. Dai, and J. Liu, Novel ultrasound contrast agent based on microbubbles generated from surfactant mixtures of span 60 and polyoxyethylene 40 stearate, *Acta Biomaterialia* 6, 3542-3549, (2010).
- Xu, Z., N.B. Holland, and R.E. Marchant, Conformations of short-chain poly (ethylene oxide) lipopolymers at the air-water interface: A combined film balance and surface tension study, *Langmuir* 17, 377-383, (2001).
- Yoon, J.H., K.S. Lee, J.E. Yang, M.S. Won, and Y.B. Shim, Electron transfer kinetics and morphology of cytochrome*c* at the biomimetic phospholipid layers, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 644, 36-43, (2010).

Zasadzinski, JA, R. Viswanathan, L. Madsen, J. Garnaes, and DK Schwartz, Langmuir-blodgett films, *Science* 263, 1726, (1994).

TÜBİTAK  
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

<b>Proje No:</b> 109M494
<b>Proje Başlığı:</b> Ultrason Kontrast Ajanlarının Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu
<b>Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar:</b> Yrd. Doç. Dr. Sevgi KILIÇ ÖZDEMİR Doç.Dr. Ekrem ÖZDEMİR Prof.Dr. Salih OKUR
<b>Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:</b> İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Kimya Mühendisliği Bölümü Urla, 35430-İZMİR
<b>Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:</b>
<b>Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:</b> 15.04.2010-15.10.2012
<b>Öz (en çok 70 kelime):</b> Ultrason görüntüleme tıp'ta çeşitli hastalıkların teşhisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, çevreleyen dokulardan gelen arka plan sinyaller yöntemin hassasiyetini azaltmakta, doğru teşhis için yeterince net bir görüntü elde edilememektedir. Görüntü kalitesinin artırılması için kontrast ajanı olarak adlandırılan mikroköpükçükler kullanılmaktadır. Mikroköpükçükler ayrıca ilaç, gen, DNA taşımakta ve kontrollü salımlarında da kullanılabilir. Bu çalışmada, moleküler görüntüleme ve tedavi amaçlı kullanılacak ultrason kontrast ajanlarının monotabaka yapısının yeniden tasarımı, stabiliteilerinin artırılması, ve karakterizasyonları yapılmıştır.
<b>Anahtar Kelimeler:</b> Ultrason, kontrast ajanı, mikroköpükçük, fosfolipid, monotabaka, Langmuir-Blodgett, LB, Brewster açısı mikroskobu, BAM, moleküler görüntüleme.
<a href="#">Fikri Ürün Bildirim Formu</a> Sunuldu mu? Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/> Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.

## **Projeden Yapılan Yayınlar:**

### Yayınlar

- Sagdic EA, Bolukcu ES, Kose D, Ozdemir E, Kilic-Ozdemir S, “Enhancement of Stability of Microbubbles As Ultrasound Contrast Agents” 244th American Chemical Society National Meeting, Philadelphia, PA, August 19-23, 2012
- Ozbakir O, Beceren B, Okur S, Ozdemir E, Kilic-Ozdemir S, “Optimization of Poly(ethylene glycol) Density for Preparation of Blood-Compatible Material” 7<sup>th</sup> Nanoscience and Nanotechnology Conference, Sabancı University, Istanbul, June 27, 2011
- Kose D, Binici D, Okur S, Ozdemir E, Kilic-Ozdemir S, “Phase Behavior and Morphology of Phospholipid Langmuir-Blodgett Monolayers” 7<sup>th</sup> Nanoscience and Nanotechnology Conference, Sabancı University, Istanbul, June 27, 2011
- Akinci SZ, Okur S, Ozdemir E, Kilic-Ozdemir S, “Investigation of Shell Characteristics of Contrast Agents for Ultrasonography” 6<sup>th</sup> Nanoscience and Nanotechnology Conference, Cesme-Izmir, June 15-18, 2010
- Akinci SZ, Yoruk S, Sen AE, Ozdemir E, Okur S, Kilic-Ozdemir S, “Protein Adsorption on Cholesterol Incorporated Langmuir-Blodgett Phospholipid-Emulsifier Monolayers” 6<sup>th</sup> Nanoscience and Nanotechnology Conference, Cesme-Izmir, June 15-18, 2010
- Akinci SZ., Bekat T, Kilic-Ozdemir S, Okur S, “AFM and Kelvin Probe Study of Emulsifier Incorporated Phospholipids” 6<sup>th</sup> Nanoscience and Nanotechnology Conference, Cesme-Izmir, June 15-18, 2010
- Tekin UA, Islamoglu R, Kilic-Ozdemir S, Okur S, Ozdemir E, “Development of a Humidity Sensor Using PEG<sub>40</sub>-Stearate” 6<sup>th</sup> Nanoscience and Nanotechnology Conference, Cesme-Izmir, June 15-18, 2010
- Akıncı SZ, Bekat T, Özdemir E, Okur S, Kılıç-Özdemir S, “Ultrason Görüntülemeye Kullanılan Mikroköpükçüklerin Üretilmesi” 9. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi, Ankara, June 22-25, 2010
- Akinci SZ., Ceylan S., Bergama OE., Ozdemir E., Okur S., Kilic-Ozdemir S., “Towards the Development of Stable Ultrasound Contrast Agents” 5th Nanoscience and Nanotechnology Conference, Anadolu University, Eskisehir, June 8-12, 2009

- Kilic-Ozdemir S., Okur S., Ozdemir E., “Humidity Sensing Properties of PEG-40 LB films detected using QCM technique” 5th Nanoscience and Nanotechnology Conference, Anadolu University, Eskisehir, June 8-12, 2009

### Tezler

- Saliha Zeyneb Akıncı, “Towards the Development of Ultrasound Contrast Agents: Investigation of Monolayer Microstructure”, Haziran 2011
- Emine Aysu Sağdıç, “Preparation and Characterization of Microbubbles for Ultrasound Imaging” , Aralık 2012
- Elif Şeniz Bölükçü, “Design and Characterization of Shell Structure of Microbubbles Used for Ultrasound Imaging”, Aralık 2012
- Derya Köse, “Towards Drug Loading onto Microbubbles for Therapeutic Ultrasound”, (Haziran 2013)

Not: Proje kapsamında elde edilen bulgular, hakemli dergilerde yayınlanmak üzere dizim aşamasındadır.