



**Biyosentetik Hibrit Polimerlerin RAFT Polimerizasyonu
İle Üretilmesi ve Hücre Membraniyla Etkileşimlerinin
Vücut Dışında Değerlendirilmesi**

Program Kodu: 1001

Proje No: 111T960

Proje Yürütücüsü:

Prof. Dr. Esmâ Volga BULMUŞ ZAREİE

Bursiyerler:

Esra AYDINLIOĞLU

Vildan GÜVEN

Abdülkadir GÜL

MAYIS 2015

ANKARA



ÖNSÖZ

Gen terapisi, gen sessizleştirme terapisi, DNA aşılı ve kanser kemoterapisi gibi çok sayıda önemli tedavi stratejisinde kullanılan etken maddelerin ve ilaç taşıma sistemlerinin birçoğu hücrelerin membranlarından yeterli miktarlarda geçemezler ve tedavi edici aktivitelerini gösteremedi bozunurlar. Bu durum çok sayıda önemli tedavi stratejisinin, klinikte insanlar ve hayvanlar üzerinde uygulanabilen gerçek tedavilere dönüşmesini önemli ölçüde sınırlamaktadır.

Önerilen proje ile hücre membranını geçemeyen etken maddelerin ve ilaç taşıma sistemlerinin hücre sitozolüne taşınmasını mümkün kılacak, endozom ve/veya lizozom membranıyla etkileşebilen, iyi tanımlanmış polimerlerin üretilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla moleküler seviyede tasarlanmış arjinin, yağ asidi veya kolesterol içeren (ko)polimerler tersinir katılma ayrışma zincir transfer (RAFT) polimerizasyonu üretilmiş ve in vitro deneyler ile hücre membranıyla etkileşimleri belirlenmiştir. Elde edilen bulgular, yağ asidi ve arjinin (ko)polimerlerinin toksik etki göstermeden hücre membranıyla etkileştiğini göstermiştir. Sonuç olarak, bu proje ile potansiyel olarak hücre sitozolüne etken maddelerin geçişini sağlayabilecek yeni polimerler üretilmiştir. Böylece çok sayıda tedavi stratejisinin insan ve hayvanlar için gerçek tedavilere dönüşmesine bir adım daha yaklaşılmıştır.

Bu proje kapsamında yapılan bütün çalışmalar TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.



İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ	xi
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	4
2.1 Arjinin/Oktaarjinin Polimerleri	6
2.2 Yağ Asidi Polimerleri.....	7
2.3 Kolesterol Polimerleri.....	8
2.4 Tersinir Katılma Ayrışma Zincir Transfer (RAFT) Polimerizasyonu	11
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	12
3.1 Kullanılan Kimyasallar	12
3.2 Kullanılan Enstrümental Karakterizasyon Metodları	13
3.2.1 Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Analizi ile Kimyasal Yapı Analizi	13
3.2.2 Jel Geçirgenlik Kromatografisi Yöntemi ile Moleküler Ağırlık Analizi	13
3.2.3 Dinamik Işık Saçılımı Yöntemi ve UV-Görünür Spektroskopisi ile Hidrodinamik Boyutlar ve pH-Duyarlı Davranışın İncelenmesi.....	13
3.2.4 Atomik Kuvvet Mikroskobu ile Moleküllerin Morfoloji ve Konformasyon Analizi ...	14
3.2.5 Yüze Plazmon Rezonans Analizi.....	14
3.2.6 Akış Sitometresi ve Floresans Mikroskobu.....	14
3.3 Polimerlerin Sentezi ve Karakterizasyonları	15
3.3.1 Arjinin Polimerlerinin Sentezi	15
3.3.2 Yağ Asidi Polimerlerinin Sentezi	20
3.3.3 Kolesterol Polimerlerinin Sentezi.....	26
3.4 Sentezlenen Polimerlerin Hücre Kültürü ve Hemoliz Deneyleri	29
3.4.1 Hücre Kültürü.....	29
3.4.2 Sentezlenen Polimerlerin RAFT Uç Grubunun Kırılması	30
3.4.3 Polimerlerin Toksisitesinin İncelenmesi.....	30
3.4.4 Polimerlerin Floresan Boya ile Etiketlenmesi.....	31
3.4.5 Hücre Alımı Deneyleri	32
3.4.6 Hücre İçi Dağılım Deneyleri	33
3.4.7 Hemoliz Deneyi.....	34
4. BULGULAR.....	35
4.1 Arjinin İçeren Polimerlerin Sentezi	35
4.1.1 Arjinin Monomeri Sentezi	35
4.1.2 Arjinin Monomerinin Serbest Radikal Polimerizasyonu	39
4.1.3 Amin Reaktif PFMA Monomerinin RAFT Polimerizasyonu	44
4.1.4 Fonksiyonel Polimer PPFMA'nın Arjinin Amino Asiti ile Modifiye Edilmesi.....	47
4.1.5 PPFMA- <i>b</i> -PPEGMA Kopolimerlerinin RAFT Polimerizasyonu ile Sentezi	48
4.1.6 PPFMA- <i>b</i> -PPEGMA Kopolimerlerinin Arjinin ile Modifikasyonu.....	50
4.1.7 PPFMA- <i>b</i> -PPEGMA Kopolimerlerinin Oktaarjinin ile Modifikasyonu.....	52
4.2 Arjinin İçeren Polimerlerin Karakterizasyonu	53

4.3 Arjinin İçeren Polimerlerin Membran Aktivitelerinin İncelenmesi.....	55
4.4 Arjinin İçeren Polimerlerin Hücre Canlılığına Etkileri	56
4.5 Arjinin İçeren Polimerlerin Hücreler Tarafından Alımı ve Hücre İçi Dağılımları	57
4.6 Yağ Asidi Polimerlerinin Sentezi	61
4.7 Yağ Asidi Polimerlerinin Karakterizasyonu.....	71
4.8 Yağ Asidi Polimerlerinin Membran Aktivitelerinin İncelenmesi	72
4.9 Yağ Asidi Polimerlerinin Hücre Canlılığına Etkileri	75
4.10 Yağ Asidi Polimerlerinin Hücreler Tarafından Alımı ve Hücre İçi Dağılımları	76
4.11 Kolesterol Polimerlerinin Sentezi	79
4.11.1 Anyonik Kolesterol Polimerlerinin Sentezi	79
4.11.2 Katyonik Kolesterol Polimerlerinin Sentezi	87
4.12 Kolesterol Polimerlerinin Karakterizasyonu	90
4.13 Kolesterol Polimerlerinin Membran Aktivitelerinin İncelenmesi.....	92
4.14 Kolesterol Polimerlerinin Hücre Canlılığına Etkileri	97
4.15 Kolesterol Polimerlerinin Hücreler Tarafından Alımı ve Hücre İçi Dağılımları	99
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	102
EKLER	110
EK A. HÜCRE ALIMI ÖRNEK ANALİZİ	110
KAYNAKLAR.....	111



ŞEKİL LİSTESİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa Numarası</u>
Şekil 3.1. Pentaflorofenolden pentaflorofenil metakrilat (PFMA) sentezi şeması.	15
Şekil 3.2. L- Arjinin Metil Ester (AME) ile Pentaflorofenil Metakrilat (PFMA) reaksiyonunun şematik gösterimi.	16
Şekil 3.3. PPFMA- <i>b</i> -PPEGMA kopolimerlerinin ajinin ile reaksiyon şeması.	20
Şekil 3.4. Oleik asitin, model bileşik merkaptolanol (ME) ile katılma reaksiyonu genel şeması.	21
Şekil 3.5.10-undekanoik asitin, merkaptolanol (ME) ile katılma reaksiyonu.	21
Şekil 3.6. 11-[2-(2-metill-akriloksil)-etil sülfanil]-undekanoik asit (UDAMA) sentezi şematik gösterimi.	22
Şekil 3.7. 11-[2-(2-metil-akriloksil)-etil sülfanil]-undekanoik asitin (UDAMA) homopolimerizasyon şeması.	23
Şekil 3.8. 11-[2-(2-metil-akriloksil)-etil sülfanil]-undekanoik asitin (UDAMA) ile tert-bütillmetakrilat (t-BMA) ile kopolimerizasyon şeması.	23
Şekil 3.9. Poli(11-[2-(2-metill-akriloksil)-etil sülfanil]-undekanoik (p(UDAMA)))'nın RAFT polimerizasyonu ile sentezi.	25
Şekil 3.10. Poli(UDAMA-ko-t-bütillmetakrilat) (p(UDAMA-ko-t-BMA)) kopolimerlerinin RAFT polimerizasyonu. ile sentezi.	25
Şekil 3.11. Poli(UDAMA-ko-metakrilik asit) (p(UDAMA-ko-MAA)) kopolimerlerinin RAFT polimerizasyonu ile sentezi.	26
Şekil 3.12. Kolesteril metakrilatın oluşma reaksiyonunun şematik gösterimi.	27
Şekil 3.13. Poli(kolesteril metakrilat-ko-t-bütill metakrilat) (p(CMA-ko-t-BMA)) kopolimerlerinin sentezi.	27
Şekil 4.1. Vakum distilasyon sonrası PFMA monomerinin ¹ H ve ¹⁹ F NMR spektrumları.	36
Şekil 4.2. L-Arjinin metil ester (AME)'nin ¹ H NMR spektrumu.	37
Şekil 4.3. L-Arjinin metil ester (AME) ve PFMA'nın reaksiyonu sonrası elde edilen karışımın ¹ H NMR spektrumu.	37

Şekil 4.4. Arjinin metil ester metakrilamid (AMME) monomerinin saflaştırma sonrası ¹ H NMR spektrumu.	38
Şekil 4.5. Elde edilen AMME monomerinin MALDI-ToF spektrumu.	38
Şekil 4.6. AMME'nin sulu ortamda gerçekleştirilen serbest radikal polimerizasyonu sonuçları. Diyaliz sonrası örneklerin 1H NMR spektrumları (D ₂ O). Üst: 4 saatlik polimerizasyon; Alt: 10 saatlik polimerizasyon.	39
Şekil 4.7. Başlatıcı olarak AMPA ile gerçekleştirilen AMME monomerinin 4 saatlik polimerizasyonu sonrası elde edilen polimerizasyon karışımının (üst) ve saflaştırılmış polimerin (alt) ¹ H NMR spektrumları (D ₂ O).	41
Şekil 4.8. P(AMME)'nin diyaliz sonrası ¹ H-NMR sonucu.	43
Şekil 4.9. AMME'nin RAFT polimerizasyonu sonuçları. [AMME] ₀ / [ECT] ₀ /[Başlatıcı] ₀ = 250/3/1; sıcaklık= 50°C; çözügen= DMAc.	44
Şekil 4.10. PFMA'nın RAFT polimerizasyonu. Monomer konsantrasyonu= 2M; çözügen= dioksan; polimerizasyon sıcaklığı 90°C.....	46
Şekil 4.11. (Üst) PPFMA'nın modifikasyon öncesi ¹⁹ F-NMR spektrumu. (Alt) PPFMA'nın AME ile reaksiyonu sonrası alınan ¹⁹ F-NMR spektrumu.....	47
Şekil 4.12. PPFMA makroRAFT ajanı ile PEGMA'nın kopolimerizasyonu sonrası alınmış ¹ H NMR spektrumu. Monomer/MakroRAFT/Başlatıcı= 100/1/0.1. Polimerizasyon süresi 8 saat.	48
Şekil 4.13. PPFMA makroRAFT ajanından PEGMA zincir uzatma kopolimerizasyonu sırasında monomer dönüşümüne karşı kopolimerin molekül ağırlığı (M _n) ve dağılımı (PDI) değişimi.	49
Şekil 4.14. PPFMA makroRAFT ajanından PEGMA ile zincir uzatma polimerizasyonu sonucu oluşan kopolimerlerin jel geçirgenlik kromatogramları.....	50
Şekil 4.15. PPFMA- <i>b</i> -PPEGMA blok kopolimerinin arjinin metil ester (AME) ile reaksiyonu karışımının ¹⁹ F-NMR spektrumu.	51
Şekil 4.16. P(AMME)- <i>b</i> -PEGMA, arjinin metil ester ile modifiye edilmiş PPFMA- <i>b</i> -PPEGMA, blok kopolimerinin saflaştırma sonrası alınmış ¹ H-NMR spektrumu (D ₂ O).	51
Şekil 4.17. Oktaarjinin ile modifiye edilmiş PPFMA- <i>b</i> -PPEGMA blok kopolimerinin saflaştırma sonrası alınmış ¹ H-NMR spektrumu (D ₂ O).....	52
Şekil 4.18. PPFMA- <i>b</i> -PPEGMA blok kopolimerinin oktaarjinin ile modifikasyonu öncesi ve sonrası alınmış GPC kromatogramları.....	53

- Şekil 4.19. PAMME (Mn:9500) ve PAMME-*b*-PPEGMA (Mn:14000) polimerlerinin pH 5.0 ve 7.4'de alınmış AFM görüntüleri..... 54
- Şekil 4.20. PAMME (Mn:9500) ve PAMME-*b*-PPEGMA (Mn:14000) polimerlerinin iki farklı pH değerinde (pH 5 ve pH 7.4) DLS ölçümleri ile elde edilmiş sayıca ortalama hidrodinamik çapları..... 54
- Şekil 4.21. PAMME (Mn:9500 ve Mn:12000) polimerinin SPR çipi üzerindeki lipid katmanıyla etkileşmesi (A) Mn:9500 pH 7.4, (B) Mn:9500 pH 5 ve (C) Mn:12000 pH 5.0. 55
- Şekil 4.22. PAMME-*b*-PPEGMA (Mn:14000) blok kopolimerinin SPR çipi üzerindeki lipid katmanıyla etkileşmesi (A) pH 7.4 ve (B) pH 5.0..... 56
- Şekil 4.23. Arjinin metil ester metakrilat polimeri P(AMME) (Mn 17000 g/mol, PDI 1.27)'nin insan akciğer kanser hücre hattı A549 hücre hattının canlılığına etkisi: RAFT uç grubu aminoliz edilmiş (siyah çubuklar) ve edilmemiş (beyaz çubuklar) polimerler. 57
- Şekil 4.24. Floresan boya ile işaretlenmiş PAMME (Mn:9500) (üst) ve PAMME-*b*-PPEGMA (Mn:14000) (orta) polimerlerinin 3 saat boyunca insan akciğer kanser hücre hattı (A549) tarafından alımlarının endositoz inhibitörleri varlığında (alt) ve yokluğunda akış sitometresi ile 1 saat boyunca incelenmesi. Örnek akış sitometresi diyagramları Ekler'de verilmektedir. Noc:Nokodazol; CytD: Sitokalsin D..... 60
- Şekil 4.25. Floresan (yeşil) boya ile işaretlenmiş PAMME-*b*-PPEGMA (Mn:14000) polimerlerinin insan akciğer kanser hücre hattı (A549) tarafından alımlarının floresans mikroskobu ile incelenmesi. (a) Hücrenin faz-kontrast görüntüsü (b) DAPI ile boyanmış hücrelerin çekirdekleri (c) p(AMME)-ko-PEGMA polimerinin hücre içinde dağılımı (d) Farklı kanallarla çekilmiş a, b ve c mikrograflarının karşılaştırılması. Skala uzunluğu 10 µm'dir. 61
- Şekil 4.26. 10-undekanoik asit ve 2-merkaptolanolün termal katılma reaksiyonunun DCM-su ekstraksiyonundan sonra çekilmiş ¹H-NMR spektrumu (CDCl₃)..... 62
- Şekil 4.27. 11-[2-(2-metill-akriloksil)-etil sülfanil]-undekanoik asit (UDAMA) monomerinin kolon kromatografisi ile saflaştırılmasından önce (üst) ve sonra (alt) alınmış ¹H-NMR spektrumları (CDCl₃). 63
- Şekil 4.28. UDAMA monomerinin serbest radikal polimerleşmesi sonrası ¹H NMR spektrumu (saflaştırılmadan önce) ([Monomer] = 1M, monomer: AIBN = 20:1, çözüen: THF). 64
- Şekil 4.29. UDAMA monomerinin RAFT polimerizasyonu deneyinde 8 saat sonunda elde edilen polimerizasyon karışımının ¹H NMR spektrumu ([M]₀= 4 M; [M]₀/[RAFT]₀/[AIBN]₀= 400/4/1, çözüen: asetonitril). 66

- Şekil 4.30. UDAMA'nın RAFT homopolimerizasyonu kinetik çalışma sonuçları; $\ln (M_0/M) -$ zaman, sayıca ortalama molekül ağırlığı (M_n) – dönüşüm ve polidispersite indeks (PDI) – dönüşüm grafikleri $[M]_0 = 4 \text{ M}$; $[M]_0/[RAFT]_0/[AIBN]_0 = 400/4/1$; çözügen= Asetonitril. . 66
- Şekil 4.31. 6 saatlik polimerleşme sonrası, UDAMA ve MAA kopolimerizasyon karışımının ^1H NMR spektrumu (üstte); polimerizasyonun saflaştırılmış ^1H NMR spektrumu (altta). ($[\text{Monomer}] = 1 \text{ M}$; beslemedeki $[UDAMA]/[MAA]/[RAFT]/[ACVA] = 10/40/1/0.25$). 69
- Şekil 4.32. UDAMA ve MAA komonomerlerinin RAFT kopolimerizasyonu kinetik çalışmaları. (Üst) $\ln [M]_0/[M]$ zaman; (Orta ve Alt) Sırasıyla beslemede toplam monomer içinde %20 ve %50 UDAMA içeren kopolimerlerin monomer dönüşümüne karşı M_n ve PDI grafikleri. 70
- Şekil 4.33. Değişen UDAMA içeriğine sahip kopolimerlerin (beslemedeki toplam monomerin %20 ve %50), pH 5.0 ve pH 7.4 tampon çözeltiler içerisinde absorpsiyon ölçümleri. Polimerlerin konsantrasyonları 4 mg/ml'dir. Besleme kompozisyonları %20 ve %50 olan örneklerin kopolimer kompozisyonları %23 ve %65'dir. 71
- Şekil 4.34. Molce %20 UDAMA içeriğine sahip iki farklı molekül ağırlıktaki (6000 ve 9000 g/mol) kopolimerlerin (besleme kompozisyonu %20), pH 5.0 ve pH 7.4'de alınmış AFM görüntüleri. 72
- Şekil 4.35. P(MAA-ko-UDAMA) kopolimerlerinin iki farklı kopolimer konsantrasyonunda pH'ya bağımlı hemolitik aktivitesi. Grafik içinde kopolimerizasyon besleme kompozisyonları gösterilmiştir. Besleme kompozisyonları %20 ve %50 olan örneklerin kopolimer kompozisyonları %23 ve %65'dir..... 74
- Şekil 4.36. P(MAA-ko-UDAMA) kopolimerinin (M_n 9000 g/mol, PDI 1.6, molce %20 UDAMA) pH 5.0 ve 7.4'de endozom membranını taklit eden lipid katmanı ile etkileşiminin SPR ile ölçülmesi..... 75
- Şekil 4.37. %20 UDAMA içeren P(MAA-ko-UDAMA) kopolimerlerinin NIH3T3 ve A549 hücrelerinin canlılığına etkileri. İnkübasyon süresi 72 saat. 76
- Şekil 4.38. P(MAA-ko-UDAMA) kopolimerinin (9 kDa, %20 UDAMA) konsantrasyon ve zamana bağlı olarak hücre alımının akış sitometresi ile analizi..... 77
- Şekil 4.39. P(MAA-ko-UDAMA) kopolimerinin (9 kDa, %20 UDAMA) endositoz inhibitörleri varlığında hücre alımının akış sitometresi ile analizi. İnkübasyon süresi 1 saat; polimer konsantrasyonu= 25 μM 77
- Şekil 4.40. A549 hücrelerinin Oregon Green (OG) ile işaretlenmiş 20 % UDAMA içeren P(MAA-ko- UDAMA)(M_w : 9 kDa) inkübasyonundan sonra elde edilen floresan

- mikrografları 40X büyütme a) DAPI ile boyanan çekirdek b) OG-işaretlenmiş Kopolimer ile inkübasyon c) a ve b'nin üst üste çakıştırılmasıyla elde edilen görüntü. 78
- Şekil 4.41. Projede sentezlenen kolesteril metakrilat monomerinin ¹H-NMR spektrumu. 79
- Şekil 4.42. CMA ve t-BMA kopolimerizasyon deneyinde 8 saat sonunda elde edilen polimerizasyon karışımının ¹H NMR spektrumu (Toplam monomer konsantrasyonu: 4.2 M, [t-BMA]/[CMA]/[RAFT]/[AIBN] mol oranı= 490/10/1/0.2)..... 80
- Şekil 4.43. CMA ve t-BMA kopolimerizasyonunun; ln Mo/M – zaman, Mn – dönüşüm ve PDI – dönüşüm grafikleri ([M]₀= 4.2 M; [M]₀/[RAFT]₀/[AIBN]₀= 500/1/0.2). 82
- Şekil 4.44. CMA ve t-BMA kopolimerizasyonunun; ln Mo/M – zaman, Mn – dönüşüm ve PDI – dönüşüm grafikleri ([M]₀= 5.9 M; [M]₀/[RAFT]₀/[AIBN]₀= 204/1/0.2). 83
- Şekil 4.45. Kolesterol içeren kopolimerlerin hidroliz öncesi ve sonrası ¹H-NMR spektrumları. (Polimer özellikleri= Mn= 89500, PDI=1.29, Kolesterol içeriği= % 10)..... 86
- Şekil 4.46. %10 CMA içeren p(AEAEMA-ko-CMA) kopolimerlerinin RAFT polimerizasyonu kinetik çalışma sonuçları. (Üst) ln(Mo/M) – zaman; (Alt) sayıca ortalama molekül ağırlığı (Mn) – dönüşüm ve polidispersite indeks (PDI) – dönüşüm grafikleri. Polimerizasyon Şartları: [M]₀= 1.5 M; [AEAEMA]/[CMA]/[RAFT]/[AIBN]= 22.5/2.5/1/0.25; Çözgen= Toluen..... 88
- Şekil 4.47. %20 CMA içeren p(AEAEMA-ko-CMA) kopolimerlerinin RAFT polimerizasyonu kinetik çalışma sonuçları. (Üst) ln (Mo/M) – zaman; (Alt) sayıca ortalama molekül ağırlığı (Mn) – dönüşüm ve polidispersite indeks (PDI) – dönüşüm grafikleri. Polimerizasyon Şartları: [M]₀= 1.5 M; [AEAEMA]/[CMA]/[RAFT]/[AIBN]= 20.0/5.0/1.0/0.25; Çözgen= Toluen..... 89
- Şekil 4.48. %40 CMA içeren p(AEAEMA-ko-CMA) kopolimerlerinin RAFT polimerizasyonu kinetik çalışma sonuçları. (Üst) ln (Mo/M) – zaman; (Alt) sayıca ortalama molekül ağırlığı (Mn) – dönüşüm ve polidispersite indeks (PDI) – dönüşüm grafikleri. Polimerizasyon Şartları: [M]₀= 1.5 M; [AEAEMA]/[CMA]/[RAFT]/[AIBN]= 15.0/10.0/1.0/0.25; Çözgen= Toluen..... 90
- Şekil 4.49 Değişen molekül ağırlıklarında %2 CMA içeren kopolimer çözeltilerinin pH bağımlı bulanıklık deneyi..... 92
- Şekil 4.50 %2, 4 ve 8 (mol) kolesterol içeren p(MAA-ko-CMA) kopolimerlerinin (Mn= 16,000 - 18,000) hemolitik aktivitesi. 93
- Şekil 4.51. %2 CMA içeren kopolimerlerin değişen molekül ağırlıklarda ve konsantrasyonlarda pH'ya bağımlı hemolitik aktivitesi..... 94

- Şekil 4.52. %4 CMA içeren kopolimerlerin değişen molekül ağırlıklarda ve konsantrasyonlarda pH'ya bağımlı hemolitik aktivitesi..... 95
- Şekil 4.53. %8 CMA içeren kopolimerlerin değişen molekül ağırlıklarında ve konsantrasyonlarda pH'ya bağımlı hemolitik aktivitesi. 95
- Şekil 4.54. (ÜST) P(MAA-ko-CMA) kopolimerlerinin (molce %2, 4 ve 8 kolesterol içeren) hücre plazma membranı benzeri lipid tabaka ile etkileşimlerinin SPR ile ölçülmesi, (ALT) molce %2 kolesterol içeren kopolimerin hücre plazma membranı (PM) ve endozom membranı (EM) benzeri lipid tabakalar ile etkileşiminin SPR ile ölçülmesi. PM ve EM benzeri lipid tabakalar sırasıyla 0.42 ve 0.80'lik kolesterol/fosfatidilkolin mol oranlarına sahiptir..... 96
- Şekil 4.55. Değişen molekül ağırlıklarda, %2 (üst) ve 8% (alt) CMA içeren p(MAA-co-CMA) kopolimerlerinin NIH3T3 hücrelerinin canlılığına etkileri. İnkübasyon süresi= 72 saat. 97
- Şekil 4.56 (ÜST) Değişen konsantrasyon ve sürelerde P(AEAEMA-ko-CMA) (Mn= 5000 Da, %20 CMA içerikli) kopolimerin NIH 3T3 hücrelerinin canlılığına etkisi; (ALT) Değişen konsantrasyonlarda ve molekül ağırlıklarda P(AEAEMA-ko-CMA) (%10 CMA içerikli) kopolimerlerin A549 hücrelerinin canlılığına etkisi. 98
- Şekil 4.57. NIH3T3 hücrelerinin Oregon Green (OG) ile işaretlenmiş 2 % CMA içeren P(MAA-ko-CMA) (Mn 20 kDa) inkübasyonundan sonra elde edilen floresan mikrografları 40X büyütme a) DAPI ile boyanan çekirdek b) OG-işaretlenmiş kopolimer ile inkübasyon c) a ve b'nin üst üste çakıştırılmasıyla elde edilen görüntü. 99
- Şekil 4.58 P(MAA-ko-CMA) kopolimerinin (20 kDa ve 70 kDa; %2 CMA) hücre alımının akış sitometresi ile ölçümü (inkübasyon süresi 1 veya 3 saat). 100
- Şekil 4.59 P(MAA-ko-CMA) kopolimerinin (20 kDa ve 70 kDa; %2 CMA) hücre alımının akış sitometresi ile ölçümü (inkübasyon süresi 1 veya 3 saat). 101
- Şekil 4.60 Katyonik kolesterol kopolimerinin (Mn= 15500 Da, %10 CMA içerikli) endositoz inhibitörleri varlığında A549 hücreleri tarafından alımının akış sitometrisi ile ölçümü (1 saat inkübasyon). 101
- Şekil A.1. 50 µM p(AMME) polimerinin A549 hücreleri tarafından 3 saat sonucunda alımı. A) Saçılım diyagramı B) Histogram C) İstatiksel analiz D) Hücre alımı denklemi..... 110



TABLO LİSTESİ

Tablo

Sayfa Numarası

Tablo 3.1. AMME'nin RAFT polimerizasyonu koşulları	17
Tablo 3.2. PFMA RAFT polimerizasyonu şartları. [M]= 2M, çözügen= dioksan, RAFT ajanı (R)= 4-siyano-4-(fenilkarbonotiyolitiyo)pentanoik asit, başlatıcı (I)= AIBN.....	18
Tablo 3.3. Yağ asidi monomeriyle gerçekleştirilen serbest radikal polimerizasyonları.....	23
Tablo 3.4. UDAMA monomerinin RAFT homopolimerizasyon şartları, T= 65 °C	24
Tablo 3.5. UDAMA'nın RAFT kopolimerizasyonları	25
Tablo 4.1. Başlatıcı olarak AMPA ile gerçekleştirilen AMME'nin serbest radikal polimerizasyonlarından elde edilen monomer dönüşüm değerleri	40
Tablo 4.2. AMME'nin RAFT polimerizasyonu sonuçları	42
Tablo 4.3. PFMA monomerinin RAFT polimerizasyon sonuçları [Monomer]= 2 M; Çözügen: Dioksan	45
Tablo 4.4. PPFMA makroRAFT ajanı (Mn:8000 PDI:1.40) kullanılarak PEGMA komonomeri ile blok kopolimerizasyon sonuçları.....	49
Tablo 4.5. UDAMA'nın RAFT polimerizasyonları ve elde edilen monomer dönüşüm değerleri	65
Tablo 4.6. UDAMA ve tert-bütül metakrilat (t-BMA) kopolimerizasyon sonuçları. [Toplam Monomer]= 3M. Beslemedeki [UDAMA]/[t-BMA]/[RAFT]/[AIBN] mol oranı= 10/40/1/0.25	67
Tablo 4.7. UDAMA ve metakrilik asitin (MAA) kopolimerizasyon sonuçları. [Toplam Monomer]= 3M, Beslemedeki [UDAMA]/[MAA]/[RAFT]/[AIBN] mol oranı= 60/40/1/0.25	68
Tablo 4.8. UDAMA ve MAA kopolimerizasyonlarının zaman bağlı monomer dönüşümleri, sayıca ortalama molekül ağırlıkları (Mn), polidispersite indeksleri (PDI) ve kompozisyonları	68
Tablo 4.9. Molce %20 ve %50 UDAMA içeren kopolimerlerin tampon çözelti içerisindeki DLS sonuçları (pH 5.0 ve 7.4). Besleme kompozisyonları %20 ve %50 olan örneklerin kopolimer kompozisyonları %23 ve %65'dir.....	72

Tablo 4.10. Kolesteril metakrilat (CMA) ve tert-bütül metakrilat (t-BMA)'ın RAFT tekniği ile gerçekleştirilen kopolimerizasyonlarının sonuçları	81
Tablo 4.11. %2 kolesterol içeren kopolimerlerin özellikleri. Kopolimerizasyon şartları: [Toplam monomer]= 4.2 M; Beslemedeki [t-BMA]/ [CMA]/[RAFT]/[AIBN] Mol oranı= 490/10/1/0.2; Sıcaklık= 68°C; Çözgen: Toluen.....	84
Tablo 4.12. %4 kolesterol içeren kopolimerlerin özellikleri. Kopolimerizasyon şartları: [Toplam monomer]= 4.2 M; Beslemedeki [t-BMA]/ [CMA]/[RAFT]/[AIBN] Mol oranı= 480/20/1/0.2; Sıcaklık= 68°C; Çözgen: Toluen.....	84
Tablo 4.13. %8 kolesterol içeren kopolimerlerin özellikleri. Kopolimerizasyon şartları: [Toplam monomer]= 4.2 M; Beslemedeki [t-BMA]/ [CMA]/[RAFT]/[AIBN] mol oranı= 460/40/1/0.2; Sıcaklık= 68°C; Çözgen: Toluen.....	84
Tablo 4.14. %10 kolesterol içeren kopolimerlerin özellikleri. Kopolimerizasyon şartları: [Toplam monomer]= 4.2 M; Beslemedeki [t-BMA]/ [CMA]/[RAFT]/[AIBN] Mol oranı= 450/50/1/0.2; Sıcaklık= 68°C; Çözgen: Toluen.....	85
Tablo 4.15. %10 kolesterol içeren p(AEAEMA-ko-CMA) kopolimerlerinin özellikleri. Kopolimerizasyon şartları: [Toplam monomer]= 1.5 M; Beslemedeki [AEAEMA]/[CMA]/[RAFT]/[AIBN] Mol oranı= 22.5/2.5/1.0/0.25; Sıcaklık= 68°C; Çözgen: Toluen	87
Tablo 4.16. Değişen molekül ağırlıklarında %2 CMA içeren kopolimerlerin tampon çözeltiler içinde sayıca ortalama hidrodinamik çapları	91
Tablo 4.17. Değişen molekül ağırlıklarında %8 CMA içeren kopolimerlerin tampon çözeltiler içinde sayıca ortalama hidrodinamik çapları	91



ÖZET

Gen terapisi, gen sessizleştirme terapisi, DNA aşılı ve kanser kemoterapisi gibi çok sayıda önemli tedavi stratejisinde kullanılan etken maddelerin ve ilaç taşıma sistemlerinin birçoğu hücrelerin membranlarından yeterli miktarlarda geçemezler ve tedavi edici aktivitelerini göstermeden bozunurlar. Bu durum çok sayıda önemli tedavi stratejisinin, klinikte insanlar ve hayvanlar üzerinde uygulanabilen gerçek tedavilere dönüşmesini önemli ölçüde sınırlamaktadır.

Önerilen proje ile hücre sitozolüne etken maddelerin taşınmasını kolaylaştıracak, endozom ve/veya lizozom membranının yapısal kararlılığını veya bütünlüğünü bozabilen, iyi tanımlanmış, amino asit, peptit veya lipit içeren biyosentetik hibrit polimerlerin Tersinir Katılma Ayrışma Zincir Transfer (RAFT) polimerizasyon yöntemiyle üretilmesi, bu polimerlerin membran aktivitesinin bilinen ve yeni geliştirilecek olan yöntemlerle karakterize edilmesi ve polimerlerin hücre alımlarının ve hücre-içi dağılımlarının *in vitro* deneyler ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla, molekül ağırlıkları iyi kontrol edilmiş dar molekül ağırlığı dağılımına sahip arjinin amino asidi, oktaarjinin peptidi, undekanoik asit veya kolesterol içeren metakrilat (ko)polimerleri RAFT polimerizasyonu ile üretilmiştir. Üretilen polimerlerin çeşitli teknikler ile ayrıntılı olarak fizikokimyasal karakterizasyonu yapıldıktan sonra hücre membranlarıyla etkileşimleri, literatürde bu amaç için yaygın olarak kullanılan hemoliz deneyleriyle ve ayrıca yüzey plazmon rezonans (SPR) kullanılarak yeni geliştirilen bir yöntem ile incelenmiştir. Bunlara ek olarak *in vitro* hücre kültürlerinde, üretilen kopolimerlerin hücre canlılığına etkileri, hücreler tarafından alımları ve hücre içinde dağılımları belirlenmiştir. Tüm deneylerin sonucunda elde edilen bulgular; arjinin veya undekanoik asit içeren polimerlerin hücre canlılığına belirgin bir etki göstermeden hücre içine alınabildiğini, hücre/endozom membranı ile etkileşebildiğini ve hücre sitozolüne yayılabildiğini göstermiştir.

Sonuç olarak, potansiyel olarak hücre içine etkili bir şekilde ilaç taşınımı mümkün kılacak polimerler üretilmiştir. Böylece çok sayıda potansiyel tedavi stratejisinin gerçek tedavilere dönüşmesine bir adım daha yaklaşmıştır.



ABSTRACT

In numerous treatment strategies such as gene therapy, gene silencing therapy, DNA vaccines and cancer chemotherapy therapeutic agents are required to show activity inside the cells. However, most therapeutic molecules and delivery systems used in these strategies cannot cross through cellular membranes at therapeutic quantities and get degraded before displaying therapeutic activity. This barrier limits the translation of such potent therapeutic strategies into clinically applicable treatments for animal and human use.

This project aims to synthesize via Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer (RAFT) polymerization endosomal/lysosomal membrane-disrupting, well-defined biosynthetic hybrid polymers containing amino acid, peptide or lipid moieties to enable the effective cytoplasmic delivery of therapeutics; characterize the membrane-disruptive activity of the polymers and determine the in vitro cell uptake and intracellular distribution profile of the polymers.

For this purpose, well-defined methacrylate copolymers of arginine amino acid, octaarginine peptide, undecanoic acid and cholesterol were synthesized via RAFT polymerization. Physicochemical characterization of polymers were performed via various characterization techniques. Interactions of polymers with cell membrane were analyzed via hemolysis experiments and also a newly developed method using surface plasmon resonance (SPR). Additionally; cytotoxicity, cell uptake and intracellular distribution of synthesized polymers were determined using in vitro cultured healthy and cancer cells. The overall results have shown that arginine and undecanoic acid containing polymers are efficiently taken up by cells without having significant cytotoxicity, and interact with cell/endosome membrane and distribute into cell cytosol.

In conclusion, polymers that would potentially enable the intracellular delivery of therapeutics were successfully developed. This potentially takes many potential therapeutic strategies one step further towards becoming clinically applicable real treatments.



1. GİRİŞ

DNA, RNA ve proteinler gibi biyolojik makromoleküllerin klinikte etkili ilaçlar olarak kullanılmalarının önündeki önemli engellerden biri, bu moleküllerin hücre membranından yeterli miktarlarda geçememeleridir (Pack vd., 2005; Bulmus, 2005). Gen susturma stratejisinde kullanılan küçük RNA dizilerinin (siRNA) ve protein aşularının hücrelerin sitoplazmasına, gen transferinde ve DNA aşularında kullanılan DNA'nın ise hücrelerin çekirdeğine ulaşması gereklidir. Bu makromoleküller, büyük boyutları ve yüklü, hidrofilik yapıları nedeniyle lipid esaslı olan hücre membranından pasif difüzyon ile geçemezler. Ayrıca kanser kemoterapisinde kullanılan doksorubisin gibi küçük molekül ağırlıklı ilaçların da hücrenin içinde çekirdeğine ulaşması gerekmektedir. Bu tür görece hidrofobik ve küçük boyutta moleküller, hücre membranından pasif difüzyon ile geçebilmektedir. Ancak bu tür kanser ilaçlarının, vücuttan kolay atılmalarını önlemek, biyolojik sıvılarda çözünürlüğünü arttırmak ve kanser hücrelerine hedefleme yapabilmek amaçlarıyla genellikle makromolekül veya nanoparçacık esaslı taşıyıcılarla birlikte kullanılmaları gerekmektedir. Bu durumda yine hücre membranı bu makromolekül veya molekül üstü yapıların hücre içine geçişinde önemli bir engeldir.

Yukarıda bahsedilen biyolojik makromoleküller ve nanoparçacık/makromolekül esaslı ilaç salım sistemleri genellikle endositoz mekanizması aracılığıyla hücreler tarafından alınır ve endozom ve lizozom gibi membranla çevrili vesiküller içinde parçalanıp etkisiz hale getirilirler (Pack vd., 2005; Bulmus, 2005; Jones vd., 2003). Tedavi edici etkinin gösterilebilmesi için etken maddenin endozom veya parçalanmadan önce lizozomdan kaçıp sitozole ulaşması gerekmektedir.

Kısaca, kanser kemoterapisinden gen susturma stratejisine kadar birçok yaklaşım çok çeşitli hastalıkların tedavisinde umut vaat etmekle beraber, bu yaklaşımların kullandığı etken maddelerin tedavi için yeterli olamayacak kadar az miktarlarda hücre içine ulaşması bu stratejilerin gerçek tedavilere dönüşmesi önünde önemli bir engeldir (Ranucci vd., 2008; Min vd., 2006). Bu engeli aşmada endozom veya lizozom membranıyla bütünleşebilen füzojenik peptitler ve katyonik lipidler, veya endozom/lizozom membranının yapısal bütünlüğünü bozabilen pH'ya duyarlı sentetik polimerler kullanılmıştır (Meyer vd., 2008; Torchilin, 2008; Stewart vd., 2004; Huang vd., 2005; Wolfrum vd., 2007; Bulmus vd., 2003; Hoffman vd., 2007; Murthy vd., 1999; Grube vd., 2008; Yessine vd., 2007; Funhoff vd., 2005; Convertine vd., 2009; Henry vd., 2006; Foster vd., 2010).

Gerçekleştirilen projeye, sentetik polimerler ile füzojenik peptit/amino asit veya lipidleri biraraya getiren, endozom veya lizozom membranını kararsız hale getirebilen polimerlerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu tür polimerler fonksiyonel olarak klasik ilaç salım sistemlerinin

ötesinde yapılarıdır. Rasyonel bir tasarım ve fizikokimyasal özelliklerin hassas bir şekilde kontrolü, bu yapıların biyolojik özellikleri ve aktivitesi için hayati bir öneme sahiptir. Özellikle polimerlerin molekül ağırlığı ve molekül ağırlığı dağılımları, polimerlerin kan akışında kalış süreleri, vücut içinde dağıldıkları organlar, hücre membranı ile etkileşimleri ve hücre içine giriş karakteristiklerini doğrudan etkiler (Caliceti vd., 2003; Ali vd., 2006). Dolayısıyla bu proje kapsamında molekül ağırlıkları kontrol edilebilen ve dar molekül ağırlığı dağılımları olan polimerlerin sentezi bir kontrollü/yaşayan (controlled/living) polimerleştirme tekniği olan Tersinir Katılma Ayrışma Zincir Transfer (RAFT) polimerizasyonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. RAFT polimerizasyonu, çok çeşitli monomerlerle uyumu, yumuşak koşullar altında (sulu çözeltilerde ve oda sıcaklığında) gerçekleştirilebilmesi, metal katalizörler gibi ekstra bileşenlere ihtiyaç duymaması gibi özellikleri nedeniyle biyolojik uygulamalar için iyi tanımlanmış polimerlerin sentezi için en uygun teknik olarak kabul görmektedir (Boyer vd., 2009). RAFT tekniği ile istenen molekül ağırlıkta, dar molekül ağırlığı dağılımına (≤ 1.2) sahip, uç-grup fonksiyonel ve çeşitli yapılarda (blok kopolimerler, yıldız polimerler vb.) polimerler kolaylıkla sentezlenebilmektedir.

Projede polimerler biyolojik bileşenden türetilmiş 4 farklı yapıdan birini içerecek şekilde sentezlenmiştir. Bu yapılar: 1) arjinin amino asiti; 2) oktaarjinin peptidi; 3) yağ asidi (undekanoik asit); 4) kolesterol.

Arjinin esaslı peptitlerin hücre membranıyla etkileştiği ve hücre-içi ilaç salım uygulamalarında kullanımı literatürde daha önce rapor edilmiştir (Szabo vd., 2010). Ancak arjinin amino asitini içeren monomerlerin RAFT tekniği ile iyi-tanımlanmış polimerlerinin sentezi projenin başlangıcından sonra yayınlanmış iki makalede rapor edilmiştir (Treat vd., 2011, Kim vd., 2012) Projede arjinin içeren homopolimerler ve polietilen glikol (met)akrilat ile birlikte hazırlanmış kopolimerler iki farklı yöntem ile sentezlenmiştir. Yöntemlerden ilkinde arjinin amino asitinden doğrudan metakrilat monomeri sentezlenmiş ve bu monomerin RAFT polimerizasyonu çalışılmıştır. Diğer yöntem de ise fonksiyonel gruplara sahip bir polimer RAFT tekniği ile üretilmiş ve polimerizasyon sonrası arjinin amino asiti polimere bağlanmıştır. Oktaarjinin içeren polimerler de ikinci yöntem takip edilerek üretilmiştir.

Projede ayrıca bir yağ asidi olan undekanoik asitten metakrilat monomeri sentezlenmiş ve bu monomerin homopolimerleri ve metakrilik asit ile kopolimerleri RAFT tekniği kullanılarak sentezlenmiştir. Bildiğimiz kadarıyla yağ asidi polimerlerinin hücre içine ilaç salım amacıyla kullanımı literatürde henüz yer almamıştır. Son olarak hücre içine siRNA gibi makromolekül esaslı ilaçların girmesini kolaylaştırdığı bilinen kolesterol kullanılmıştır (Huang vd., 2005; Wolfrum vd., 2007). Kolesteroleden türetilmiş metakrilat monomeri önce metakrilik asit ile daha sonra etilaminetilaminmetakrilat (Kurtuluş vd., 2014) ile yine RAFT tekniği kullanılarak kopolimerleştirilmiştir.



Böylece bu proje ile biyolojik ve sentetik bileşenler RAFT tekniği kullanılarak birleştirilmiş ve iyi tanımlanmış yeni hibrit polimerler üretilmiştir. Polimerlerin çeşitli tekniklerle detaylı olarak fizikokimyasal karakterizasyonu yapıldıktan sonra hücre membranlarıyla etkileşimleri, kırmızı kan hücreleri hemoliz deneyleriyle ve ayrıca endozom/lizozom membranı benzeri sentetik lipid tabakaları kullanılarak yüzey plazmon rezonans ile incelenmiştir. Ayrıca polimerler fluoresans ile işaretlenerek vücut dışında kültür edilmiş hücreler tarafından alımları ve bu hücreler içindeki dağılımları tespit edilmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Günümüzde kullanılan birçok tedavi stratejisi, etken ajanların hedeflenen hücrelerin içine taşınmasını gerektirir. Örnek olarak, kanserli hücrelerin ölümünü başlatmak için kansere karşı kullanılan kemoterapi ajanlarından paklitaksel ve platin etken maddelerinin sırasıyla, hücre içindeki microtübüllere ve hücre çekirdeği içindeki DNA'ya etki etmesi gerekir. Gen terapisinde kullanılan DNA plazmidlerin hasta hücrenin çekirdeğine ulaşması gerekmektedir. Protein/peptit aşılıların, temel histokompatibilite sınıf 1 yolağıyla sunulabilmesi için makrofajların sitoplazmasına girmesi gerekmektedir. Tüm bu tedavi stratejilerinin ve burada bahsedilmeyen diğer yaklaşımların kanser ve viral enfeksiyonlar dahil çok çeşitli hastalıkların tedavisinde büyük bir potansiyele sahip olmalarına rağmen, klinikte uygulanan gerçek tedavilere dönüşmesini engelleyen ortak en önemli problemlerinden biri, ilgili etken maddelerin hedef hücrelerin plazma zarından verimsiz taşınmalarıdır (Pack vd., 2005; Bulmus, 2005; Jones vd., 2003; Ranucci vd., 2008; Mukherjee vd., 1997). Verimsiz hücre membranı taşınımı, etken ajanların konsantrasyonlarının hedef hücrelerin içinde tedavi için gerekli konsantrasyonların çok altında kalmasına sebep olmaktadır. Bu durum, gereken konsantrasyonları tutturmak için daha sık ve yüksek dozlarda ilaç uygulaması yapılmasına sebep olur. Bu da ilaçların zararlı ve toksik yan etkileriyle beraber ilaca karşı dirençliliğe neden olur. Sonuç olarak masraflı, istenmeyen yan etkilere sahip, tedavi etkisi olmayan uygulamalar ortaya çıkar.

Protein ve DNA gibi biyolojik makromoleküller, sentetik polimerler ve nanopartiküller gibi büyük hidrodinamik hacime sahip yapılar ökaryotik hücrelerin plazma membranından pasif difüzyon ile taşınmazlar (Pack vd., 2005; Bulmus, 2005; Jones vd., 2003; Ranucci vd., 2008; Mukherjee vd., 1997). Bu tür yapılar hücre içine endositoz mekanizması ile alınır. Endositoz ile alınan materyaller önce endozom ve sonra lizozom gibi vesiküller ile çevrelenir ve lizozom içindeki enzimler ve düşük pH nedeniyle sitozole ulaşmadan bozunurlar. Örnek olarak, fare fibroblast hücreleri tarafından endositoz ile alınan protein ve nükleik asit ilaçların sitoplazmaya ulaşan yüzdesinin sırasıyla %5 (Ranucci vd., 2008) ve %20'den (Min vd., 2006) daha düşük olduğu tahmin edilmektedir. Kısaca endositoz ile alınan moleküllerin veya çoklu moleküllerden oluşan yapıların bozunmadan önce endozom/lizozom membranından geçerek hücrenin sitozolüne geçmesi gerekmektedir. Endozom ve lizozomların membranı, genel olarak hücrenin plazma membranından oluşur, ancak kompozisyonlarında küçük farklılıklar görülebilmektedir.

Makromolekül ve moleküler üstü yapıların endozom veya lizozom membranından taşınması için virüs ve toksinlerin hücreleri enfekte ederken kullandıkları peptitlere benzeyen sentetik peptidler (füzogenik peptidler) kullanılmıştır. Hücre membranıyla etkileşebilen füzogenik peptidlerin çeşitli etken maddelerin sitoplazmaya taşınımında olumlu etkisi kanıtlanmıştır (Meyer vd., 2008; Torchilin vd., 2008; Stewart vd., 2004; Subbarao vd., 1987). Bu tür peptitlerin

kompozisyonunda genelde asidik, bazik ve hidrofobik amino asitler yer alır. Ayrıca arjinin esaslı peptidlerin hücre membranına bağlanma ve hücreler tarafından alınmayı arttırdığı literatürde yaygın olarak rapor edilmiştir (Szabo vd., 2010; Fei vd., 2011) .

Hücre membranından seçici olarak geçebilen füzojenik peptidler ilk olarak 1980'lerin sonunda, AIDS'e yol açan immün yetmezlik virüsünün (HIV-1) hücre içine girme mekanizması dikkate alınarak keşfedilmiştir. Virüsten izole edilen, hücre membranı ile etkileşimi sağlayan transkripsiyon aktive edici (TAT) protein kılıfının dış ortamdan hücre içerisine girişi verimli bir şekilde ve birçok hücre hattı için artırdığı görülmüştür (Wagstaff vd., 2006). Bu özellikleri sebebiyle füzojenik peptidler ilaç salım sistemlerinde, özellikle biyolojik ilaçları hücre içerisine güvenli ve verimli bir şekilde ulaştırabilmek için kullanılmaya başlanmıştır (Fonseca vd., 2009). TAT protein kılıfının hücre membranı ile etkileşen kısmı incelendiğinde arjinin amino asidince zengin olduğu ve mekanizmanın öncüsü olan bileşenin arjinin olduğu görülmüştür (Futaki, 2005) Bu mekanizma arjinin amino asidinin fosfolipid yapıya sahip hücre zarındaki fosfat gruplarıyla etkileşmesi sonucunda oluşmaktadır (Herce vd., 2009). Bu etkileşimin sebeplerinden biri olarak ise arjinin üzerinde bulunan, vücut pH'sında pozitif yüklü guanidin gruplarının olabileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda arjinin peptidleri için; tekrar eden arjinin birimleri sayısının hücre zarından geçişi etkilediği ve en uygun arjinin yapısının oktaarjinin olduğu görülmüştür (Nakase vd., 2012).

Füzojenik peptitlerin dışında, lipidler hücre membranından taşınımı sağlamak amacıyla çeşitli etken maddelere veya taşıma sistemlerine konjuge edilerek kullanılmışlardır. Örneğin, kolesterol-siRNA konjugatlarının, serbest siRNA'ya göre hücre içine daha kolaylıkla girdiği ve yüksek biyolojik aktivite gösterdiği literatürde bildirilmiştir (Huang vd., 2005; Wolfrum vd., 2007).

Peptit ve lipitlerin dışında hücre-içi ilaç salım uygulamaları için membran-bozucu veya endozomolitik sentetik polimerler de kullanılmaktadır. Bu polimerler arasında asidik ve hidrofobik monomerlerden oluşan kopolimerler (örneğin: poli(metakrilik asit-ko-bütül metakrilat; poli(maleik asit-ko-stiren)), asidik hidrofobik monomerlerin homopolimerleri (örneğin: poli(etilakrilik asit), poli(propilakrilik asit)) geliştirilmiştir (Meyer vd., 2008; Torchilin, 2008; Stewart vd., 2004; Huang vd., 2005; Wolfrum vd., 2007; Bulmus vd., 2003; Hoffman vd., 2007; Murthy vd., 1999; Grube vd., 2008; Yessine vd., 2007; Funhoff vd., 2005; Convertine vd., 2009; Henry vd., 2006; Foster vd., 2010).

Ayrıca kısıtlı sayıda çalışmada (Funhoff vd., 2005; Johnson vd., 2010; Lee vd., 2008; Yin vd., 2009) sentetik polimerler ile füzojenik peptitlerin birleştirildiği hibrit yapılar kullanılmıştır. Dolayısıyla peptit ve lipitlerle sentetik birimleri birleştiren bu proje literatürdeki boşluğu doldurması açısından önemlidir. Özellikle tümüyle sentetik polimerlerin membran bozucu aktivitesinin peptit ve lipit esaslı sistemlerin aktivitesine kıyasla daha düşük olduğu

dikkate alınır, projede üretilen hibrit yapıların, sentetik polimerlerin fiziksel ve kimyasal çok yönlülüğü ile biyolojik moleküllerin etkinliğini sinerjetik bir şekilde birleştirerek hücre içi ilaç taşıma uygulamalarında membran taşınımı engelini aşabilme potansiyelleri yüksektir.

2.1 Arjinin/Oktaarjinin Polimerleri

Bu projenin amaçlarından biri arjinin amino asitini veya oktaarjinin peptidini içeren polimetakrilat ve polietilen glikol metakrilat (PEGMA)'dan oluşmuş iyi-tanımlanmış kopolimerleri RAFT tekniği ile hazırlamaktır. Bunun için iki farklı yöntem ile izlenmiştir. Yöntemlerden ilkinde arjinin amino asitinden doğrudan metakrilat monomeri sentezlenmiş ve bu monomerin RAFT polimerizasyonu çalışılmıştır. Diğer yöntem de ise aktif ester grubuna sahip bir polimer olan pentaflorofenilmetakrilat (PFMA) polimeri RAFT tekniği ile üretilmiş ve polimerizasyon sonrası arjinin amino asiti polimere seçici olarak bağlanmıştır. Oktaarjinin içeren polimerler de ikinci yöntem takip edilerek üretilmiştir. PFMA'nın projede ön-polimer olarak seçilmesinin sebebi üzerindeki pentaflorofenilester grubunun birincil aminlere karşı çok reaktif olmasıdır (Gibson vd., 2009; Batz vd., 1973). Proje kapsamında yapılmış olan arjinin amino asidinden doğrudan türetilmiş monomer sentezine daha önce literatürde rastlanmamıştır. Guanidin grubu benzeri bir yapıya sahip monomer sentezi ve bu monomerin RAFT polimerizasyonu daha önce çalışılmıştır (Treat vd., 2011). Bu polimerlerin hücre alımı deneyleri umut vaat edici sonuçlar vermiştir. Projede arjinin/oktaarjinin polimerlerinde kullanılan komonomer polietilen glikol (met)akrilat (PEGMA)'ın (tarak tipi PEG'in), protein, peptit, oligonükleotid gibi biyolojik makromoleküllerin immünojenik özelliklerini maskeleyen ve yapısal kararlılıklarını artırma özelliklerine sahip olduğu yayınlarda rapor edilmiştir (Gao vd., 2010; Gao vd., 2009; Gunasekaran vd., 2011). Proje kapsamında sentezlenen PFMA ve PEGMA kopolimerlerinin sentezi daha önce literatürde yayınlanmıştır (Nuhn vd., 2012). Proje kapsamında oktaarjinin içeren polimerler, PEGMA-PFMA kopolimerlerine polimerizasyon sonrası oktaarjinin konjuge edilerek üretilmiştir. Bugüne kadar oktaarjinin çeşitli ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılmış ve genel olarak hücre alımını artırıcı yönde sonuçlar vermiştir (Biswas vd., 2013; O'Donnell vd., 2015). Örneğin, oktaarjinin konjuge edilmiş N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide (HPMA) kopolimeri çalışmaları oktaarjinin içeriğinin polimerin hücre geçirgenliğini attırdığı kanıtlamıştır (Shamay vd., 2014). Bu proje kapsamında PEGMA-PFMA kopolimerine oktaarjinin bağlanması literatürde ilk defa gerçekleştirilmiştir.

2.2 Yağ Asidi Polimerleri

Gerçekleştirilen projenin bir diğer amacı, yağ asidi birimlerini içeren iyi-tanımlanmış kopolimerlerin RAFT tekniği ile sentezidir. Projede ön denemeler sonucunda yağ asidi olarak undekanoik asidin kullanılmasına karar verilmiştir. Öncelikle undekanoik asit türevi bir metakrilat monomeri (undekanoik asit metakrilat, UDAMA) sentezlenmiştir. RAFT tekniği ile üretilen homopolimerlerin suda çözünürlüğünün olmaması ve pH hassasiyetinin artırılması için bir sonraki adımda metakrilik asit (MAA) ile poli(MAA-ko-UDAMA) kopolimerleri üretilmiştir. Önemli bir nokta olarak, undekanoik asit monomerinin RAFT polimerizasyonunun henüz literatürde yer almamış olduğu not edilmelidir. Kısaca, projenin bu kısmındaki çalışmalar, hem sentetik hem de uygulama açısından, bildiğimiz kadarıyla literatür için yenidir.

Yağ asitleri, gıda takviyesi, kaplama, plastik ve ilaç gibi birbirinden farklı alanlarda kullanılmaktadır. Özellikle, doymamış yağ asitlerinin, geri dönüştürülebilir malzeme kaynağı olarak modifiye edilmesiyle, çevreye yönelik kullanımı olan çalışmalar vardır (Meier vd., 2007). Tiyol-ene katılma kimyasıyla, Hint yağından türetilmiş olan metil-10-undekenot yağ asidi ile farklı yapılar oluşturan monomerler sentezlenmiştir. Elde edilen monomerler, polikondenzasyon polimerizasyonu ile termal özellik içeren polimerlere dönüştürülmüşlerdir. Bu yapılar petrol bazlı plastik yapılara alternatif olan ve çevreye zarar vermeyen polimerlerdir (Türünç ve Meier, 2010).

Diğer bir çalışmada ise, yine bir doymamış yağ asidi olan oleik asit, poliüretan sentezi için polimerleştirilmiştir. Bu sentezde, oleik asit, UV ışığı kullanılarak, 2-merkaptolanol ile radikal eklenme reaksiyonu ile modifiye edilmiştir. Elde edilen monomer polikondenzasyon ile polimerleştirilmiştir. Elde edilen polimerlerin, ticari olarak kullanılan poliollere alternatif olarak üretilmesi gerçekleştirmiştir (Desroches vd., 2011).

Yukarıda bahsedilen örnekler, yağ asitlerinin malzeme alanında kullanımına dair örneklerdir. Yağ asitleri, içerisinde bulunan uzun alkil karbon zinciri ve karboksilik asit gruplarından dolayı amfililik özellik göstermektedir. Endositoz vesikülünde bulunan pH değişiminde, yağ asitlerinin karboksilik gruplarının protone olması ve uzun alkil zincirlerinin yarattığı hidrofobik etkileşimlerin membran bozucu özellik göstererek, yağ asidi polimerlerinin sitoplazmada dağılması öngörülmektedir. Wolfrum'un çalışmasında, hücre içi gen susturma tedavisine yönelik kullanılan siRNA moleküllerinin, etkin bir biçimde taşınımı için lipofilik konjugatlar sentezlenmiştir. Kolesterol bazlı siRNA taşınımına alternatif olarak, oleik, docosanik, miristoleik, lithokolik-oleik, palmitik ve laurat yağları kullanılarak farklı hidrofobik zincir uzunlukları içeren konjugatlar hazırlanmıştır. Bu çalışmada, kolesterol içeren konjugatın en etkili siRNA taşıyıcı ajan olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, diğer farklı zincir gruplarına sahip yağlarında etkili bir hücre içi siRNA taşıyıcı olduğu bulunmuştur (Wolfrum vd., 2007).

Tiyol-ene eklenme kimyası kullanılarak, farklı tiyoeter grupları içeren yağların kullanılmasıyla, biyomimetik katyonik ilaç taşıyıcı ajanlar sentezlenmiştir. C6 ve C16 arasında değişen tiyoether yağ, 2 farklı alkin grubu içeren karboksilik asit bağlayıcı ve 7 farklı katyonik amin içeren gruplarla birlikte 100 yeni molekül içeren bir kütüphane oluşturulmuştur. Sentezler, fosfolipitlerin gliserol çekirdeğini taklit eden bir yapıya benzemesi göz önüne alınarak tasarlanmıştır. Yapılan hücre içi deneyler sonucunda, 11 karbon zincirine sahip undekanoik asitin en etkili transfeksiyon etkisine sahip olduğu bulunmuştur (Li, vd., 2012).

Nükleik asitlerin taşınımı için yağ ve polimer yapıların birlikte kullanıldığı bir sistem geliştirilmiştir. Bu sistemde, polietileniminin, oleik ve stearik yağ asitleriyle modifiye edilmesiyle, hücre içi siRNA taşıyıcı ajanlar sentezlenmiştir. Yağ asitleriyle kullanılan polietilenimin, tek başına kullanılan polietilenimine kıyasla hücre içi taşınım için %90 daha etkili olduğu bulunmuştur (Alshamsan, vd., 2008).

Yaşayan bir polimerizasyon tekniği olan RAFT polimerizasyonu ile 2-metakriloliletilfosforilkolin yağı kullanılarak bir homopolimer elde edilmiştir. Tiyoester kapalı gruba sahip olan polimerler makro RAFT ajanı olarak kullanılmış ve n-bütil metakrilat monomeri kullanılarak diblok kopolimerler sentezlenmiştir. Elde edilen polimerlerin miselik yapıda olması sebebiyle, suda az çözünür olduğu bilinen paklitakselin bu misellere yüklenmesiyle, bu kanser ilacının suda çözünür olarak kullanılabilmesine olanak sağlanmıştır (Yusa vd., 2005).

2.3 Kolesterol Polimerleri

Projede bir diğer hedefimiz, nötr bir lipit olan kolesterolün sadece endozom veya lizozom membranıyla etkileşmesini sağlamak için metakrilik asit ile iyi-tanımlanmış kolesterol metakrilat-metakrilik asit kopolimerlerini (P(MAA-CMA)) hazırlamak ve hücre-içi ilaç salım uygulamaları amacıyla hücre membranlarıyla etkileşimlerini incelemektir. Bununla birlikte proje sürecinde P(MAA-CMA) kopolimerleri ile alınan sonuçlar dikkate alınarak ayrıca katyonik karaktere sahip kolesterol içeren polimerler de sentezlenmiştir. Bunun için grubumuzun daha önce sentezlemiş olduğu etilaminetilamin metakrilat (AEAEMA) ile kolesterol metakrilat (CMA) RAFT tekniği aracılığıyla kopolimerleştirilmiştir.

İlaç taşıyıcı sistemlerde kolesterol hücre membranını geçebilme yeteneğine sahip olması nedeniyle genel olarak kullanılmıştır (Sevimli vd., 2012). siRNA taşınımı için sentezlenen lifofilik siRNA konjugatları arasında apoB mRNA seviyesini en çok baskılayabilen kolesterol konjugatının olduğu gözlemlenmiştir (Wolfrum vd., 2007). Farklı hidrofobik zincir uzunluklarına sahip olan bu konjugatlardan kolesterol konjugatı ayrıca plazma apoB ve serum kolesterol seviyesini azaltabilen en etkili konjugattır. Ayrıca dokosanil konjugatı da kolesterole

benzer etkiler göstermiştir. Stearoil ve lithokoleik-oleoil konjugatları kolesterol ve dokosanil konjugatlarından daha az etkiye sahiptir. Bunun yanında, kolesterol vücutta amfifilik fosfolipitler içeren lipoproteinler tarafından taşınırlar. Bu lipoproteinler sayesinde sirkülasyonda kolesterolün çözünürlüğü sağlanmaktadır. HDL lipoproteini kolesterolü perifer dokulardan başka dokulara endositoz ve endositoz olmaksızın taşımaktadır. LDL lipoproteini ise kolesterolü hücreler arası taşımaktadır. Hepatositler LDL-kolesterolünü LDL reseptör-endositozunun apolipoprotein B100 etkileşimi aracılığıyla alır. Endositoz sonrası serbest kolesterol lizozom enzimleri tarafından salgılanır ve LDL reseptörleri aracılığıyla hücre yüzeyine tekrar taşınırlar. Bu çalışmada HDL tarafından taşınan kolesterol-siRNA konjugatlarının, serbest kolesterol-siRNA konjugatlarından in vivo apoB protein ekspresyonunu susturmada yaklaşık 15 kat kadar daha etkili olduğu gözlemlenmiştir (Wolfrum vd., 2007).

Kolesterol kullanılarak yapılan diğer bir çalışmada ise, pH'ya duyarlı, üronik asit konjuge edilmiş pullulan ve kolesterol esaslı nanoparçacıklar sentezlenmiştir. Elde edilen nanoparçacıklar, kansere karşı ajan olarak kullanılan doksuribisin ile kullanıldığında MCF7 meme kanseri hücreleri üstünde yüksek toksisite göstermiştir (Wang vd., 2014).

Hücre içi ilaç salım uygulamalarında viral vektörlere alternatif olarak sentetik amfifilik yapıda polikasyonlar ve polianyonlar kullanılmaktadırlar. Fonksiyonel grup olarak asidik gruplar içeren polianyonlar örneğin poli(akrilik asit) ya da poli(metakrilik asit) içermektedirler. Bu tür anyonik polimerler asidik grupların yanı sıra asidik ortamda membran-bozucu etkiyi artırabilmek için hidrofobik gruplar içerecek şekilde tasarlanırlar. pH-duyarlı poliasitler düşük pH'da protonlanmış asit gruplarına sahiplerken; yüksek pH'lara çıktıkça protonlarını salmaya başlarlar (Almeida vd., 2012). Fonksiyonel asit grupların pKa değerlerini geçen pH değerlerinde iyonik itme gerçekleşir ve uzun zincir konformasyonuna sebep olur. pKa değerinden düşük pH değerlerinde ise aksine lipid membranları ve polimerler arasında hidrofobik etkileşimler sayesinde çekici kuvvetler oluşur (Tonge ve Tighe, 2001). Membran-bozucu polianyonlara örnek olarak farklı moleküler ağırlıklarda sentezlenen poli(stiren-alt-maleik anhidrat) (PSMA) alkilamid; propilamin, bütülin ve pentilamin türevleri gösterilebilir. Propilamin türevleri hemolitik aktivite göstermezken, alkil zincirindeki artış pH 5.8'de hemolitik aktivite artışına sebep olmuştur. Polimerlerin azalan hidrofobisiteyi sayesinde nötral pH değerlerinde hemolitik aktivite görülmez. Moleküler ağırlığındaki artış hemolitik aktivitenin de artmasına sebep olur (Henry vd., 2006).

Poli(etilakrilik asit) (PEAA) pH'ya bağımlı bir şekilde lipozomları parçalamıştır. Asidik koşullarda, bu polimer lipid membranlarla kuvvetli etkileşim göstermiştir. Alkil grupların artırılması ile hidrofobisitenin artırılmasının pH'ya bağlı membran bozucu davranışı nasıl etkilediğinin açıklanması için bir seri polimer sentezlenmiştir. PEAA, melittin peptidi ile eş değer etkide hemolitik aktivite göstermiştir. Nötr pH ortamında bu polimer hemolitik aktivite

göstermemektedir. Ayrıca, bir metil grubu fazlası ile daha hidrofobik olan poli(propil akrilik asit) (PPAAc), PEAAc polimerinden 15 kat daha fazla hemolitik aktivite göstermektedir (Murthy vd., 1999).

Piridil disulfid, metakrilik asit ve bütül akrilatın kopolimeri (poli(MAA-ko-BA-ko-PDSA)) pH'ya duyarlı membran bozucu özellik göstermiştir. Bu polimerler, düşük pH'larda hemoliz yaparlarken, 3T3 fibroblast ve THP-1 makrofaj hücrelerinde toksik etki göstermemişlerdir (Bulmus vd., 2003).

Polikasyonlar sahip oldukları amin grupları sayesinde nükleik asitlerle kolaylıkla elektrostatik kompleksler oluşturabildikleri için genlerin hücre içine taşınımında yaygın olarak kullanılmışlardır. Yaygın olarak bilinen polikasyonlar polietilenimin (PEI); poli(diamino)etil metakrilat (PDMAEMA); bir polisakkarit olan kitosan ve spermin-modifiye dekstran genellikle genlerin taşınımı için kullanılmışlardır.

Farklı moleküler ağırlıkta sentezlenen polietilenimin polimerleri arasında gen taşınımında en uygun moleküler ağırlıklar 5 ve 25 kDa arasındadır. Bu polimerlerde molekül ağırlık arttıkça sitotoksitenin de arttığı gözlemlenmiştir. Düşük molekül ağırlıktaki polimerler ise daha az sitotoksiste gösterirken gen taşınımında daha az etki göstermiştir. Düşük molekül ağırlıktaki polimerler daha az pozitif yük taşıdıkları için negatif yüklü DNA ile kompleks oluşturmada güçlükler yaşanmıştır (Godbey vd., 1999).

Doğal bir amin olan spermin fizyolojik pH'da pozitif yüklü amin grubuna sahiptir ve bütün ökaryotların hücre büyümesi için gereklidir. Biyouyumludur ve nükleik asitlerle kompleks oluşturma yeteneği yüksektir (Du vd., 2012). Dekstran-spermin polimerleri plazmid DNA'nın gen ekspresyonunun koşullarını belirleyebilmek için sentezlenmiştir (Abdullah vd., 2010). Dekstran-spermin konjugatları spermin içeriğine bağlı olarak transfeksiyon etkisi göstermiştir. Sperminin birincil ve ikincil amin grupları proton-sünger etkisini sağlamaktadırlar.

Grubumuzca sentezlenen bir monomer; 2-((t-bütoksikarbonil) amino) etil) amino) etil metakrilat (Boc-AEAEMA) kullanılarak yeni spermin benzeri polimerler sentezlenmiştir. Grubumuzca sentezlenmiş bu polimerin P(AEAEMA); polietileniminden daha fazla proton-sünger kapasitesine sahip ve daha az sitotoksik olduğu gözlenmiştir (Kurtulus vd., 2014). Bu umut verici sonuçlar ve projenin başlangıcında tasarlanmış olan kolesterol içeren anyonik kopolimerlerin olumsuz hücre alımı sonuçları vermesi üzerine, proje kapsamında katyonik kolesterol kopolimerleri, P(AEAEMA-CMA) üretilmiş ve hücre alımları ve hücre içi dağılımları araştırılmıştır.

2.4 Tersinir Katılma Ayrışma Zincir Transfer (RAFT) Polimerizasyonu

Projede önerilen polimerlerin fizikokimyasal özelliklerinin rasyonel tasarımı ve tam kontrolü, biyolojik özellikleri ve aktivitesini belirlemesi nedeniyle son derece önemlidir. En son bulunan yaşayan radikal polimerizasyon tekniği tersinir Katılma-Ayrışma Zincir Transfer (RAFT) polimerizasyonudur. İlk defa 1998 yılında rapor edilen RAFT polimerizasyon tekniği, tiyokarboniltiyo (thiocarbonylthio, $-C(=S)S$) grubu içeren zincir transfer ajanları kullanır. Bu teknik ile istenen molekül ağırlıkta, dar molekül ağırlığı dağılımına (<1.2) sahip, fonksiyonel uç gruplu ve istenen mimaride çok çeşitli, iyi tanımlanmış polimerlerin sentezlenmesi mümkün olmuştur (Moad vd., 2009; Bulmus, 2011; Boyer vd., 2009). Ayrıca bu teknik ile sulu çözeltilerde ve oda sıcaklıklarında, herhangi bir katalizöre ihtiyaç duymadan polimerler üretilebilir. Bu özellikleri nedeniyle RAFT tekniği, biyolojik uygulamalara yönelik polimerlerin hazırlanması için en uygun teknik olarak görülmüştür ve bu projede önerilen polimerlerin sentezi için kullanılmıştır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Kimyasallar

Trietilamin (Aldrich,%99), kloroform (Aldrich,%99.5), kloroform-d (100%, 99.96 atom % D, 0.03 % (v/v) TMS, Aldrich), H-D-Arg-Pbf-Allil ester.HCl (Bachem,%98.7), H-D-Arg-Pbf-tBuO.HCl (Bachem,%98.7), L-Arjinin (98.5% Sigma), pentaflorofenil metakrilat (Santa Cruz Biotechnology), metakriloil klorür (99.3% Sigma), metanol (99.7% Sigma), sodyum klorür (Sigma Aldrich), sülfürik asit (95% Sigma) temin edildiği şekilde kullanıldı. 2,2 – Azobisisobutironitril (AIBN) (Wako Chemicals) hediye olarak temin edildi ve kullanılmadan önce metanolde iki kere rekristalize edildi. 2,2 azobis(2-metilpropionamidin).2HCl (AMPA), N,N-Dimetilasetamid (DMAc, Sigma-Aldrich, HPLC grade >99.9%, Alfa Easer HPLC grade > 99.5%), GPC mobil faz olarak kullanıldı. 10-undekenoik asit (%98, Aldrich), hexane (Aldrich,%99), toluen (Riedel de haen), metanol (Carlo elba, HPCL grade ultragradient), metakriloil klorür (Sigma), tetrahidrofuran (THF) (Sigma aldrich), dimetilformamid (DMF, Sigma Aldrich), diklorometan (DCM, Sigma Aldrich), kolesteril (Sigma Aldrich >99%), toluen (Sigma Aldrich>99.7%), 1,4-dioxane anhydrous (99.8% Sigma), 2-merkaptotanol (Aldrich) temin edildiği şekilde kullanıldı. t-BMA (Sigma Aldrich, Fluka 98%) bazik alümina kolondan geçirilerek kullanıldı. Raft ajanı (4-siyano-4-(fenilkarbonotiyoyl)pentanoik asit ve hekzandekanetiyoil (Sigma Aldrich) temin edildiği şekilde kullanıldı. 4-siyano-4-(etiltiyokarboniltiyoyl) sulfanil pentanoik asit (ECT) RAFT ajanı olarak sentezlendi ve kullanıldı. 4, 4'-Azobis (4-siyanovalerik asit) ($\geq 75\%$)(Sigma Aldrich) (ACVA) başlatıcı olarak kullanıldı. Silika jel (gözenek büyüklüğü 60 Å, 70-230 mesh) Fluka'dan temin edildi. Asetik asit, sodyum asetat, sitrik asit, mono ve dibazik fosfat tuzları Merck firmasından temin edildi. Polietilen glikol metil eter metakrilat (Mn 475, Sigma) kullanılmadan önce bazik alüminyum oksit kolondan geçirilerek kullanıldı. Metakrilik asit (MAA, Sigma) inhibitörü uzaklaştırıldıktan sonra kullanıldı. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), L-glutamine, tyripsin ve FBS (Foetal Bovine Serum) Gibco'dan temin edildi. RPMI-1640 Biological Industries'den temin edilmiştir. Oregon Green® maleimide ve DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol Dilaktat) floresan boya ları Invitrogen-Molecular Probes'dan temin edilmiştir. PBS (fosfat tampon çözeltisi, pH 7.1, 0.1 mM) mono ve dibazik tuzlar ve sodyum klorür kullanılarak hazırlandı. Thiazoly Blue Tetrazolium Blue (MTT) Sigma- Aldrich firmasından alındı. Fare fibroblast hücre hattı (NIH 3T3) ve akciğer kanseri epitel hücre hattı (A549), İYTE-Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Araştırma ve Uygulama Merkezi tarafından sağlanmıştır.

3.2 Kullanılan Enstrümental Karakterizasyon Metodları

Sentezlenen polimerlerin aşağıdaki cihaz ve metodlar kullanılarak karakterizasyonları yapılmıştır.

3.2.1 Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Analizi ile Kimyasal Yapı Analizi

Sentezlenen polimer ve monomer yapıları, polimerlerin moleküler ağırlıkları ve saflıklarının analizinde proton nükleer manyetik rezonans ($^1\text{H-NMR}$) spektroskopisi kullanılmıştır. Ayrıca arjininin pentaflorofenil ester ile reaksiyonlarının verimi $^{19}\text{F-NMR}$ spektroskopisi ile analiz edilmiştir. Örnekler, deutere çözügen içinde (CDCl_3 , DMSO-d_6 veya D_2O) çözülmüş ve Varian VNMRJ 400 cihazı kullanılarak analiz edilmiştir. ACD/SpecManager yazılımı kullanılarak elde edilen sonuçlar analiz edilmiştir.

3.2.2 Jel Geçirgenlik Kromatografisi Yöntemi ile Moleküler Ağırlık Analizi

Jel geçirgenlik kromatografisi sentezlenen polimerlerin molekül ağırlıkları ve molekül ağırlık dağılımlarını analiz etmek üzere kullanılmıştır. Bu analizler için Shimadzu marka RID-10A kırılma indisi detektörü kullanılmıştır. Shimadzu jel geçirgenlik kromatografisi cihazı SIL-10AD otomatik enjektör, PSS Gram 30 A^0 ve 100 A^0 (10 μm , 8x300 mm) kolonları ve koruyucu kolon içermektedir.

Bu analizler için polimer örnekleri 2 mg/ml konsantrasyonda N,N-dimetilasetamid (DMAc) çözügeni içinde hazırlanmış ve 0.45 μm filtreler kullanılarak filtre edilmiştir. %0.05 LiBr (1 mg/ml) içeren DMAc mobil faz olarak kullanılmıştır.

Kolesterol polimerlerinin analizinde Boğaziçi Üniversitesinde bulunan, mobil faz olarak THF kullanan GPC Viscotek GPCmax VE-2001 cihazı kullanılmıştır..

3.2.3 Dinamik Işık Saçılımı Yöntemi ve UV-Görünür Spektroskopisi ile Hidrodinamik Boyutlar ve pH-Duyarlı Davranışın İncelenmesi

Sentezlenen polimerlerin, hidrodinamik çapları farklı pH'larda hazırlanan tampon çözeltilerde dinamik ışık saçılımı tekniği ile ölçülmüştür. Dinamik ışık saçılımı ölçümleri Malvern ZetaSizer Nano ZS (Işık kaynağı He-Ne lazer 633 nm, Max 5mW, güç 100 V) cihazı ile tek kullanımlık polistren küvetlerde, oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

Polimerlerin pH duyarlı davranışları ve floresan boya ile etiketlenme dereceleri Thermo Scientific Evolution 201 UV-görünür spektrofotometre ile kuartz küvetler kullanılarak analiz edilmişlerdir.

3.2.4 Atomik Kuvvet Mikroskobu ile Moleküllerin Morfoloji ve Konformasyon Analizi

Arjinin ve yağ asidi polimerlerinin morfolojileri ve konformasyonlarının analizi atomik kuvvet mikroskobu (AFM) aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Polimerlerin morfolojilerini belirlemek için, 10^{-9} M konsantrasyonda hazırlanan polimer örnekleri 15 dakika sonike edilmiştir. Ardından 20 µl solüsyon mika yüzey üzerine damlatılmış ve liyofilizasyon yöntemi ile su uzaklaştırılmıştır. Örneklerin faz-kontrast ve topografik mikroskop görüntüleri Nanosurf Instrument Taramalı Prob Mikroskobu kullanılarak hafifçe dokunma modunda (tapping mode) elde edilmiştir.

3.2.5 Yüzey Plazmon Rezonans Analizi

Polimerlerin membran aktiviteleri değişen pH tampon çözeltilerinde, yüzey plazmon rezonans kullanılarak belirlenmiştir. Bu yöntemde, altın slaytlar üzerinde hekzandekantiyol molekülleri, kendi kendine organizasyonu ile tek tabaka olarak kaplanmıştır. Literatürde yer aldığı üzere, hücre membranının iki temel bileşeninden olan fosfatidilkolin ile kolesterol (kolesterol:fosfatidilkolin mol oranı= 0.42) içeren kloroform çözeltisi buharlaştırılarak ince film tabakası oluşturulur. Elde edilen film, uygun pH'daki tampon çözeltisi ile hidrate edilir ve vorteks/sonikasyon ile unilamellar vesiküler lipozomlar oluşturulur.

SPR kullanılarak altın yüzey üzerinden oluşturulan lipid çift-tabakası ile polimerlerin etkileşimi incelenmiştir. Bu deneyler kısaca aşağıda özetlenmiştir. Öncelikle (kolesterol/fosfatidilkolin mol oranı= 0.42-lisozom benzeri membran öncelikle hazırlanmıştır. Küçük unilamellar vesiküller (small unilamellar vesicles) literatürde rapor edilmiş yöntemler ile hazırlanmıştır (Morrissey, 2001). Lipozomlar, SPR'a 20 µL/dk akış hızı ile, 6.5 dk boyunca yüzeyler doygunluğa ulaşıncaya kadar enjekte edilmiştir. 20 dk boyunca akış durdurulmuştur. Bu süre zarfında lipozomlar yüzeye bağlanarak lipid çift-tabakası oluşturmuşlardır. Çok kereler pH 5.0 veya pH 7.4 tampon çözeltisiyle yüzeyler yıkanmış ve stabil hale getirilmişlerdir. Polimer çözeltileri 0.1 mM konsantrasyonda ve istenilen pH'daki tampon çözeltide hazırlanıp, 20 µL/dk akış hızı ile SPR hücrelerine 6.5 dk boyunca enjekte edilmiştir. Polimer, yüzey bağlanmaları SPR kaymalarından takip edilmiştir. Bu çalışmada Nanodev şirketinin SPR sıvı algılama sistemi kullanılarak deneyler gerçekleştirilmiştir.

3.2.6 Akış Sitometresi ve Floresans Mikroskobu

Polimerlerin hücre alımını ve hücre içi lokalizasyonu belirleme deneylerinde sırasıyla İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü (İYTE) Biyomühendislik ve Biyoteknoloji Araştırma Merkezi'nde bulunan BD FACSCantoTM akış sitometresi ve İYTE Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde bulunan Olympus IX81 floresan mikroskobu kullanılmıştır.

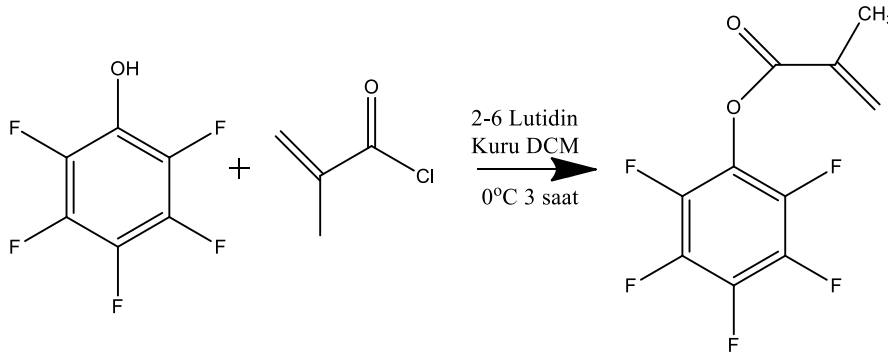
3.3 Polimerlerin Sentezi ve Karakterizasyonları

Bu proje kapsamında sentezlenen arjinin, yağ asidi ve kolesterol polimerlerinin sentez yöntemleri ve karakterizasyon teknikleri aşağıda verilmiştir.

3.3.1 Arjinin Polimerlerinin Sentezi

Pentaflorofenil Metakrilat Sentezi

Pentaflorofenol (5.4 g, 29.3 mmol) ve 3.5 ml 2.6-lutidin (3.5 ml, 30.0 mmol) kuru diklorometanda (50 ml) azot altında çözüldükten sonra buz banyosundaki karışıma metakrilil klorür (2.6 ml, 30 mmol) damla damla eklendi. Reaksiyona gece boyunca oda sıcaklığında devam edildi. Oluşan lutidin-hidrojen klorür tuzu filtre edilip filtrat 3 defa su (30ml) ile yıkandı. Toplanan organik faz magnezyum sülfatla kurutuldu. Karışımın içerisinde bulunan çözücü diklorometan vakumda uçurulup, reaksiyon karışımı ¹⁹F NMR ile analiz edildi. Daha sonra karışım vakum altında distile edildi. Distilasyon sonrası elde edilen ürün (Şekil 3.1), saf pentaflorofenil metakrilat (PFMA) ¹H NMR ile karakterize edildi.

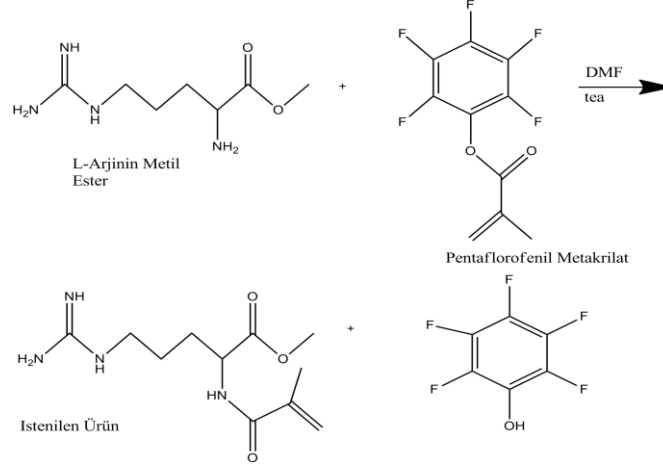


Şekil 3.1. Pentaflorofenolden pentaflorofenil metakrilat (PFMA) sentezi şeması.

Arjinin Metil Ester Metakrilamid (AMME) Monomerinin Hazırlanması

Arjinin metil ester hazırlanmış ve pentaflorofenil metakrilat ile reaksiyona sokularak L-arjinin metil ester metakrilat (AMME) monomeri hazırlanmıştır. Kısaca, L-arjinin metanol içinde süspansiyonu elde edildikten sonra içerisinde 10 dakika boyunca sodyum klorür ve %96'lık sülfirik asit reaksiyonu sonucu oluşan hidroklorik asit gazı cam pipet yardımı ile geçirildi. Sonrasında 15 dakika 100°C yağ banyosunda ısıtıldıktan sonra çözücü uçurulup prosedür baştan alınarak tekrarlandı. Çözücü tekrar uçurulduktan sonra ürüne (metanol içinde) dietiler eklenip oda sıcaklığında 5 saat bekletildi. Ardından kristalleştirmek amacıyla bir gece 4°C'de bekletildi. Son olarak ürün soğuk eter ile yıkandı ve ¹H NMR ile analiz edildi. Hazırlanan arjinin metil ester (AME, 400 mg, 1.53 mmol) ve PFMA (275 µl, 1.53 mmol), trietilamin (TEA)

(534 µl, 3.83 mmol) varlığında DMF içinde (3.60 mL) gece boyunca, oda sıcaklığında reaksiyona sokuldu (Şekil 3.2). Reaksiyon sonrası, oluşan arjinin metil ester metakrilamid, (AMME) dietileter/su ile ekstrakte edilip vakum altında kurutulduktan sonra ¹H NMR ve MALDI-ToF spektrometreleriyle analiz edildi. Reaksiyon sonucu oluşan tuz süzöldükten sonra çözgen uçurulup ürün ¹H NMR ile analiz edildi.



Şekil 3.2. L- Arjinin Metil Ester (AME) ile Pentaflorofenil Metakrilat (PFMA) reaksiyonunun şematik gösterimi.

Arjinin Metil Ester Metakrilamid (AMME) Monomerinin Serbest Radikal Polimerizasyonu

Polimerizasyon denemelerinde ACVA serbest radikal başlatıcısı kullanılmıştır. Bu polimerizasyonlarda çözgen olarak sodyum asetat-asetik asit tamponu (pH 5.2)/metanol (65:35 v:v) karışımı kullanılmıştır. Kısaca, tampon içinde çözülmüş arjinin metakrilat metil ester monomeri ile metanol içinde çözülmüş başlatıcı olarak kullanılan ACVA karıştırılmıştır. Sonuçta oluşan çözeltideki monomer konsantrasyonu 0.2 M, monomer/başlatıcı mol oranı 200/1'dir. Karışımdaki oksijen daha sonra 20 dakika azot ile süpürülmüştür. Bu süre sonunda polimerizasyon karışımı azot atmosferi altında 70°C'ye ısıtılmış yağ banyosu içinde değişen sürelerle (4, 8, 10 ssat) reaksiyona sokulmuştur. Polimerizasyon sonrası, polimerizasyon çözeltileri 5 gün boyunca 1000 MWCO'luk membranlarla, tampon çözelti (pH 5.2) kullanılarak diyaliz edilip saflaştırılmıştır. Diyaliz sonrası çözeltiler liyofilizatörde kurutulularak örnekler ¹H NMR ile D₂O çözgeninde analiz edilmiştir.

Bir sonraki set deneyde AMME'nin polimerizasyon denemelerine daha düşük sıcaklıklarda serbest radikal oluşturabilen bir azo başlatıcısı olan 2,2 azobis(2-metilpropionamidin).2HCl (AMPA)'nın varlığında devam edilmiştir. Kısaca, AMME (0.2 M), hacimce %35 metanol içeren asetat tampon çözeltisinde (pH 5.2) çözülüp, suda çözülmüş başlatıcı AMPA eklendikten sonra (AMME: AMPA mol oranı= 200/1) çözelti azot ile süpürülmüş ve 50°C'ye ayarlanmış yağ banyosunda değişen sürelerde (2, 4 ve 7 saat)

polimerizasyonlar gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyon çözeltileri ve diyaliz sonrası toplanan saflaştırılmış polimer örnekleri ¹H NMR ile analiz edilmiştir.

AMME Monomerinin RAFT Polimerizasyon Çalışmaları

AMME'nin RAFT polimerizasyonu çalışmalarına başlamadan önce, kullanılacak zincir transfer RAFT ajanının planlanan polimerizasyon ortamındaki aminolizinin kinetiği UV-VIS spektrofotometre ile belirlendi. Bu amaçla 4-siyano-4-(fenilkarbonotiyoiltilyo) pentanoik asit veya siyano-4- (etiltiyokarboniltiyoiltilyo) sulfanil pentanoik asit (ECT) (0.0055 M, 3.4 mg) ve AMME monomeri (0.2 M, 138 mg), sodyum asetat tampon çözeltisi (pH 5.2)/metanol (65:35 v:v) karışımı içinde çözülüp 70°C veya 50°C'de bulunan yağ banyosunda inkübe edilmiştir. 0, 2, 4, 5, 6 ve 7. saatlerde çözülden örnekler alınmış ve gerekli seyreltme sonrası UV-VIS spektrometrede 302.6 nm'de absorbans değerleri kaydedilmiştir.

Aminoliz deneylerinin sonuçları ışığında, AMME'nin RAFT polimerizasyonu 4-siyano-4-(etiltiyokarboniltiyoiltilyo) sulfanil pentanoik asit (ECT) kullanılarak gerçekleştirilmesine karar verilmiştir. Bu RAFT ajanının yapılan aminoliz deneyleri sonucunda 70°C'de oldukça yavaş aminoliz olduğu gözlemlenmiştir. AMME'nin RAFT polimerizasyonu; başlatıcı olarak 2,2 azobis(2-metilpropionamidin).2HCl (AMPA) veya 2,2-azobisisobutironitril (AIBN) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyon için AMME (6.49x10⁻³mol), ECT (5.90x10⁻⁵ mol) ve başlatıcı (1.19x10⁻⁵ mol) 2.5 mL çözügen içerisinde çözülmüştür. Reaksiyon ortamı buz banyosu içinde 20 dakika azot ile süpürüldükten sonra 50°C'de Tablo 3.1'de gösterilen koşullarda polimerizasyona bırakılmıştır. Polimerler, polimerizasyon karışımının 1 kDa membran ile diyaliz edilmesi sonucu saflaştırılmıştır. Diyaliz için kullanılan sistem metanol ve asidik su karışımıdır. Bu karışımın metanol içeriği dereceli bir şekilde azaltılmıştır. Dört gün sonunda saf suya karşılık diyaliz yapılmış ve örnekler ¹H-NMR ve GPC ile analiz edilmiştir.

Tablo 3.1. AMME'nin RAFT polimerizasyonu koşulları

[AMME] (mol/l)	[AMME] _o / [ECT] _o / [Başlatıcı] _o	Başlatıcı	Çözügen	Süre (saat)
0.4	250/3/1	AIBN	DMAc	2
0.4	250/3/1	AIBN	DMAc	4
0.4	250/3/1	AIBN	DMAc	6
0.4	250/3/1	AIBN	DMAc	8
0.4	250/3/1	AIBN	DMAc	12
0.2	545/5.5/1	AMPA	Metanol- Asetat Tamponu	22

Poli(pentaflorofenil metakrilat) Polimerlerinin Sentezi

Arjinin monomerinden polimerlerin üretimi çalışmalarına paralel olarak pentaflorofenilmetakrilat (PFMA) aktif ester polimerinin RAFT tekniği ile sentezi ve korumasız arjinin ile modifiye edilmesi üstüne çalışmalar da gerçekleştirilmiştir. PFMA'nın tüm RAFT polimerizasyonu çalışmaları Tablo 3.2'de özetlenmiştir. Deneylerde kısaca, PFMA (2M, 3.9×10^{-4} mol), RAFT ajanı (4-siyano-4-(fenilkarbonotiyolitiyo)pentanoik asit) ve AIBN dioksanda (200 μ L) çözülmüştür. Polimerizasyon ortamı azot ile süpürüldükten sonra 90°C veya 80°C'deki yağ banyosunda bırakılmıştır. Monomer/RAFT ajanı/Başlatıcı ([M]/[R]/[I]) mol oranları Tablo 3.2'de belirtildiği şekilde değiştirilmiştir. Polimerizasyon karışımı ¹H NMR ile analiz edilerek monomer dönüşümü değerleri elde edilmiştir. Polimerizasyon karışımının hekzan içerisinde 3 defa saflaştırılmasından elde edilen polimerler (PPFMA) GPC ve ¹H NMR ile karakterize edilmiştir.

Tablo 3.2. PFMA RAFT polimerizasyonu şartları. [M]= 2M, çözügen= dioksan, RAFT ajanı (R)= 4-siyano-4-(fenilkarbonotiyolitiyo)pentanoik asit, başlatıcı (I)= AIBN

[M]/[R]/[I]	Polimerizasyon süresi (dak)	Polimerizasyon Sıcaklığı (°C)
50/1/0.25	15	90
50/1/0.25	30	90
50/1/0.25	60	90
50/1/0.25	120	90
25/1/0.25	7	90
25/1/0.25	15	90
25/1/0.25	22	90
25/1/0.25	30	90
100/1/0.25	7	90
100/1/0.25	15	90
100/1/0.25	22	90
100/1/0.25	30	90
100/1/0.125	7	80
100/1/0.125	15	80
100/1/0.125	22	80
100/1/0.125	30	80

25/1/0.25	7	80
25/1/0.25	15	80
25/1/0.25	22	80
25/1/0.25	30	80
25/1/0.125	7	80
25/1/0.125	15	80
25/1/0.125	22	80
25/1/0.125	30	80

Fonksiyonel Polimer PPFMA'dan Arjinin Polimerlerinin Türetilmesi

Polimerizasyon çalışmalarının ardından elde edilen PPFMA polimerleri ile arjinin metil ester (AME) reaksiyona sokularak arjinin içeren polimerlerin sentezi denenmiştir. Bu reaksiyonlarda kısaca, PPFMA (0.16 mmol pentafluorofenil grupları) kuru DMF içinde (3 mL) çözülmüştür. Ayrıca AME (72 mg; 0.32 mmol) ve baz olarak kuru TEA (258 mg; 2.56 mmol) kuru DMF (3.2 mL) içinde çözülmüştür. Son olarak polimerli çözelti, AME çözeltisinin içerisine şırınga ile yavaşça eklenmiştir. 50°C'de 16 saat boyunca reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonrası, karışım dietileter (DEE) içinde çöktürülmüştür. Çöken kısım uzaklaştırıldıktan sonra toplanan dietileter fazı su ile ekstrakte edilmiştir. Tüm fazlar toplanmış, kurutulduktan sonra GPC ve ¹H NMR ile D₂O, DMSO-d₆ veya CDCl₃ içinde analiz edilmiştir.

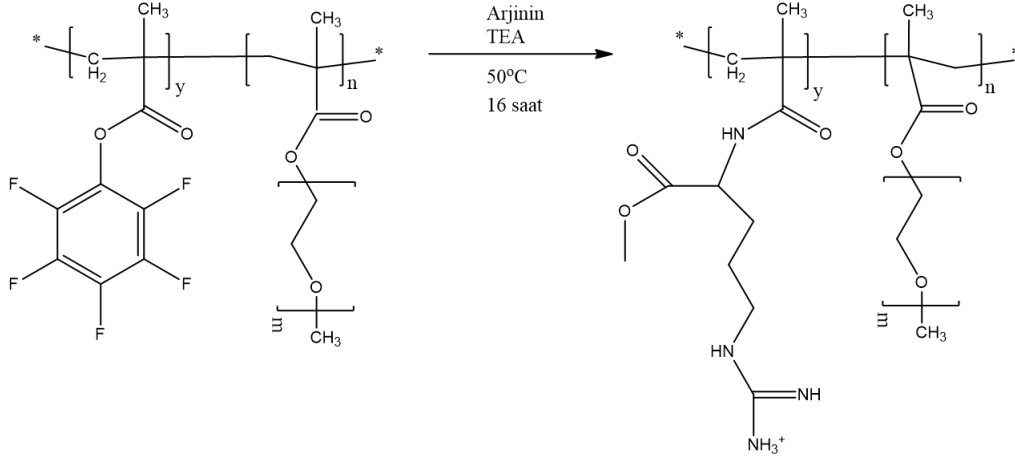
PPFMA-*b*-PPEGMA Kopolimerlerinin RAFT Polimerizasyonu ile Sentezi

Makro-zincir transfer ajanı olarak PPFMA (0.0035mmol), AIBN ve PEGMA monomeri (0.5M), dioksanda (700 µL) çözülüp 65°C'de 2, 4 ve 8 saat süre ile polimerizasyona bırakılmıştır. Başlangıç monomer/RAFT/başlatıcı mol oranları 100/1/0.1 şeklindedir. Polimerizasyon sonrası, polimerizasyon karışımı üç defa heksanda çöktürülerek saflaştırılmıştır. ¹H-NMR ve GPC ile örnekler analiz edilmiştir.

PPFMA-*b*-PPEGMA Blok Kopolimerlerinin Arjinin ile Modifikasyonu

Önceki raporda verildiği şekilde üretilen PPFMA-*b*-PPEGMA kopolimerleri, Şekil 3.3'de görüldüğü gibi arjinin ile modifiye edilmiştir. PPFMA-*b*-PPEGMA kopolimeri (M_n: 14000, PDI: 1.60, PFMA birimleri 0.14 mmol) 264 µL DMF içerisinde çözüldü. Arjinin metil ester (AME) (0.5 M) ve trietilamin (TEA), DMF'de çözülerek stok çözelti hazırlandı. Pentafluorofenil gruplarının

bir katı olacak şekilde AME stok çözeltisinden kopolimer çözeltisine eklendi. 16 saat boyunca 50°C'de reaksiyon gerçekleştirildi. Reaksiyon sonrası karışım, verim hesabı için ¹⁹F-NMR ile analiz edildi. Daha sonra reaksiyon ortamı su içerisinde çözülerek dietileter ile ekstraksiyon yapıldı. Ekstraksiyon sonrası örnek ¹H-NMR ile analiz edilmiştir.



Şekil 3.3. PPFMA-*b*-PPEGMA kopolimerlerinin arjinin ile reaksiyon şeması.

PPFMA-*b*-PPEGMA Blok Kopolimerlerinin Oktaarjinin (R8) ile Modifikasyonu

Projenin bu kısmında oktaarjinin peptidi içeren polimerlerin sentezi amacıyla PPFMA-*b*-PPEGMA kopolimerlerin oktaarjinin (R8) ile reaksiyonu, AME ile gerçekleştirilen reaksiyon koşullarının aynısı kullanılarak denenmiştir. Reaksiyon sonrası yapılan analizlerde oktaarjinine ait guanidin gruplarının hepsini protonlayabilmek adına Polimer/R8/TEA oranları 1/1/10 olarak denenmiştir. Malzeme miktarları ¹⁹F-NMR görüntüleme için yeterli olmadığından reaksiyon diyaliz ile saflaştırma sonrası ¹H-NMR ile analiz edilmiştir.

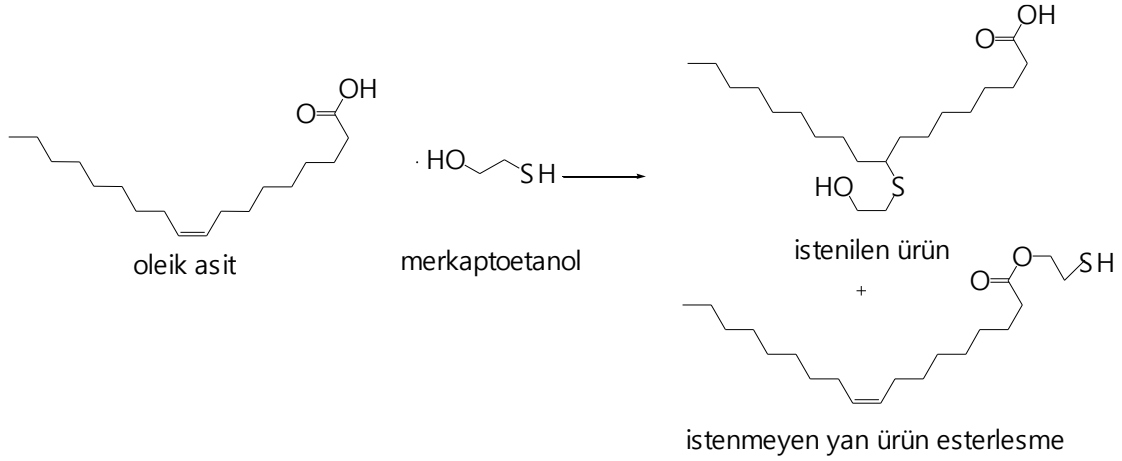
Arjinin Polimerlerinin Karakterizasyonu

Polimerler Kısım 3.2'de bahsedilen karakterizasyon tekniklerinden NMR, GPC, AFM, SPR ve DLS metodları ile karakterize edilmişlerdir. Elde edilen arjinin polimerlerinin hidrodinamik çap ölçümleri, dinamik ışık saçılımı yöntemiyle belirlenmiştir. Polimerin dinamik ışık saçılması (DLS) ölçümleri, Malvern ZetasizerNano ZS Particle Analyzer cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. 2 farklı tampon çözelti içinde (pH 5 ve pH 7.4), polimerlerin konsantrasyonları 10⁻⁵ mM olacak şekilde polimerler çözüldü. DLS ölçümleri 3 kez tekrarlandı.

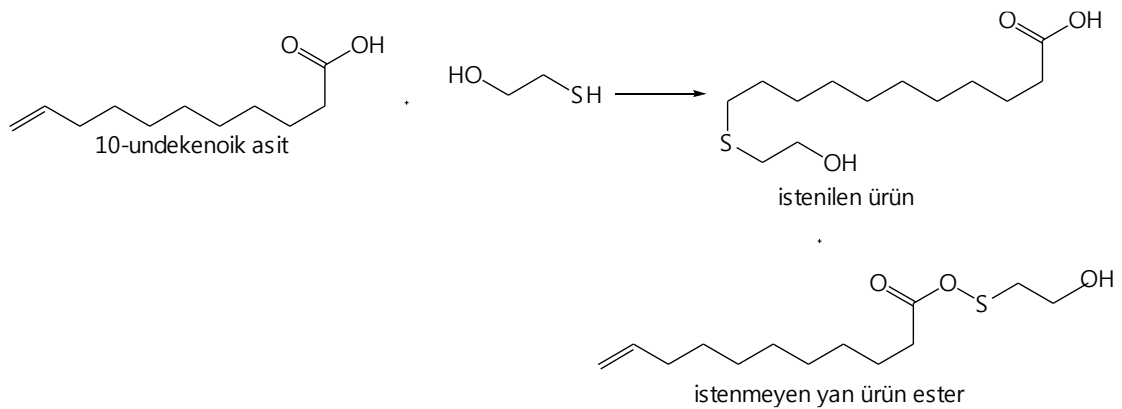
3.3.2 Yağ Asidi Polimerlerinin Sentezi

Yağ Asidi Monomerinin Sentezi ve Serbest Radikal Polimerleşmesi

Bu kısımdaki ilk çalışmalara literatürdeki yayınlar takip edilerek oleik asit ile başlanmıştır (Desroches vd., 2011). Oleik asidin merkapto grubu içeren bir monomer ile katılma reaksiyonu sonucu istenen yağ asidi monomerinin sentezlenmesi amaçlanmıştır. Monomerler kullanılmadan önce oleik asit ile model bir merkapto bileşiği (merkaptoetanol) kullanılarak katılma reaksiyonu için uygun şartların belirlenmesine karar verilmiştir. Bununla birlikte ön denemeler sonucunda literatürde de belirtildiği gibi oleik asit gibi iç karbonlarında "en" grubu içeren yağ asitlerinin düşük reaktivitesi gözlenmiş ve oleik asit ile beraber 10-undekenoik asit de denenmiştir (Şekil 3.4 ve 3.5) (Turunc vd., 2010). Model merkapto bileşiği ile Michael katılma, termal ve radikalik katılma reaksiyonları denenmiştir.



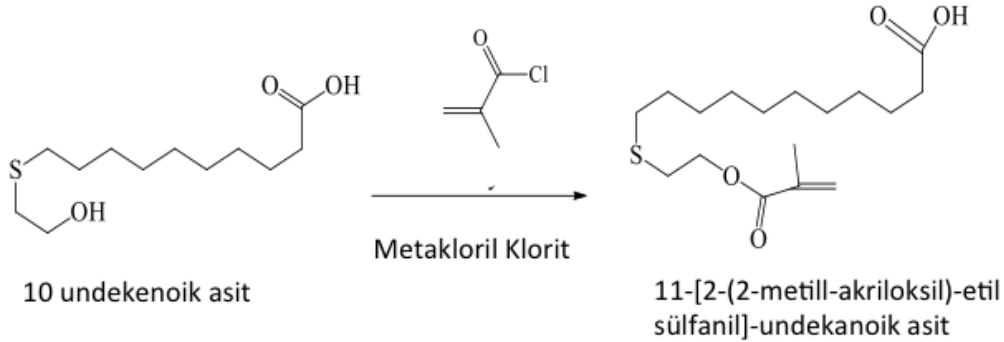
Şekil 3.4. Oleik asitin, model bileşik merkaptoetanol (ME) ile katılma reaksiyonu genel şeması.



Şekil 3.5. 10-undekenoik asitin, merkaptoetanol (ME) ile katılma reaksiyonu.

Monomer sentezine yönelik yapılan ön denemeler sonucunda 10-undekenoik asitin termal eklenme reaksiyonunun verimli olduğu belirlenmiştir. Bu doğrultuda, 10-undekenoik asit kullanılarak termal katılma reaksiyonu esas alınarak 10-undekenoik asit esaslı metakrilat monomeri sentezine ve polimerleştirilmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Kısaca ilk adımda, merkaptotanol (ME) ve 10-undekenoik asit (UDA) (1M) tolüen içinde çözülmüş ve 75°C’de 48 saat reaksiyona sokulmuştur. Reaksiyonda UDA:ME mol oranı 1:3’tür. Reaksiyon sonrası, reaksiyon karışımı diklorometan (DCM)-su ile 3 kere ekstrakte edildikten sonra organik faz kurutulup elde edilen ürün ¹H NMR ile analiz edilmiştir. Bu ürün daha sonra metakrilatlama reaksiyonunda kullanılmıştır.

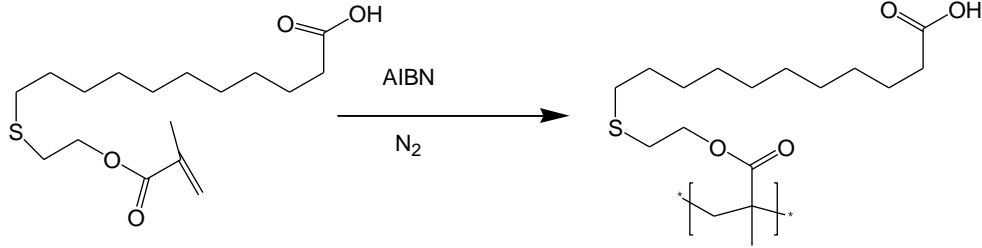
İkinci adımda, termal katılma reaksiyonuyla elde edilen, merkaptotanol eklenmiş 10-undekenoik asit, metakrilatlama reaksiyonu ile polimerleşme için uygun bir metakrilat monomeri haline getirilmiştir. Kullanılan sentez yöntemi literatürde sıkça kullanılan bir yöntemdir. Kısaca; ilk basamakta elde edilen ürün (1 br); tetrahidrofuranda çözüldükten sonra, trietilamin (3 br) ile karıştırıldı. Buz banyosuna konulan bu çözeltiye metakriloil klorür (3 br) damla damla eklendi. Bu adımdan sonra reaksiyon çözeltisine istenmeyen polimerizasyonu engellemek için inhibitör BHT eklendi. Reaksiyon karışımı ertesi gün filtre edildikten sonra kurutulmuş ve DCM-su ile ekstrakte edildi. Organik faz kurutulduktan sonra ¹H NMR ile analiz edilmiştir. Reaksiyon şeması Şekil 3.6’da gösterilmektedir. Elde edilen reaksiyon ürünü, değişen oranlarda etil asetat/hekzan karışımları kullanılarak silika jel kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonra toplanan son ürün ¹H NMR ile analiz edilmiştir.



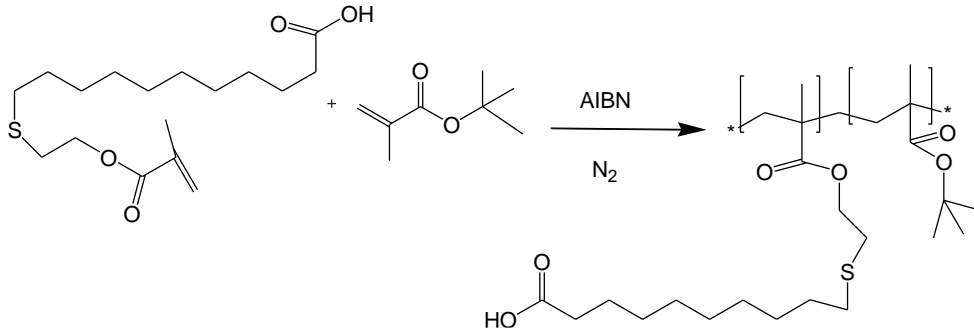
Şekil 3.6. 11-[2-(2-metill-akriloksil)-etil sülfanil]-undekanoik asit (UDAMA) sentezi şematik gösterimi.

İstenilen 10-undekanoik asit metakrilat (UDAMA) monomerinin sentezinden sonra bu monomerin polimerleşmesi öncelikle serbest radikal polimerizasyon yöntemiyle denenmiştir. Kısaca, monomer (UDAMA), radikal başlatıcı olarak AIBN, değişen oranlarda asetonitril veya THF içinde çözülmüş ve cam bir vialde aktarılmıştır. Vialin kapağı iyice kapatıldıktan sonra buz

banyosu içindeki çözelti azot ile süpürülmüştür. Daha sonra polimerizasyon viali 65°C'ye ısıtılmış yağ banyosuna konularak polimerizasyon 24 saat boyunca sürdürülmüştür. Homopolimerizasyonlara ek olarak, yağ asidi monomeri, bir komonomer ile (t-bütilmetakrilat, t-BMA) ile de kopolimerleştirilmiştir. Tablo 3.3'de gerçekleştirilmiş olan polimerizasyon reaksiyonlarının şartları verilmiştir. Ayrıca Şekil 3.7 ve 3.8 ile gerçekleştirilen polimerizasyonlar şematik olarak gösterilmiştir. Polimerizasyon sonrası, çözgen uzaklaştırıldıktan sonra polimerizasyon karışımları ¹H NMR ile analiz edilmiştir.



Şekil 3.7. 11-[2-(2-metil-akriloksil)-etil sülfanil]-undekanoik asitin (UDAMA) homopolimerizasyon şeması.



Şekil 3.8. 11-[2-(2-metil-akriloksil)-etil sülfanil]-undekanoik asitin (UDAMA) ile tert-bütilmetakrilat (t-BMA) ile kopolimerizasyon şeması.

Tablo 3.3. Yağ asidi monomeriyle gerçekleştirilen serbest radikal polimerizasyonları

Monomer	Ko-monomer	[Toplam Monomer] (M)	Monomer:AIBN mol oranı	Çözücü	Polimerizasyon süresi (saat)
UDAMA	-	0.5	124:1	asetonitril	18
UDAMA	-	0.5	3:1	asetonitril	18
UDAMA	-	1.0	20:1	THF	24
UDAMA	-	1.0	200:1	THF	24
UDAMA	t-BMA	3.0 (UDAMA:t-BMA= 1:1)	20:1	THF	24

Yağ Asidi Polimerlerinin RAFT Polimerizasyonları

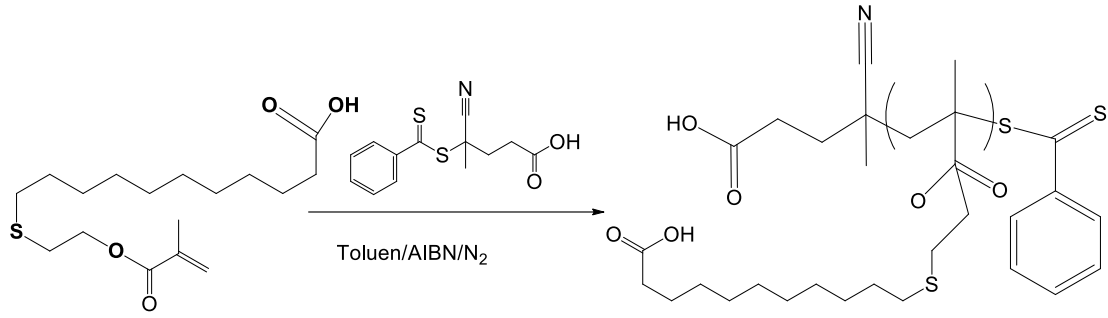
Yağ asidi monomerinin serbest radikal polimerizasyonu ile yapılan çalışmaları sonrasında, RAFT tekniği ile homopolimerizasyonu ve kopolimerizasyonu denenmiştir. Tablo 3.4 ve 3.5’de homopolimerizasyon ve kopolimerizasyon için kullanılan şartlar belirtilmiştir. Polimerizasyonlar şematik olarak Şekil 3.9, 3.10 ve 3.11’de gösterilmiştir. Kısaca; UDAMA (ve komonomer) belirtilen oranlarda ve belirtilen çözügen içinde çözüldü. Polimerizasyon başlatıcısı olarak AIBN (veya ACVA) ve RAFT ajanı olarak 4-siyano-4- (fenilkarbonotiyoiltiy) pentanoik asit çözeltiye eklendi. Karışımların ağızları septum yardımıyla kapatıldıktan sonra buz banyosu içinde çözeltilerdeki oksijen, azot gazı yardımıyla uzaklaştırıldı. Takiben, çözeltiler belirtilen süreler boyunca 65 (homopolimerizasyon) veya 70 °C (kopolimerizasyonda)’deki yağ banyosu içinde tutuldu. Polimerizasyon süresi sonunda, karışımlar soğutulduktan sonra havaya maruz bırakılarak polimerizasyonlar durduruldu. Polimerizasyon sonrası, çözügen uzaklaştırıldıktan sonra polimerizasyon karışımları ¹H NMR ve GPC ile analiz edilmiştir.

Tablo 3.4. UDAMA monomerinin RAFT homopolimerizasyon şartları, T= 65 °C

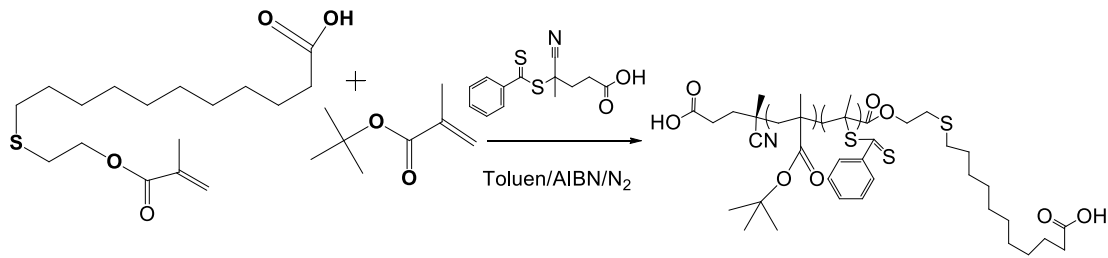
Polimerizasyon süresi (saat)	[Monomer] (M)	[M]/[RAFT]/[AIBN]	Çözücü
2	2	200/4/1	Toluen
4	2	200/4/1	Toluen
8	2	200/4/1	Toluen
24	2	200/4/1	Toluen
2	4	200/4/1	THF
4	4	200/4/1	THF
8	4	200/4/1	THF
24	4	200/4/1	THF
2	4	400/4/1	Asetonitril
4	4	400/4/1	Asetonitril
8	4	400/4/1	Asetonitril
24	4	400/4/1	Asetonitril
1	3	200/4/1	Toluen
2	3	200/4/1	Toluen
3	3	200/4/1	Toluen
4	3	200/4/1	Toluen
6	3	200/4/1	Toluen

Tablo 3.5. UDAMA'nın RAFT kopolimerizasyonları

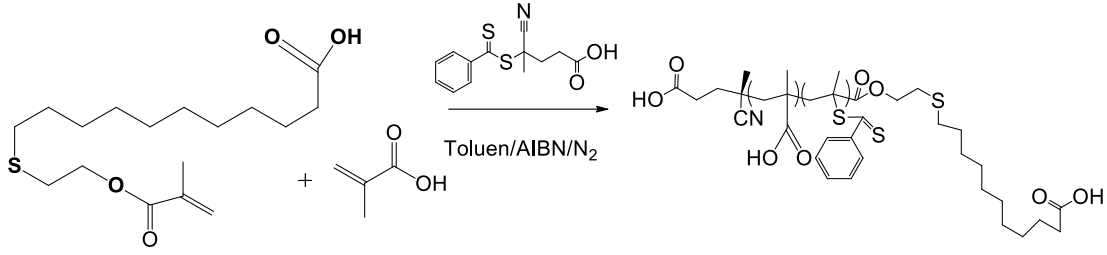
Ko-monomer	Başlatıcı	Sıcaklık (°C)	[Toplam Monomer] (M)	[UDAMA]/[komonomer]/[RAFT]/[Başlatıcı]	Çözücü	Polimerizasyon Süresi (Saat)
t-BMA	AIBN	70	3	240/160/4/1	Asetonitril	2, 4, 6, 8, 10
MAA	ACVA	70	1	40/160/4/1	Metanol	2, 4, 6, 8, 10
MAA	ACVA	70	1	100/100/4/1	Asetonitril	2, 4, 6, 8, 10



Şekil 3.9. Poli(11-[2-(2-metill-akriloksil)-etil sülfanil]-undekanoik (p(UDAMA))'nın RAFT polimerizasyonu ile sentezi.



Şekil 3.10. Poli(UDAMA-ko-t-bütülmetakrilat) (p(UDAMA-ko-t-BMA)) kopolimerlerinin RAFT polimerizasyonu ile sentezi.



Şekil 3.11. Poli(UDAMA-ko-metakrilik asit) (p(UDAMA-ko-MAA)) kopolimerlerinin RAFT polimerizasyonu ile sentezi.

Yağ Asidi Kopolimerlerinin pH Duyarlı Davranışlarının Karakterizasyonu

P(MAA-ko-UDAMA) kopolimerlerinin sulu çözeltilerinin pH'ya duyarlı faz ayrılma davranışları UV-vis spektrofotometre ile belirlendi. Bu amaçla, 2 farklı pH değerinde (pH 5.0 ve 7.4), fosfat ve sitrat tampon çözeltileri hazırlandı. Elde edilen tampon çözeltilerin, iyonik dengesi ise 0.1 M sodyum klorür kullanılarak eşitlendi. Polimerizasyon beslemesinde molce %20 (Mn: 5870 g/mol, PDI: 1.21; kopolimer UDAMA içeriği molce %23) ve %50 (Mn: 10900 and PDI: 1.25; kopolimer UDAMA içeriği molce %65) UDAMA içeriklerine sahip olan kopolimerler, değişen pH'larda tampon çözeltiler içinde çözüldü. Polimerlerin konsantrasyonları 4 mg/ml olarak ayarlandı. Bu polimerler çözeltilerinin absorpsanları UV-Vis spektrometresi ile 500 nm dalga boyunda ölçüldü. Tüm ölçümler 3 kez tekrarlandı. Polimerin dinamik ışık saçılması (DLS) ölçümleri, Malvern ZetasizerNano ZS Particle Analyzer cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. 2 farklı tampon çözelti içinde (pH 5.5 ve pH 7.4), polimerlerin konsantrasyonları 4 mg/ml olacak şekilde polimerler çözüldü. DLS ölçümleri 3 kez tekrarlandı.

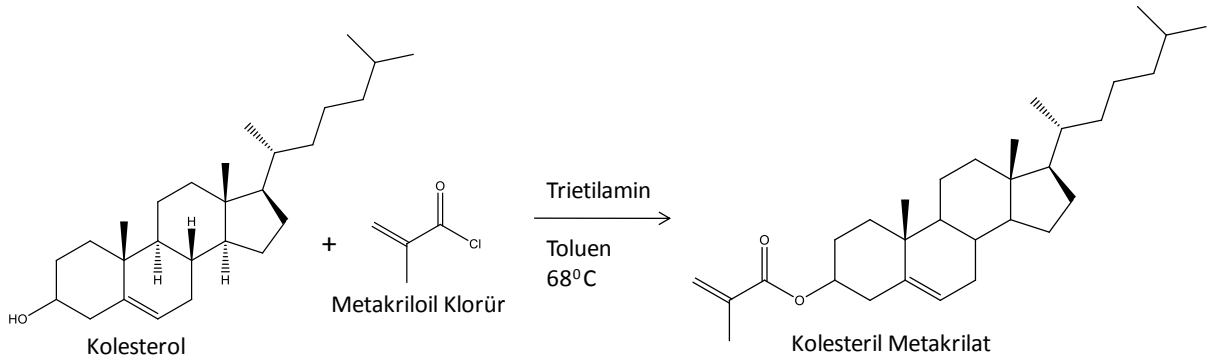
3.3.3 Kolesterol Polimerlerinin Sentezi

Kolesterilmetakrilat Monomerinin ve Polimerinin Sentezi

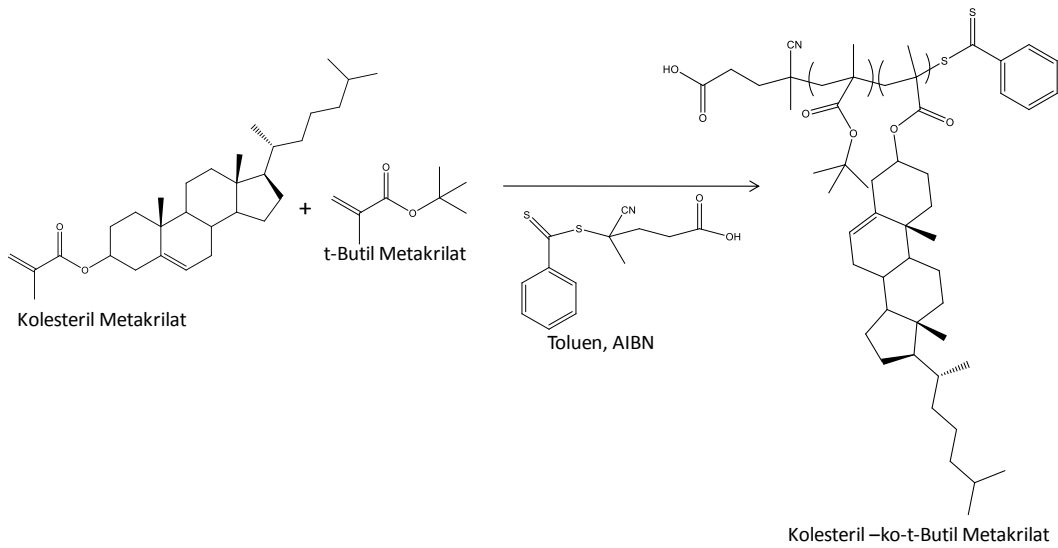
Kolesterol (0.02 mol), tolüen (12 ml) ve trietilamin (3.75 ml) karışımı içinde çözüldü ve 60°C 1 saat süre ile geri döngü ile ısıtıldı. Metakriloil klorür (0.6 mol) damla damla çözeltiliye eklendi. 12 saat boyunca geri döngüye devam edildi. Daha sonra reaksiyon karışımı oda sıcaklığına getirildi ve metanol de çözülmüş hidroklorik asit (1.6 N) içinde çöktürülerek filtre edildi. Ürün kurutulduktan sonra ¹H NMR ile analiz edildi. Reaksiyon şeması Şekil 3.12'de gösterilmiştir.

Monomer sentezinden sonra, proje önerisinde verildiği şekilde kolesteril metakrilat monomerinin t-butilmetakrilat ile değişen molekül ağırlıklarında kopolimerleri hazırlanmasına yönelik deneyler gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyonlar şematik olarak Şekil 3.13'de

gösterilmiştir. Kısaca; kolesteril metakrilat ve tert-butil metakrilat Tablo 3.6’da verilen oranlarda toluen içinde çözüldü. Polimerizasyon başlatıcısı olarak AIBN ve RAFT ajanı olarak 4-siyano-4- (fenilkarbonotiyoyl)pentanoik asit çözeltiliye eklendi. Karışımların ağızları septum yardımıyla kapatıldıktan sonra buz banyosu içinde çözeltilerdeki oksijen, azot gazı yardımıyla yarım saat boyunca uzaklaştırıldı. Takiben, çözeltiler belirtilen süreler boyunca 68°C’deki yağ banyosu içinde tutuldu. Polimerizasyon süresi sonunda, karışımlar soğutulduktan sonra havaya maruz bırakılarak polimerizasyonlar durduruldu. Çözgen uzaklaştırıldıktan sonra polimerizasyon karışımları, monomer dönüşümünün belirlenmesi için ¹H-NMR analizine tabi tutuldu. Daha sonra polimerizasyon karışımları metanol içerisinde çöktürülerek dönüşmemiş monomer ve diğer ajanlar uzaklaştırıldıktan sonra polimerler GPC ile analiz edildi.



Şekil 3.12. Kolesteril metakrilatın oluşma reaksiyonunun şematik gösterimi.



Şekil 3.13. Poli(kolesteril metakrilat-ko-t-bütül metakrilat) (p(CMA-ko-t-BMA)) kopolimerlerinin sentezi.

Tablo 3.6. Kolesteril metakrilat (CMA) ve t-bütül metakrilatın (t-BMA) kopolimerizasyon şartları.
T= 68 °C. Çözgen: Toluen

Toplam Monomer Konsantrasyonu	[t-BMA]/[CMA]/[RAFT]/[AIBN] Mol Oranı	Polimerizasyon süresi (saat)
4.2 M	490/10/1/0.2	2,4,6,8,18
5.9 M	200/4/1/0.2	2,4,6,8,18

Gerçekleştirilen %2 kolesteril metakrilat (CMA) içeren CMA ve t-bütül metakrilat (t-BMA) kopolimerizasyonunun kinetik çalışmasından elde edilen sonuçlara göre 490/10/1/0.2 mol oranında [t-BMA]/[CMA]/[RAFT]/[AIBN] içeren kinetik polimerizasyonla arzu edilen yüksek moleküler ağırlıklara çıkıldığı gözlemlenmiştir. Bu kinetik sonuçlar gözönüne alınarak değişen molekül ağırlıklarında %2 CMA içeren kopolimerler fizikokimyasal karakterizasyonlarda kullanılmak üzere daha büyük ölçekte üretilmiştir. Ayrıca 4%, %8 ve %10 CMA içeriğine sahip kopolimerlerin kinetik çalışmaları tamamlanmış ve değişen molekül ağırlıklarında kopolimerler üretilmiştir. Böylece değişen kompozisyonlarda ve molekül ağırlıklarında CMA-ko-t-BMA kopolimerleri üretilmiştir. Kopolimerizasyon şartları Tablo 3.6'da verilmiştir.

Daha sonra bu üretilen kopolimerlerin asit hidroliz ile tert-butül grupları uzaklaştırılarak CMA-metakrilik asit kopolimerleri (p(CMA-ko-MAA)) üretilmiştir. Hidroliz deneyleri kısaca şöyle gerçekleştirilmiştir: Kolesteril metakrilat-ko-t-butül metakrilat polimerleri (0.46 M t-bütül ester) diklorometanda çözüldü. Çözelti hızlıca karıştırılırken t-bütül esterinin molce 50 kat fazlası kadar trifloroasetik asit eklendi. Reaksiyona 32 saat devam edildi. Reaksiyon sonrası, TFA azot gazı ile süpürülerek uçuruldu. Reaksiyon karışımı 10 mM NaOH çözeltisinde çözüldükten sonra diyaliz tüplerine (MWCO:3500 veya MWCO:1000) transfer edildi. Son ürün P(MAA-ko-CMA), ultra saf suya karşı 3 gün süren diyalizden sonra liyofilizatörden beyaz toz olarak elde edildi.

Kolesterilmetakrilat Polimerinin Karakterizasyonu

Değişen molekül ağırlıklarda ve kompozisyonlarda P(MAA-ko-CMA)'ların DLS analizi için polimerler 0.125 mM olacak şekilde pH 5.5 ve pH 7.4'deki 150 mM fosfat tampon çözeltisi içinde hazırlanmışlardır. Malvern NanoZS Particle Analyzer cihazı ile DLS ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Ölçümler 3 kez tekrarlanmıştır. Polimerlerin bulanıklık testi deneyi şu şekilde yapılmıştır: Öncelikle, iki farklı pH değerinde (5.5 ve 7.4 arası) fosfat tampon çözeltileri hazırlandı. 2% CMA içeren polimerler son derişimleri 0.125 mM olacak şekilde tampon çözeltileri içinde çözüldüler. Bu polimerlerin farklı tampon çözeltiler içindeki absorbanları UV-Vis spektrometresi ile 400 nm dalga boyunda ölçüldü.

Katyonik Kolesterol Kopolimerlerinin Sentezi

2-(Amino etil) amino etil metakrilat (AEAEMA), literatürde rapor edilen prosedür takip edilerek sentezlenmiştir (Kurtulus vd., 2014). Kopolimerizasyonlar yukarıda verilen prosedür takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Kopolimerizasyon şartları Tablo 3.7’de verilmektedir. Polimerler diklorometan içinde çözülüp, hekzan içerisinde çöktürülerek saflaştırılmışlardır. Ürünler, GPC ve ¹H-NMR ile analiz edilmiştir.

Tablo 3.7. Kolesterol metakrilat (CMA) ve AEAEMA kopolimerizasyon şartları. T=68°C; Çözgen: Toluen

[(AEAEMA)]/[CMA]/[RAFT]/[AIBN] Mol Oranı	Monomer Konsantrasyonu (M)	Polimerizasyon Süresi (Saat)
90/10/4/1	1.5	2,4,6,8
100/100/4/1	1.5	2,4,6,8
75/50/5/1	1.5	2,4,6,8
225/25/5/1	1.5	12
450/50/5/1	1.5	12
900/100/5/1	1.5	12
200/50/5/1	1.5	12
400/100/5/1	1.5	12
800/200/5/1	1.5	12

Kopolimerlerin sentezinden sonra Boc- gruplarının ve RAFT gruplarının uzaklaştırılması (aminoliz) literatürde rapor edilen prosedür takip edilerek gerçekleştirilmiştir (Kurtulus vd., 2014).

3.4 Sentezlenen Polimerlerin Hücre Kültürü ve Hemoliz Deneyleri

3.4.1 Hücre Kültürü

Proje boyunca sentezlenen tüm polimerlerin hücre kültürü deneyleri aşağıdaki prosedürler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürü deneylerinde insan bronş epitelyum sağlıklı hücre hattı (BEAS-2B), insan akciğer adenokarsinom epitelyum hücre hattı (A549) ve fare fibroblast hücre hattı (NIH 3T3) kullanılmıştır. BEAS-2B ve NIH 3T3 hücre hatları, %4.5

glukoz, % 10 sığır serumu ve %1 pen-strep içeren DMEM ortamında, A549 hücre hattı ise RPMI-1640 hücre kültür ortamına ek olarak % 10 sığır serumu ve %1 pen-strep kullanılarak, 37 °C ve %5'lik CO₂ atmosferinde büyütülmüşlerdir. Hücreler yüzeyi % 90 oranında kapladıklarında EDTA içeren tripsin enzimi kullanılarak yüzeyden kaldırılmışlar ve belirlenen oranlarda yeni yüzeylere aktarılmıştır. Hemoliz deneyinde ise kırmızı kan hücreleri kullanılmıştır.

3.4.2 Sentezlenen Polimerlerin RAFT Uç Grubunun Kırılması

Polimerlerin toksisite deneylerinin yapılması amacıyla öncelikle, polimerlerin uç grubunu oluşturan ve olası toksik özellik gösterebilen, tiyokarboniltiyo uç grubu, literatürde yaygın olarak uygulanan aminoliz reaksiyonu ile kaldırılmıştır. Kısaca, polimerler (4 mM) metanol içinde çözülerek, uç grubunun kapatılması için uygun monomer birimi eklenerek (12 mM) ile hekzilamin (40 mM) ve trietilamin (40 mM) varlığında 3 saat azot altında tutularak reaksiyona sokulmuştur. Reaksiyon tamamlandıktan sonra polimerler suya karşı yapılan diyaliz ile saflaştırılmışlardır. Polimerlerin uç grubunun kaldırılması, UV- Vis spektroskopisi yöntemi ile gözlenmiştir. Son adımda toksisite deneyleri öncesi PBS içinde değişen konsantrasyonlarda polimer çözeltileri hazırlanarak 0.45 µm filtreden geçirilerek sterilize edilmişlerdir.

3.4.3 Polimerlerin Toksisitesinin İncelenmesi

Polimerlerin hücreler üzerindeki toksik özelliklerinin belirlenebilmesi için 3-(4,5-dimetil-2-thiazol)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromid (MTT) deneyleri gerçekleştirilmiştir. MTT metodu ile hücre canlılığının belirlenmesi, mitokondriyal enzimlerinin tetrazolyum boyasını indirgemesine dayanır ve enzimlerin konsantrasyonu reaksiyon sonucu oluşan renk yoğunluğu ile doğru orantılıdır. 96-haneli mikropalakaya 10⁴ hücre/hane konsantrasyonda hücreler uygun besi ortamı içinde yerleştirilmiş ve 24 saat boyunca 37°C ve %5'lik CO₂ atmosferinde büyütülmüşlerdir. Polimerler her bir haneye belirlenen konsantrasyonları oluşturacak şekilde, fosfat tamponunun hücre kültür ortamındaki oranı %0.5 hacim/hacim değerini geçmeyecek şekilde aktarılmışlardır. Her bir hanenin son hacim değeri 200 µl olarak ayarlanmıştır ve hücreler 24 veya 72 saat boyunca 37 °C ve %5'lik CO₂ atmosferinde inkübe edilmişlerdir.

İnkübasyon sonrasında 5 mg/ml konsantrasyonda hazırlanmış MTT boyası %10 hacim/hacim oranında hücre kültür ortamına eklenmiş ve hücreler 4 saat boyunca 37°C ve %5'lik CO₂ atmosferinde inkübe edilmişlerdir. MTT boyası ile inkübasyon sonrasında mikropalakalar 1800 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmişler ve süpernatantlar uzaklaştırılarak, pelletler 100 µl DMSO ile çözülmüşlerdir. Hücre canlılığı 570 ve 690 nm dalga

boyunda, Varioskan Flash, Thermo Electron Corporation cihazı kullanılarak gerçekleştirilen spektroskopik analiz ile ölçülmüştür.

3.4.4 Polimerlerin Floresan Boya ile Etiketlenmesi

Polimerlerin hücre alımlarının ve hücre içi dağılımlarının akış sitometresi ve floresan mikroskobu ile incelenebilmesi için öncelikle uygun bir floresan etiket ile işaretlenmesi gereklidir. Floresan etiket olarak literatürde daha önce polimerlerin hücre alım deneylerinde kullanılmış, geniş bir pH aralığında (pH 3 - pH 10) kararlı floresan yapıda olan Oregon Green boyası kullanılmıştır.

p(AEAEMA-ko-CMA)) kopolimerleri dışında tüm polimerler maleimid uç grubu fonksiyonelliğine sahip olan Oregon Green boyası kullanılarak etiketlenmiştir.

Oregon Green maleimid etiketinin arjinin ve yağ asidi polimerlerine bağlanması polimerin uç grup olarak taşıdığı RAFT ajanının kırılması ile oluşan tiyol grubunun maleimid grubu ile katılma reaksiyonuna girmesi ile gerçekleştirilmiştir (Boyer, 2009a; 2009b, 2009c). p(AEAEMA-ko-CMA)) polimerleri ise Oregon Green 488 carboxylic asit süksinimidil ester *5-isomer floresan boyası kullanılarak etiketlenmiştir.

Etiketlin polimerlere bağlanma reaksiyonu için Oregon Green maleimid boyası 100 mM konsantrasyonda DMF ile çözülmüştür. Tiyol uç grup fonksiyonelliğine sahip polimerler, 1 mM konsantrasyonda fosfat tamponunda (pH: 7.1, 0.5 M) çözülmüş ve 5 dakika süre ile TCEP (10 mM) ile reaksiyona sokulmuşlardır. Polimer çözeltisine, DMF içinde çözülmüş boya solüsyonu (100 mM) karıştırma altında eklenmiştir. Reaksiyon azot altında 2 saat süre ile gerçekleştirilmiş ve bu sürenin sonunda solüsyona azot altında 10 mM TCEP eklenmiştir. Bunu takiben reaksiyona gece boyunca devam edilmiştir.

p(AEAEMA-ko-CMA)) kopolimerleri (0.0435 mol, $M_n = 15500$ Da, %10 CMA içerikli) 200 μ l DMF içinde çözünüp 1.5 mg Oregon Green 488 carboxylic acid,succinimidyl ester *5-isomer floresan boyası eklenerek 24 saat oda sıcaklığında reaksiyona tabii tutulmuştur.

p(CMA-ko-MAA)) kopolimeri ise öncelikle karboksil gruplarının %2'si tiyole dönüştürülmüştür. Kısaca, kopolimer N-hidroksisülfosükkimimid (Sulfo-NHS) ve 1-etil-3-(3 dimetilaminopropil)karbodiimid (EDC) varlığında pH 5.5 tamponu içinde sisteamin ile 3 saat boyunca reaksiyona sokulmuştur. Reaksiyon sonrası diyaliz ve liyofilizasyon ile elde edilen tiyol modifiye polimer ile eşdeğer molde Oregon Green Maleimid tris(2-karboksietil)fosfin (TCEP) varlığında azot altında 2 saat süresince reaksiyona sokulmuştur.

İnkübasyon süresinin sonunda elde edilen polimerler MWCO 3500 Da diyaliz membranı kullanılarak 5 gün boyunca diyaliz edilmiş ve sonrasında dondurularak kurutulmuştur. Polimer zincirlerinin floresan etiketlerce işaretlenme oranı 10 μ M polimer konsantrasyonunda, kuvarz küvet kullanılarak UV-Vis spektrometre (Thermo Scientific

Evolution 201 Spektrofotometre) ile 300-800 nm aralığında tarama ile belirlenmiştir. Floresan etiketin polimere bağlanma derecesi, 491 nm dalga boyundaki absorbanans değeri (A_x), polimer konsantrasyonu (C)(mg/ml), polimerin molekül ağırlığı (M_w) (g/mol), ışık yolu (L)(cm) ve sönme katsayısı ($\epsilon = 81000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kullanılarak Denklem 3.1' de gösterildiği şekilde hesaplanmıştır. Proje de yer alan polimerlerin tümünde aynı mol oranları kullanılmıştır.

$$n_{Dye/Polymer} = \frac{A_x \cdot M_w}{C \cdot \epsilon \cdot L} \quad (\text{Denklem 3.1})$$

3.4.5 Hücre Alımı Deneyleri

Floresan boya ile işaretlenmiş polimerlerin hücre hatları tarafından alımları akış sitometresi yöntemi ile belirlenmiştir. 24-haneli mikroplakaya $5 \cdot 10^4$ hücre/hane konsantrasyonda A549 hücreleri uygun besi ortamı içinde yerleştirilmiş ve 24 saat boyunca 37°C ve %5'lik CO_2 atmosferinde büyütülmüşlerdir. Polimerler ayrı ayrı her bir haneye uygun konsantrasyonlarını oluşturacak şekilde, fosfat tamponunun hücre kültür ortamındaki oranı %0.5 hacim/hacim değerini geçmeyecek şekilde aktarılmışlardır. Her bir hanenin son hacim değeri 500 μl olarak belirlenmiştir ve hücreler 1 veya 3 saat boyunca 37°C ve %5'lik CO_2 atmosferinde inkübe edilmişlerdir.

Floresan boya ile işaretlenmiş polimerlerin A549 hücreleri tarafından alımlarının enerjiye bağımlılığının belirlendiği deney setinde, hücrelerin membran aktivitelerini durdurabilmek için mikroplakalar 1 saat 4°C 'da inkübe edilmişler ve daha sonra floresan boya ile işaretlenmiş peptid ve polimerler uygun konsantrasyonlarda olacak ve fosfat tamponunun hücre kültür ortamındaki oranı %0.5 hacim/hacim değerini geçmeyecek şekilde aktarılmışlardır. Her bir hanenin son hacim değeri 500 μl olarak ayarlanmıştır. Hücreler 1 saat boyunca 4°C ve %5'lik CO_2 atmosferinde inkübe edilmişlerdir.

Floresan boya ile işaretlenmiş peptid ve polimerlerin, A549 hücreleri ve NIH/3T3 hücreleri tarafından endositoz aracılığıyla alımlarında hücre iskeletinin rolünün belirlenmesi deney setinde, hücrelerin aktin filamentlerinin ve mikrotübül aktivitelerini durdurabilmek için hücreler 1 saat 37°C 'da 20 μM nokodazol ve sitokalsin D kimyasalları ile inkübe edilmişler ve daha sonra floresan boya ile işaretlenmiş polimerler 40 veya 100 μM konsantrasyonda ve fosfat tamponunun hücre kültür ortamındaki oranı %0.5 hacim/hacim değerini geçmeyecek şekilde ayrı hanelere aktarılmışlardır. Her bir hanenin son hacim değeri 500 μl olarak ayarlanmıştır. Hücreler 1 saat boyunca 37°C ve %5'lik CO_2 atmosferde inkübe edilmişlerdir.

Her bir deney setinde inkübasyon sonrasında, hücre kültür ortamı her bir haneden uzaklaştırılmış ve hücreler fosfat tamponu ile iki kez yıkanmışlardır. Hücreler yüzeyden tripsin enzimi ile muamele sonucu ayrılmış ve serum içeren hücre kültür ortamının eklenmesi ile

toplanarak 1000 rpm ve 4°C'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmişlerdir. Supernatant atıldıktan sonra hücre pelleti 200 µl fosfat tamponunda asılı hale getirilmiştir. Oregon Green 488 katı faz lazerine ve 530/300 filtre konfigürasyonuna sahip olan BD FACSCanto™ (BD Biosciences, San Jose, USA) akış sitometrisi cihazı ile 10,000 hücre analiz edilerek, elde edilen veri Denklem 3.2'ye göre analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar polimerlerin etiket derecesi ile normalize edilmiştir. İstatiksel analiz iki yönlü t-test ile gerçekleştirilmiştir.

$$\% \text{ Hücre Alımı} = \frac{OG \text{ ortalama}_{P_3} * \text{Hücre Sayısı}_{P_3}}{OG \text{ ortalama}_{P_1} * \text{Hücre Sayısı}_{P_1}} \quad (\text{Denklem 3.2})$$

3.4.6 Hücre İçi Dağılım Deneyleri

Polimerlerin hücre içi dağılımı floresan mikroskobu (Olympus IX81) kullanılarak belirlenmiştir. Hücrelerin nükleusları mavi renkte DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol Dilaktat) floresan boyası ile işaretlenmiştir. Bu deneylerde A549 hücreleri kullanılmıştır.

4 haneli, cam yüzeyli plakaya (1.7 cm²/hane) hücrelerin daha iyi tutunması için öncelikle yüzey modifikasyonu yapılmıştır. A549 hücrelerinin yüzeylerinde integrin reseptörleri olduğundan, bu hücreler için yüzey modifikasyonu fibronektin proteini ile gerçekleştirilmiştir. Fibronektin ile yüzey modifikasyonu için 1 mg/ml konsantrasyondaki fibronektin proteini PBS ile seyreltilerek 2.5 µg/cm² konsantrasyonda cam haneli plakanın yüzeyini kaplayacak şekilde konulur. Cam yüzeyli plaka en az 45 dakika boyunca steril hava akışına bırakılır ve bu süre sonunda sıvı yüzeyden boşaltılır.

Cam yüzeylerin modifikasyonundan sonra 3.10⁴ hücre/hane konsantrasyonda A549 hücreleri uygun besi ortamı içinde yerleştirilmiş ve 24 saat boyunca 37°C ve %5 'lik CO₂ atmosferinde büyütülmüşlerdir. Floresan boya ile işaretlenmiş polimerler, hanelere 40 µM konsantrasyonda olacak ve fosfat tamponunun hücre kültür ortamındaki oranı %0.5 hacim/hacim değerini geçmeyecek şekilde aktarılmışlardır. Her bir hanenin son hacim değeri 200 µl olarak ayarlanmıştır ve hücreler 3 saat boyunca 37°C ve %5'lik CO₂ atmosferinde inkübe edilmişlerdir. Hücrelerin polimerler ile inkübasyonu sonrasında haneler steril PBS ile iki defa yıkanmışlardır. Hücreler 200 µl, %4 oranında paraformaldehit içeren fiksasyon solüsyonunda oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilerek fikse edilmişlerdir. Hücrelerin fiksasyon solüsyonu ile inkübasyonu sonrasında haneler PBS ile iki defa yıkanmışlardır. Daha sonra DAPI nükleus spesifik boyası 150 nM final konsantrasyonda olan 200 µl PBS hanelere aktarılmış ve 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında haneler steril PBS ile iki defa yıkanmışlardır. Prolong Gold floresan boya solma önleyici kimyasal hücrelerin bulunduğu yüzeye damlatılmıştır ve yüzey lamel ile kapatılmıştır.

DAPI ve Oregon Green boyaalarının sönme ve emisyon dalga boyu değerleri sırasıyla 358-461 nm ve 496-524 nm'dir. Floresan mikroskobu ile belirtilen sönme ve emisyon değerlerine uygun filtreler kullanılarak çekilen fotoğraflar, CellSense™ Olympus ve Image J programı kullanılarak birleştirilmişlerdir.

3.4.7 Hemoliz Deneyi

Değişen moleköl ağırlıklarda ve kompozisyonlarda P(MAA-ko-CMA) ve P(MAA-ko-UDAMA) polimerlerinin kırmızı kan hücre membranına etkileri hemoliz deneyleri ile test edildi. Hemoliz deneyi kısaca aşağıda verildiği gibi yapıldı: 150 mM tuzlu su çözeltisi ile yıkanan kırmızı kan hücreleri, pH 5.5 veya pH 7.4'deki 100 mM fosfat tampon çözeltisi içinde süspansiyon haline getirildi ve 10^8 hücre/200 μ l konsantrasyonda olacak şekilde seyreltildi. Hücre çözeltisinden 200 μ l, farklı konsantrasyonlarda polimer içeren pH 5.5 veya pH 7.4 fosfat tampon çözeltisinden 800 μ l karıştırılıp 1 saat 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüpler santrifüj edildi. Süpernatant çözeltileri temiz tüplere alınıp absorbanları 541 nm'de ölçüldü. Triton X-100 çözeltisi (aę. %1) pozitif kontrol ve fosfat tampon çözeltisi negatif kontrol olarak kullanıldı. Her deney 3 kez tekrarlandı.

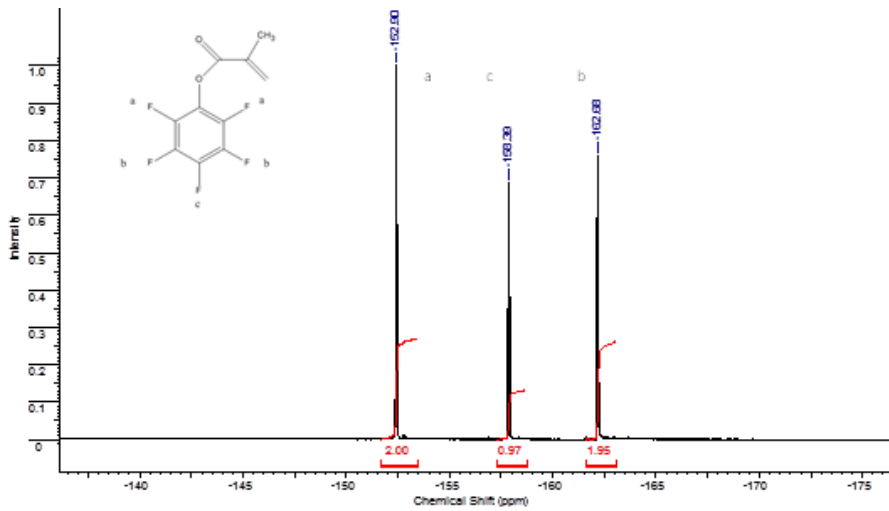
4. BULGULAR

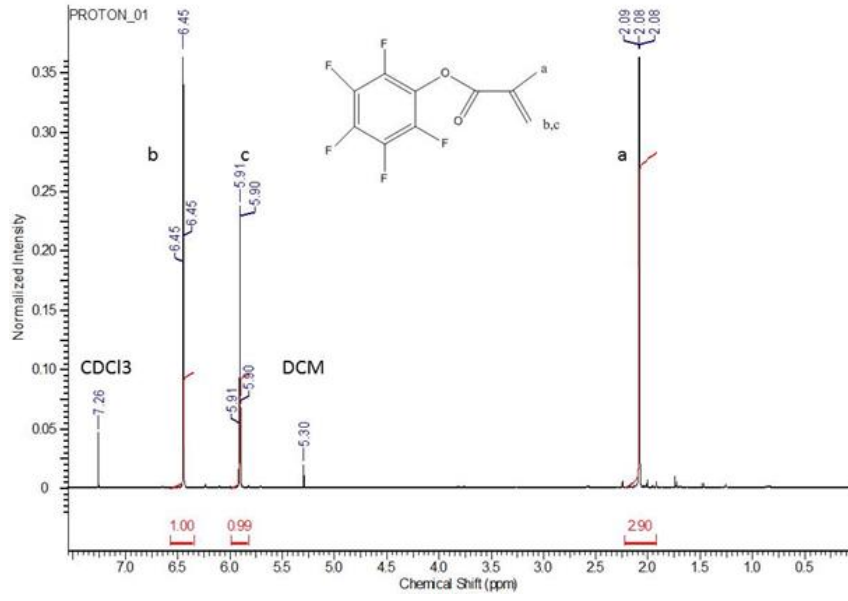
4.1 Arjinin İçeren Polimerlerin Sentezi

Ara raporlarda anlatıldığı üzere iyi tanımlanmış arjinin polimerlerinin sentezi için bir seri ön deneme yapılmıştır. Bu ön denemeler karboksilik asit ve guanidin grubu, sırasıyla alil ester ve pentametil-2,3-dihidrobzofuran-5-sülfonil (Pbf) korumalı H-arjinin(Pbf)-alil esterin doğrudan polimerleştirilmesini, H-Arg(Pbf)-2-klorotritil reçinesinin arjinin monomeri sentezinde kullanılmasını ve H-Arg(Pbf)-alil esterin metakriloil klorür ile reaksiyonuyla arjinin monomeri sentezini içermektedir. Ön denemeler sonrası birincil aminlerle spesifik olarak reaksiyona girebilen bir aktif ester olan, pentaflorofenil metakrilat (PFMA) monomerinin kullanılmasıyla arjinin içeren polimerlerin sentezlenmesi gerçekleştirilmiştir. Arjinin içeren polimerler iki ayrı yöntem ile sentezlenmiştir. Bu yöntemler; (1) arjinin metil ester metakrilat monomerinin PFMA'dan türetilerek sentezlenmesi ve RAFT tekniği ile polimerleştirilmesi ve (2) PFMA monomerinin RAFT polimerizasyonu ile aktif ester polimerlerinin sentezi ve elde edilen polimerlerin arjinin metil ester ile modifiye edilmesidir.

4.1.1 Arjinin Monomeri Sentezi

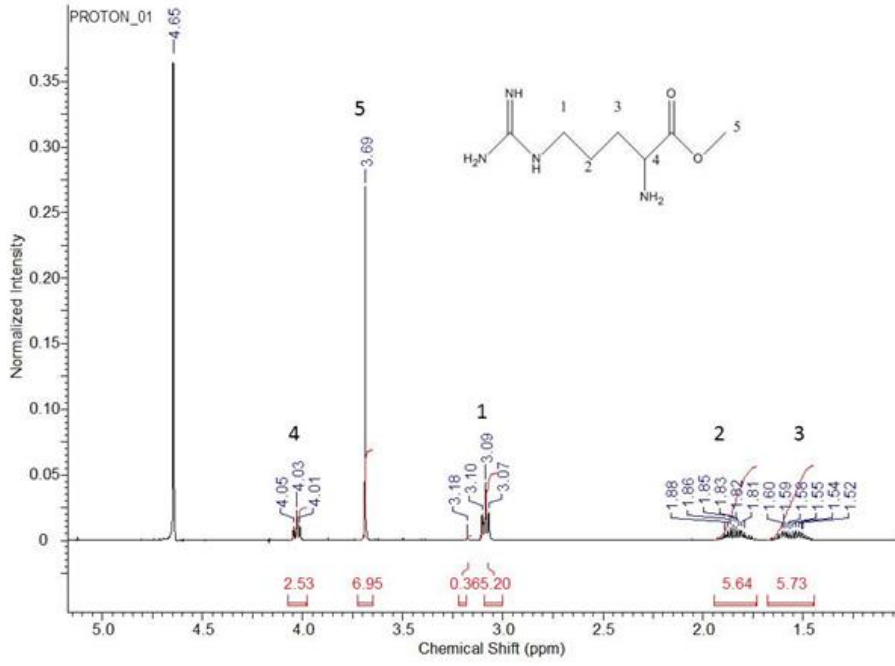
Çalışmada öncelikle PFMA monomeri sentezlenmiştir. Birincil aminlere reaktivitesi bilinen PFMA monomerinin sentezi literatürde belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir (Eberhardt vd., 2005). Vakum distilasyon sonrası elde edilen saflaştırılmış PFMA monomerinin ¹H ve ¹⁹F NMR spektrumları Şekil 4.1'de verilmektedir. Sentezde toplam verim %57'dir.



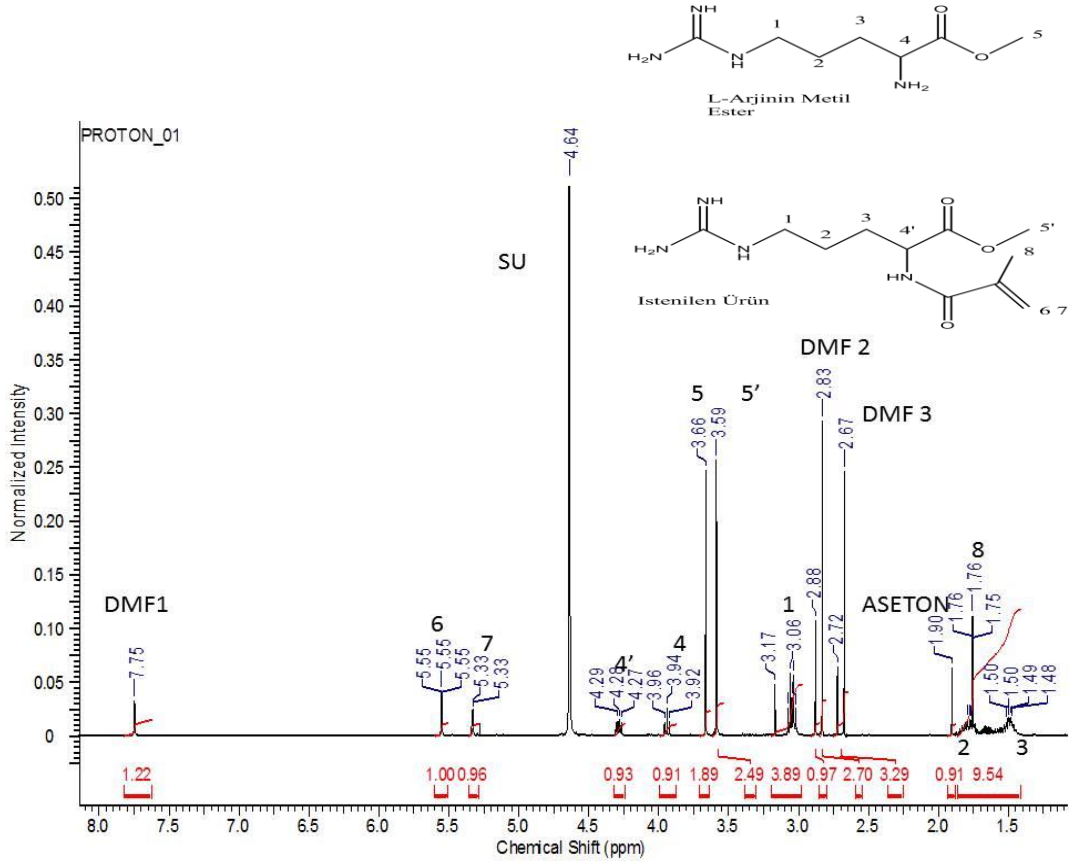


Şekil 4.1. Vakum distilasyon sonrası PFMA monomerinin ¹⁹F NMR ve ¹H ve spektrumları.

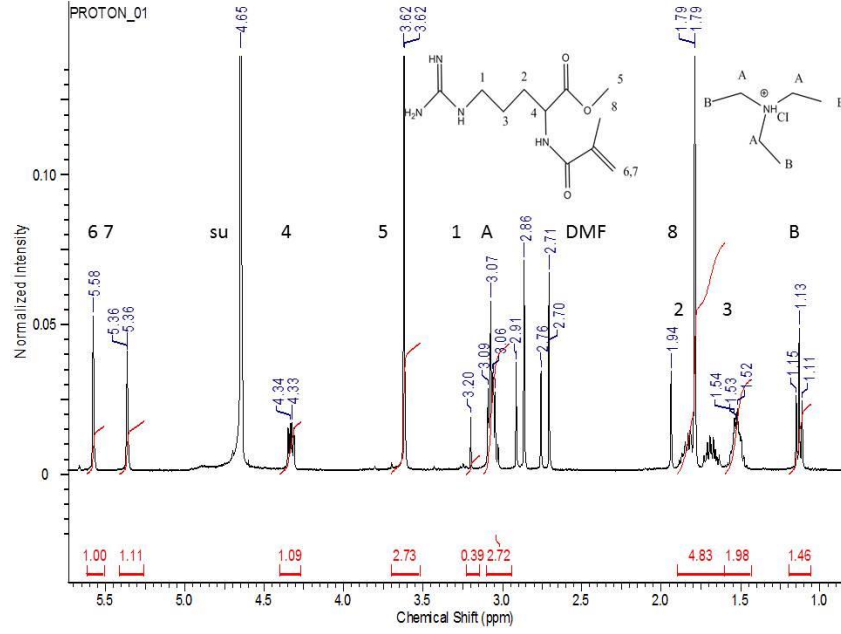
İkinci adımda, sentezlenen PFMA ile guanidin grubu koruma grubu içermeyen arjinin metil ester (AME) doğrudan reaksiyona sokulmuştur. Şekil 4.2 - 4.4'de reaksiyon öncesi AME, reaksiyon karışımı ve saflaştırma sonrası arjinin metil ester metakrilamid (AMME) monomerinin ¹H NMR spektrumları verilmektedir. Serbest AME'nin 4.07 ppm'deki -CH₂-CH(-C=O)-NH₂ kaymasının reaksiyon sonrası tamamen kaybolması ve 4.34 ppm'de -CH₂-CH(-C=O)-NH-C(=O)- protonuna spesifik kaymanın oluşması reaksiyonun 100% verimle ve seçici olarak alfa primer aminden gerçekleştiğini göstermiştir. Bu bulgu ayrıca Şekil 4.5'de verilen MALDI-ToF spektrumuyla da desteklenmiştir. Teorik molekül kütlesi 256.30 olan AMME monomerinin deneysel kütlesi 255.70 amu olarak bulunmuştur.



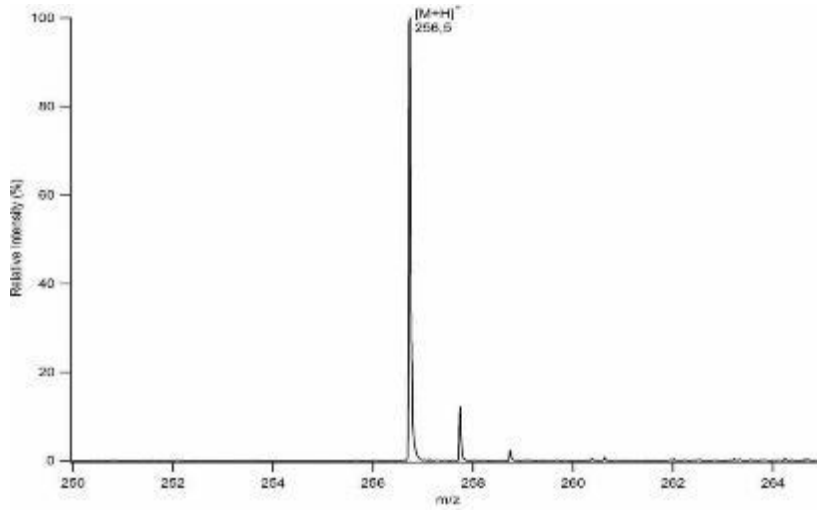
Şekil 4.2. L-Arjinin metil ester (AME)'nin ¹H NMR spektrumu.



Şekil 4.3. L-Arjinin metil ester (AME) ve PFMA'nın reaksiyonu sonrası elde edilen karışımın ¹H NMR spektrumu.



Şekil 4.4. Arjinin metil ester metakrilamid (AMME) monomerinin saflaştırma sonrası ^1H NMR spektrumu.

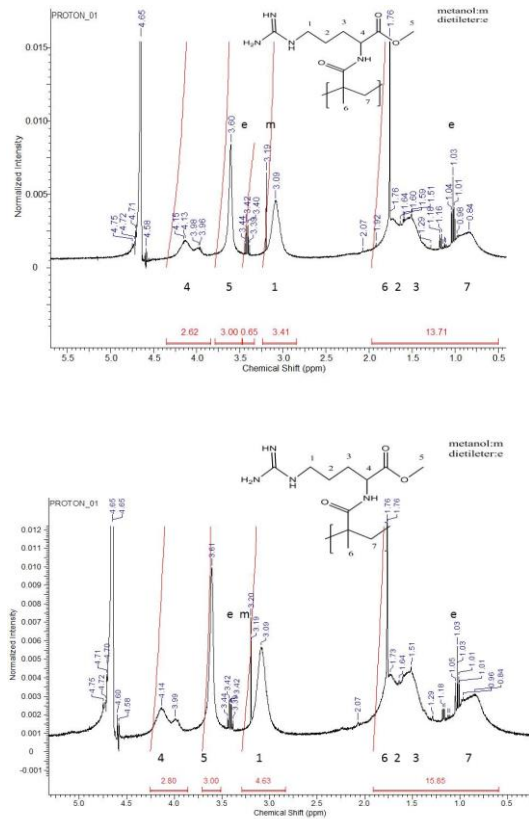


Şekil 4.5. Elde edilen AMME monomerinin MALDI-ToF spektrumu.

Sonuç olarak; arjinin metil ester metakrilamid (AMME) monomerinin sentezi literatürde olmayan yeni bir sentez yöntemi ile PFMA aktif ester monomeri ve guanidin grubu korumasız arjinin amino asitinin doğrudan reaksiyonu ile tek adımda başarıyla gerçekleştirilmiştir.

4.1.2 Arjinin Monomerinin Serbest Radikal Polimerizasyonu

Öncelikle sentezlenmiş AMME monomerinin serbest radikal polimerizasyonu denenmiştir. Arjinin monomerinin serbest radikal polimerizasyonu DMF, asetonitril ve metanol gibi polar organik çözümlerde, ACVA başlatıcısı ile beslemedeki monomer/başlatıcı mol oranları $[M]/[I]$ 50/1 ve başlangıç monomer konsantrasyonu $[M]= 0.2-0.5$ M olacak şekilde denenmiş ancak tüm polimerizasyonlar jelleşme ile sonuçlanmıştır. Daha sonra serbest radikal polimerizasyon denemeleri çözümler olarak sulu tampon çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu polimerizasyonlarda çözümler olarak sodyum asetat-asetik asit tamponu (pH 5.2):metanol (65:35 v:v) karışımı kullanılmıştır. Başlangıç monomer konsantrasyonu $[M]= 0.2$ M, $[M]/[I]$ oranı 200/1 olarak tutulmuştur. Sulu ortamdaki polimerizasyon denemelerinin ilk setinde başlatıcı olarak ACVA kullanılmıştır. ACVA'nın kullanıldığı polimerizasyonlarda sıcaklık 70°C'dir. Bu polimerizasyonlardan elde edilen polimerlerin diyalizi sonrası alınan ^1H NMR spektrumlarına örnekler Şekil 4.6'da verilmektedir. Spektrumlarda karakteristik polimer pikleri 0.5-2.0 ppm'de görülmektedir. Ayrıca karakteristik arjinin sinyalleri de 3.6 ve 4.15 ppm'de açık şekilde görülmektedir. Spektrumlarda monomer piklerinin olmadığı not edilmelidir.

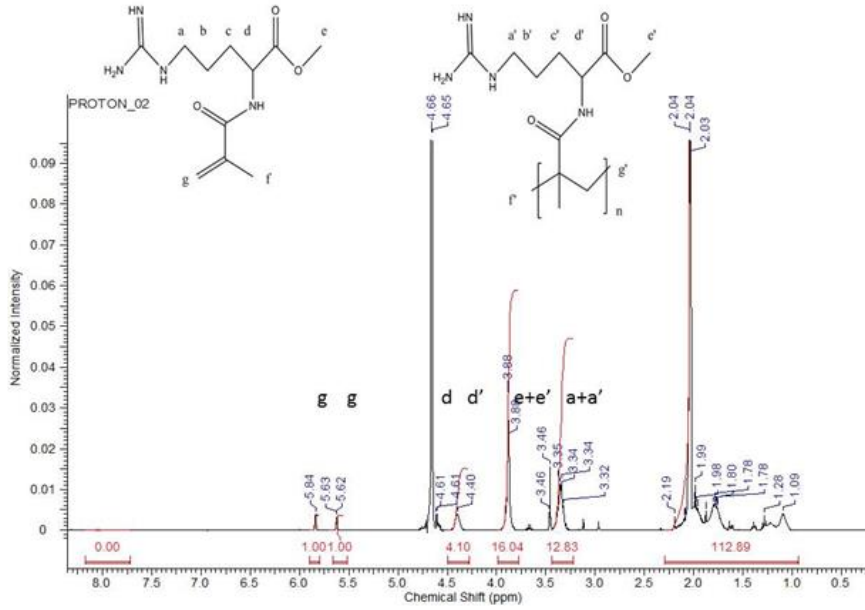


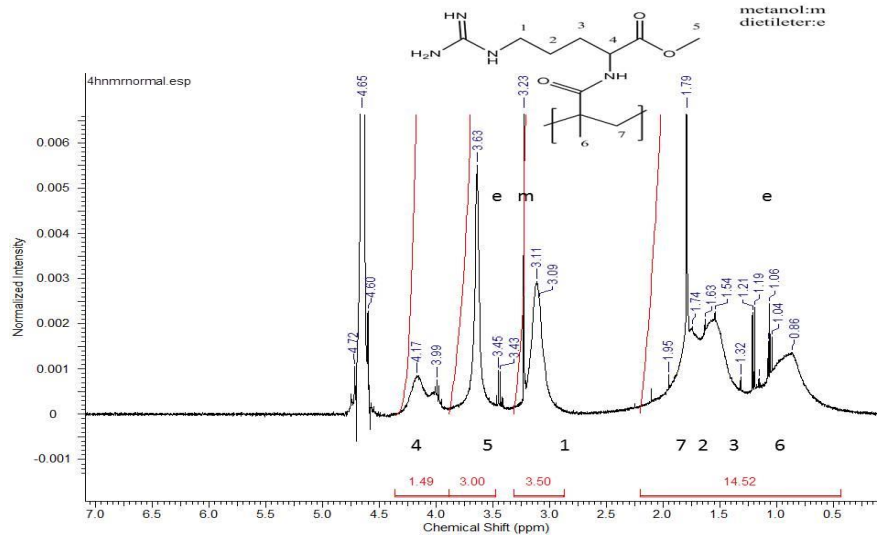
Şekil 4.6. AMME'nin sulu ortamda gerçekleştirilen serbest radikal polimerizasyonu sonuçları. Diyaliz sonrası örneklerin ^1H NMR spektrumları (D_2O). Üst: 4 saatlik polimerizasyon; Alt: 10 saatlik polimerizasyon.

Sulu ortamdaki polimerizasyon denemelerinin ikinci setinde başlatıcı olarak AMPA kullanılmıştır. AMPA'nın kullanıldığı polimerizasyonlarda sıcaklık 50°C'dir. RAFT ajanı aminoliz deneyleri sonuçlarından RAFT ajanı degradasyonunun 70°C'de oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle AMME'nin polimerizasyon denemelerine daha düşük sıcaklıklarda radikal oluşturabilen AMPA'nın varlığında devam edilmiştir. Bu polimerizasyonlardan elde edilen polimerizasyon karışımlarının ¹H NMR spektrumlarından monomerin polimere dönüşüm değerleri hesaplanmıştır. Dönüşümler Tablo 4.1'de verilmektedir. Buradan görüleceği üzere 4 saatlik polimerizasyon sonucunda dahi %81 gibi oldukça yüksek dönüşüm değerleri elde edilmiştir (Şekil 4.7 üst spektrum). Diyaliz sonrası elde edilen polimerlerin spektrumlarına bir örnek Şekil 4.7'de verilmektedir. Bu spektrumda karakteristik polimer ana zincir ve arjinin sinyalleri açık bir şekilde görülmektedir.

Tablo 4.1. Başlatıcı olarak AMPA ile gerçekleştirilen AMME'nin serbest radikal polimerizasyonlarından elde edilen monomer dönüşüm değerleri

Polimerizasyon Süresi (saat)	Monomer Dönüşümü (%)
2	30
4	81
7	99





Şekil 4.7. Başlatıcı olarak AMPA ile gerçekleştirilen AMME monomerinin 4 saatlik polimerizasyonu sonrası elde edilen polimerizasyon karışımının (üst) ve saflaştırılmış polimerin (alt) ^1H NMR spektrumları (D_2O).

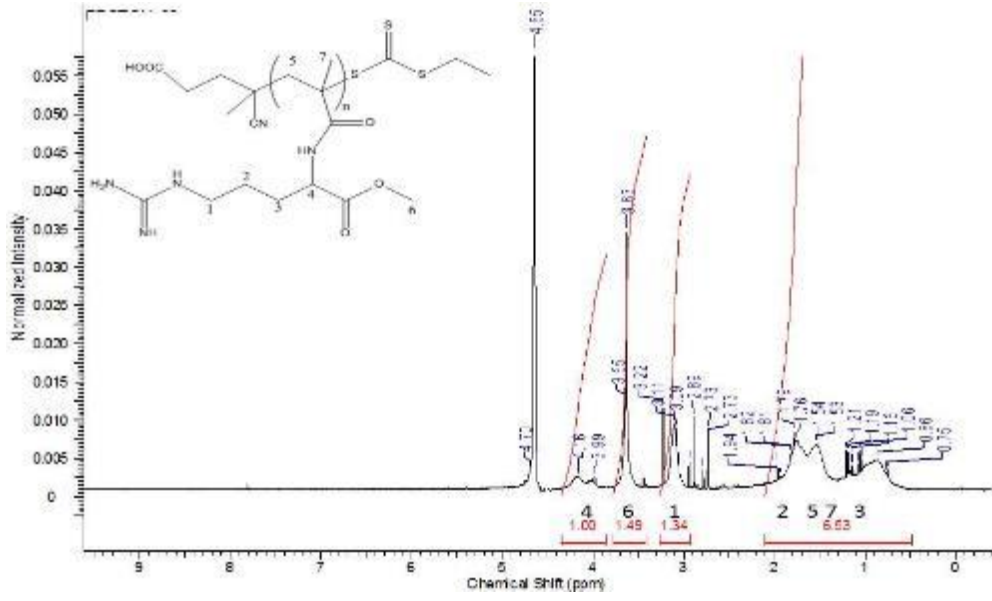
Serbest radikal polimerizasyon sonuçları elde edildikten sonra, projede asıl kullanılması amaçlanan; iyi-tanımlanmış polimer eldesi sağlayan RAFT tekniği ile AMME monomerinin polimerizasyon denemelerine geçilmiştir. RAFT polimerizasyon deneylerinde öncelikle zincir transfer ajanı (RAFT ajanı) olarak kullanılması planlanan 4-siyano-4-(fenilkarbonotiyoyliyo) pentanoik asitin, arjinin metil ester metakrilat (AMME) monomeri varlığında aminoliz çalışması yapılmıştır. Bu çalışmaya göre kullanılan ditiyo esaslı RAFT ajanının 50°C 'de aminolizinin 7 saat içinde %45 olduğu belirlenmiştir (veri sunulmamıştır). Bu oldukça yüksek degradasyon dikkate alınarak, AMME'nin iyi tanımlanmış yapıda polimerlerin üretiminin 4-siyano-4-(fenilkarbonotiyoyliyo) pentanoik asitin RAFT ajanı olarak kullanılmasıyla yapılamayacağına karar verilmiştir. Dolayısıyla yeni bir RAFT ajanı, 4-siyano-4-(etiltiyokarboniltiyoyliyo) sülfanillpentanoik asid (ECT) literatürde yayınlanmış bir prosedür takip edilerek sentezlenmiştir (Moad vd., 2004). ECT tritiyo esaslı bir RAFT ajanı olup, sulu çözeltilerde hidroliz ve aminolizinin çok yavaş olduğu bilinmektedir. Emin olmak için AMME'nin ECT ile RAFT polimerizasyonu deneyleri öncesi ECT'nin AMME monomeri varlığında 70°C 'de aminolizi UV-vis spektroskopi ile incelenmiştir. Bu deney sonuçları ECT'nin 24 saat içinde 70°C 'de aminolizinin %10'nun altında olduğunu göstermiştir (veri gösterilmemiştir). Böylece ECT'nin, proje kapsamında arjinin içeren iyi tanımlanmış polimerlerin üretiminde RAFT ajanı olarak kullanılmasına karar verilmiştir. Buna uygun olarak yapılan bir seri polimerizasyon optimizasyon deneyi sonucu Tablo 4.2'de verilen şartlar altında 250/3/1'lik $[\text{AMME}]_0/[\text{ECT}]_0/[\text{Başlatıcı}]_0$ oranında kinetik çalışmalar yapılmıştır. Tabloda elde edilen polimerlerin

özellikleri verilmiştir. Monomer dönüşüm değerleri ¹H-NMR spektrumundan, molekül ağırlık bilgileri GPC ile belirlenmiştir.

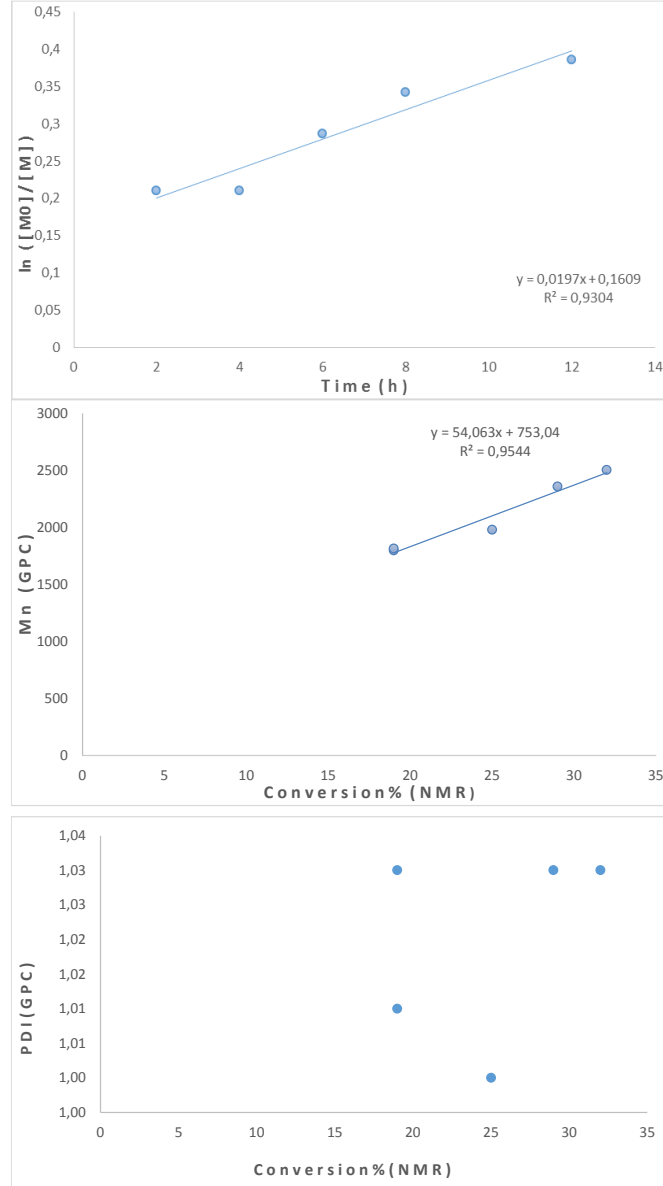
Tablo 4.2. AMME'nin RAFT polimerizasyonu sonuçları

[AMME] (mol/l)	[AMME] _o / [ECT] _o / [Başlatıcı] _o	Başlatıcı	Çözgen	Süre (saat)	Dönüşüm. (%) (NMR)	Mn (GPC) (g/mol)	PDI (GPC)
0.4	250/3/1	AIBN	DMAc	2	19	1800	1.03
0.4	250/3/1	AIBN	DMAc	4	19	1817	1.01
0.4	250/3/1	AIBN	DMAc	6	25	1982	1.00
0.4	250/3/1	AIBN	DMAc	8	29	2362	1.03
0.4	250/3/1	AIBN	DMAc	12	32	2508	1.03
0.2	545/5.5/1	AMPA	Metanol- Asetat Tamponu	22	57	17000	1.27

Polimerlerde düşük polariteye sahip RAFT uç gruplarının varlığı polimerlerin çözünürlük özelliklerinin değişmesine sebep olmuştur. Bu sebeple; polimerlerin saflaştırılması için serbest radikal polimerizasyon çalışmalarından farklı olarak yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Polimerizasyon karışımı, metanol:su (50/50 v/v) (pH 4.0) karışımı içinde diyaliz edilmiştir. Saflaştırma sonrası alınan NMR spektrumu Şekil 4.8'de verilmektedir. Spektrumda monomer sinyallerinin (5-6 ppm) yokluğu saflaştırma yönteminin başarısını göstermiştir. Şekil 4.9'da RAFT polimerizasyonu kinetik çalışma sonuçları verilmiştir. Dönüşümün zamanla ve Mn değerlerinin monomer dönüşümü ile lineer ilişkisi, ayrıca düşük PDI değerleri, AMME polimerlerinin başarıyla RAFT kontrollü olarak sentezlendiğini göstermiştir.



Şekil 4.8. P(AMME)'nin diyaliz sonrası ¹H-NMR sonucu.



Şekil 4.9. AMME'nin RAFT polimerizasyonu sonuçları. $[AMME]_0/[ECT]_0/[Başlatıcı]_0 = 250/3/1$; sıcaklık= 50°C; çözügen= DMAc.

4.1.3 Amin Reaktif PFMA Monomerinin RAFT Polimerizasyonu

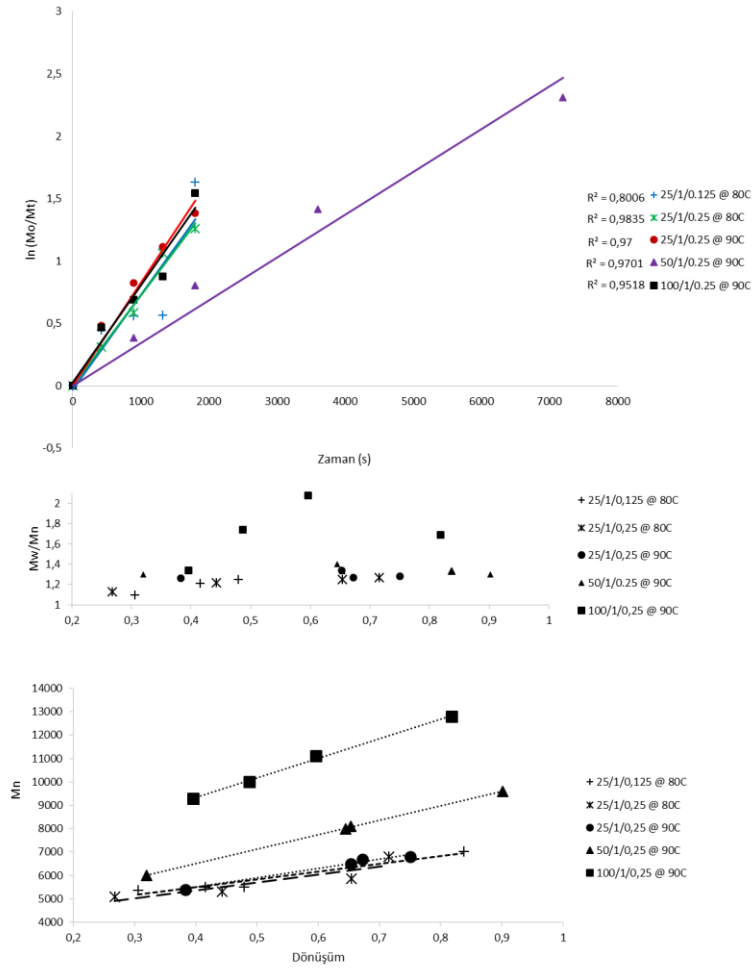
Amin-reaktif bir aktif ester olan pentaflorofenil metakrilat (PFMA) monomerlerinin sentez sonuçları Bölüm 4.1.1'de sunulmuştur. Monomer sentezinin ardından, PFMA polimerlerinin hazırlanması ve arjinin amino asidi ve oktaarjinin peptidi ile modifiye edilmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda öncelikle bir dizi PFMA homopolimerizasyonu gerçekleştirilerek RAFT mekanizması kontrollü polimerizasyon optimizasyonu yapılmıştır. Bu denemelerin bazılarının sonuçları Tablo 4.3'de sunulmaktadır.

Tablo 4.3. PFMA monomerinin RAFT polimerizasyon sonuçları [Monomer]= 2 M; Çözgen: Dioksan

[M]/[R]/[I]	Polimerizasyon süresi (dak)	Monomer Dönüşüm ^a	M _n Teorik ^b	PD ^c	M _n (GPC)	PDI
90°C						
50/1/0.25	15	0,32	4307	23	6000	1,30
50/1/0.25	30	0,64	8403	31	8000	1,40
50/1/0.25	60	0,65	8511	32	8100	1,33
50/1/0.25	120	0,90	11638	38	9600	1,30
90°C						
25/1/0.25	7	0,38	2690	21	5400	1.26
25/1/0.25	15	0,65	4391	26	6500	1.34
25/1/0.25	22	0,67	4517	26	6700	1.27
25/1/0.25	30	0,75	5006	27	6800	1.28
90°C						
100/1/0.25	7	0,39	10252	37	9300	1,34
100/1/0.25	15	0,48	12556	40	10000	1,74
100/1/0.25	22	0,59	15297	44	11100	2,08
100/1/0.25	30	0,81	20897	51	12800	1,69
80°C						
100/1/0.125	7	0,24	6388	35	8980	1,42
100/1/0.125	15	0,27	7284	37	9540	1,43
100/1/0.125	22	0,31	8100	41	10540	1,44
100/1/0.125	30	0,36	9325	46	11710	1,28
80°C						
25/1/0.25	7	0,26	1964	20	5085	1,13
25/1/0.25	15	0,44	3069	21	5320	1,22
25/1/0.25	22	0,65	4399	23	5850	1,25
25/1/0.25	30	0,71	4787	27	6800	1,27
80°C						

25/1/0.125	7	0,30	2204	21	5370	1,10
25/1/0.125	15	0,41	2899	22	5500	1,21
25/1/0.125	22	0,48	3298	22	5500	1,25
25/1/0.125	30	0,83	5558	28	7030	1,33

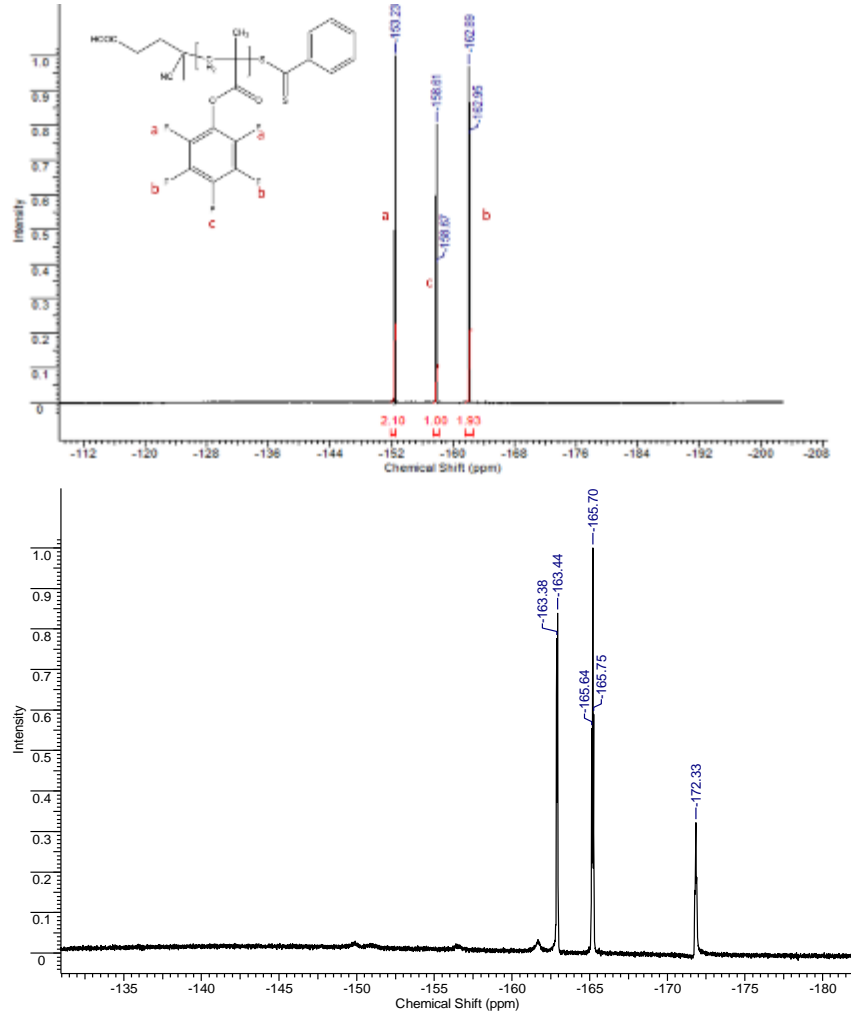
Tablo 4.3'de belirtilen polimerlerin monomer dönüşümü ile sayıca molekül ağırlığı ilişkisi Şekil 4.10'da görüldüğü gibi lineerdir. Ayrıca Monomer/RAFT oranı arttıkça polimerlerin molekül ağırlıklarının arttığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar PFMA'nın RAFT kontrollü bir polimerizasyon mekanizması ile polimerleştiğini göstermektedir. Monomer/RAFT/Başlatıcı mol oranının 100/1/0.25 olduğu durumda polimerlerin molekül ağırlığı dağılımlarında artış gözlenmiştir. Bu, RAFT kontrolünün kaybolmaya başladığını ve polimerleşme sırasında yan reaksiyonların olduğunu gösterebilmektedir.



Şekil 4.10. PFMA'nın RAFT polimerizasyonu. Monomer konsantrasyonu=2M; çözügen= dioksan; polimerizasyon sıcaklığı 90°C.

4.1.4 Fonksiyonel Polimer PPFMA'nın Arjinin Amino Asiti ile Modifiye Edilmesi

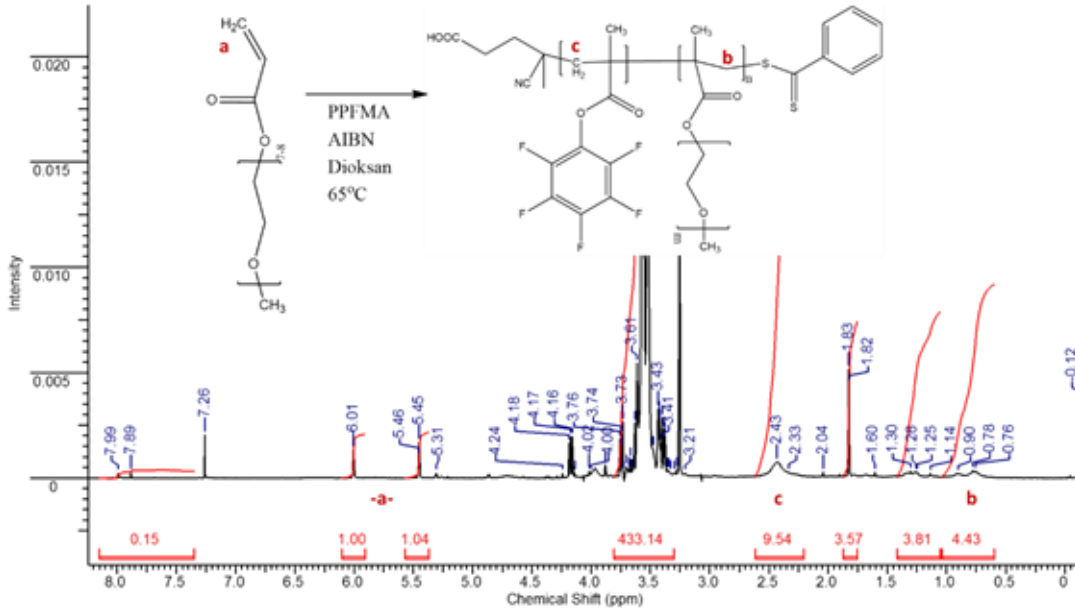
Arjinin içeren polimerler, doğrudan arjinin içeren monomerin (AMME) polimerleştirilmesine alternatif olarak aktif ester polimeri PPFMA'nın arjinin metil ester (AME) ile modifikasyonu ile de üretilmiştir. PPFMA'nın AME ile modifikasyonu verimi ^{19}F NMR analizi ile belirlenmiştir. Reaksiyon sonrası hiçbir işlem yapılmadan reaksiyon karışımı ^{19}F -NMR ile incelenmiştir (Şekil 4.11). Reaksiyon sonrasında PPFMA'ya ait polimerik flor pikleri gözükmemektedir. Polimerin yapısında olan -153 ppm, -158 ppm ve -162 ppm sinyalleri, -163 ppm, -166 ppm ve -172 ppm değerlerine kaymıştır. Yeni spektrumda görülen sinyaller, reaksiyon yan ürünü pentafluorofenol'e aittir. Bu sonuç PPFMA'nın tüm pentafluorfenil gruplarının AME ile reaksiyona girdiğini PAMME polimerinin oluştuğunu göstermektedir. Dolayısıyla modifikasyon verimi %100'dür.



Şekil 4.11. (Üst) PPFMA'nın modifikasyon öncesi ^{19}F -NMR spektrumu. (Alt) PPFMA'nın AME ile reaksiyonu sonrası alınan ^{19}F -NMR spektrumu.

4.1.5 PPFMA-*b*-PEGMA Kopolimerlerinin RAFT Polimerizasyonu ile Sentezi

Proje başvurusunda önerildiği şekilde üretilen polimerlerin kompozisyonu (belirli kimyasal grupların varlığı, hidrofobik ve hidrofilik grupların oranı, yük yoğunluğu vb.), polimerlerin toksik özelliklerini doğrudan etkileyen bir özelliktir. PPFMA'dan türetilen polimerlerin potansiyel *in vivo* kullanımlarını dikkate alarak ve olası toksisitelerini azaltmak için PPFMA'nın biyolojik olarak uyumlu bir polimer olan poli(oligoetilen glikol metakrilat) (PEGMA) ile blok kopolimerleri hazırlanmıştır. Bu amaçla önce PPFMA makroRAFT ajanı hazırlanmış ve bu makroRAFT ajandan PEGMA monomeri ile uzatılmıştır. Şekil 4.12, kopolimerizasyon sonrası alınmış ¹H NMR spektrumunu göstermektedir. PEGMA komonomerinin polimere dönüşümü burada açıkça görülmektedir.



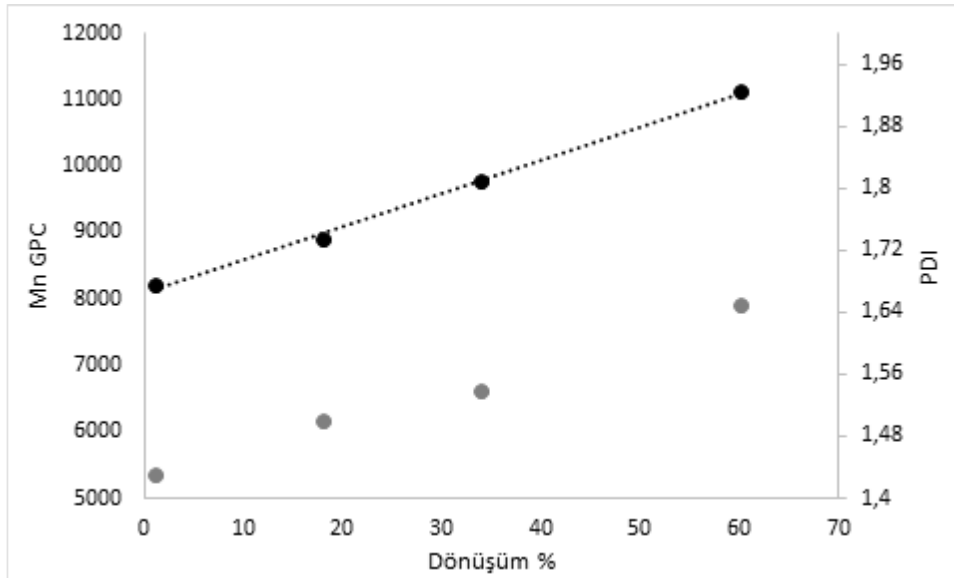
Şekil 4.12. PPFMA makroRAFT ajanı ile PEGMA'nın kopolimerizasyonu sonrası alınmış ¹H NMR spektrumu. Monomer/MakroRAFT/Başlatıcı= 100/1/0.1. Polimerizasyon süresi 8 saat.

Tablo 4.4, kopolimerizasyonlardan elde edilen polimerlerin özelliklerini vermektedir. Görüleceği üzere zaman ile monomer dönüşümü ve polimerlerin molekül ağırlıkları artmıştır. Molekül ağırlığı dağılımları oldukça yüksektir. Ancak PPFMA'nın fonksiyonel yapısı sonucu makroRAFT ajanın molekül ağırlığı dağılımının yüksek olduğu gözönüne alınırsa blok kopolimerizasyon sonrası PDI değerlerinin artışı beklenen bir sonuçtur. Bu sonuçlar literatür ile uyumludur (Eberhart vd., 2005). Şekil 4.13, oluşan kopolimerlerin monomer dönüşümü ile lineer şekilde arttığını göstermektedir. Bu sonuç, PPFMA ve PEGMA kopolimerizasyonunun

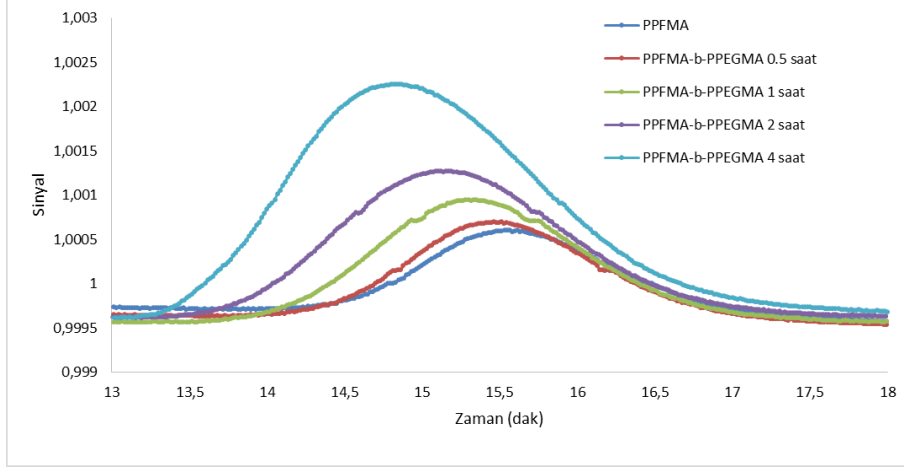
RAFT kontrollü karakterini ve blok kopolimerlerin oluştuğunu göstermektedir. GPC ölçümleri kopolimerizasyonun gerçekleştiğini ve monomodal dağılıma sahip kopolimerlerin oluştuğunu ispatlamıştır (Şekil 4.14). Sonuç olarak PPFMA-*b*-PEGMA kopolimerleri RAFT tekniği ile başarıyla hazırlanmıştır.

Tablo 4.4. PPFMA makroRAFT ajanı (M_n :8000 PDI:1.40) kullanılarak PEGMA komonomeri ile blok kopolimerizasyon sonuçları

Polimerleştirme Zamanı (saat)	Monomer Dönüşümü (%)	M_n (GPC)	PDI	PPEGMA İçeriği mol%
0.5	1	8220	1.43	1
1	18	8900	1.50	32
2	34	9780	1.54	40
4	60	11140	1.65	67



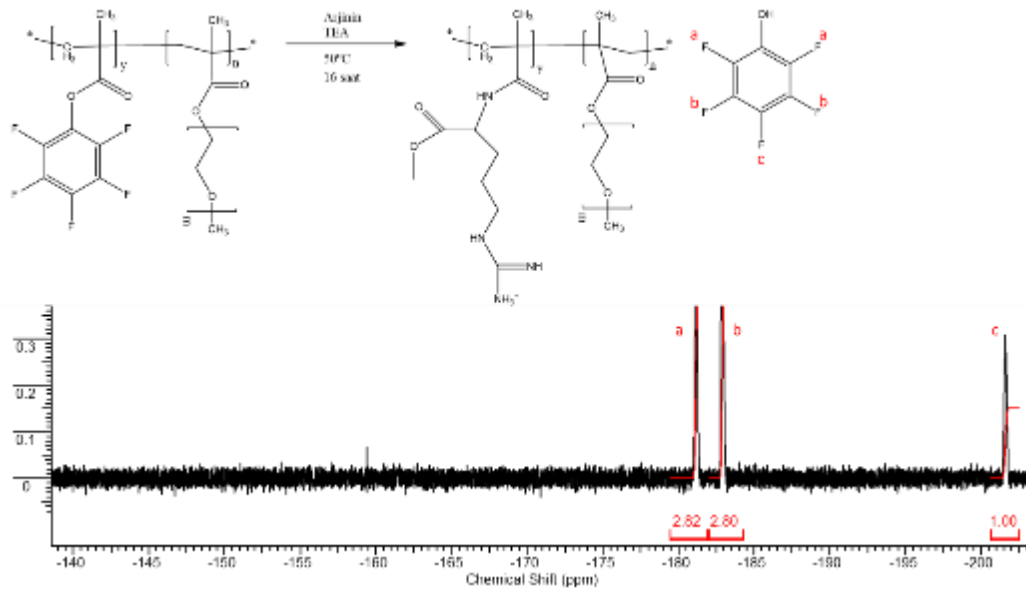
Şekil 4.13. PPFMA makroRAFT ajanından PEGMA zincir uzatma kopolimerizasyonu sırasında monomer dönüşümüne karşı kopolimerin molekül ağırlığı (M_n) ve dağılımı (PDI) değişimi.



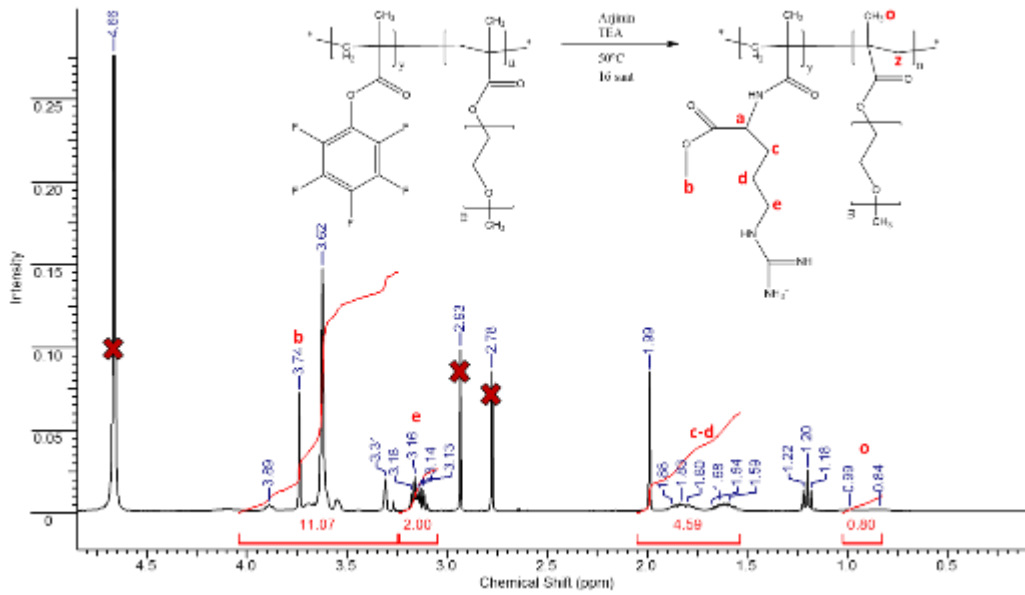
Şekil 4.14. PPFMA makroRAFT ajanından PEGMA ile zincir uzatma polimerizasyonu sonucu oluşan kopolimerlerin jel geçirgenlik kromatogramları.

4.1.6 PPFMA-*b*-PPEGMA Kopolimerlerinin Arjinin ile Modifikasyonu

Arjinin polimerlerinin kuvvetli katyonik özelliğinin *in vivo* uygulamalarda yaratabileceği sorunları dikkate alarak arjinin polimerini maskelemek amacıyla PPFMA polimerinin PEG esaslı PEG-metakrilat polimeri (PPEGMA) ile blok kopolimerleri bir önceki bölümde açıklandığı gibi sentezlendi. Sonraki adımda bu kopolimerlerin arjinin metil ester (AME) ile modifikasyonu çalışmaları yapıldı. Deneysel olarak PPFMA homopolimerinin modifikasyonu ile aynı koşullar altında denenmiş kopolimer modifikasyonu sonrası alınan ¹⁹F-NMR spektrumu Şekil 4.15’de gösterilmektedir. Bu sonuca göre reaksiyon verimi yaklaşık 100% olarak hesaplanmıştır. Polimere ait herhangi bir flor piki gözükmemektedir. Şekil 4.15’e göre reaksiyon ortamında bağlanmamış arjinin moleküllerinin varlığı gözükmemektedir. Bu sebeple reaksiyon karışımı diyaliz edilmiş ve saf arjinin bağlı kopolimer elde edilmiştir. Saflaştırma sonrasında alınan ¹H-NMR spektrumunda ise (Şekil 4.16) arjinin bağlanmış kopolimer yapısının son hali görülmektedir. Bu sonuca göre 3.60 ppm’deki sinyal arjinin bağlanmış polimerin yapısındaki amid bağına komşu (COO-CH-NH-C=O) yapısını göstermektedir. Bu sonuçlar aktif ester homopolimerlerinin arjinin modifikasyonu sonuçları ile tutarlıdır.



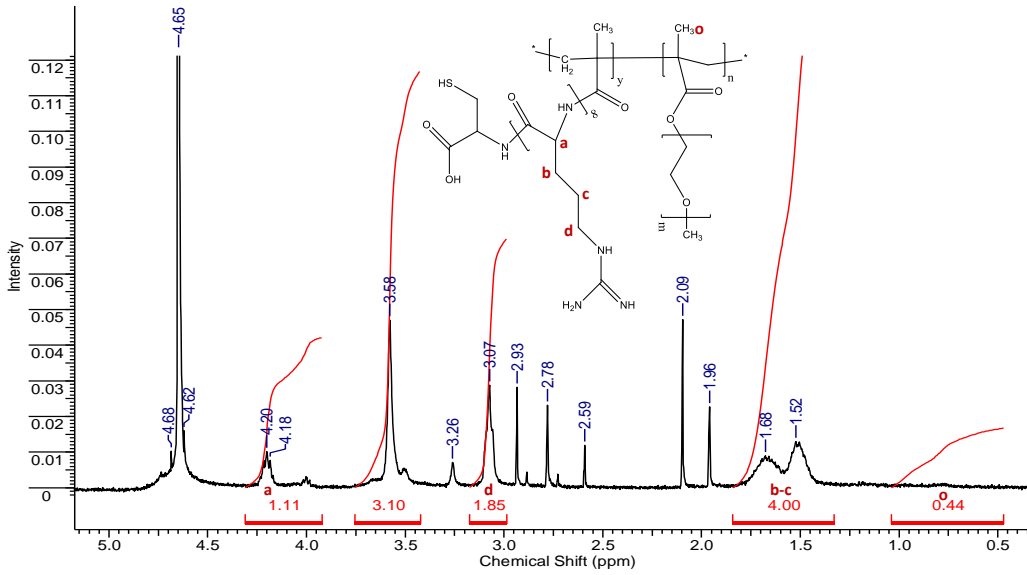
Şekil 4.15. PPFMA-*b*-PPEGMA blok kopolimerinin arjinin metil ester (AME) ile reaksiyonu karışımının ¹⁹F-NMR spektrumu.



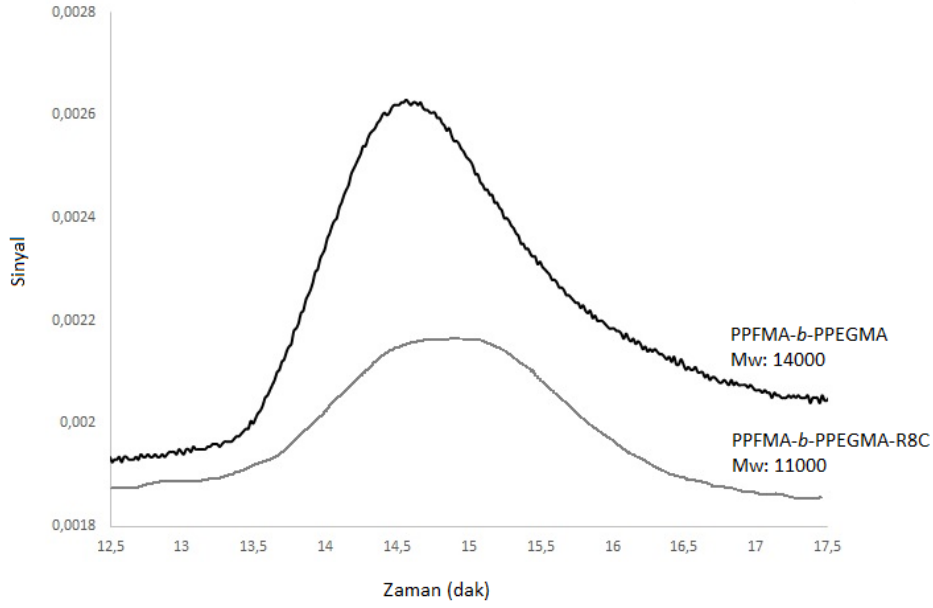
Şekil 4.16. P(AMME)-*b*-PEGMA, arjinin metil ester ile modifiye edilmiş PPFMA-*b*-PPEGMA, blok kopolimerinin saflaştırma sonrası alınmış ¹H-NMR spektrumu (D₂O).

4.1.7 PPFMA-*b*-PPEGMA Kopolimerlerinin Oktaarjinin ile Modifikasyonu

Projenin bu kısmında PPFMA-*b*-PPEGMA kopolimerlerin oktaarjinin (R8) ile modifikasyonu, AME ile gerçekleştirilmiş olan reaksiyon ile benzer koşullarda denenmiştir. Modifikasyon için PFMA aktif ester grupları/R8/TEA mol oranları 1/1/10 olarak sabit tutulmuştur. Modifikasyon sonrası kopolimer ¹H-NMR ile analiz edilmiştir. Şekil 4.17'de yer alan NMR spektrumunda oktaarjinine ait proton pikleri açıkça görülmektedir. Aynı zamanda kopolimer ana zincir (0.5-1.0 ppm) ve oligoeten glikol (3.58 ppm) birimlerine ait sinyaller de görülmektedir. Kopolimerin reaksiyon sonrası suda çözünür hale gelmesi modifikasyonun olduğuna dair en önemli göstergedir. Şekil 4.18 kopolimerin reaksiyon öncesi ve sonrasında alınmış GPC kromatogramlarını göstermektedir. Öncelikle modifiye edilmiş polimerin diyaliz ile saflaştırma sonrası alınmış GPC kromatogramında 11000 g/mol ağırlığına tekabül eden tek bir pikin olması bağlanmamış peptidin (Mw 1514 g/mol) tamamen uzaklaştırılmış olduğunun kanıtıdır. Modifikasyon öncesi 14000 g/mol olan kopolimerin, modifikasyon ve takip eden diyaliz işlemi sonrası molekül ağırlığının Mn 11000 g/mol değerine düşmüş olması amfifilik yapıda olan PPFMA-*b*-PPEGMA kopolimerinin oktaarjinin peptidi ile modifikasyon sonrası amfifilik yapıdan çift hidrofilik yapıya geçtiğini ve bu nedenle moleküler hidrodinamik hacminin küçüldüğünün göstergesi olabilir. Sonuç olarak; GCP kromatogramında sadece bir pikin olması, reaksiyon sonrası saflaştırıldıktan sonra alınan örneğin NMR spektrumunda hem R8 hem PEGMA bloğuna ait sinyallerin varlığı ve son olarak suda çözünmeyen polimerin suda çözünür hale gelmesi oktaarjinin bağlanmasının başarıyla gerçekleştiğini göstermektedir.



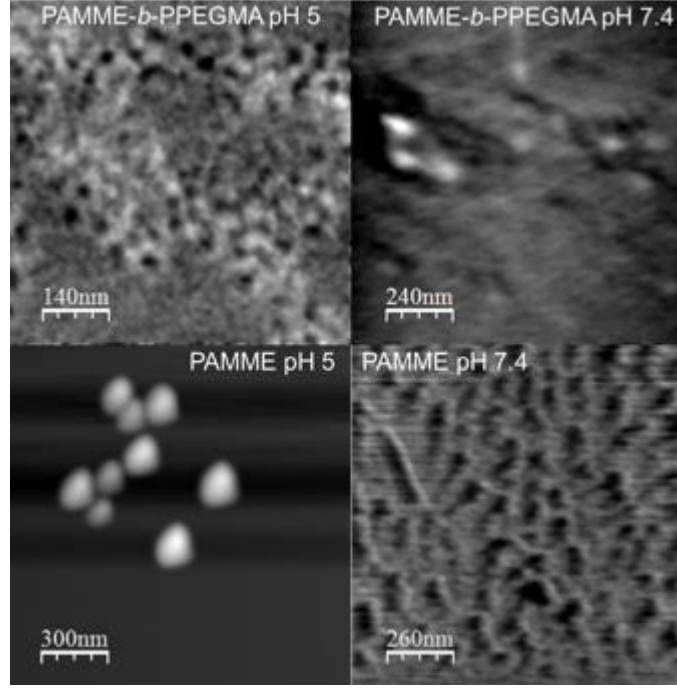
Şekil 4.17. Oktaarjinin ile modifiye edilmiş PPFMA-*b*-PPEGMA blok kopolimerinin saflaştırma sonrası alınmış ¹H-NMR spektrumu (D₂O).



Şekil 4.18. PPFMA-*b*-PPEGMA blok kopolimerinin oktaarjinin ile modifikasyonu öncesi ve sonrası alınmış GPC kromatogramları.

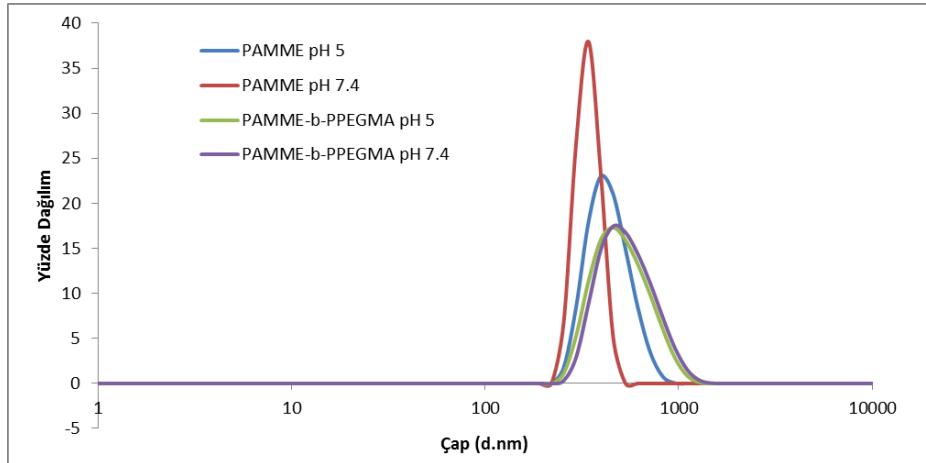
4.2 Arjinin İçeren Polimerlerin Karakterizasyonu

Başarıyla sentezlenen polimerlerin yapılarının daha iyi anlaşılması ve karakterizasyonlarının tamamlanması amacıyla polimerler, AFM ve DLS teknikleri ile incelenmiştir. Şekil 4.19 polimerlerin iki farklı pH değerinde AFM görüntülerini göstermektedir. Görüntülerde PAMME-*b*-PPEGMA ve PAMME polimerlerinin her iki pH değerinde de partiküller ve agregat benzeri yapılar oluşturduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.19. PAMME (Mn:9500) ve PAMME-*b*-PPEGMA (Mn:14000) polimerlerinin pH 5.0 ve 7.4'de alınmış AFM görüntüleri.

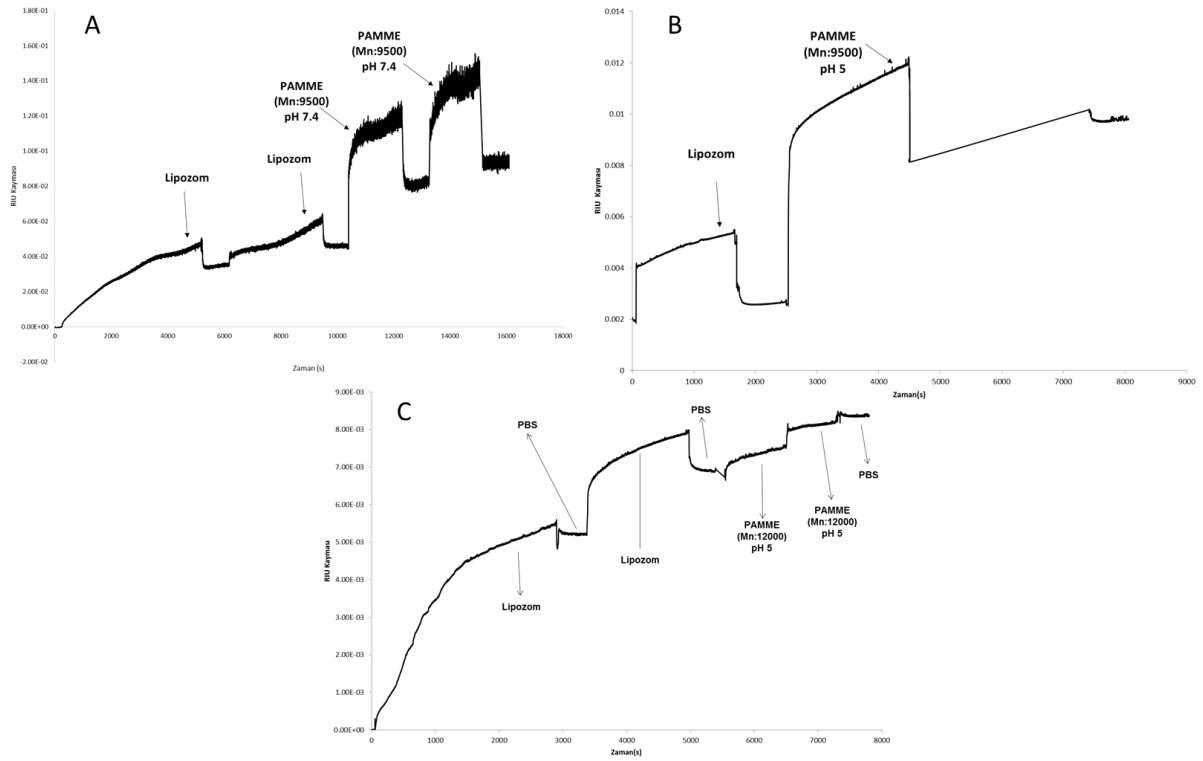
Benzer şekilde DLS sonuçları da polimerlerin sulu çözelti içinde kendi kendine organize olduğunu göstermiştir (Şekil 4.20). Polimerlerin sayıca ortalama hidrodinamik çapları 300 ile 600 nm arasında bulunmuştur. Kopolimerlerin hidrodinamik çapı, homopolimere göre daha yüksektir.



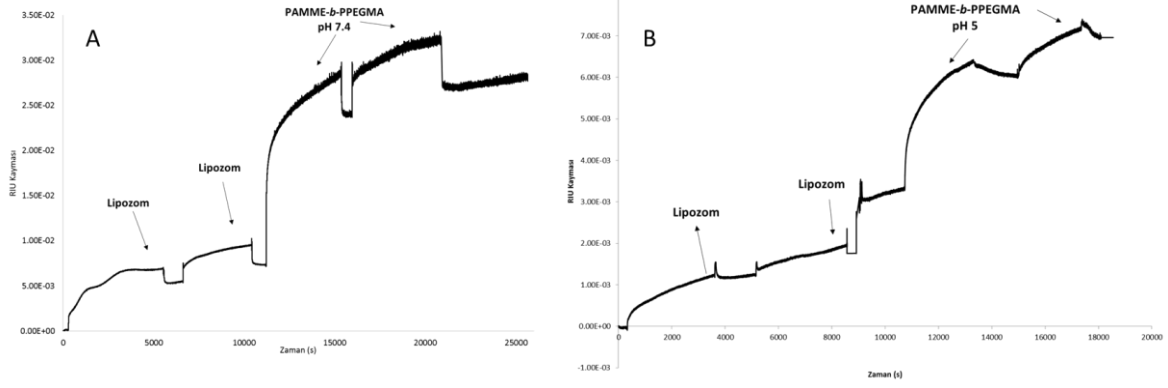
Şekil 4.20. PAMME (Mn:9500) ve PAMME-*b*-PPEGMA (Mn:14000) polimerlerinin iki farklı pH değerinde (pH 5 ve pH 7.4) DLS ölçümleri ile elde edilmiş sayıca ortalama hidrodinamik çapları.

4.3 Arjinin İçeren Polimerlerin Membran Aktivitelerinin İncelenmesi

Arjinin içeren polimerlerin membran aktiviteleri yüzey plazmon rezonans (SPR) ölçümleri ile incelenmiştir. Bu ölçümlerde önce SPR çipi üzerinde endozom membranı kompozisyonuna benzer şekilde hazırlanmış fosfatidilkolin ve kolesterol içeren lipid tabakası oluşturulmuştur. Daha sonra polimerler, SPR cihazı hücresi içinde bu çip yüzeyi ile iki farklı pH ortamında etkileştirilmiş ve polimerlerin yüzeye bağlanmaları irdelenmiştir. İki farklı pH'da (pH 7.4 ve pH 5) PAMME ve PAMME-*b*-PPEGMA ve pH 5 için iki farklı molekül ağırlığındaki PAMME (Mn:9500 ve Mn:12000) denenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.21 ve 4.22'de gösterilmiştir. SPR sonuçlarından hem PAMME hem de PAMME-*b*-PPEGMA polimerlerinin her iki pH değerinde de lipid tabakasıyla belirgin bir şekilde etkileştiği anlaşılmaktadır. Molekül ağırlık artınca etkileşim azalma göstermiştir. Önemli bir nokta kopolimer yapısındaki PEGMA bloğu etkileşimi belirgin bir şekilde azaltmamıştır. Sonuç olarak üretilen arjinin homo- ve kopolimerleri hücre membranı ile etkileşim potansiyeline sahip olarak görülmüş ve bu polimerlerin canlı hücre hatlarıyla etkileşimleri incelenmiştir.



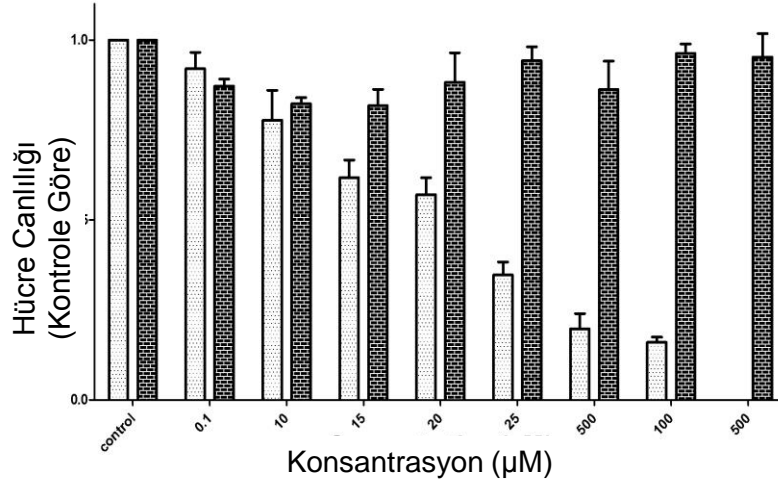
Şekil 4.21. PAMME (Mn:9500 ve Mn:12000) polimerinin SPR çipi üzerindeki lipid katmanıyla etkileşmesi (A) Mn:9500 pH 7.4, (B) Mn:9500 pH 5 ve (C) Mn:12000 pH 5.0.



Şekil 4.22. PAMME-*b*-PPEGMA (Mn:14000) blok kopolimerinin SPR çipi üzerindeki lipid katmanıyla etkileşmesi (A) pH 7.4 ve (B) pH 5.0.

4.4 Arjinin İçeren Polimerlerin Hücre Canlılığına Etkileri

Arjinin içeren polimerlerin hücre canlılığına etkileri 3-(4,5-dimetil-2-thiazol)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromid (MTT) deneyleri ile gerçekleştirilmiştir. MTT metodu ile hücre canlılığının belirlenmesi, mitokondriyal enzimlerinin tetrazolyum boyasını indirgemesine dayanır ve enzimlerin konsantrasyonu reaksiyon sonucu oluşan renk yoğunluğu ile doğru orantılıdır. Bu amaçla arjinin metil ester metakrilat polimeri P(AMME) (Mn 17000 g/mol, PDI 1.27) A549 insan akciğer kanser hücre hattı ile 24 veya 72 saat süresince sekiz farklı konsantrasyonda (0.1 – 500 μ M) inkübe edildi. Polimerin toksisitesi RAFT uç grubu aminoliz ile uzaklaştırma öncesinde ve sonrasında incelenerek RAFT uç grup varlığının toksisiteye etkisi de ayrıca belirlendi. Şekil 4.23’de 72 saat inkübasyon sonrası ölçülen hücre canlılığı değerleri gösterilmektedir. Görüleceği üzere aminoliz öncesi RAFT uç grubunun hücre canlılığına negatif etkisi açık bir şekilde gözlemlenmiştir. Literatürde RAFT uç grubunun toksik etkileri bilindiğinden, sonuçlar literatür ile uyumludur (Pissuwan vd., 2010). Aminoliz sonrası elde edilen polimerin 500 μ M gibi yüksek konsantrasyonlara çıkıldığında dahi hücre canlılığına etkisinin olmadığı açıkça görülmektedir.



Şekil 4.23. Arjinin metil ester metakrilat polimeri P(AMME) (M_n 17000 g/mol, PDI 1.27)'nin insan akciğer kanser hücre hattı A549 hücre hattının canlılığına etkisi: RAFT uç grubu aminoliz edilmiş (siyah çubuklar) ve edilmemiş (beyaz çubuklar) polimerler.

4.5 Arjinin İçeren Polimerlerin Hücreler Tarafından Alımı ve Hücre İçi Dağılımları

Proje kapsamında geliştirilen polimerlerin hücre içine alınmasının nicel tayini hücre içi ilaç taşıyıcı sistemlerin bileşenleri olarak tasarlanan membran aktif polimerlerin etkinliğini belirlemek adına oldukça önemli bir basamaktır. Proje kapsamında geliştirilen tüm polimerler Oregon Green boyası ile işaretlenmiş ve hücre içine alımları ve alım mekanizmaları akış sitometri yöntemi ile incelenmiştir. Polimerlerin hücre içine alımında enerjiye bağlı mekanizmaların ve/veya hücre iskeleti bileşenlerinin etkinliği araştırılmıştır.

Literatür göz önüne alındığında, hücre iskeleti bileşenlerinin endositoz aktivitesinde veziküllerin oluşumu ve taşınmasında çok önemli rol oynadığı bilinmektedir. Endositoz veziküllerin oluşmasında aktin önemli bir rol oynarken, oluşan veziküllerin hücre içine taşınmasında mikrotübüllerin görev aldığı bilinmektedir (Vercauteren vd., 2010). Transport inhibitörleri olarak belirtilen nokodazol ve sitokalasin D kimyasallarının sırasıyla mikrotübüllerin depolimerizasyonunu sağlayarak ve aktin polimerizasyonunu engelleyerek hücrelerin endositoz aktiviteleri üzerinde olumsuz etki yarattığı belirtilmiştir (Khalil vd., 2006) Bu sebeplerle, hücre iskeletinin temel iki bileşeni olan mikrotübül ve aktin filamentlerinin polimerlerin alımına olan etkisi incelenmiştir. Burada önemli olan bir nokta proje kapsamında kullanılan hücre hattının canlılığı üzerine kullanılan transport inhibitörlerinin önemli ölçüde etki göstermeyecek inkübasyon koşulları, grubumuz tarafından yapılmış olan diğer bir çalışmada belirlenmiş olmasıdır (Özer, 2014). Bu çalışmaya göre nokodazol ve sitokalasin D ajanlarının

her ikisinin de 20 µM konsantrasyonda ortamda bulunduğu durumda hücre canlılığı halen %50 değerinin üzerindedir. Dolayısıyla bu proje kapsamında 20 µM sitokalsin D ve nokodazol ile çalışma konsantrasyonu olarak seçilmiştir.

Oregon Green boyası ile işaretlenmiş PAMME ve PAMME-*b*-PPEGMA polimerlerinin hücre içine alımları ve PAMME-*b*-PPEGMA polimerlerinin alım mekanizması akış sitometri yöntemi ile belirlenmiştir. Arjinin polimerlerinin hücre içine alımları, negatif kontrole (polimer ile inkübe edilmemiş hücrelere) göre ortalama floresan değeri olarak belirtilmiştir.

PAMME ve PAMME-*b*-PPEGMA polimerlerinin hücre içine alım miktarının, polimer konsantrasyonuna ve inkübasyon süresine bağlı değişimleri Şekil 4.24'deki üst ve orta grafiklerde gösterilmiştir. PAMME ve PAMME-*b*-PPEGMA polimerlerinin hücreler tarafından alım değerleri karşılaştırıldığında PAMME-*b*-PPEGMA polimerlerinin PAMME polimerine göre çok daha fazla hücre içine alındığı tespit edilmiştir.

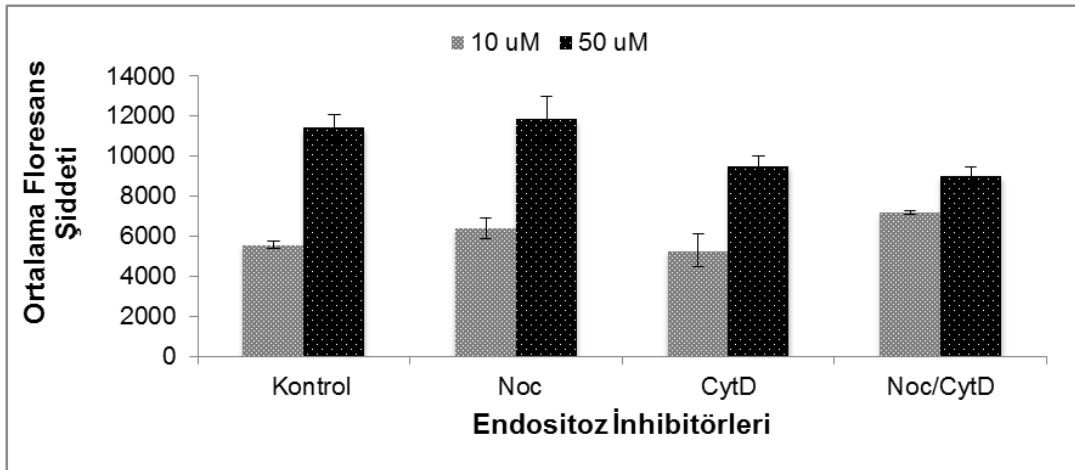
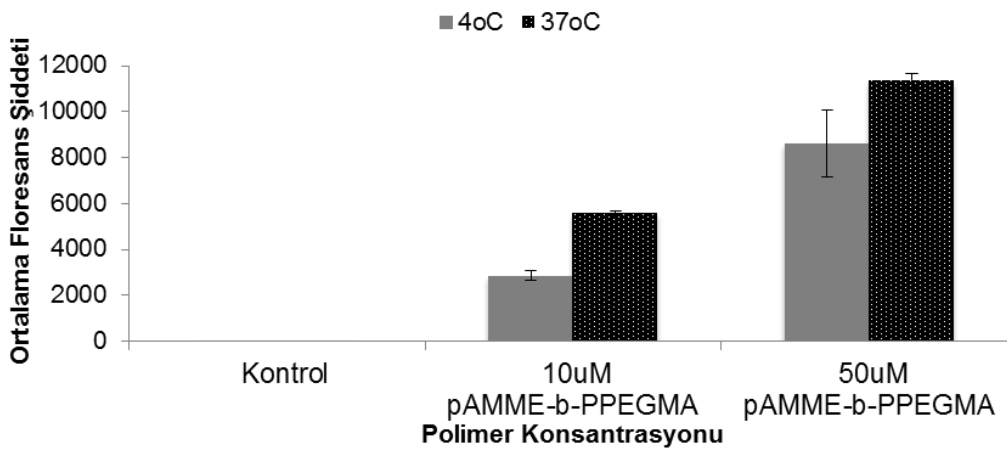
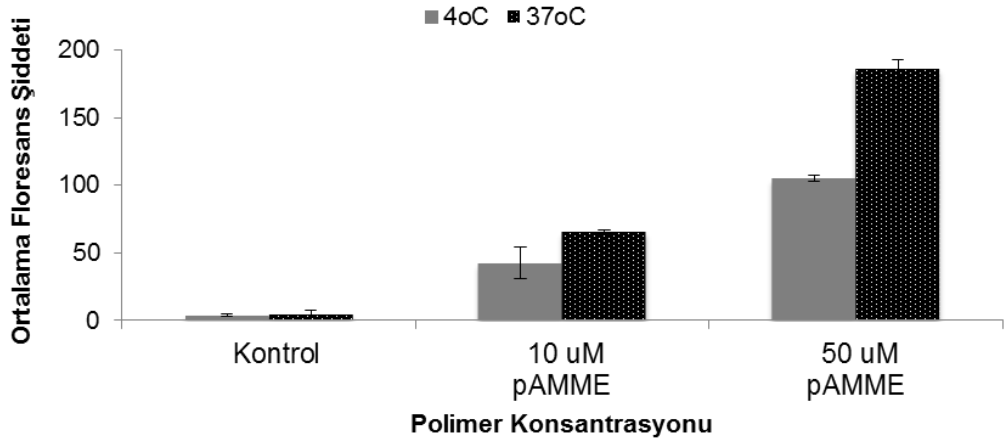
pAMME ve pAMME-*b*-PPEGMA polimerlerinin hücreler tarafından alım kinetiği incelendiğinde, hücre alımının polimer konsantrasyonuna bağlı olarak artış gösterdiği ($p < 0.05$, *t*-test), fakat çalışılan inkübasyon sürelerinin (1 ve 3 saat) hücre alımının üzerinde istatistiksel olarak önemli bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0.05$, *t*-test) (1 saat sonucu gösterilmemiştir). Bu duruma ise pAMME ve pAMME-*b*-PPEGMA polimerlerinin hücreler tarafından çok hızlı ve etkin olarak alınmasının sebep olduğu düşünülmektedir.

pAMME ve pAMME-*b*-PPEGMA polimerlerinin hücreler tarafından alım mekanizmasının enerjiye bağımlılığı ise hücrelerin polimerlerle 4°C ve 37°C'de inkübe edilmesi ile belirlenmiştir. Hücrelerin 37°C'den düşük sıcaklıklarda inkübasyonu sonucunda, enerjiye bağımlı endositoz olaylarının azaldığı bilinmektedir (Iacopetta vd., 1983; Khalil vd., 2006). Buna karşılık literatürde 8 adet arjinin molekülünden oluşan peptidin (R8) hücreler tarafından enerjiden bağımsız yolaklar ile alındığı da belirtilmiştir (Futaki vd., 2001). A549 hücrelerinin floresan boya ile işaretli pAMME ile 4°C ve 37°C'de 3 saat inkübasyonu sonucunda aynı konsantrasyon değerinde (10 µM) ortalama floresans şiddeti değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir ($p > 0.05$, *t*-test) ve pAMME polimerlerinin hücreye temel olarak enerjiden bağımsız yolaklar ile alındığı belirlenmiştir. A549 hücreleri floresan boya ile işaretli yüksek konsantrasyonda (50 µM) pAMME ve pAMME-*b*-PPEGMA polimerleri ile 4°C ve 37°C'de inkübe edildiği zaman ise 37°C'de ortalama floresans şiddeti değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p < 0.05$, *t*-test). Böylelikle, ortamda yüksek konsantrasyonda arjinin bazlı polimerlerin bulunması durumunda enerjiden bağımsız membran aktivitelerinin yanı sıra endositoz aktivitelerinin de etkin olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 4.24üst ve Şekil 4.24orta). pAMME-*b*-PPEGMA kopolimerlerinin hücre alımı düşük konsantrasyonda (10 µM) endositoz inhibitörlerinden etkilenmezken, yüksek konsantrasyonda (50 µM) endositoz inhibitörleri ile inkübasyonun hücre alımını azalttığı görülmüştür (Şekil

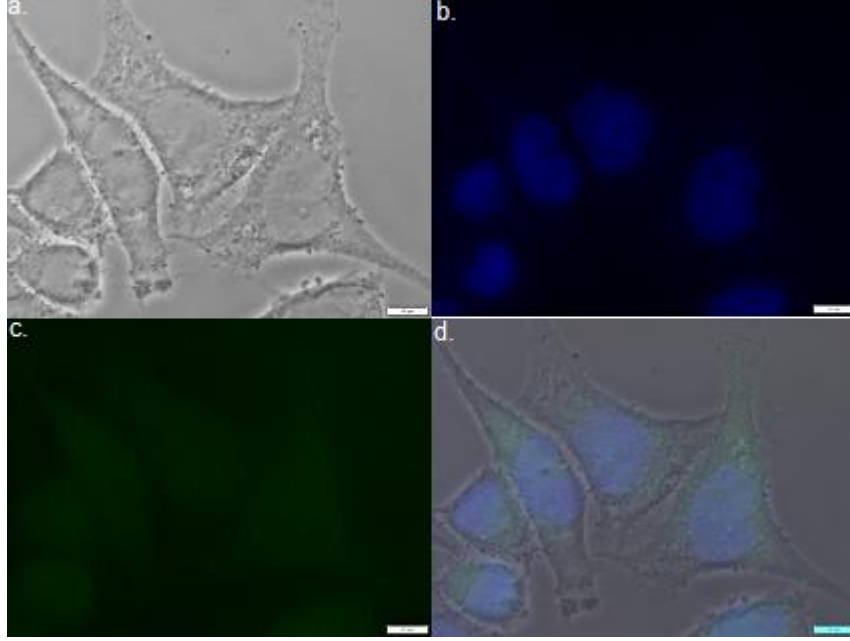
4.24alt). Bu durum, kopolimerlerin düşük konsantrasyonlarda kısmi de olsa endositoz dışı yollardan alındığının doğrudan bir göstergesidir.

Yüksek konsantrasyonda pAMME ve pAMME-*b*-PPEGMA polimerlerinin hücre alımında etkin rol oynayan endositoz aktivitelerinde hücre iskeletinin rolü, hücrelerin nokodazol (Noc) ve sitokalsin D (CytD) kimyasallarının varlığında polimer alımların belirlenmesi ile gerçekleştirilmiştir. Buna göre, pAMME-*b*-PPEGMA polimerinin endositoz yolağı aracılığıyla alımının sitokalsin D ve her iki inhibitörün birlikte kullanıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdiği belirlenmiştir ($p < 0.05$, *t-test*). Bunun sonucunda da pAMME-ko-PEGMA polimerlerinin endositoz ile hücre alınmasında aktin filamentlerinin aktif rol üstlendiği sonucuna varılmıştır.

pAMME-*b*-PPEGMA polimerlerinin hücre içinde dağılımları floresans mikroskopi yöntemi ile belirlenmiştir. Oregon Green boyası ile işaretli polimerler (yeşil renk) bu deneylerde kullanılmıştır. Nükleus mavi renkte ışımaya sahip olan DAPI floresan boyası ile işaretlenmiştir. Hücrelerde lizozom veziküllerini boyamak amacıyla ayrıca Lysotracker boyası da kullanılmaya çalışılmıştır. Ancak, canlı hücrelerde kullanılması gereken bu boya ile yapılan denemelerde hücrelerin mikroskop alttaşları üstünde canlılığını sağlamakta ve boyanın seçici olarak lizozom veziküllerini boyamakta önemli sorunlar ile karşılaşmıştır. Bu nedenle fikse edilmiş hücreler ile floresans mikroskobu deneyleri gerçekleştirilmiş olup organel spesifik boya olarak sadece çekirdek seçici DAPI boyası kullanılmıştır. A549 hücrelerinin pAMME-*b*-PPEGMA polimerleri ile inkübasyonu sonucunda alınan mikrograflar Şekil 4.25'de gösterilmiştir. Buna göre sentezlenen pAMME-*b*-PPEGMA polimerlerin hücre içinde veziküllerde birikmediği, sitozole dağıldığı sonucuna ulaşılmıştır. Floresans mikroskop ile elde edilen mikrograflar akış sitometrisi deneyleri ile ulaşılan sonuçları doğrular niteliktedir.



Şekil 4.24. Floresan boya ile işaretlenmiş PAMME (Mn:9500) (üst) ve PAMME-b-PPEGMA (Mn:14000) (orta) polimerlerinin 3 saat boyunca insan akciğer kanser hücre hattı (A549) tarafından alımlarının endositoz inhibitörleri varlığında (alt) ve yokluğunda akış sitometresi ile 1 saat boyunca incelenmesi. Örnek akış sitometresi diyagramları Ekler'de verilmektedir. Noc:Nokodazol; CytD: Sitokalsin D.

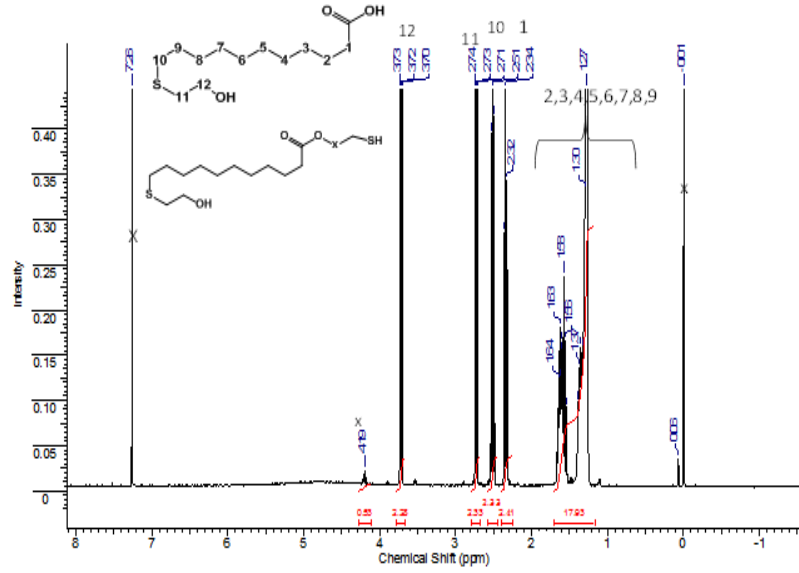


Şekil 4.25. Floresan (yeşil) boya ile işaretlenmiş PAMME-*b*-PPEGMA (Mn:14000) polimerlerinin insan akciğer kanser hücre hattı (A549) tarafından alımlarının floresans mikroskobu ile incelenmesi. (a) Hücrenin faz-kontrast görüntüsü (b) DAPI ile boyanmış hücrelerin çekirdekleri (c) p(AMME)-ko-PEGMA polimerinin hücre içinde dağılımı (d) Farklı kanallarla çekilmiş a, b ve c mikrograflarının çakıştırılması. Skala uzunluğu 10 µm'dir.

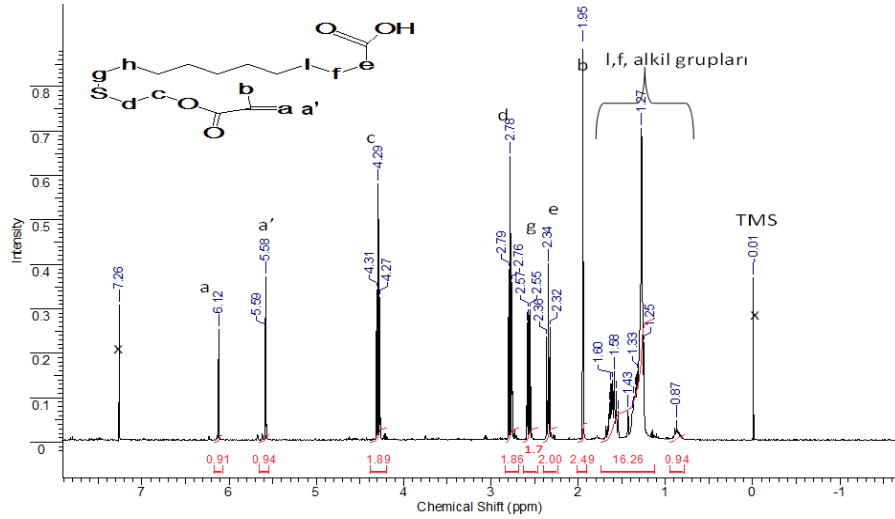
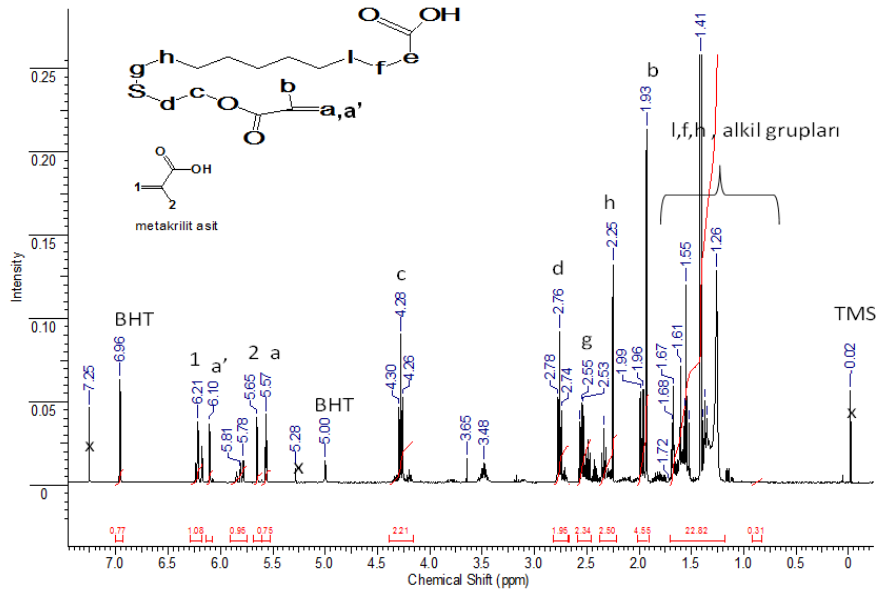
4.6 Yağ Asidi Polimerlerinin Sentezi

Projenin bu kısmında yağ asidi birimlerini içeren iyi-tanımlanmış polimerlerin RAFT tekniği ile sentezi ve bu polimerlerin membran aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Projede ön diğer yağ asitleri ile yapılmış ön denemeler sonucunda ve literatür (Li, vd., 2012) ışığında yağ asidi olarak undekenoik asidin kullanılmasına karar verilmiştir. Ön denemeler sırasında oleik asit ve 10-undekenoik asit kullanılarak Michael katılma reaksiyonuyla termal ve radikalik katılma reaksiyonları incelenmiştir. Bu incelemeler sonucunda termal katılma reaksiyonuyla, doymamış bir yağ asidi olan 10-undekenoik asit ve 2-merkaptetanol kullanılarak yapılan sentez sonucu başarılı olmuş ve monomer sentezine yönelik çalışmalar bu yönde ilerlemiştir. 10-undekenoik asitin (UDA), 2-merkaptetanol ile termal katılma reaksiyonu sonucu Şekil 4.26'da gösterilmektedir. ¹H NMR spektrumu reaksiyon karışımının DCM ve su ile ekstraksiyonundan sonra elde edilmiştir. NMR spektrumundan katılma reaksiyonu verimi hesaplandığında ortamdaki yağ asidinin molce %100'ünün tiyol-en katılma reaksiyonuna girdiği görülmektedir. Ayrıca istenmeyen yan reaksiyon, ME'nin alkol grubu ile UDA'nın karboksilik asit grubu arasında esterleşme reaksiyonunun miktarı hesaplandığında yağ asidinin molce %24'ünün ester oluşturduğu anlaşılmıştır. Bununla birlikte, yağ asidi

esterinin bir sonraki metakrilatlama reaksiyonunda bir etkisi olmaması nedeniyle, esteri uzaklaştırma yönünde bir teşebbüste bulunulmayarak metakrilatlama reaksiyonuna geçilmiştir. Literatürde yaygın olarak rapor edilmiş prosedürler kullanılarak hidroksil grubu ile modifiye edilmiş yağ asidi metakrilolil klorür ile reaksiyona sokulmuştur. Reaksiyon karışımından ürün silika jel kromatografisi saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonrası elde edilen ürünün ^1H NMR spektrumu Şekil 4.27'de gösterilmiştir. Görüleceği üzere, hedeflenen 11-[2-(2-metill-akriloksil)-etil sülfanil]-undekanoik asit (UDAMA) monomeri %100 saflıkta elde edilmiştir.



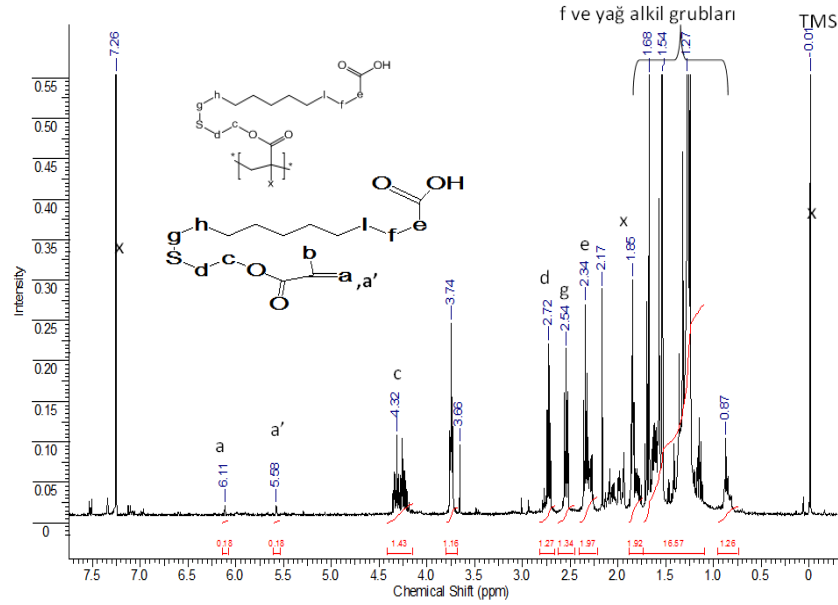
Şekil 4.26. 10-undekanoik asit ve 2-merkaptetanolün termal katılma reaksiyonunun DCM-su ekstraksiyonundan sonra çekilmiş ^1H -NMR spektrumu (CDCl_3).



Şekil 4.27. 11-[2-(2-metil-akriloksil)-etil sülfanil]-undekanoik asit (UDAMA) monomerinin kolon kromatografisi ile saflaştırılmasından önce (üst) ve sonra (alt) alınmış ¹H-NMR spektrumları (CDCl₃).

İstenen monomer yapısı saf bir şekilde elde edildikten sonra, yağ asidi monomerinin serbest radikal polimerizasyonu gerçekleştirilerek ön polimerizasyon denemeleri yapılmıştır. Bu ön denemelerde monomer konsantrasyonu, çözücü türü, monomer/başlatıcı oranı gibi parametrelerin yağ asidi monomerinin homopolimerizasyonuna etkileri incelenmiştir. Bu ön deneyler sonucunda; monomer konsantrasyonu 1 M ve üstünde iken ve THF çözügen olarak kullanıldığında homopolimerizasyonun yüksek dönüşümlerle gerçekleştiği gözlenmiştir (Şekil 4.28). 1 M monomer konsantrasyonu kullanılarak gerçekleştirilen iki farklı homopolimerizasyon deneyinde monomer/AIBN oranı 200/1 ve 20/1 iken, sırasıyla %44 ve %78 monomer

dönüşümü elde edilmiştir. Monomerin polimere dönüşümü, monomerin karakteristik doymamış bağ proton sinyallerinin (a ve a') polimer+monomer sinyaline (c) oranlamasıyla hesap edilmiştir. Homopolimerizasyon deneyleri yeni yağ asidi monomerinin uygun şartlar sağlandığında radikalik mekanizma ile polimerleştiğini açıkça ispatlamıştır. Böylece monomerin büyüklüğü dikkate alındığında önemli bir aşama kaydedilmiştir.

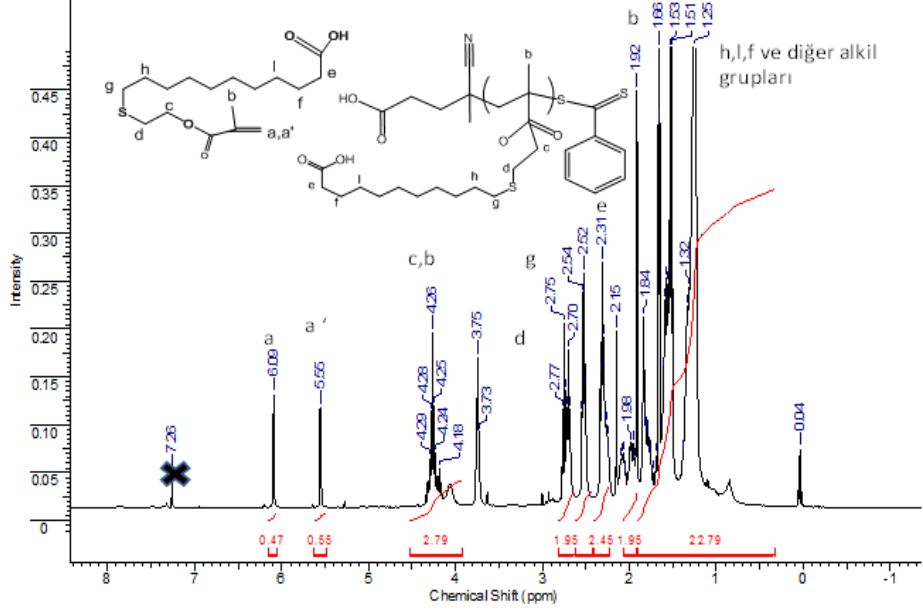


Şekil 4.28. UDAMA monomerinin serbest radikal polimerleşmesi sonrası ¹H NMR spektrumu (saflaştırılmadan önce) ([Monomer] = 1M, monomer: AIBN = 20:1, çözügen: THF).

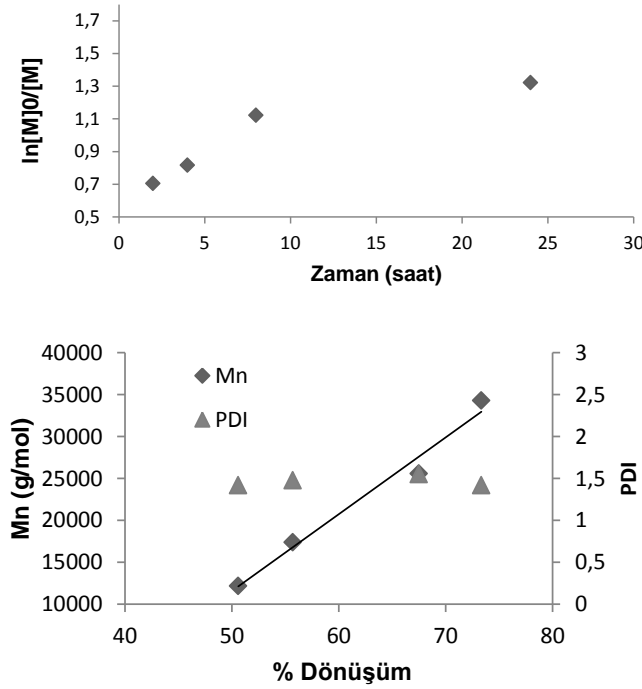
Sonraki adımda UDAMA monomerinin RAFT polimerizasyonu denemelerine geçilmiştir. Bu denemelerde RAFT ajanı olarak -siyano-4-(fenilkarbonotiyoloji)pentanoik asit ve başlatıcı olarak AIBN kullanılmıştır. Gerçekleştirilen RAFT polimerizasyonları ve elde edilen monomer dönüşüm değerleri Tablo 4.5'de belirtilmiştir. Şekil 4.29'da ise örnek olarak elde edilen bir polimerizasyon karışımının ¹H NMR spektrumu verilmiştir. Polimerizasyon karışımları aseton içinde çözülüp hekzan içinde çöktürüldükten sonra dönüşmemiş monomer ve ajanlardan uzaklaştırılarak GPC ile analiz edilmişlerdir. Bir polimerizasyon setinin sonuçları Şekil 4.30'da gösterilmektedir. Görüleceği gibi monomer dönüşümü ile sayıca ortalama molekül ağırlık (M_n) değerlerinin lineer artmış olması ve polidispersite indeks değerlerinin (PDI) 1.5'ten düşük olması RAFT kontrollü yağ asidi polimerlerinin sentzlendiğini göstermektedir.

Tablo 4.5. UDAMA'nın RAFT polimerizasyonları ve elde edilen monomer dönüşüm değerleri

Polimerleşme Süresi (Saat)	[Monomer] (M)	[M]/[RAFT]/[AIBN]	Çözücü	Monomer Dönüşümü (%) (NMR)
2	2	200/4/1	Toluen	33
4	2	200/4/1	Toluen	54
8	2	200/4/1	Toluen	55
24	2	200/4/1	Toluen	60
2	4	200/4/1	THF	45
4	4	200/4/1	THF	58
8	4	200/4/1	THF	63
24	4	200/4/1	THF	68
2	4	400/4/1	Asetonitril	51
4	4	400/4/1	Asetonitril	56
8	4	400/4/1	Asetonitril	68
24	4	400/4/1	Asetonitril	74
1	3	200/4/1	Toluen	42
2	3	200/4/1	Toluen	53
3	3	200/4/1	Toluen	55
4	3	200/4/1	Toluen	60
6	3	200/4/1	Toluen	62



Şekil 4.29. UDAMA monomerinin RAFT polimerizasyonu deneyinde 8 saat sonunda elde edilen polimerizasyon karışımının ^1H NMR spektrumu ($[\text{M}]_0 = 4 \text{ M}$; $[\text{M}]_0/[\text{RAFT}]_0/[\text{AIBN}]_0 = 400/4/1$, çözügen: asetonitril).



Şekil 4.30. UDAMA'nın RAFT homopolimerizasyonu kinetik çalışma sonuçları; $\ln(\text{M}_0/\text{M})$ – zaman, sayıca ortalama molekül ağırlığı (Mn) – dönüşüm ve polidispersite indeksi (PDI) – dönüşüm grafikleri $[\text{M}]_0 = 4 \text{ M}$; $[\text{M}]_0/[\text{RAFT}]_0/[\text{AIBN}]_0 = 400/4/1$; çözügen= Asetonitril.

Sentezlenen UDAMA homopolimerlerinin suda çözünmediği gözlemlenmiştir. Polimerlerin suda çözünürlüğünü arttırmak için elde edilen yağ asidi monomerinin farklı komonomerlerle RAFT kopolimerizasyonlarının denenmesine karar verilmiştir. Öncelikle proje önerisinde yer aldığı şekilde PEGMA komonomeri ile kopolimerler üretilmesine çalışılmıştır ancak PEGMA ve UDAMA monomerlerinin her ikisinin de büyük moleküller olması nedeniyle verimli bir kopolimerleşme elde edilememiştir. UDAMA monomerinin içeriğinde bulunan uzun alkil zincirinin varlığı nedeniyle hidrofobik karakterine uygun olarak t-bütil metakrilat (t-BMA) ile kopolimerleştirilmesi denenmiştir. Oluşacak kopolimerlerden t-bütil grubunun uzaklaştırılması ile UDAMA-metakrilik asit kopolimerlerinin üretilmesi öngörülmüştür. Suda çözünürlüğü sağlayabilmek adına öncelikle t-BMA: UDAMA mol oranı 4: 1 olarak kopolimerizasyon denemesi yapılmıştır. Tablo 4.6'dan görüleceği gibi t-BMA'nın dönüşümü, UDAMA'ya göre oldukça yüksektir ve oluşan ürünün rasgele kopolimer olması mümkün görünmemektedir. UDAMA'nın dönüşümü de ilk saat içinde tamamlanmış görünmektedir. Ayrıca dönüşümün lineer olarak artmaması polimerizasyonun RAFT kontrolü olmadan gerçekleştiğini göstermiştir. Bu deneylere paralel UDAMA monomerinin metakrilik asit (MAA) monomeriyle doğrudan kopolimerleşme deneyleri de gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kopolimerizasyon deneylerinin sonuçları Tablo 4.7'de özetlenmiştir. Bu kopolimerizasyonlarda komonomerlerin dönüşüm değerleri birbirine paraleldir ve sonuçta elde edilen polimerlerin birlikte amfifilik yapıda ve suda çözünebilir özelliklere sahip olduğu gözlemlenmiştir. Böylece çalışmalara UDAMA ve MAA komonomer çifti ile devam edilmiştir.

Tablo 4.6. UDAMA ve tert-bütil metakrilat (t-BMA) kopolimerizasyon sonuçları. [Toplam Monomer]= 3M. Beslemedeki [UDAMA]/[t-BMA]/[RAFT]/[AIBN] mol oranı= 10/40/1/0.25

Süre (Saat)	Toplam Monomer Dönüşümü (%)	UDAMA Dönüşümü (%)	t-BMA Dönüşümü (%)
2	90	58	98
3	93	66	99
4	90	58	99
6	94	55	99

Tablo 4.7. UDAMA ve metakrilik asitin (MAA) kopolimerizasyon sonuçları. [Toplam Monomer]= 3M, Beslemedeki [UDAMA]/[MAA]/[RAFT]/[AIBN] mol oranı= 60/40/1/0.25

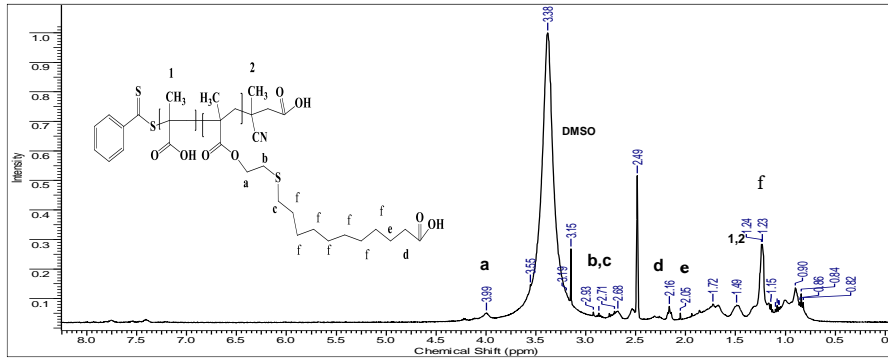
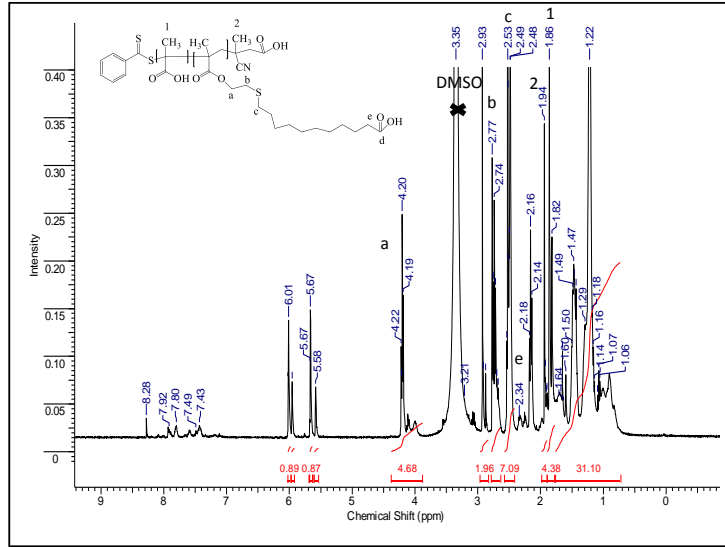
Süre	Toplam Monomer Dönüşümü (%)	UDAMA Dönüşümü (%)	MAA Dönüşümü (%)
2	44	43	46
3	55	49	65
4	60	55	66
8	66	61	73

Farklı UDAMA içeriğine sahip olan kopolimerler (molce %20 veya %50 UDAMA),değişen [UDAMA]/[MAA]/[RAFT]/[BAŞLATICI] mol oranlarında (10/40/1/0.25 ya da 25/25/1/0.25) monomer konsantrasyonu (1 M) sabit kalacak şekilde sentezlendi. Monomer dönüşümleri ¹H-NMR spektrumları yardımı ile hesaplandı (Şekil 4.31). Tablo 4.8'de, (p(MAA-ko-UDAMA)) kopolimerlerinin monomer dönüşümleri, sayıca ortalama molekül ağırlığı (M_n), polidispersite indeksi (PDI) belirtilmiştir. Tabloda belirtildiği üzere monomer dönüşümlerinin benzer olmasına rağmen, beslemedeki UDAMA içeriğinin artmasıyla birlikte, polimerizasyonların RAFT kontrollü mekanizmalarını kaybettiği, PDI ve M_n değerlerinde belirgin bir artış olduğu görülmektedir. Bu durum, UDAMA'nın kimyasal yapısından kaynaklı zincir transfer reaksiyonlarına atfedilmiştir.

Tablo 4.8. UDAMA ve MAA kopolimerizasyonlarının zaman bağlı monomer dönüşümleri, sayıca ortalama molekül ağırlıkları (M_n), polidispersite indeksleri (PDI) ve kompozisyonları

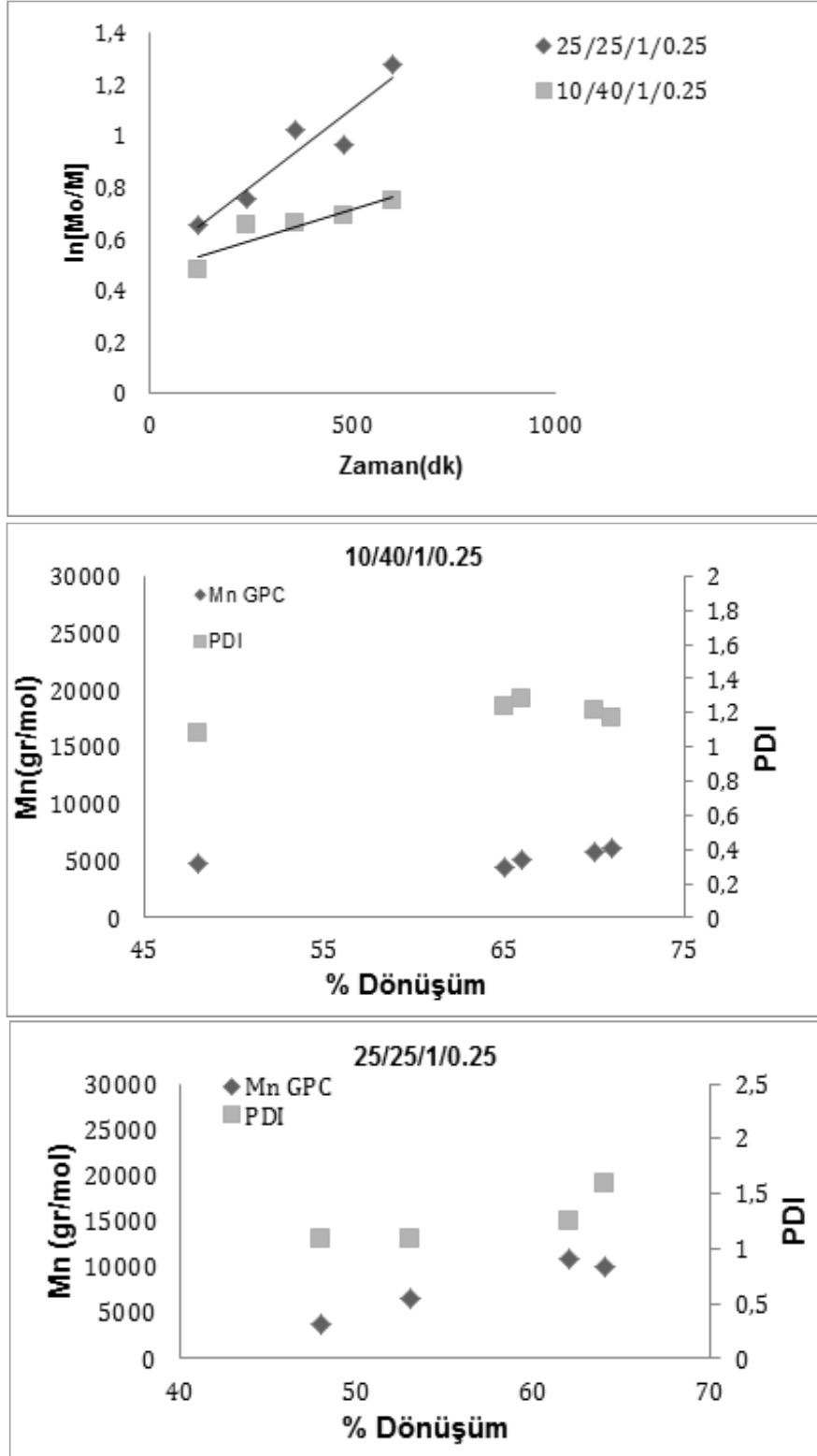
Polimerizasyon Süresi (saat)	M_n (g/mol)	PDI	Dönüşüm (%)	% UDAMA İçeriği
[UDAMA]/[MAA]/[RAFT]/[ACVA]= 10/40/1/0.25				
2	4800	1,08	48	34
4	4400	1,24	65	32
6	5100	1,28	66	32
8	5900	1,21	70	16
10	6100	1,17	71	10

[UDAMA]/[MAA]/[RAFT]/[ACVA]= 25/25/1/0.25				
2	3800	1,08	48	70
4	6500	1,08	53	97
6	10000	1,59	64	52
8	11000	1,25	62	59



Şekil 4.31. 6 saatlik polimerleşme sonrası, UDAMA ve MAA kopolimerizasyon karışımının ^1H NMR spektrumu (üstte); polimerizasyonun saflaştırılmış ^1H NMR spektrumu (altta). ([Monomer] = 1 M; beslemedeki [UDAMA]/[MAA]/[RAFT]/[ACVA]= 10/40/1/0.25).

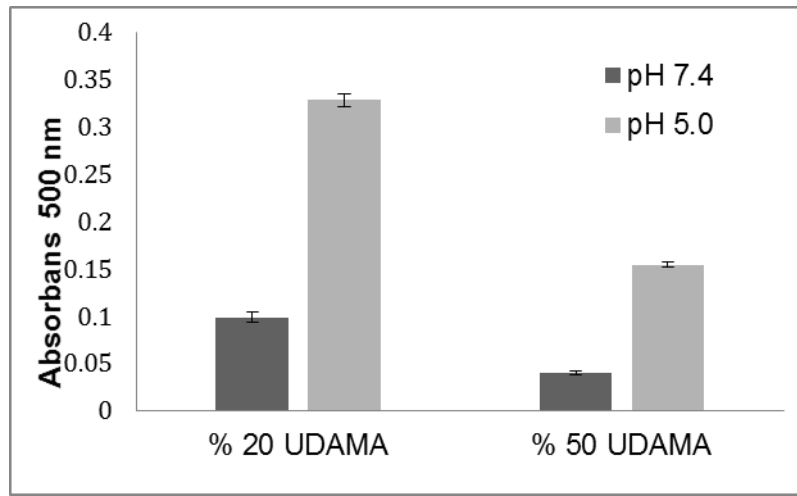
Şekil 4.32, RAFT kopolimerizasyonlarının kinetik sonuçlarını göstermektedir. Tüm polimerizasyonlarda, $\ln [M]_0/[M]$ değeri zamanla lineer artış göstermiştir. Bu polimerizasyonun pseudo birinci derece kinetiğe sahip olduğunu işaret eder. Ayrıca monomer dönüşümüyle molekül ağırlığının lineer artışı gözlenmiştir. Tüm bu sonuçlar, RAFT kontrollü polimerizasyonun gerçekleştiğini göstermektedir.



Şekil 4.32. UDAMA ve MAA komonomerlerinin RAFT kopolimerizasyonu kinetik çalışmaları. (Üst) $\ln [M]_0/[M]$ zaman; (Orta ve Alt) Sırasıyla beslemede toplam monomer içinde %20 ve %50 UDAMA içeren kopolimerlerin monomer dönüşümüne karşı M_n ve PDI grafikleri.

4.7 Yağ Asidi Polimerlerinin Karakterizasyonu

P(MAA-ko-UDAMA) kopolimerlerinin sulu çözeltilerinin pH'ya duyarlı faz davranışları UV-vis spektrofotometre ile belirlendi (Şekil 4.33). Kopolimerlerin amfifilik karakteri ve asidik pH'da MAA birimlerinin protone olup hidrofobisitenin artması nedeniyle kopolimer zincirleri çözünür durumdan çözünmez duruma geçiş yaparlar. Bu da çözeltilerin türbiditesini ve ışık absorbansını artırır. Bu durum Şekil 4.33'de açıkça iki kopolimer için de görülmektedir. Her iki kopolimerin absorbans değerlerinin farklı oluşu kullanılan kopolimerlerin molekül ağırlıklarının dolayısıyla molar konsantrasyonlarının farklı olmasından kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.33. Değişen UDAMA içeriğine sahip kopolimerlerin (beslemedeki toplam monomerin %20 ve %50), pH 5.0 ve pH 7.4 tampon çözeltiler içerisinde absorbans ölçümleri. Polimerlerin konsantrasyonları 4 mg/ml'dir. Besleme kompozisyonları %20 ve %50 olan örneklerin kopolimer kompozisyonları %23 ve %65'dir.

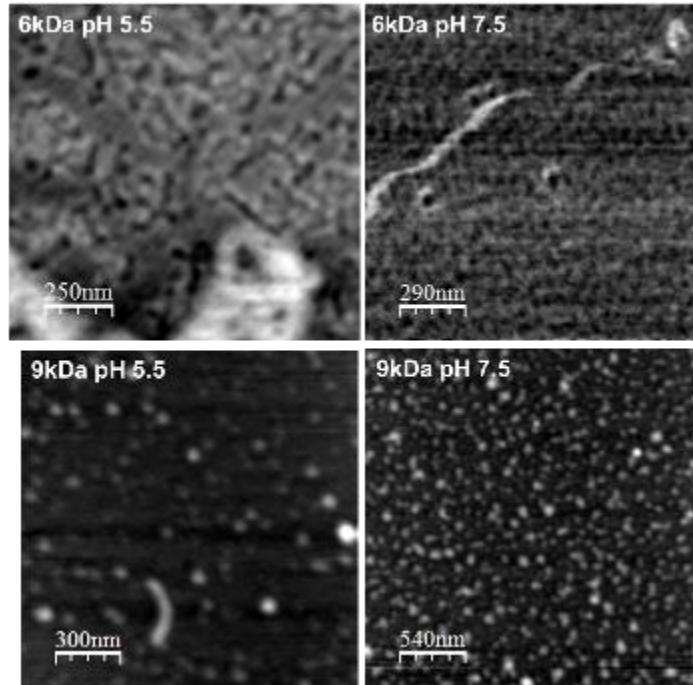
Polimerin dinamik ışık saçılması (DLS) ölçümlerinin sonuçları Tablo 4.9'da verilmektedir. MAA birimlerinin, pH 7.4'de deprotone olması sebebiyle polimerler unimer yapıdadır. pH 5.0'da polimerlerin hidrodinamik çaplarının artması, MAA birimlerinin protone olup hidrofobisitenin artması ve elektrostatik yükünün azalması ile polimerlerin zincir arası etkileşimlerinin artmasından kaynaklanabilir. Yüksek UDAMA içeriğine sahip kopolimerlerin, daha küçük çapa sahip olmaları, polimerlerin zincir-içi hidrofobik etkileşimlerinin arttığına işaret eder.

Şekil 4.34, hafifçe dokunma modunda alınmış molce %20 UDAMA içeriğine sahip iki farklı molekül ağırlıktaki (6000 ve 9000 g/mol) kopolimerlerin, pH 5.0 ve pH 7.4'de alınmış AFM görüntülerini sunmaktadır. Görüleceği üzere aynı UDAMA içeriğine sahip kopolimerlerden

düşük molekül ağırlığına sahip olanı her iki pH değerinde de zincir yapısını korumaktadır. 9 kDa'lık kopolimer her iki pH değerinde de açık bir şekilde küresel partiküller oluşturmuştur.

Tablo 4.9. Molce %20 ve %50 UDAMA içeren kopolimerlerin tampon çözelti içerisindeki DLS sonuçları (pH 5.0 ve 7.4). Besleme kompozisyonları %20 ve %50 olan örneklerin kopolimer kompozisyonları %23 ve %65'dir

	pH 7.4		pH 5.0	
UDAMA içeriği	20 %	50 %	20 %	50 %
Hidrodinamik Çap (nm)	8,3±1,0	5,9±0,5	10,1±0,0	8,44 ± 0,5



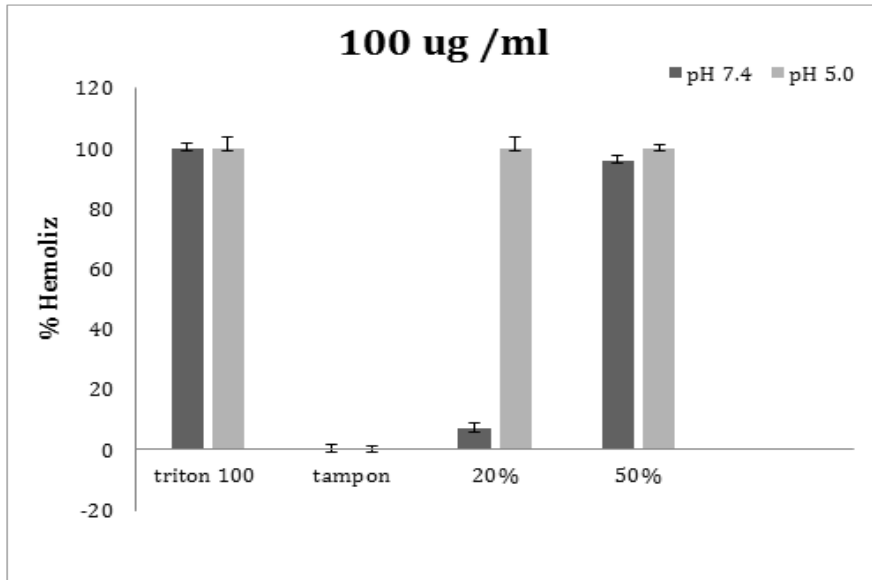
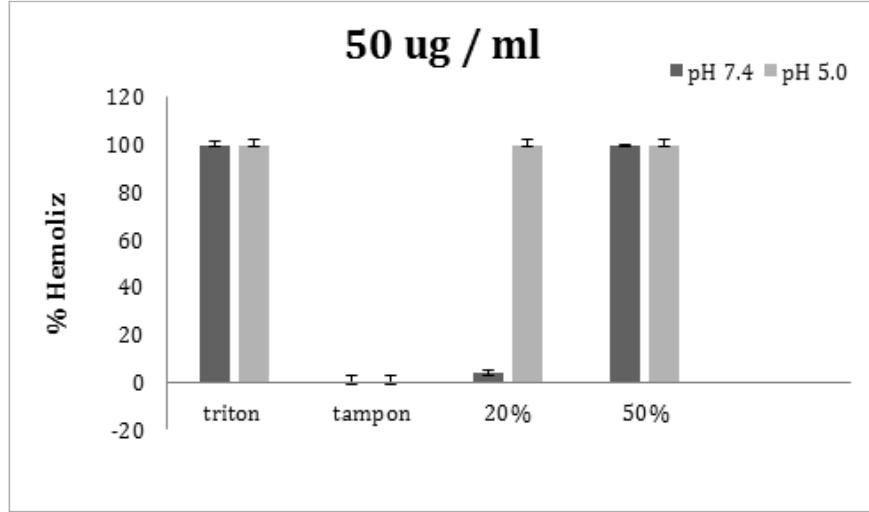
Şekil 4.34. Molce %20 UDAMA içeriğine sahip iki farklı molekül ağırlıktaki (6000 ve 9000 g/mol) kopolimerlerin (besleme kompozisyonu %20), pH 5.0 ve pH 7.4'de alınmış AFM görüntüleri.

4.8 Yağ Asidi Polimerlerinin Membran Aktivitelerinin İncelenmesi

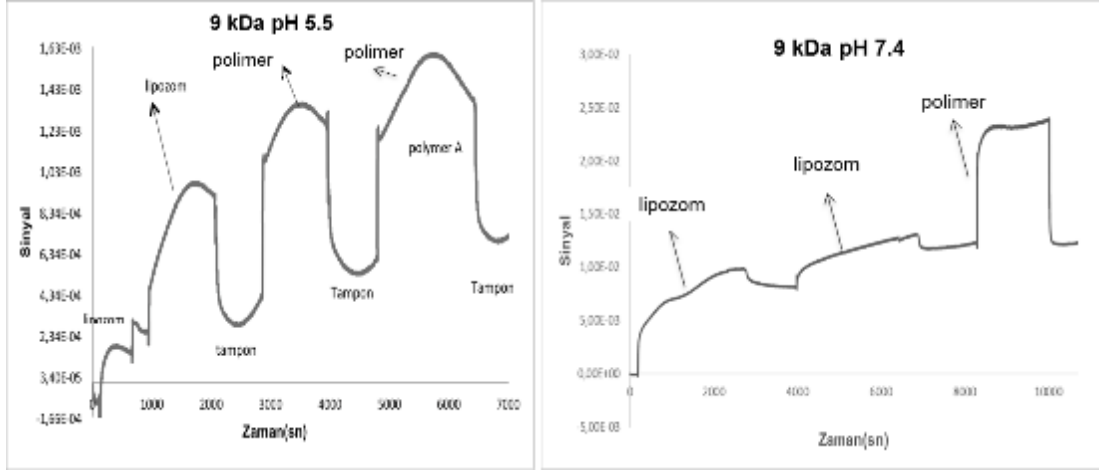
P(MAA-ko-UDAMA) kopolimerlerinin kırmızı kan hücre membranına etkileri hemoliz deneyleri ile belirlendi. %23 ve %65 UDAMA içeriğine sahip kopolimerler (besleme kompozisyonları, sırasıyla %20 ve %50), triton x-100 (pozitif kontrol), polimer içermeyen tampon çözeltiler (negatif kontrol) kırmızı kan hücreleri ile 1 saat 37°C'de inkübe edildiler. Hemolitik aktivite iki farklı kopolimer konsantrasyonunda (50 ve 100 µg/ml) belirlendi. Şekil

4.35’de sonuçlar görülmektedir. İki konsantrasyon değerinde de %23 UDAMA içeriğine sahip olan kopolimerin (besleme kompozisyonu %20) istenilen hemolitik aktiviteyi gösterdiği ve potansiyel bir membran bozucu ajan olabileceği görülmektedir. Etkileyici bir şekilde bu kopolimerin pH 5.0’da %100, pH 7.4 ise %10’un altında hemolitik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. %65 UDAMA içeriğine sahip olan kopolimer (besleme kompozisyonu %50) ise, %23 UDAMA içeren kopolimere kıyasla, hidrofobik karakterinin fazla olmasından dolayı her iki pH değerinde de membran bozucu özellik göstermiştir. pH 7.4’de asidik gruplarının deprotone olmasına rağmen, UDAMA içeriğin yüksek olması sebebiyle yeterli hidrofilik özellik gösterememiştir.

Proje kapsamında P(MAA-ko-UDAMA) kopolimerlerinin membran aktiviteleri hemoliz deneylerine ek olarak yüzey plazmon rezonans (SPR) ölçümleri ile de belirlenmiştir. Böylece yeni geliştirilen bu yöntemin sonuçları hemoliz deneylerinden elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılmıştır. Şekil 4.36, %20 UDAMA içeriğine sahip kopolimerin (M_n 9000 g/mol) (besleme kompozisyonu %20) pH 5.0 ve pH 7.4’de lipid tabakası kaplı SPR çipi üzerinde alınmış ölçüm sonuçlarını göstermektedir. Çip üzerinde hazırlanan lipid tabakası endozom membranını taklit edecek kompozisyonda hazırlanmıştır. Şekil 4.36’da görüldüğü gibi P(MAA-ko-UDAMA) kopolimerleri pH 7.4’de negatif yüklü olmaları nedeniyle negatif yüklü fosfatidilkolin lipid tabakasıyla etkileşmez. Ortamın asiditesi arttığında, pH 5.0’da kopolimer negatif yükünü kaybeder, hidrofobisitesi artar. Kopolimerdeki lipofilik yapı, çip yüzeyindeki lipofilik yapı ile hidrofobik kuvvetler aracılığıyla etkileşir. Bu etkileşim SPR sensogramında polimerin yüzeye bağlanması şeklinde ölçülmektedir. Bu sonuçlar, aynı kopolimerin hemoliz deneyleri sonuçları ile uyum içindedir.



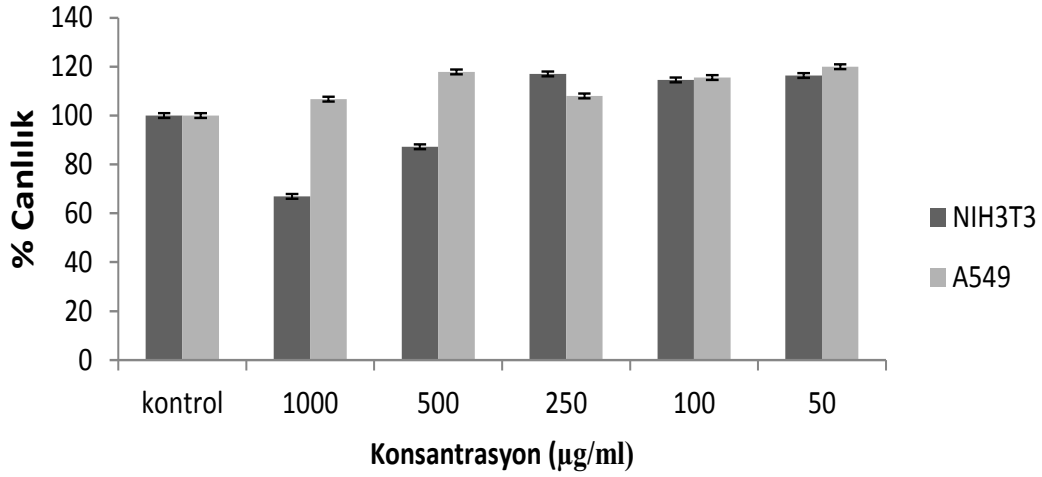
Şekil 4.35. P(MAA-ko-UDAMA) kopolimerlerinin iki farklı kopolimer konsantrasyonunda pH'ya bağımlı hemolitik aktivitesi. Grafik içinde kopolimerizasyon besleme kompozisyonları gösterilmiştir. Besleme kompozisyonları %20 ve %50 olan örneklerin kopolimer kompozisyonları %23 ve %65'dir.



Şekil 4.36. P(MAA-ko-UDAMA) kopolimerinin (M_n 9000 g/mol, PDI 1.6, molce %20 UDAMA) pH 5.0 ve 7.4'de endozom membranını taklit eden lipid katmanı ile etkileşiminin SPR ile ölçülmesi.

4.9 Yağ Asidi Polimerlerinin Hücre Canlılığına Etkileri

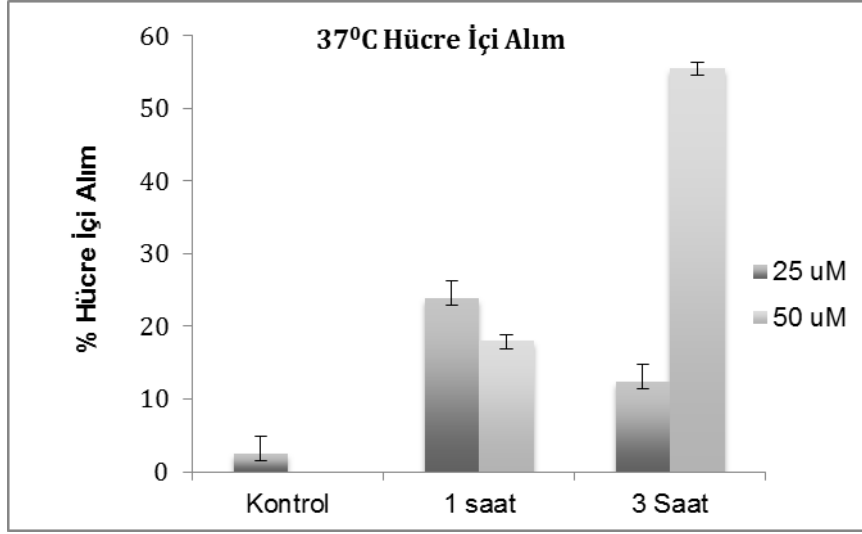
Kopolimerlerden %20-23 UDAMA içeriğine sahip olan istenen pH'ya bağımlı membran aktivitesini gösterdikleri için sadece bu kopolimerin toksisitesi incelenmiştir. NIH3T3 fare fibroblast hücre hattı ve A549 insan akciğer kanseri hücre hattı kullanılmıştır. Kopolimerlerdeki RAFT uç grubunun olası toksik özelliği dikkate alınarak, toksisite deneyleri öncesi aminoliz reaksiyonu yardımıyla polimerlerin RAFT uç grubu uzaklaştırılmıştır. UV- VIS spektroskopik ölçümü, polimerlerin RAFT uç grubunun uzaklaştığını göstermiştir (veri gösterilmemiştir). P(MAA-ko-UDAMA) kopolimerinin (M_n :10 kDa, PDI 1.3) 72 saat inkübasyon süresi için hücre canlılığına etkisi MTT yöntemiyle belirlendi (Şekil 4.37). Sonuçlar bu kopolimerin çalışılan konsantrasyon aralığında A549 kanser hücreleri üzerinde toksik etkisinin olmadığını göstermiştir. NIH3T3 hücrelerinde kopolimer doza bağlı toksisite göstermiştir. Ancak kopolimer, 1000 $\mu\text{g/ml}$ gibi yüksek konsantrasyonların üzerinde toksik etkiye sahiptir. Sonuç olarak yüksek hemolitik aktivite gösteren yağ asidi kopolimerinin (M_n 10 kDa, %20 UDAMA içeriği) iki farklı hücre hattı üstünde önemli bir toksik etkisi olmadığı görülmüştür.



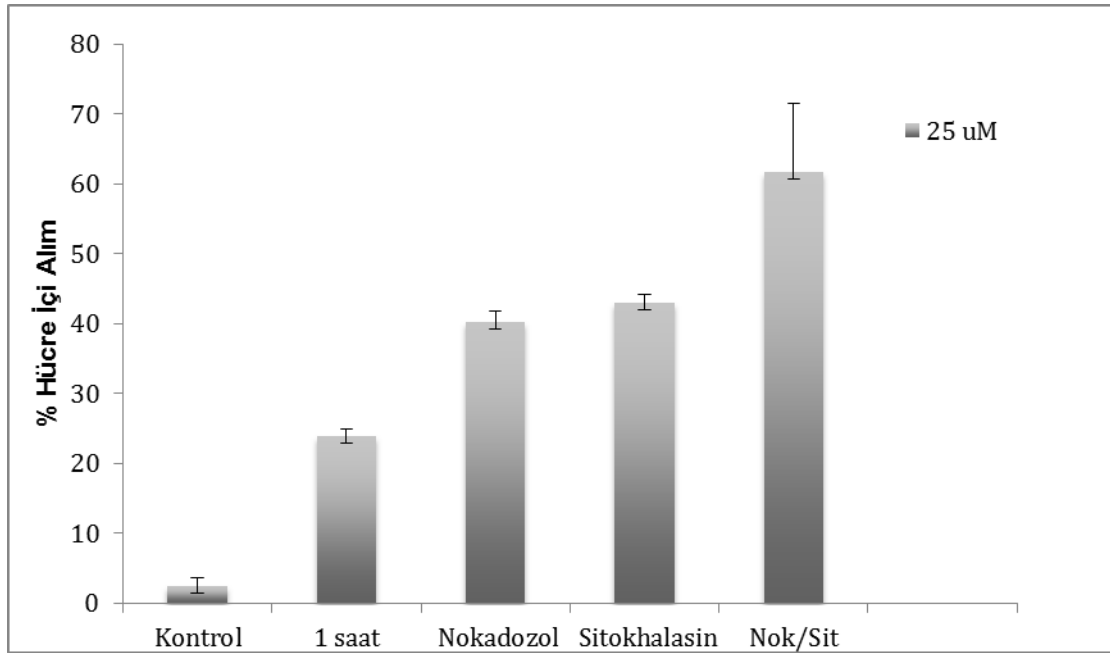
Şekil 4.37. %20 UDAMA içeren P(MAA-ko-UDAMA) kopolimerlerinin NIH3T3 ve A549 hücrelerinin canlılığına etkileri. İnkübasyon süresi 72 saat.

4.10 Yağ Asidi Polimerlerinin Hücreler Tarafından Alımı ve Hücre İçi Dağılımları

Elde edilen membran aktif yağ asidi kopolimerinin (M_n :9000 g/mol, PDI= 1.6), hücre içi alımı ve alım mekanizması polimerin Oregon Green floresans boyasıyla işaretlenmesinden sonra akış sitometrisi kullanılarak belirlenmiştir. Polimerin, hücre içi alımında hücre iskeleti bileşenlerinin etkinliği araştırılmıştır. Yağ asidi polimerlerinin hücre içine alım değeri, negatif kontrole (polimer ile inkübe edilmemiş hücrelere) göre ortalama floresan yüzde değeri olarak belirtilmiştir. Hücre alımı deneyleri, bu kopolimerin ileride antikanser tedavi yöntemlerinde taşıyıcı olarak kullanılması potansiyeli gözönünde bulundurularak insan akciğer A549 hücre hattı kullanılarak çalışılmıştır. Polimerin konsantrasyonu, inkübasyon süresi ve endositoz inhibitörlerinin varlığının hücrelerin polimer alımına etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.38 ve 4.39'da gösterilmiştir.



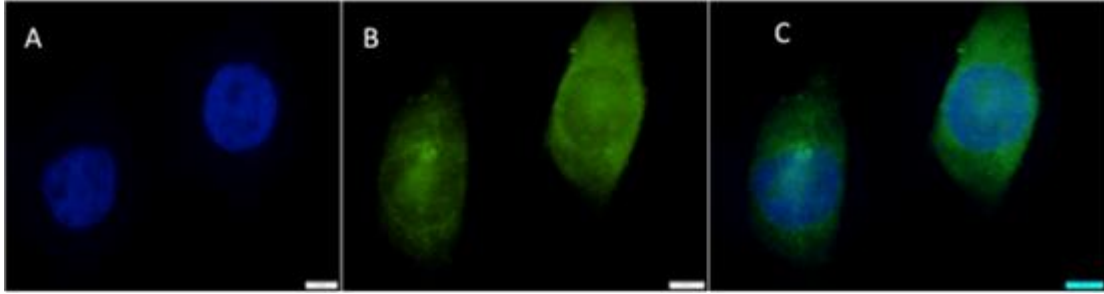
Şekil 4.38. P(MAA-ko-UDAMA) kopolimerinin (9 kDa, %20 UDAMA) konsantrasyon ve zamana bağlı olarak hücre alımının akış sitometresi ile analizi.



Şekil 4.39. P(MAA-ko-UDAMA) kopolimerinin (9 kDa, %20 UDAMA) endositoz inhibitörleri varlığında hücre alımının akış sitometresi ile analizi. İnkübasyon süresi 1 saat; polimer konsantrasyonu= 25 μ M.

Şekil 4.38'den görüleceği gibi yağ asidi kopolimeri doza ve süreye bağlı olarak hücre içine etkili bir şekilde alınmaktadır. İlginç olarak, endositoz inhibitörleri varlığında yapılan deneylerde polimerlerin hücre içine alınımının, inhibitör yokluğundaki alınımına kıyaslandığında daha fazla olduğu bulunmuştur.

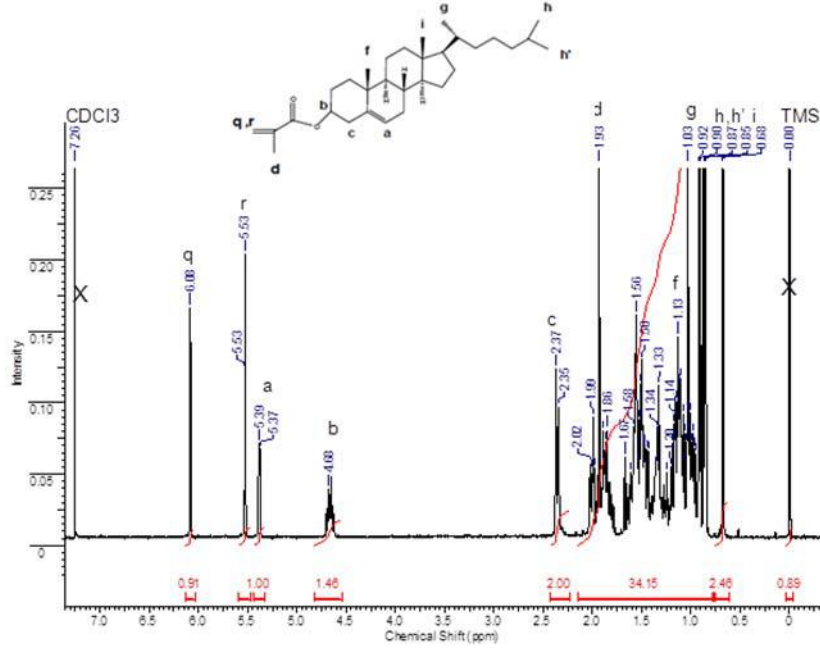
Yağ asidi polimerinin, hücre içinde dağılımı floresan mikroskopi yöntemi ile belirlenmiştir. Oregon Green boyası ile işaretli polimerler (yeşil renk) bu deneylerde kullanılmıştır. Nükleus mavi renkte ışımaya sahip olan DAPI ile boyanmıştır. Polimerin A549 kanser hücresi içerisinde dağılımını gösteren mikrograflar Şekil 4.40'da gösterilmiştir. Yeşil renkli olan yağ polimerinin genel olarak sitozole dağıldığı açık bir şekilde görülmektedir. Bu da endositoz yolu ile alınan polimerlerin etkili bir şekilde endozom ve/veya lizozom veziküllerinden çıktığının önemli bir göstergesidir.



Şekil 4.40. A549 hücrelerinin Oregon Green (OG) ile işaretlenmiş 20 % UDAMA içeren P(MAA-ko-UDAMA)(Mw: 9 kDa) inkübasyonundan sonra elde edilen floresan mikrografları 40X büyütme a) DAPI ile boyanan çekirdek b) OG-işaretlenmiş Kopolimer ile inkübasyon c) a ve b'nin üst üste çakıştırılmasıyla elde edilen görüntü.

4.11 Kolesterol Polimerlerinin Sentezi

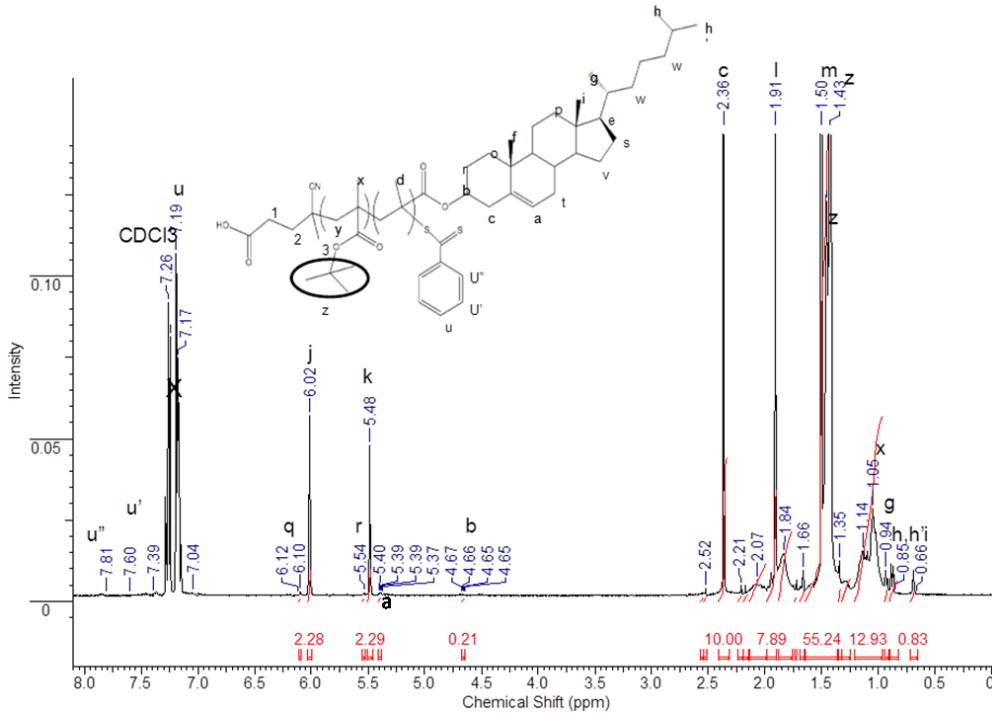
Kolesteril monomeri grubumuzun önceki çalışmalarındaki prosedürler takip edilerek sentezlendi. Sentezlenen monomerin ^1H NMR spektrumu Şekil 4.41'de gösterilmektedir. İstenen ürün 100% saflıkta elde edilmiştir.



Şekil 4.41. Projele sentezlenen kolesteril metakrilat monomerinin ^1H -NMR spektrumu.

4.11.1 Anyonik Kolesterol Polimerlerinin Sentezi

Proje önerisinde belirtildiği gibi, proje kapsamındaki amaçlarımızdan bir tanesi değişen molekül ağırlıklarda ve kompozisyonlarda kolesteril metakrilat ve metakrilik asit kopolimerlerini (P(CMA-ko-MAA)) sentezlemek ve bu kopolimerlerin hücre membranlarıyla etkileşimlerini test etmektir. Bu amaçla öncelikle değişen molekül ağırlıklarında kopolimerlerin sentezi gerçekleştirilmiştir. P(CMA-ko-MAA) kopolimerlerinin sentezindeki ilk adım kolesteril metakrilat ile uygun çözünürlüğe sahip t-bütill metakrilatın kopolimerlerini (p(CMA-ko-t-BMA)) hazırlamak ve daha sonra bu kopolimerlerin asit hidrolizi ile P(CMA-ko-MAA) kopolimerlerini oluşturmaktır. Bu yaklaşımla ilk olarak değişen molekül ağırlıklarda p(CMA-ko-t-BMA) kopolimerlerinin sentezine yönelik optimizasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.6). Değişen polimerizasyon süreleri ve değişen monomer konsantrasyonları ile gerçekleştirilen tüm deneylerde başarılı polimerizasyon sonuçları alınmıştır. Örnek olarak, 4.2 M monomer konsantrasyonu ile gerçekleştirilmiş deneyde 8 saat sonrası elde edilen polimerizasyon karışımının ^1H -NMR spektrumu Şekil 4.42'de gösterilmiştir.



Şekil 4.42. CMA ve t-BMA kopolimerizasyon deneyinde 8 saat sonunda elde edilen polimerizasyon karışımının ^1H NMR spektrumu (Toplam monomer konsantrasyonu: 4.2 M, [t-BMA]/[CMA]/[RAFT]/[AIBN] mol oranı= 490/10/1/0.2).

Tablo 4.10'da polimerizasyon deneyleri için belirlenen monomerin polimere dönüşüm yüzdesi, RAFT mekanizmasıyla sentezlenmiş polimerlerin GPC'den elde edilmiş deneysel molekül ağırlıkları ve molekül ağırlığı dağılımları (PDI) verilmiştir. Toplam monomer dönüşümü, polimerizasyon karışımlarının ^1H NMR analizlerinden Denklem 4.1'e göre hesaplanmıştır (Harf kodları için bkz Şekil 4.42)

$$Dönüşüm (\%) = \frac{\left[\frac{(f a + f b)}{2} - \frac{(f q + f r)}{2} \right] + \left[\frac{(f m + f z)}{9} - \frac{(f j + f k)}{2} \right]}{\left[\frac{(f a + f b)}{2} + \frac{(f m + f z)}{9} \right]} \times 100 \quad (\text{Denklem 4.1})$$

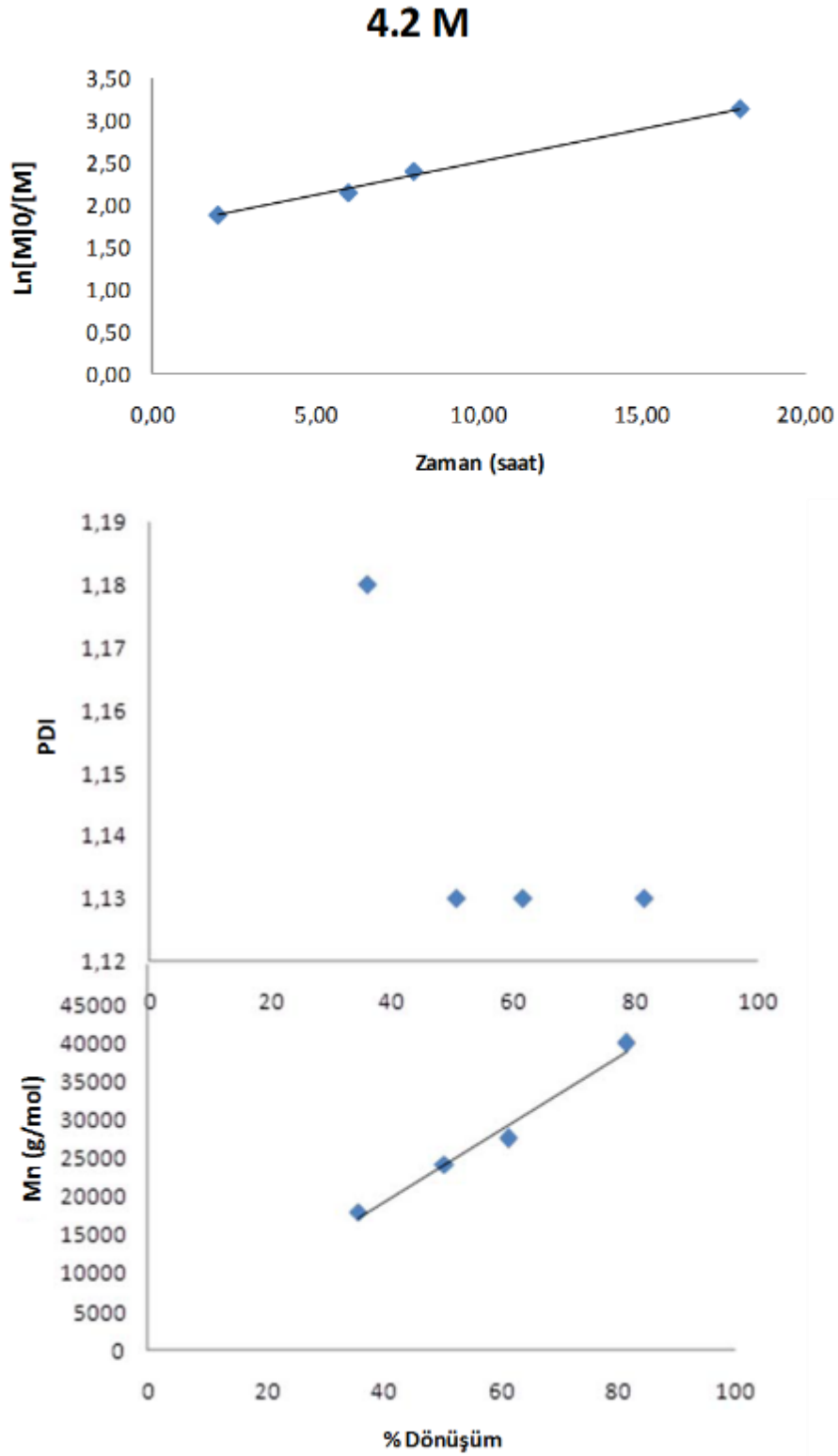
Tablo 4.10. Kolesteril metakrilat (CMA) ve tert-bütül metakrilat (t-BMA)'ın RAFT tekniği ile gerçekleştirilen kopolimerizasyonlarının sonuçları

Toplam Monomer Konsantrasyonu	[t-BMA]/[CMA]/[RAFT]/[AIBN]	Süre (saat)	% Dönüşüm	Mn (g/mol)	PDI
4.2 M	490/10/1/0.2	2	37	23300	1.13
4.2 M	490/10/1/0.2	6	52	31300	1.09
4.2 M	490/10/1/0.2	8	62	36500	1.09
4.2 M	490/10/1/0.2	18	86	58400	1.11
5.9M	200/4/1/0.2	2	37	8433	1.30
5.9M	200/4/1/0.2	6	81	27000	1.13
5.9M	200/4/1/0.2	8	90	29000	1.20
5.9M	200/4/1/0.2	18	95	35500	1.20

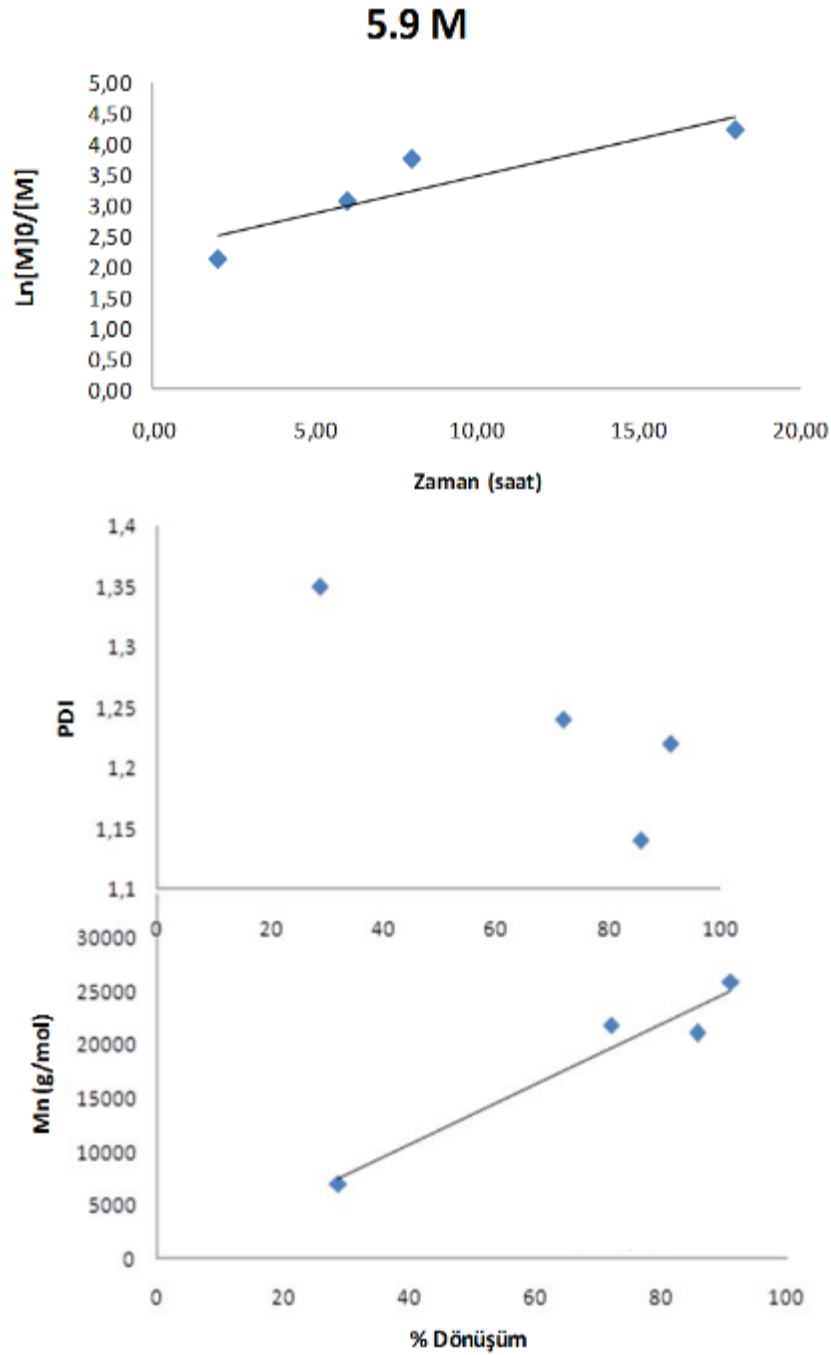
Ölçümler, monomer dönüşümlerinin ($\ln M_0/M$) zamanla doğrusal bir şekilde arttığını, monomer dönüşümleriyle molekül ağırlıklarının doğrusal bir şekilde arttığını, başlangıç monomer/RAFT ajanı oranının artmasıyla molekül ağırlıklarında artış olduğunu ve molekül ağırlığı dağılımlarının 1.3'ün altında olduğunu göstermektedir (Şekil 4.43 ve 4.44). Tüm bu sonuçlar Cma ve t-BMA kopolimerizasyonlarının denenen şartlar altında RAFT mekanizmasıyla kontrol edilmiş olduğunu ispatlar. Ayrıca hedeflendiği şekilde 9,000 ile 60,000 arasında değişen molekül ağırlıklarında kopolimerler üretilebilmiştir.

Sonuç olarak; kolesterilmetakrilat monomeri grubumuz tarafından ön çalışmalar ile belirlenen prosedürleri uygulayarak başarıyla sentezlenmiştir. Bu monomer ve t-BMA kullanılarak değişen molekül ağırlıklarda kopolimerler sentezlenerek kontrollü polimerizasyon koşulları belirlenmiştir. Daha sonra farklı kompozisyonlarda ve değişen molekül ağırlıklarda kopolimerlerin sentezi gerçekleştirilmiştir. Proje önerisinde de belirtilmiş olduğu üzere, proje başlamadan önce yapmış olduğumuz ön çalışmalarda yaklaşık 15,000 g/mol ağırlığında p(CMA-ko-MAA) kopolimerlerinin %8 ve üzeri kolesterol içeriğine sahip kompozisyonlarda suda çözünürlüğünün olmadığı görülmüştü. Bu proje kapsamında yüksek molekül ağırlıklı p(CMA-ko-MAA) kopolimerlerinin sentezi hedeflenmiş ve öncelikle bu yüksek molekül ağırlıklı kopolimerlerin suda çözünebilir kompozisyonlarının belirlenmesi gerekmiştir. Bu bağlamda öncelikle %2, %4, %8 ve %10 kolesterol içeren 10,000 – 60,000 g/mol aralığında molekül

ağırlığına sahip kopolimerler üretilmiş ve suda çözünürlükleri belirlenmiştir. Bu çalışmalar kapsamında üretilen polimerlerin özellikleri Tablo 4.11-4.14'de verilmektedir.



Şekil 4.43. CMA ve t-BMA kopolimerizasyonunun; $\ln M_0/M$ – zaman, M_n – dönüşüm ve PDI – dönüşüm grafikleri ($[M]_0 = 4.2 M$; $[M]_0/[RAFT]_0/[AIBN]_0 = 500/1/0.2$).



Şekil 4.44. CMA ve t-BMA kopolimerizasyonunun; $\ln M_0/M$ – zaman, M_n – dönüşüm ve PDI – dönüşüm grafikleri ($[M]_0 = 5.9$ M; $[M]_0/[RAFT]_0/[AIBN]_0 = 204/1/0.2$).

Tablo 4.11. %2 kolesterol içeren kopolimerlerin özellikleri. Kopolimerizasyon şartları: [Toplam monomer]= 4.2 M; Beslemedeki [t-BMA]/ [CMA]/[RAFT]/[AIBN] Mol oranı= 490/10/1/0.2; Sıcaklık= 68°C; Çözgen: Toluen

Örnek Kodu	Mn (g/mol) GPC)	PDI	Kopolimerin CMA İçeriği (%mol) (NMR)
10K	12400	1.30	1.7
20K	18200	1.30	1.9
40K	42000	1.08	1.6
30K	29000	1.12	1.7
45K	46750	1.09	1.7
50K	52100	1.10	1.7
60K	57200	1.12	1.4
49K	50600	1.16	1.9

Tablo 4.12. %4 kolesterol içeren kopolimerlerin özellikleri. Kopolimerizasyon şartları: [Toplam monomer]= 4.2 M; Beslemedeki [t-BMA]/ [CMA]/[RAFT]/[AIBN] Mol oranı= 480/20/1/0.2; Sıcaklık= 68°C; Çözgen: Toluen

Polimerizasyon Süresi (saat)	Mn(g/mol) (GPC)	PDI	Kopolimerin CMA İçeriği (%mol) (NMR)
2	425	--	--
4	2973	1.48	4.2
6	3758	1.52	3.7
8	12004	1.18	3.6
18	35255	1.19	4.1

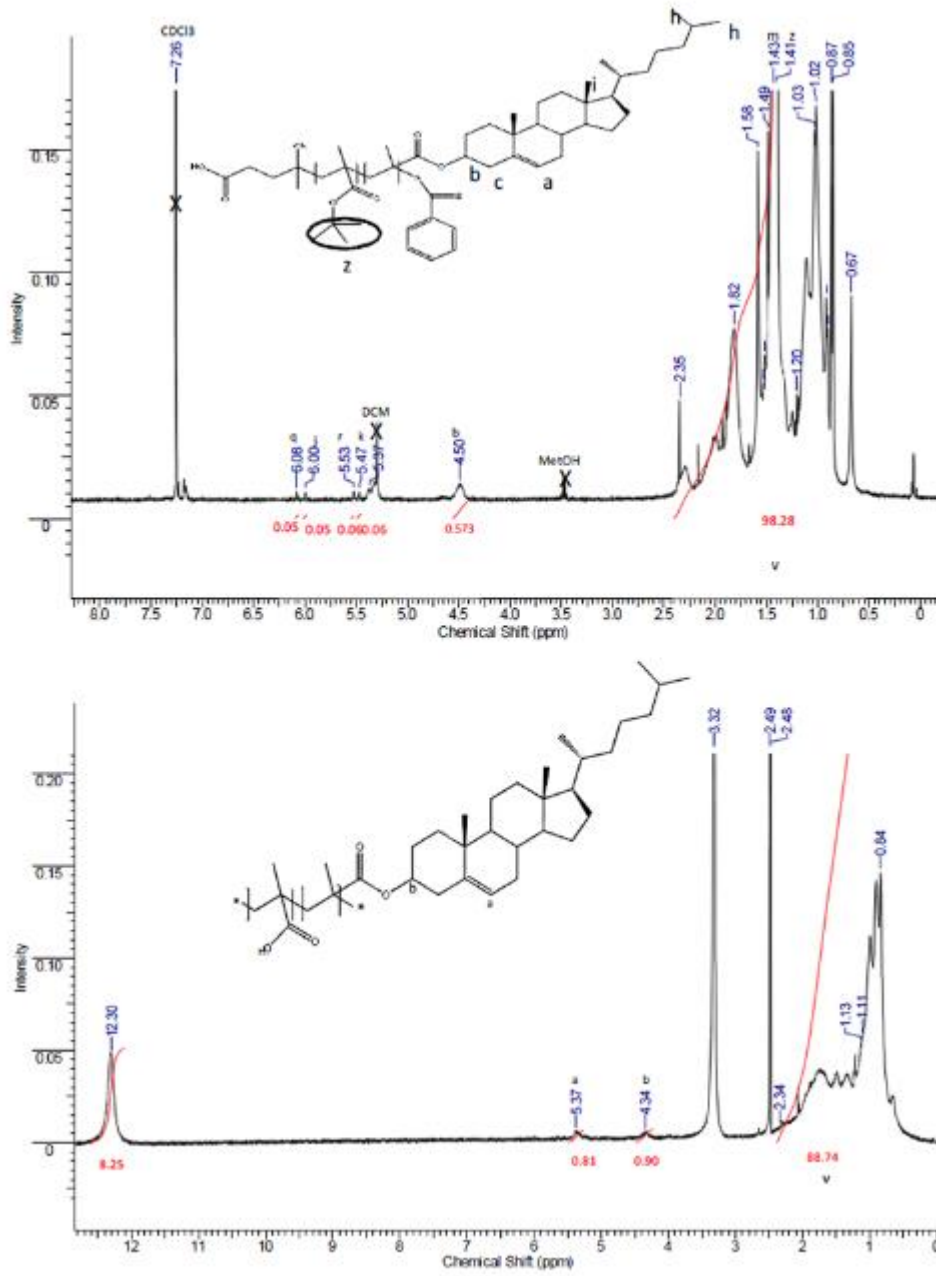
Tablo 4.13. %8 kolesterol içeren kopolimerlerin özellikleri. Kopolimerizasyon şartları: [Toplam monomer]= 4.2 M; Beslemedeki [t-BMA]/ [CMA]/[RAFT]/[AIBN] mol oranı= 460/40/1/0.2; Sıcaklık= 68°C; Çözgen: Toluen

Örnek Kodu	Mn(g/mol) (GPC)	PDI	Kopolimerin CMA İçeriği (%mol) (NMR)
9K	9250	1.31	7.2
22K	21900	1.18	7.8
27K	27000	1.18	8.2
17K	16800	1.01	7.3
66K	66100	1.48	8.2

Tablo 4.14. %10 kolesterol içeren kopolimerlerin özellikleri. Kopolimerizasyon şartları: [Toplam monomer]= 4.2 M; Beslemedeki [t-BMA]/ [CMA]/[RAFT]/[AIBN] Mol oranı= 450/50/1/0.2; Sıcaklık= 68°C; Çözgen: Toluen

Örnek Kodu	Mn(g/mol) (GPC)	PDI	Kopolimerin CMA İçeriği (%mol) (NMR)
10K	9700	1.41	9.8
75K	75000	1.21	10.3
90K	89500	1.29	10.4
35K	34600	1.18	10.6

Sentezlenen kopolimerlerin t-butil grupları TFA varlığında hidroliz edilerek p(CMA-ko-MAA) kopolimerlerine dönüştürüldü. Yapıdaki tüm t-butil koruma gruplarının uzaklaştırıldığı ¹H-NMR analizi ile doğrulandı (Şekil 4.45). ¹H-NMR spektrumlarından görüleceği gibi t-BMA polimerine ait z pik kaybolmuş olup 12.30 ppm de bulunan pik, metakrilik asitin karboksilik asit protonuna aittir. Bunun yanında polimerin yapısında herhangi bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 4.45. Kolesterol içeren kopolimerlerin hidroliz öncesi ve sonrası ¹H-NMR spektrumları. (Polimer özellikleri= Mn= 89500, PDI=1.29, Kolesterol içeriği= % 10).

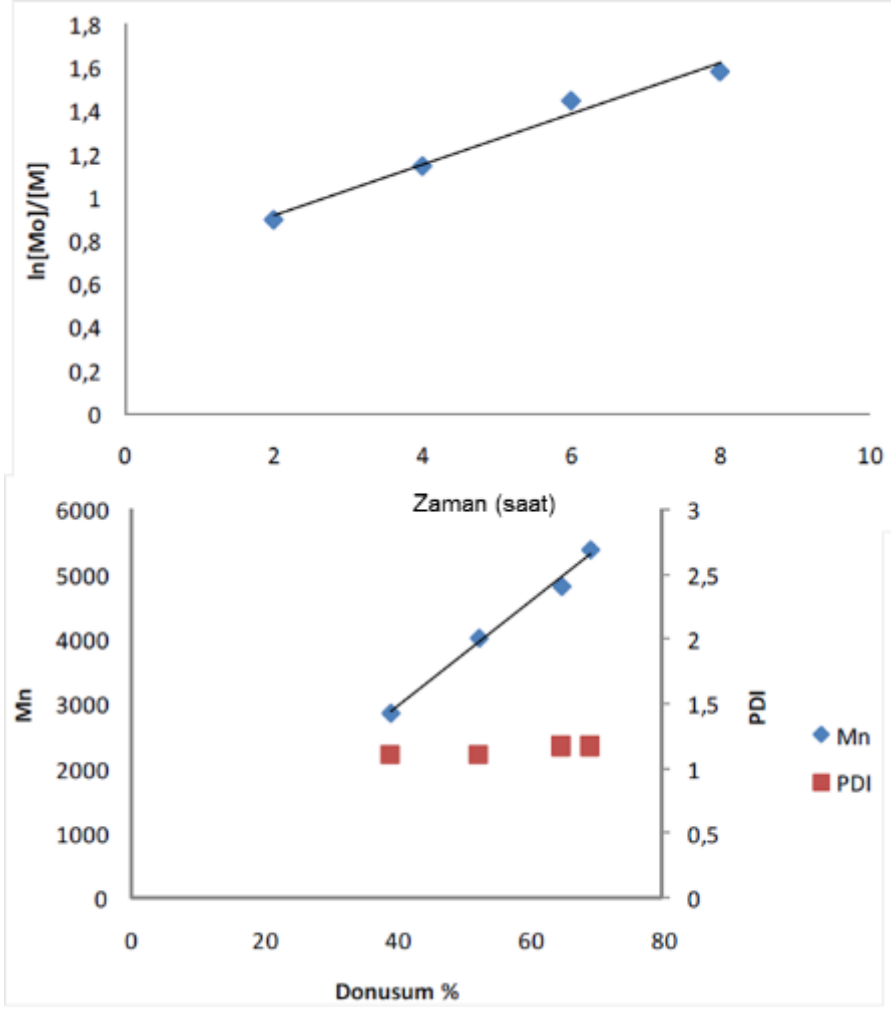
Hidroliz edilmiş polimerlerin öncelikle suda çözünürlükleri test edildi. Bu çalışmalar sonucunda çalışılan molekül ağırlığı aralığında %2 ve %4'lük kopolimerlerin tamamen çözünür olduğu, %8'lik kopolimerlerin su içinde asılı kaldığı (ancak çökmediği), ancak %10'luk kopolimerlerin hiçbir şekilde su fazına geçmediği belirlendi. Bu çözünürlük bulgularının ışığında %8 ve altında kolesterol içeren kopolimerlerin çalışmanın geri kalan kısmında kullanılmasına karar verildi.

4.11.2 Katyonik Kolesterol Polimerlerinin Sentezi

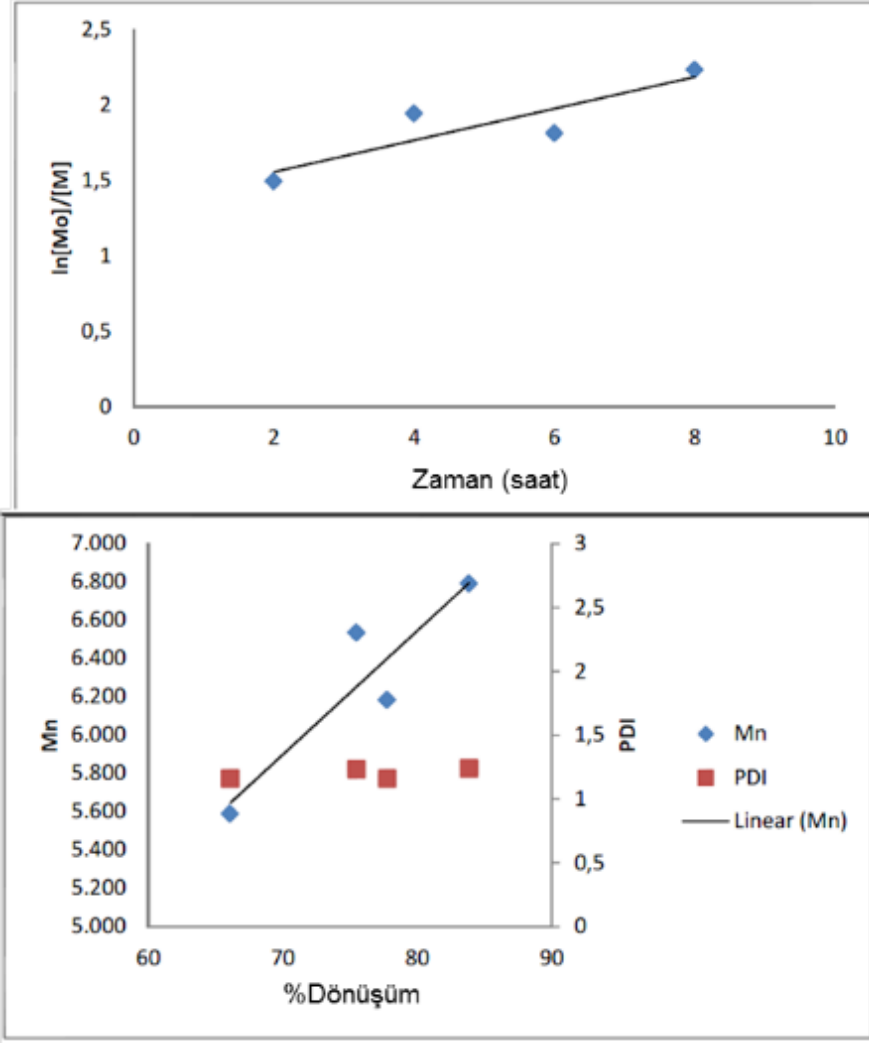
Sentezlenmiş olan anyonik kolesterol kopolimerleri (p(CMA-ko-MAA))'nin, aşağıda ayrıntılı olarak anlatılan pH'ya bağımlı membran aktivite ve hücre içine alım deneylerinin sonucunda istenen aktiviteyi göstermediği anlaşılmıştır. Bu nedenle, proje ara raporlarında da sunulmuş olduğu gibi, kolesterol metakrilatın “proton sünger” etkisi gösterebilecek katyonik kopolimerlerinin hazırlanmasına karar verilmiştir. Proton sünger polimerler, birden fazla amin içeren ve endozomal/lizozomal pH aralığında proton tutabilme kapasitesine sahip polimerlerdir. Bu tür polimerlerin endozom membranını ozmotik basınç farkı nedeniyle bozduğu literatürde ispatlanmıştır. Bu amaçla 2-(amino etil) amino etil metakrilat (AEAEMA) katyonik monomer olarak kullanılarak %10, %20 ve %40 CMA içeren p(AEAEMA-ko-CMA) kopolimerleri sentezlenmiştir. Kopolimerler GPC ve NMR ile analiz edilmişlerdir. Tablo 4.15 ve Şekil 46-48 elde edilen kopolimerlerin özelliklerini sunmaktadır. Görüleceği üzere, kopolimerizasyonlar sırasında monomer dönüşümü sabit radikal konsantrasyonunun varlığını gösterir şekilde zamanla lineer bir artış sergilemiştir. Ayrıca oluşan kopolimerlerin molekül ağırlıkları monomer dönüşümü ile doğru orantılı bir şekilde artmıştır. Molekül ağırlığı dağılımları ise oldukça küçüktür (PDI<1.2). Tüm bu sonuçlar RAFT kontrollü polimerizasyon mekanizmasını göstermektedir. Kopolimerlerin Boc-gruplarının uzaklaştırılmasının ardından %40 CMA içeren katyonik kopolimerlerin suda çözünmediği gözlemlenmiştir. Bunun üzerine hücre deneylerine %20 CMA içeren 5000 Da ağırlığındaki kopolimerle devam edilmesine karar verilmiştir.

Tablo 4.15. %10 kolesterol içeren p(AEAEMA-ko-CMA) kopolimerlerinin özellikleri. Kopolimerizasyon şartları: [Toplam monomer]= 1.5 M; Beslemedeki [AEAEMA]/[CMA]/[RAFT]/[AIBN] Mol oranı= 22.5/2.5/1.0/0.25; Sıcaklık= 68°C; Çözgen: Toluen

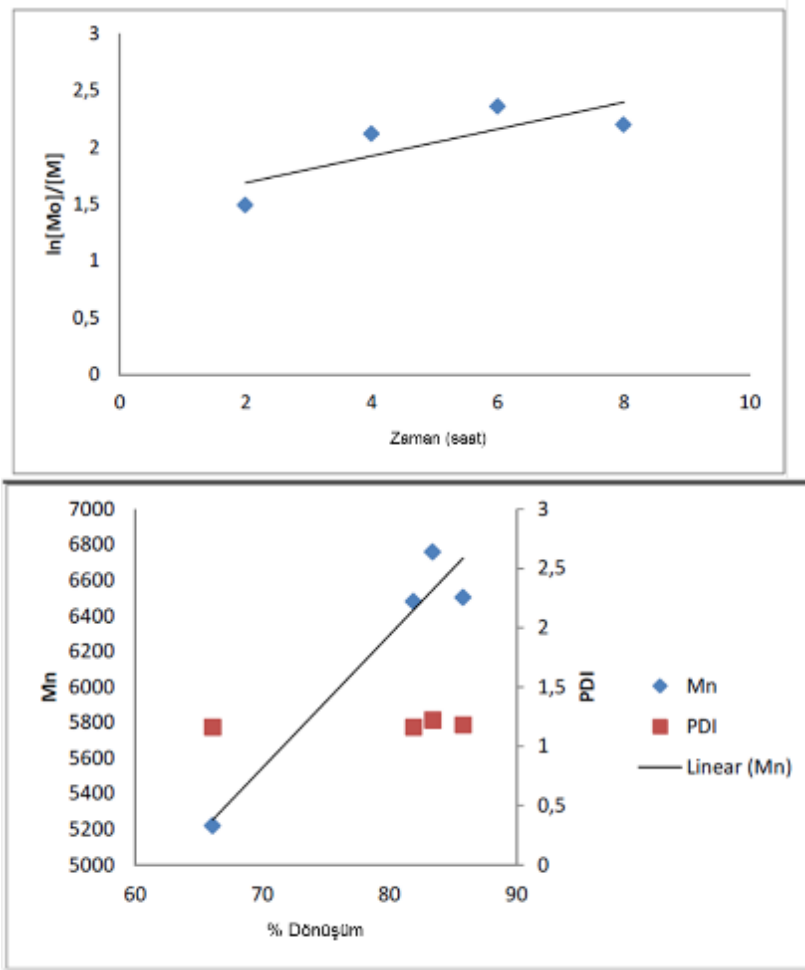
Polimerizasyon Süresi (saat)	Dönüşüm (%)	Mn (g/mol) (GPC)	PDI
2	39	2900	1.10
4	52	4000	1.10
6	65	4800	1.17
8	69	5400	1.17



Şekil 4.46. %10 CMA içeren p(AEAEMA-ko-CMA) kopolimerlerinin RAFT polimerizasyonu kinetik çalışma sonuçları. (Üst) $\ln(M_0/M)$ – zaman; (Alt) sayıca ortalama molekül ağırlığı (M_n) – dönüşüm ve polidispersite indeks (PDI) – dönüşüm grafikleri. Polimerizasyon Şartları: $[M]_0=1.5$ M; $[AEAEMA]/[CMA]/[RAFT]/[AIBN]=22.5/2.5/1/0.25$; Çözgen= Toluen.



Şekil 4.47. %20 CMA içeren p(AEAEMA-ko-CMA) kopolimerlerinin RAFT polimerizasyonu kinetik çalışma sonuçları. (Üst) $\ln (M_0/M)$ – zaman; (Alt) sayıca ortalama molekül ağırlığı (M_n) – dönüşüm ve polidispersite indeks (PDI) – dönüşüm grafikleri. Polimerizasyon Şartları: $[M]_0=1.5$ M; $[AEAEMA]/[CMA]/[RAFT]/[AIBN]= 20.0/5.0/1.0/0.25$; Çözgen= Toluen.



Şekil 4.48. %40 CMA içeren p(AEAEMA-ko-CMA) kopolimerlerinin RAFT polimerizasyonu kinetik çalışma sonuçları. (Üst) $\ln([M]_0/[M])$ – zaman; (Alt) sayıca ortalama molekül ağırlığı (M_n) – dönüşüm ve polidispersite indeks (PDI) – dönüşüm grafikleri. Polimerizasyon Şartları: $[M]_0=1.5$ M; $[AEAEMA]/[CMA]/[RAFT]/[AIBN]=15.0/10.0/1.0/0.25$; Çözgen= Toluen.

4.12 Kolesterol Polimerlerinin Karakterizasyonu

%2 ve %8 CMA içeren ve değişen molekül ağırlıklarda p(CMA-ko-MAA) kopolimerlerinin su içindeki hidrodinamik çapları DLS ile ölçüldü. Sonuçlar Tablo 4.16 ve 4.17'de özetlenmiştir. Buradan görüleceği üzere, %2'lik kopolimerlerden 60kDa ağırlığa sahip olan dışında hepsinin pH 7.4'de tek zincirler şeklinde suda kaldığı, pH 5.5'de ise kendi kendine organize olarak nanoparçacıklar oluşturduğu gözlenmiştir. 60kDa ağırlığa sahip %2'lik kopolimer ise her iki pH değerinde de nanoparçacıklar oluşturmuştur. %2'lik kopolimerin suda kendi kendine organize olması sonucu hücre membranı ile etkileşimini azaltması ve böylece hemolitik aktivitenin olmaması beklenir. %8'lik kopolimer ise çok daha yüksek agregasyon eğilimi göstermiştir. Özellikle asidik pH'da bu kopolimerin bütün molekül ağırlıklarında çok

büyük agregatlar oluşturduğu gözlenmiştir. Bu yüksek agregasyon eğiliminin polimerin hücre membranı ile hidrofobik kuvvetlerle etkileşimini artırması beklenir.

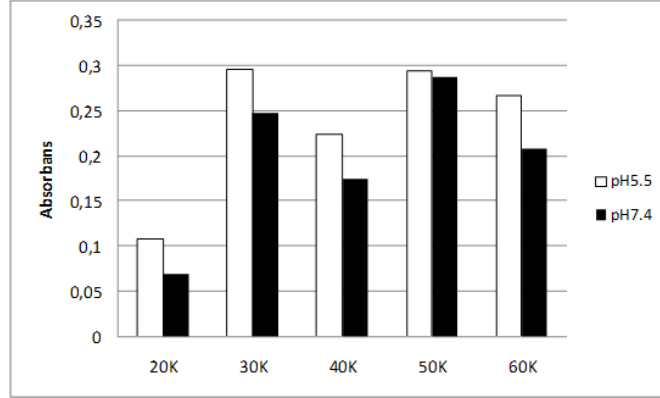
Tablo 4.16. Değişen molekül ağırlıklarında %2 CMA içeren kopolimerlerin tampon çözeltiler içinde sayıca ortalama hidrodinamik çapları

Örnek Kodu	Hidrodinamik Çap (nm)	
	pH 5.5	pH 7.4
20K	19	5
30K	20	4
40K	25	6
50K	5	7
60K	71	109

Tablo 4.17. Değişen molekül ağırlıklarında %8 CMA içeren kopolimerlerin tampon çözeltiler içinde sayıca ortalama hidrodinamik çapları

Örnek Kodu	Hidrodinamik Çap (nm)	
	pH 5.5	pH 7.4
17K	1365	265
22K	1485	193
27K	1378	271
66K	1650	605

Ayrıca %2 CMA içeren ve değişen molekül ağırlıklarda p(CMA-ko-MAA) kopolimerlerinin sulu çözeltilerinin pH'ya bağlı olarak bulanıklıklarının nasıl değiştiği UV-vis spektrometre ile belirlendi. Şekil 4.49 bu deneylerden elde edilen sonuçları göstermektedir. Grafikten görüleceği üzere, kopolimer molekül ağırlığı arttıkça çözeltilerin bulanıklığı artmıştır. Aynı şekilde asidik pH'da polimer çözeltilerinin bulanıklığı pH 7.4'e göre yüksektir. Bu sonuç DLS sonuçlarını desteklemektedir.



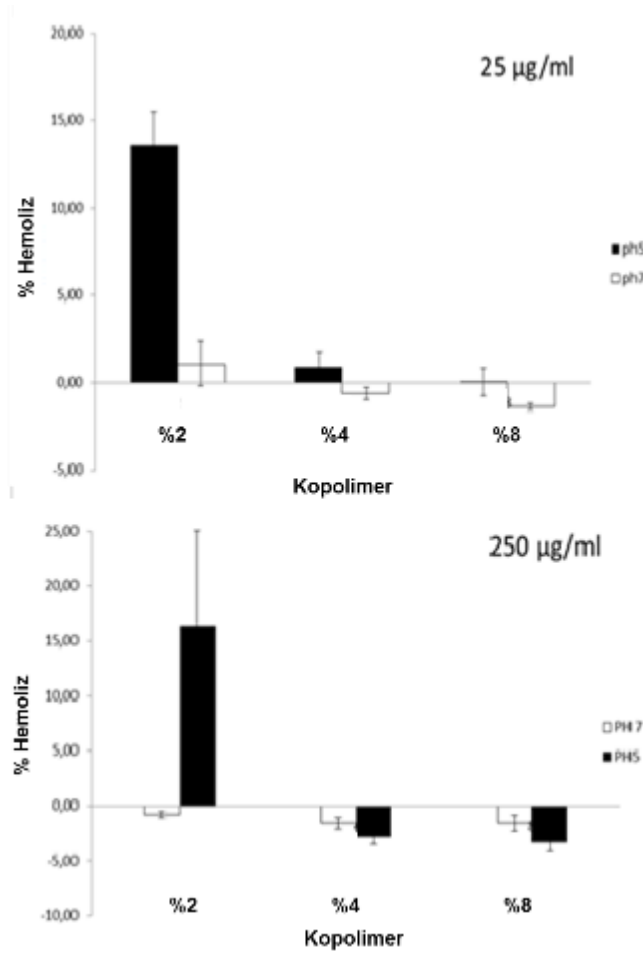
Şekil 4.49 Değişen molekül ağırlıklarında %2 CMA içeren kopolimer çözeltilerinin pH bağımlı bulanıklık deneyi.

4.13 Kolesterol Polimerlerinin Membran Aktivitelerinin İncelenmesi

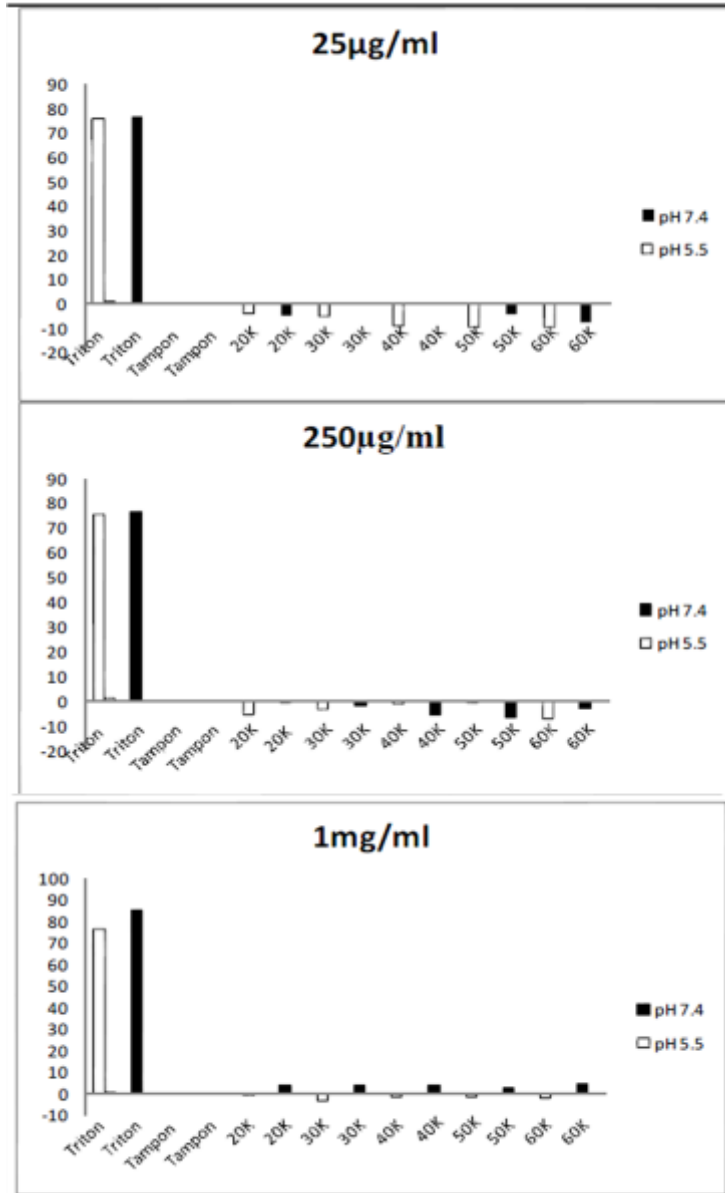
Kolesterol içeren kopolimerlerin kırmızı kan hücrelerinin membranına etkisi iki farklı pH değerinde (pH 5.5 ve 7.4) incelendi. Bu deneylerde değişen molekül ağırlıklarında %2, %4 ve %8 CMA içeren kopolimerler test edildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.50 – 4.53'te gösterilmektedir. Sonuçlardan görüleceği üzere, %2'lik ve %4'lük kopolimerler, molekül ağırlığına bağlı olarak pH duyarlı davranış sergilemiştir. %8'lik polimerlerin test edilen molekül ağırlığı ve konsantrasyon aralığında her iki pH değerinde de kayda değer hemolitik aktivitesi gözlenmedi. %2'lik kopolimer için hemolitik aktivite sadece 14-16 kDa ağırlığında elde edilmiştir. Bu hemolitik aktivite değeri de sadece %15 civarındadır. Daha yüksek molekül ağırlığında bu polimerin hemolitik aktivitesi sıfırlanmıştır. %4'lük polimer ise 4 kDa ağırlığında yüksek konsantrasyonda pH 5.5'de yaklaşık %50 hemolitik aktivite göstermiştir. Molekül ağırlık arttığında bu polimerin hemolitik aktivitesi kaybolmuştur. Sonuç olarak %2 ve %4'lük kopolimerler istendiği gibi pH bağımlı hemolitik aktivite göstermekle beraber bu aktivite yüksek değildir ve ancak çok yüksek konsantrasyonlarda elde edilmiştir. Bu nedenle P(MAA-ko-CMA) kopolimerleri, hemoliz deneylerinin sonuçları esasında hücre içi ilaç salım uygulamaları için uygun bulunmamıştır.

SPR sonuçları (Şekil 4.54), hemoliz deneylerine benzer sonuçlar vermiştir. Sadece molce %2 kolesterol içeren kopolimerler hücre membranı benzeri lipid tabakası ile pH 5.0'da etkileşim göstermiştir. Endozom membranı benzer lipid tabakalı yüzeylerle yapılan deneylerde de %2'lik monomerin pH 5.0'da etkileşimi pH 7.4'e göre daha belirgindir. Bununla birlikte SPR deneylerinde %2'lik kopolimerin lipid tabaka ile pH 5.0'daki etkileşimi diğer kopolimerlere göre çok yüksektir. Yüzeye bağlanan polimer zincir sayıları hesaplanmamış olmakla beraber, SPR'in hemoliz deneyine göre çok daha hassas bir ölçüm tekniği olduğu söylenebilir. Ayrıca

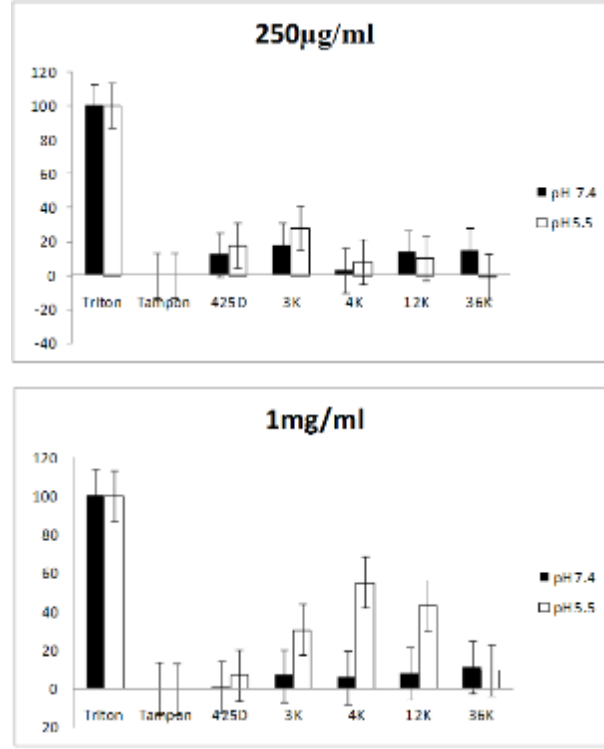
SPR deneyleri ile polimer-lipid tabaka arasındaki her türlü etkileşim algılanmaktadır. Ancak hemoliz deneylerinde polimerin kırmızı kan hücrelerinin hücre membranını tamamen parçalaması veya güçlü bir şekilde destabilize etmesi sonucu ortaya çıkan hemoglobin ölçülmektedir. Dolayısıyla polimer hücre membranı ile etkileşse bile membranı bozmadığı sürece hemoliz deneyleri sonuç vermeyecektir. Elde edilen bu bulguların, polimerlerin hücre içi sitoplazmik dağılımı ile ilişkilendirilebilmesi için bu kopolimerlerin hücre içi alımlarının ve dağılımlarının incelenmesine karar verilmiştir.



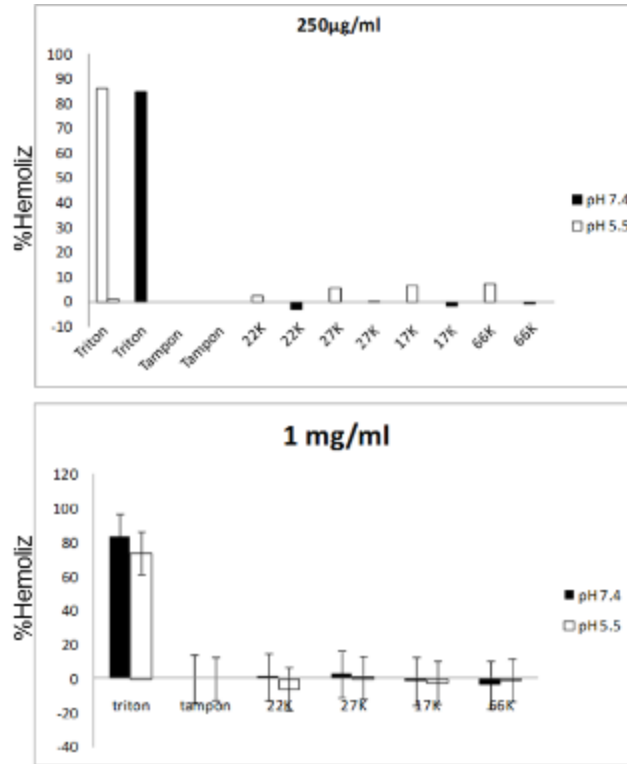
Şekil 4.50 %2, 4 ve 8 (mol) kolesterol içeren p(MAA-ko-CMA) kopolimerlerinin (Mn= 16,000 - 18,000) hemolitik aktivitesi.



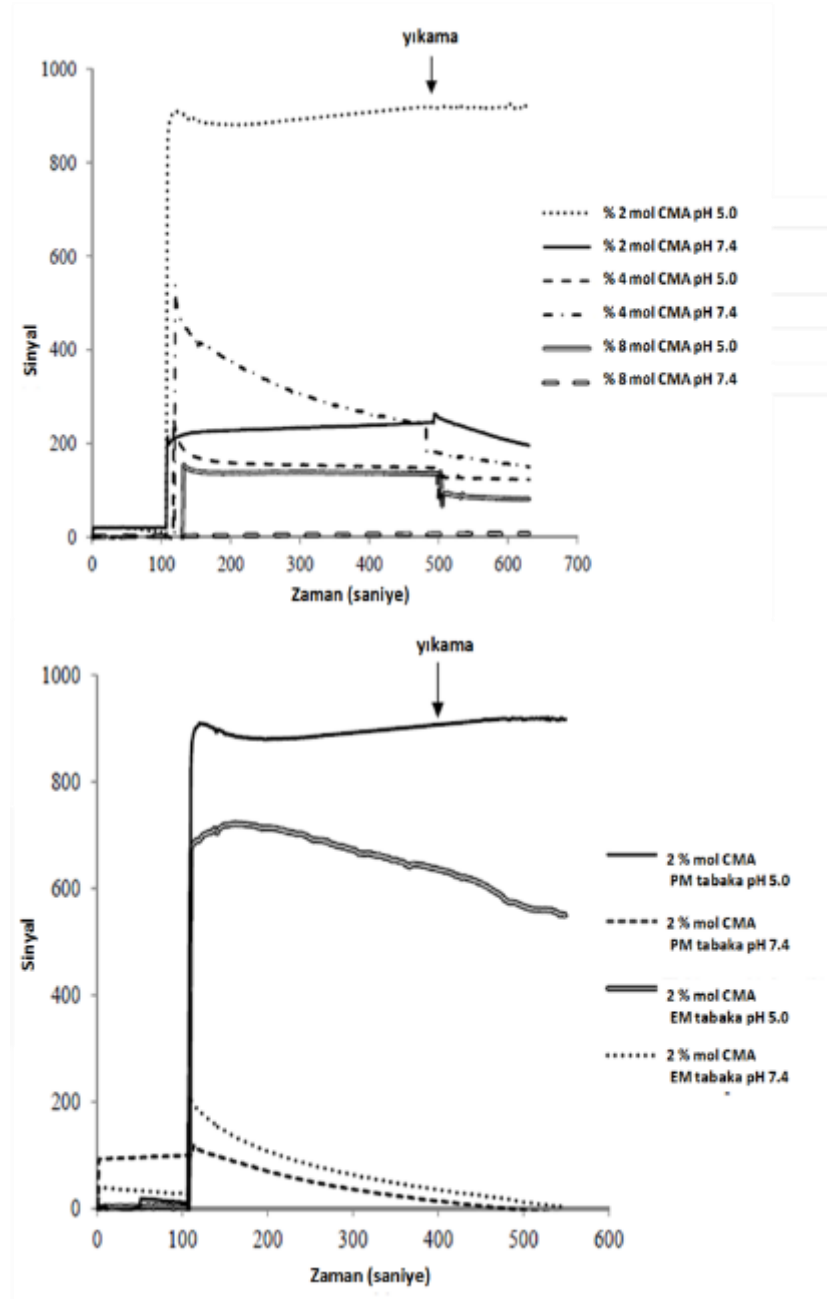
Şekil 4.51. %2 CMA içeren kopolimerlerin değişen molekül ağırlıklarda ve konsantrasyonlarda pH'ya bağımlı hemolitik aktivitesi.



Şekil 4.52. %4 CMA içeren kopolimerlerin değişen molekül ağırlıklarda ve konsantrasyonlarda pH'ya bağımlı hemolitik aktivitesi.



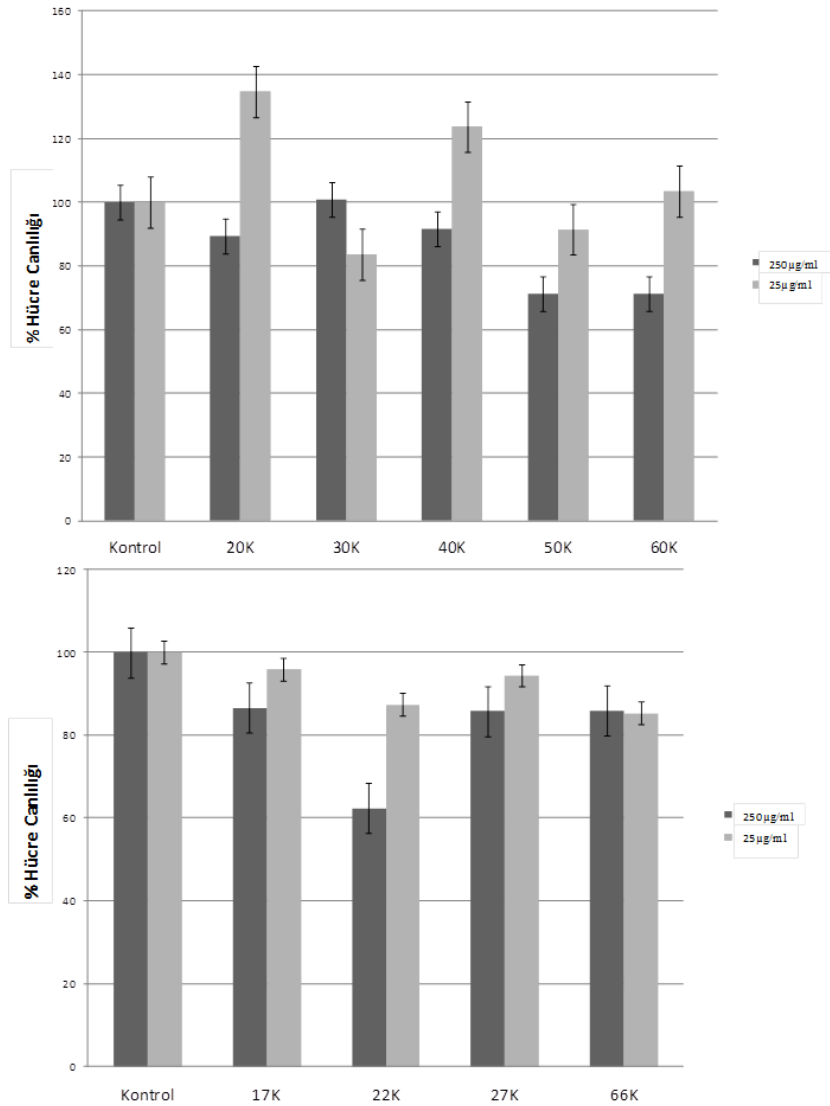
Şekil 4.53. %8 CMA içeren kopolimerlerin değişen molekül ağırlıklarında ve konsantrasyonlarda pH'ya bağımlı hemolitik aktivitesi.



Şekil 4.54. (ÜST) P(MAA-ko-CMA) kopolimerlerinin (molce %2, 4 ve 8 kolesterol içeren) hücre plazma membranı benzeri lipid tabaka ile etkileşimlerinin SPR ile ölçülmesi, (ALT) molce %2 kolesterol içeren kopolimerin hücre plazma membranı (PM) ve endozom membranı (EM) benzeri lipid tabakalar ile etkileşiminin SPR ile ölçülmesi. PM ve EM benzeri lipid tabakalar sırasıyla 0.42 ve 0.80'lik kolesterol/fosfatidilkolin mol oranlarına sahiptir.

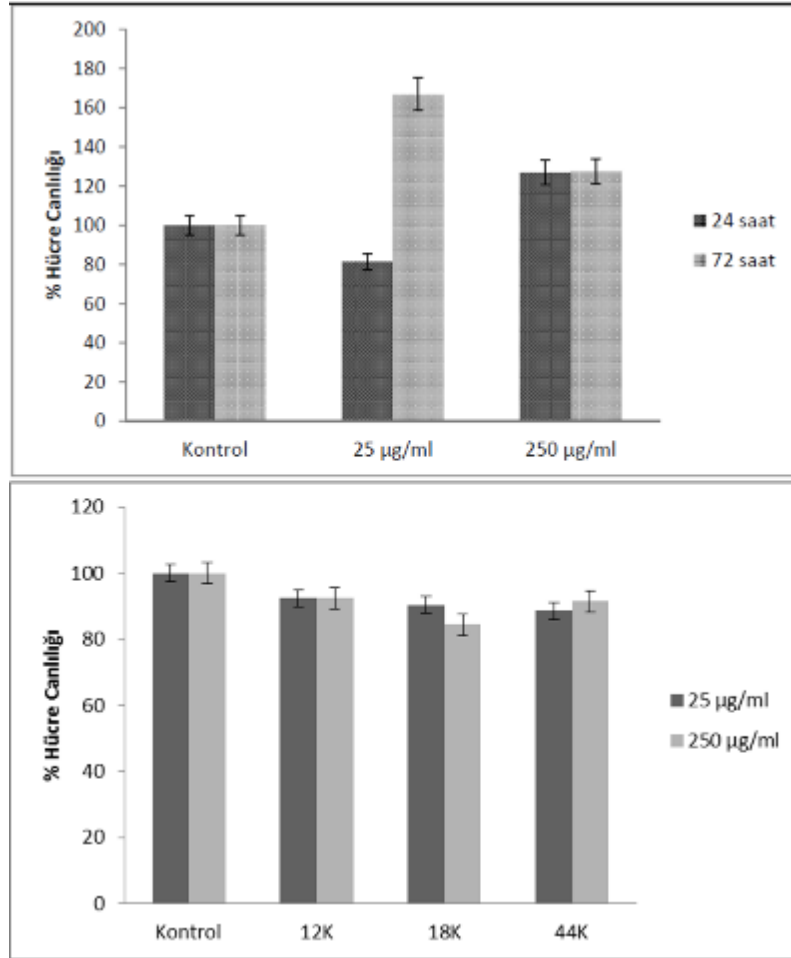
4.14 Kolesterol Polimerlerinin Hücre Canlılığına Etkileri

%2 ve %8 CMA içeren p(MAA-ko-CMA) kopolimerlerinin hücre canlılığına etkileri MTT deneyleri ile incelendi. NIH3T3 fare fibroblast hücreleri model hücre hattı olarak kullanıldı. 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süreleri ve iki farklı kopolimer konsantrasyonu test edildi. Benzer sonuçlar alındığı için sadece 72 saat inkübasyon sonuçları sunulmuştur (Şekil 4.55). Görüleceği üzere anyonik kolesterol kopolimerlerin fare fibroblast hücreleri üzerinde toksik etkiye sahip değildir.



Şekil 4.55. Değişen molekül ağırlıklarda, %2 (üst) ve 8% (alt) CMA içeren p(MAA-co-CMA) kopolimerlerinin NIH3T3 hücrelerinin canlılığına etkileri. İnkübasyon süresi= 72 saat.

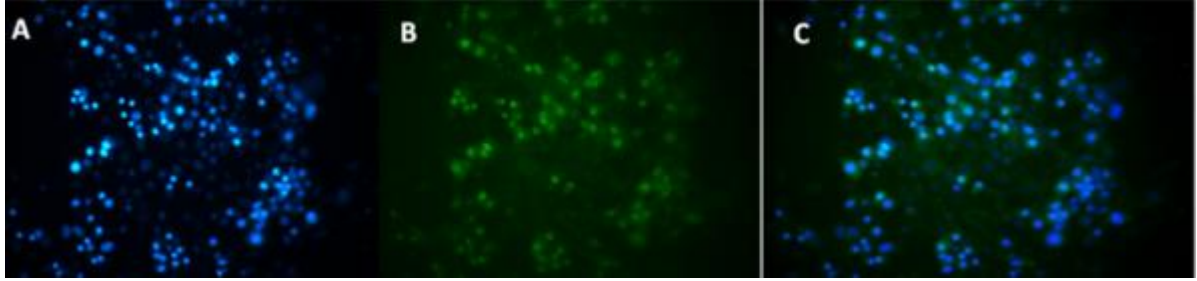
Benzer şekilde katyonik kolesterol kopolimerlerinin P(AEAEMA-ko-CMA) (Mn= 5000 Da, %20 CMA içerikli ve değişen molekül ağırlıklarda %10 CMA içerikli) MTT yöntemi ile NIH3T3 fare fibroblastları ve A549 insan akciğer kanseri hücre hatlarına canlılığı üzerinde etkileri test edildi. Yukarıda verilen P(MAA-ko-CMA) kopolimerlerinin toksisite sonuçlarına paralel olarak sadece 2 farklı P(AEAEMA-ko-CMA) kopolimer konsantrasyonunda (25 ve 250 µg/ml) toksisite denemeleri yapıldı. Sonuçlar Şekil 4.56'da gösterilmektedir. Çalışılan konsantrasyon, süre ve molekül ağırlığı aralığında kopolimerlerin her iki hücre hattı üzerinde de toksik etkisi olmadığı görüldü.



Şekil 4.56 (ÜST) Değişen konsantrasyon ve sürelerde P(AEAEMA-ko-CMA) (Mn= 5000 Da, %20 CMA içerikli) kopolimerin NIH 3T3 hücrelerinin canlılığına etkisi; (ALT) Değişen konsantrasyonlarda ve molekül ağırlıklarda P(AEAEMA-ko-CMA) (%10 CMA içerikli) kopolimerlerin A549 hücrelerinin canlılığına etkisi.

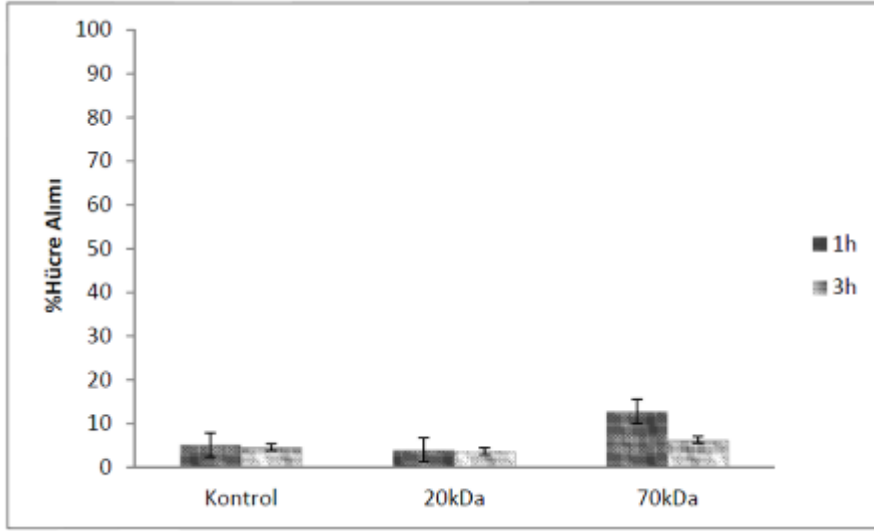
4.15 Kolesterol Polimerlerinin Hücreler Tarafından Alımı ve Hücre İçi Dağılımları

P(MAA-ko-CMA) kopolimerlerinin toksisite ve hemoliz deney sonuçlarından da görüldüğü üzere istenilen hemoliz aktivitesi profilleri elde edilemediği için, bu kopolimerlerin öncelikle hücre içi dağılımlarının incelenmesine karar verilmiştir. Bu amaçla %2 CMA içeren kopolimerler (20 kDa ve 70 kDa) öncelikle Oregon green maleimide ile etiketlendi. Floresan etiketli kopolimerlerin NIH3T3 fibroblast hücre içi dağılımları floresans mikroskobu ile incelendi. Şekil 4.57, 20 kDa'luk kopolimerin floresans mikroskop sonuçlarını sunmaktadır. Hücre çekirdeği DAPI (mavi) ile boyanmıştır. Yeşil boyalı polimerlerin hücrelerin içine dağılmış olduğu gözlenmiştir. Düşük hemoliz aktivitesine rağmen polimerlerin hücre sitozolüne difüz etmiş olması beklenmedik bir sonuçtur. 70 kDa molekül ağırlığına sahip polimer ile de benzer sonuçlar elde edilmiştir (veri gösterilmemiştir).



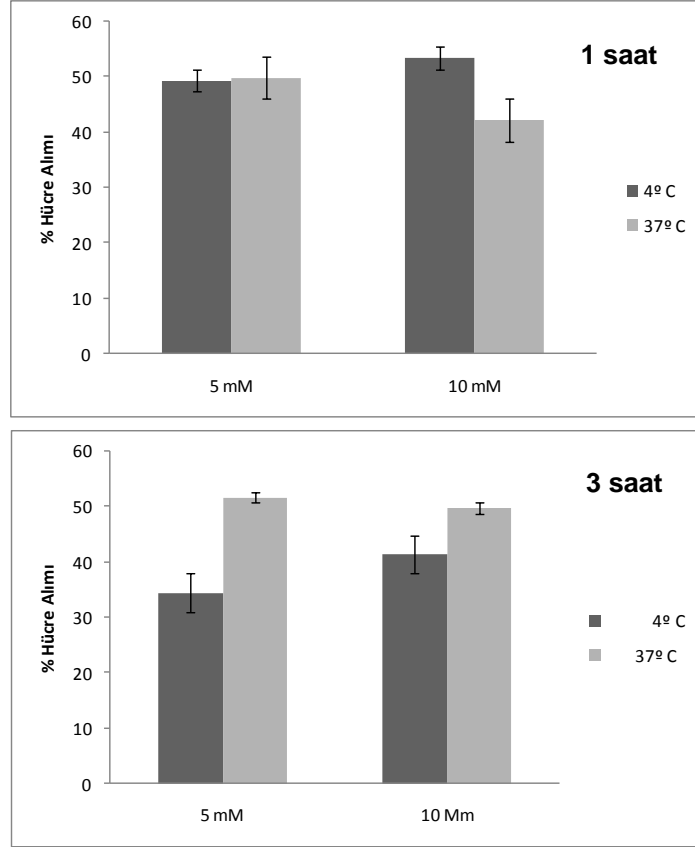
Şekil 4.57. NIH3T3 hücrelerinin Oregon Green (OG) ile işaretlenmiş 2 % CMA içeren P(MAA-ko-CMA) (Mn 20 kDa) inkübasyonundan sonra elde edilen floresan mikrografları 40X büyütme a) DAPI ile boyanan çekirdek b) OG-işaretlenmiş kopolimer ile inkübasyon c) a ve b'nin üst üste çakıştırılmasıyla elde edilen görüntü.

Hücre içi dağılım sonuçlarını doğrulamak amacıyla kopolimerlerin hücreler tarafından alınımının akış sitometrisi ile de incelenmesine karar verilmiştir. Akış sitometresi sonuçları Şekil 4.58'de verilmektedir. Görüleceği üzere NIH3T3 hücreleri, P(MAA-ko-CMA) kopolimerini (20 ve 70 kDa, %2 CMA) çok yüksek konsantrasyonlarda dahi (50 μ M) hemen hemen hiç almamaktadır. Bu sonuçlar hemoliz deneyleri sonuçlarını açıklar nitelikte olup floresans mikroskobu sonuçlarıyla ters düşmektedir. Floresans mikroskop görüntülerinde hücrelerin dış yüzeylerindeki boyayı, içindeki boyadan ayırd etmek mümkün olmadığı için görüntülerdeki yeşil floresanın hücre dışına yapışmış polimerlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak, düşük hemolitik aktivite sonuçlarına paralel olarak, P(MAA-ko-CMA) kopolimerlerinin hücreler tarafından alınmadığı görülmüştür. Bu sonuç kopolimerlerin kuvvetli negatif yüklü olmasından kaynaklanabilir.

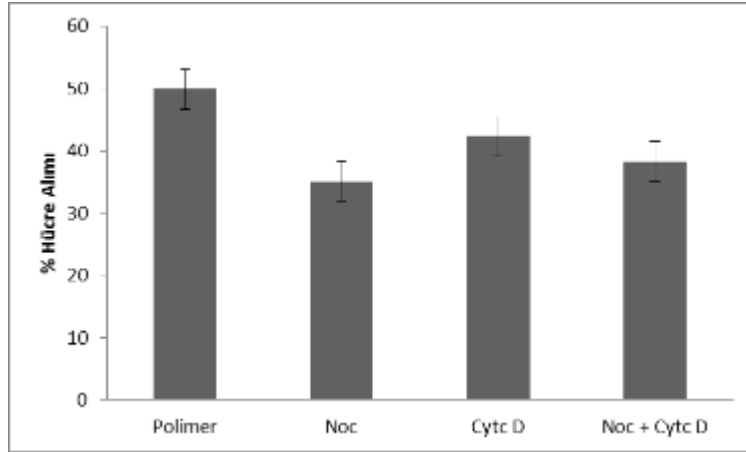


Şekil 4.58 P(MAA-ko-CMA) kopolimerinin (20 kDa ve 70 kDa; %2 CMA) hücre alımının akış sitometresi ile ölçümü (inkübasyon süresi 1 veya 3 saat).

Katyonik kolesterol kopolimerinin P(AEAEMA-ko-CMA) ($M_n = 15500$ Da, %10 CMA içerikli) 5 mM ve 10 mM konsantrasyonlarda A549 hücreleri ile inkübasyonları sonucu hücreler tarafından alımı akış sitometrisi ile incelenmiştir (Şekil 4.59). Sonuçlara göre katyonik kopolimerler A549 hücreleri tarafından belirgin bir şekilde hem 4°C hem de 37 °C'de alınmıştır. Endositoz inhibitörleri ile yapılan deneylerde inhibitörler varlığında dahi kopolimerin A549 hücreleri ile 37°C'de 1 saatlik inkübasyon sonucu hücreler tarafından alındığı gözlenmiştir (Şekil 4.60).



Şekil 4.59 P(MAA-ko-CMA) kopolimerinin (20 kDa ve 70 kDa; %2 CMA) hücre alımının akış sitometresi ile ölçümü (inkübasyon süresi 1 veya 3 saat).



Şekil 4.60 Katyonik kolesterol kopolimerinin (Mn= 15500 Da, %10 CMA içerikli) endositoz inhibitörleri varlığında A549 hücreleri tarafından alımının akış sitometresi ile ölçümü (1 saat inkübasyon).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu projenin amacı hücre içinde aktivitesini göstermesi gereken ilaçların hücre içine taşınmasını sağlamak için amino asit, peptit veya lipid içeren polimerleri Tersinir Katılma Ayrışma Zincir Transfer (Reversible Addition Fragmentation Chain Transfer) (RAFT) polimerizasyon tekniği ile sentezlemek ve fizikokimyasal özelliklerini belirlemek, sentezlenen polimerlerin hücre membranı ve lipidler ile etkileşimlerini incelemek ve hücre membranıyla etkileşme kapasitesi yüksek olan polimerlerin vücut dışında (*in vitro*) kültür edilmiş hücreler tarafından alımlarını ve hücre içinde dağılımlarını belirlemektir.

Bu proje kapsamında öncelikle arjinin amino asiti içeren polimerler sentezlenmiştir. Bu amaçla iki farklı sentetik strateji takip edilmiştir. İlk strateji guanidin grubu korunmamış arjinin metil ester (AME) amino asiti ile birincil aminlere karşı yüksek reaktivitesi olan pentafluorofenil metakrilat (PFMA) monomerinin reaksiyonu sonucu arjinin metil ester metakrilamid (AMME) monomerinin sentezini ve RAFT tekniği ile polimerleştirilmesini içerir. AMME monomerinin sentezinde PFMA ve arjinin amino asidi arasındaki reaksiyonun 100% verimle ve seçici olarak alfa primer aminden gerçekleştiği NMR ve MALDI-ToF analizleri ile gösterilmiştir. Sonuç olarak; AMME monomerinin sentezi literatürde olmayan yeni bir sentez yöntemi ile tek adımda başarıyla gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen AMME monomerinin RAFT polimerizasyon deneylerinde öncelikle zincir transfer ajanı (RAFT ajanı) olarak kullanılması planlanan 4-siyano-4-(fenilkarbonotiyolitiyo) pentanoik asitin, arjinin metil ester metakrilat (AMME) monomeri varlığında aminoliz çalışması yapılmıştır ve 7 saat içerisinde %45 bozunma görülmüştür. Dolayısıyla öncelikle sulu çözeltilerde hidroliz ve aminolizinin çok yavaş olduğu bilinen tritiyo esaslı bir RAFT ajanı, 4-siyano-4-(etiltiyokarboniltiyolitiyo) sülfanillpentanoik asid (ECT), literatürde yayınlanmış bir prosedür takip edilerek sentezlenmiştir (Moad vd., Polymer, 2004). Aminoliz deneylerinin sonucu ECT'nin 24 saat içinde 70°C'de aminolizinin %10'nun altında olduğunu göstermiştir. Böylece ECT'nin AMME'nin RAFT polimerizasyonunda RAFT ajanı olarak kullanılmasına karar verilmiştir. ECT varlığında AMME monomerinin RAFT polimerizasyonu, çözgen olarak organik (DMF) veya tampon çözelti (pH 5.0) kullanılarak başarıyla gerçekleştirilmiş ve molekül ağırlığı kontrol edilebilen, dar molekül ağırlığı dağılımına sahip arjinin polimerleri başarıyla sentezlenmiştir.

Arjinin polimerlerinin sentezinde izlenen ikinci strateji fonksiyonel PFMA polimerlerinin RAFT tekniği ile hazırlanması ve polimerizasyon sonrası AME ile modifikasyonunu içerir. Bu kapsamda öncelikle bir dizi PFMA homopolimerizasyonu gerçekleştirilerek RAFT mekanizması kontrollü polimerizasyon optimizasyonu yapılmıştır. PFMA'nın RAFT polimerizasyon çalışmaları literatür ile uyumlu olarak tamamlanmıştır (Eberhardt vd., 2005). İyi-tanımlanmış PFMA polimerlerinin eldesinin ardından polimerler, arjinin metil ester (AME)

ile reaksiyona sokulmuştur. Bu reaksiyon için literatürde önerilen yöntem denenmiş ve %60 olan reaksiyon verimi (Gibson vd., 2009) yapılan optimizasyon çalışmaları sonucu %100'e çıkarılmıştır.

Proje başvurusunda önerildiği şekilde üretilen polimerlerin kompozisyonu (belirli kimyasal grupların varlığı, hidrofobik ve hidrofilik grupların oranı, yük yoğunluğu vb.), polimerlerin toksik özelliklerini doğrudan etkileyen bir özelliktir. Arjinin polimerlerinin kuvvetli katyonik özelliğinin in vivo uygulamalarda yaratabileceği sorunları dikkate alarak PPFMA'nın biyolojik olarak uyumlu bir polimer olan poli(oligoetilen glikol metakrilat) (PEGMA) ile blok kopolimerleri de proje kapsamında hazırlanmıştır. Bu amaçla yapılan çalışmalar sonucunda makroRAFT ajanı olarak iyi-tanımlanmış PFMA polimerinden PEGMA monomerinin büyütülmesi ve böylece PPFMA-*b*-PPEGMA kopolimerlerinin hazırlanması daha kontrollü olduğu için uygun bulunmuştur. Blok kopolimerler sentezlendikten sonra AME ile reaksiyonları incelenmiştir. Deneysel olarak PPFMA homopolimerinin modifikasyonu ile aynı koşullar altında denenmiş kopolimer modifikasyonu sonrası alınan NMR sonucu reaksiyon veriminin %100 olduğunu göstermiştir. Bu reaksiyonun gerçekleştiğine dair en önemli göstergelerden bir diğeri ise; homopolimer modifikasyonunda olduğu gibi amfifilik kopolimerlerin, AME modifikasyonu sonrası tamamen suda çözünür hale gelmesidir.

Oktaarjin bugüne kadar çeşitli ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılmış ve genel olarak hücre alımını arttırıcı yönde sonuçlar vermiştir (Biswas vd., 2013; O'Donnell vd., 2015). Bu amaçla proje önerisinde belirtildiği gibi oktaarjinin polimerlerinin sentezine çalışılmıştır. PPFMA-*b*-PPEGMA kopolimerlerin oktaarjinin (R8) ile modifikasyonu, AME ile gerçekleştirilmiş olan reaksiyon ile benzer koşullarda denenmiştir. Modifikasyon sonrası polimerin suda çözünür hale gelmesi modifikasyonun olduğuna dair en önemli göstergedir. Modifikasyon öncesi 14000 g/mol olan kopolimerin, modifikasyon ve takip eden diyaliz işlemi sonrası molekül ağırlığının M_n 11000 g/mol değerine düşmüş olması amfifilik yapıda olan PPFMA-*b*-PPEGMA kopolimerinin oktaarjinin peptidi ile modifikasyon sonrası amfifilik yapıdan çift hidrofilik yapıya geçtiğini ve bu nedenle moleküler hidrodinamik hacminin küçüldüğünün göstergesi olabilir. GPC kromatogramında 11000 kDa ağırlığı dışında pik olmaması bağlanmamış peptidin (M_w 1514 g/mol) tamamen uzaklaştırılmış olduğunun kanıtıdır. Deneysel olarak kullanılan oktaarjinin peptidinin ticari yollardan eldesi oldukça pahalıdır. Konjugasyon verimi ve deney sonrası saflaştırma basamakları dikkate alındığında elde edilen son ürünün yani oktaarjinin ile modifiye olmuş kopolimerin miktarı membran aktivitesini belirlemeye yönelik deneylerde kullanılmasına izin vermeyecek kadar az bulunmuştur. Özellikle yüzey plazmon rezonans deneyleri akış altında gerçekleştiği ve hücre alım/hücre içi dağılım deneyleri polimerin ek bir konjugasyon-saflaştırma basamağından geçerek floresans boya ile işaretlenmesini gerektirdiği için proje

kapsamında oktaarjinin modifiye kopolimerlerin sadece üretim metodu geliştirilmiş ancak membran aktivitelerini tayin etmeye yönelik deneyler bu aşamada gerçekleştirilememiştir.

Arjinin polimerlerinin morfolojik özelliklerini incelemek amacıyla DLS ve AFM ölçümleri yapılmıştır. Görüntülerde PAMME-*b*-PPEGMA ve PAMME polimerlerinin her iki pH değerinde de partiküller ve agregat benzeri yapılar oluşturduğu gözlenmiştir. pH 7.4 ve pH 5.0 değerlerinde pozitif yüklü hidrofilik guanidin grupları ve hidrofobik ana zincir içeren PAMME homopolimerlerinin konsantrasyona bağlı olarak hidrofobik etkileşimler ile kendi kendine organizasyonu sonucu partikül oluşumunun gerçekleşebileceği düşünülmektedir. Dolayısıyla partikül boyutlarının daha yüksek olması beklenen bir sonuçtur. Kopolimerlerin hidrodinamik çapı, homopolimere göre daha yüksektir. Bu partikül/agregatları oluşturan polimer zincirinin daha uzun olmasına ve PPEGMA bloğunun hidrofilik yapısına atfedilmiştir. DLS ile alınan sonuçlar, AFM sonuçları ile karşılaştırıldığında daha büyük partikülleri ortaya koymuştur. Bunun DLS'in hidrodinamik çapı, AFM'nin ise kuru durumdaki morfolojileri ortaya koyuyor olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Arjinin içeren sistemlerin yapıları itibariyle membran bozucu değil membran füzojenik olduğu literatürde bilinmektedir (Futaki vd., 2001). Dolayısıyla lipid membran ile etkileşimleri durumunda membranın yapısal bütünlüğünü bozmak yerine sadece membran içine difüz etmeleri bütünleşmeleri beklenir. Bu nedenle arjinin polimerlerinin membran aktivitelerinin tayini için hemoliz deneyleri uygun değildir. Bu duruma uygun olarak sentez ve karakterizasyon aşamaları tamamlandıktan sonra arjinin polimerlerinin, polimerlerin hücre membranı ile etkileşimlerini incelemek için SPR deneyleri yapılmıştır. İki farklı pH'da (pH 7.4 ve pH 5) PAMME ve PAMME-*b*-PPEGMA ve pH 5 için iki farklı molekül ağırlıktaki PAMME (Mn:9500 ve Mn:12000) denenmiştir. Bu deneylerde kullanılan arjinin içeren homopolimerler ve kopolimerler iki farklı pH'da hücre membranı benzeri lipozom yapılarıyla etkileştirilmiştir. Molekül ağırlık artınca etkileşim azalma göstermiştir. Arjinin içeren polimerler, guanidin gruplarının yüksek pKa (12) değeri nedeniyle denen her iki pH değerinde de kuvvetli pozitif yüklüdür. Lipid tabaka üstündeki negatif yüklü fosfat gruplarıyla kuvvetli şekilde elektrostatik etkileşime girerler. Önemli bir nokta kopolimer yapısındaki PEGMA bloğu bu elektrostatik etkileşimi belirgin bir şekilde azaltmamıştır. Sonuç olarak üretilen arjinin homo- ve kopolimerleri hücre membranı ile etkileşim potansiyeline sahip olarak görülmüş ve bu polimerlerin canlı hücre hatlarıyla etkileşimleri incelenmiştir.

Arjinin polimerlerinin hücre canlılığı incelendiğinde; aminoliz sonrası elde edilen polimerin 500 µM gibi yüksek konsantrasyonlara çıkıldığında dahi hücre canlılığına etkisinin olmadığı açıkça görülmüştür. PEG türevli bir polimer olan PPEGMA'nın toksik olmadığı literatürde oldukça yaygın şekilde bilinmektedir (Pissuwan vd., 2010). Ayrıca grubumuz tarafından önceki çalışmalarında çok defalar PPEGMA'nın toksik olmadığı deneyler ile tespit

edilmiştir (Özer, 2014). Bu nedenle PAMME-*b*-PPEGMA kopolimeri için ayrıca bir toksisite deneyi gerçekleştirilmemiştir.

Bu çalışmaların ardından arjinin polimerlerinin hücre alımı ve hücre içi dağılım deneyleri gerçekleştirilmiştir. pAMME ve pAMME-*b*-PPEGMA polimerlerinin hücreler tarafından çok hızlı ve etkin olarak alındığı tespit edilmiştir. PAMME ve PAMME-*b*-PPEGMA polimerlerinin hücreler tarafından alım değerleri karşılaştırıldığında PAMME-*b*-PPEGMA polimerlerinin PAMME polimerine göre çok daha fazla hücre içine alındığı tespit edilmiştir. Bunun sebebi PAMME ve PAMME-*b*-PPEGMA polimerlerinin hücreler tarafından alım mekanizmalarının birbirinden farklı olması olabilir. Hücreler tarafından ana alım mekanizması difüzyon olan PAMME'nin, PPEGMA ile blok kopolimerleştirilmesi sonucu bu özelliğini kısmi olarak yitirmiş ve endositoz yolu ile alımı artmış olabilir. Bu durumu düşük polimer konsantrasyonunda (10 µM) hücre alımı değerleri çok belirgin olmasa da desteklemektedir. Şöyle ki; 4°C ile 37°C'deki alımlar karşılaştırıldıklarında PAMME'deki farkın, kopolimere göre daha az olduğu görülmektedir. Bu durum homopolimerin enerji gerektirmeyen pasif difüzyon yolunun baskın olan alım mekanizması olduğunu göstermektedir. Kopolimerde ise 4°C ile 37°C'deki alımlar arasındaki fark daha belirgindir. Bu durum PAMME içeren kopolimerin hala daha enerji gerektirmeyen pasif difüzyon yolu ile alındığını ancak aktif transport mekanizmaları ile alımının daha baskın hale geldiğini göstermektedir. Genel olarak aktif transport mekanizmaları aracılığıyla hücre alımının, pasif difüzyon yoluyla alıma göre nicel olarak daha yüksek olması beklenir. Ayrıca kopolimerin molekül ağırlığının ve hidrodinamik çapının daha büyük olması daha fazla endositozu tetiklemiş olabilir. PAMME ve pAMME-*b*-PPEGMA polimerlerinin hücreler tarafından alım mekanizmasının enerjiye bağımlılığının incelendiği deneylerin sonucunda pAMME polimerlerinin hücreye temel olarak enerjiden bağımsız yollar ile alındığı belirlenmiştir. Hücre membranı üzerinde gerçekleşen bu translokasyon işleminde polimerde bulunan arjinin tekrarlayan birimlerinin guanido grubunun rol oynadığı düşünülmektedir. Literatürde oktaarjinin (R8) hücreler tarafından enerjiden bağımsız yollar ile alındığı da belirtilmiştir (Futaki vd., 2001). Yüksek konsantrasyonda pAMME ve pAMME-*b*-PPEGMA polimerlerinin hücre alımında etkin rol oynayan endositoz aktivitelerinde hücre iskeletinin rolü, hücrelerin nokodazol (Noc) ve sitokalsin D (CytD) kimyasallarının varlığında polimer alımların belirlenmesi ile gerçekleştirilmiştir. Hücre iskeleti bileşenlerinin endositoz aktivitesinde veziküllerin oluşumu ve taşınmasında çok önemli rol oynadığı bilinmektedir. Literatürde aktin hücre iskeletinin endositoz veziküllerinin oluşmasında etkin rol oynarken, mikrotübül hücre iskeletinin oluşturulan vezikülün hücre içinde taşınmasında ve veziküllerin oluşmasında yardımcı olarak etkin rol oynadığı belirtilmiştir (Vercauteren vd., 2010). Literatürde transport inhibitörleri olarak belirtilen nokodazol ve sitokalsin D kimyasallarının sırasıyla mikrotübüllerin depolimerizasyonunu sağlayarak ve aktin

polimerizasyonunu engelleyerek hücrelerin endositoz aktiviteleri üzerinde olumsuz etki yarattığı belirtilmiştir (Khalil vd., 2006; Mager vd., 2010; Saha vd., 2013). Deneyle sonuçunda pAMME-ko-PEGMA polimerlerinin endositoz ile hücre alınmasında aktin filamentlerinin aktif rol üstlendiği sonucuna varılmıştır. Floresans mikroskop ile elde edilen mikrograflar akış sitometrisi deneyleri ile ulaşılan sonuçları da doğrular niteliktedir. pAMME-*b*-PPEGMA polimerlerinin hücre içinde veziküllerde birikmediği, sitozole dağıldığı sonucuna ulaşılmıştır

Arjinin polimerlerine yönelik gelecekteki çalışmalarda sentezlenen oktaarjinin polimerlerinin karakterizasyonu ve hücre deneyleri yapılmalıdır. Hücre uygulamalarından alınan pozitif sonuçlar düşünüldüğünde; arjinin polimerlerinin membran füzyojenik ve pozitif yüklü olmaları sebebiyle potansiyel gen taşıma ajanı olarak kullanılması uygun gözükmektedir.

Proje kapsamında önerilen polimerlerden bir diğeri olan yağ asidi polimerlerinin sentezine yönelik çalışmada öncelikli olarak, doymamış bir yağ asiti olan 10-undekanoik asitin, merkaptolanol ile katılma reaksiyonundan elde edilen ürün, metakrilatma prosedürü ile uygun bir metakrilat monomeri haline getirilmiştir. Monomer sentezi iki basamaktan oluşmaktadır. İlk basamakta tiyol-ene katılma reaksiyonu ile, 2-merkaptolanol bileşiğinin, 10-undekanoik asit ile, katılma reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu basamaktan elde edilen ürün ile, metakrilatma prosedürü takip edilerek RAFT polimerizasyonu için uygun bir yağ asidi monomeri sentezlenmiştir. % 92 verim ile saf olarak 11-[2-(2-metil-akriloksil)-etilsülfanil undekanoik asit (UDAMA) monomeri başarıyla elde edilmiştir. Sonraki adımda UDAMA monomerinin RAFT polimerizasyonu ile yağ polimerleri sentezlenmiştir. Farklı monomer konsantrasyonları, organik çözügen ve [monomer]/[RAFT]/[başlatıcı] mol oranları ile optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar sonrası monomer konsantrasyonu 1 M ve 4. 2 M, çözügen olarak asetonitril, ve [monomer]/[RAFT]/[başlatıcı] olarak ise 400/4/1 oranlarının polimerleşmeler için uygun olduğu öngörülmüştür. RAFT homopolimerizasyonun, kinetik çizimlerinden, logaritmik monomer dönüşümünün, $(\ln[M]_0/[M])$, lineer olarak zamana karşı arttığı görülmüştür. Bu sonuç RAFT mekanizması kontrollü polimerizasyonun gerçekleştiğini işaret etmiştir. Elde edilen yağ asidi homopolimerleri suda istenilen çözünürlüğü vermediği için, ek olarak tert-bütillmetakrilat (t-BMA) ve metakrilik asit (MAA) komonomerleriyle ayrı ayrı rastgele kopolimerler hazırlanmaya yönelik RAFT kopolimerizasyonları gerçekleştirilmiştir. t-BMA ile yapılan deneyler rastgele kopolimerlerin oluşmadığını işaret ettiği için UDAMA monomerinin, metakrilik asit ile kopolimerleşme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda monomer besleme kompozisyonları %20 ve % 50 UDAMA içeriğine sahip olacak şekilde RAFT kopolimerizasyonları gerçekleştirilmiştir. MAA ile yapılan kopolimerleşmeler sonucu suda daha iyi çözülebilen ve pH'ya duyarlı, amfililik kopolimerler, P(MAA-ko-UDAMA) elde edilmiştir. Kopolimerizasyonlarda, UDAMA monomerinin beslemedeki içeriği artırıldığında, RAFT kontrollü mekanizmanın gittikçe kaybolduğu, molekül ağırlığı dağılımı ve moleküler ağırlıkların

arttığı bulunmuştur. [UDAMA]/[MAA]/[RAFT]/[Başlatıcı] mol oranının 40/160/4/1 olduğu durumda, ağırlıkları ve molekül ağırlığı dağılımı düşük olan polimerlerin oluştuğu gözlenmiştir.

Sentezlenen yağ asidi kopolimerlerinin, pH'ya duyarlılığı UV-vis spektroskopisi ve dinamik ışık saçılım (DLS) deneyleri ile test edilmiştir. Bu deneylerin sonucunda asidik ortamda kopolimer çözelti türbitidesinin artması, kopolimerlerin asidik pH değerlerinde protone olmasıyla kopolimer zincirlerinin hidrofilik durumdan hidrofobik duruma geçmesine atfedilmiştir. DLS sonuçları, ortam pH'sının nötralden asidiğe doğru azalmasıyla kopolimerlerin kendi kendine organize olarak, hidrofobitesinin arttığı ve hidrodinamik çaplarının küçüldüğünü kanıtlamıştır. UDAMA içeriği artırıldığında hidrodinamik çapın küçülmesinin hidrofobik etkileşimin artarak zincirler arası kendi kendine organize olabilme özelliğinin sonucu olduğu düşünülmektedir. AFM sonuçlarına göre aynı UDAMA içeriğine sahip kopolimerlerden düşük molekül ağırlığa sahip olanı pH'ya duyarlı olmaksızın genişlemiş zincir konformasyonunu korumaktadır. Molekül ağırlık arttıkça, bir başka deyişle zincir uzunluğu arttıkça, polimerlerin içerdiği hidrofobik UDAMA birimlerinin çözelti içindeki mutlak miktarı artar. Bu durum hidrofobik etkileşimler ile polimer zincirlerinin biraraya gelip partiküller oluşmasını tetikleyebilir. Bunun sonucunda asidik ve nötral çözeltilerde 9 kDa'lık kopolimer açık bir şekilde küresel partiküller oluşturmuştur.

Hemoliz deneyleriyle UDAMA içeriği % 23 ve % 65 olarak hesaplanan P(MAA-ko-UDAMA) polimerlerin pH'ya duyarlı membran bozucu aktivitesi incelenmiştir. Yapılan deneylerde %23 UDAMA içeriğine sahip kopolimerlerin etkili olarak endozom pH değeri aralığında olan pH 5.0'da kırmızı kan hücrelerinin membranını bozduğu ancak hücre dışı pH değeri olan pH 7.4'de etkisinin yok denecek kadar az olduğu belirlenmiştir. Aynı kopolimerin SPR ile yapılmış olan ölçümleri, hemoliz sonuçlarını destekler nitelikte olup bu kopolimerin pH'ya duyarlı bir şekilde lipid tabakası ile etkileştiğini göstermiştir. Aynı kopolimerin NIH3T3 fare fibroblast ve A549 insan akciğer kanseri hücrelerinin canlılığı üzerine ancak 1000 µg/ml gibi çok yüksek konsantrasyonlarda etki ettiği bulunmuştur. Sonuç olarak, çok düşük konsantrasyonlarda yüksek hemolitik aktivite gösteren yağ asidi kopolimerinin (Mn 10 kDa, %23 UDAMA içeriği) etkili olduğu konsantrasyon değerlerinde iki farklı hücre hattı üstünde toksik etkisi yoktur. Yağ polimerinin hücreler tarafından alımı floresans boya ile etiketlenmiş polimerler kullanılarak akış sitometresi aracılığıyla incelenmiştir. Hücrelerin 37°C'deki alım miktarlarının konsantrasyona ve inkübasyon süresine bağlı olarak değişimi incelendiğinde, tüm polimerlerin hücre alımının polimer konsantrasyonu ve inkübasyon süresi ile arttığı tespit edilmiştir. Hücre iskeletinin temel iki bileşeni olan mikrotübül ve aktin filamentlerin belirli ajanlar kullanılarak inhibisyonu sonucu yağ polimerlerinin hücreler tarafından alımında değişiklikler olup olmadığı akış sitometresi ile ölçülmüştür. İlginç olarak, endositoz inhibitörleri varlığında yapılan deneylerde polimerlerin hücre içine alımı, inhibitör yokluğundaki alıma kıyaslandığında

daha fazladır. Bu durum hücre iskeletindeki aktin ve mikrotübül komponentlerinin, yağ asidi polimerlerinin endositoz ile hücre içine alınmasında rol aldığını, ancak bu yollardan biri veya ikisi kapatıldığında başka alt yollar ile polimerin daha fazla miktarlarda alındığına işaret etmektedir. İleride yapılacak çalışmalarda farklı yolların inhibisyonu ile bu polimerlerin alım mekanizmaları daha ayrıntılı şekilde incelenebilir. Floresan mikroskop ile gerçekleştirilen incelemeler ise yağ asidi polimerlerinin hücrelerin sitozolünde dağılabildiğini göstermiştir. Böylece üretilmiş olan yağ asidi kopolimerlerin membran aktif özelliğe sahip olduğu ve endozom veya lizozom membranını destabilize ederek hücre sitozolüne ulaşabildiği düşünülmektedir.

Yağ asidi polimerleri ile ilgili olarak gelecekte yapılması önerilen çalışmalar, bu kopolimerlerin daha yüksek molekül ağırlıklarda ve değişen UDAMA içeriklerinde sentezlenip membran aktivitelerinin optimize edilmesini ve optimize edilmiş yapıların hücre içi ilaç salım uygulamaları amacıyla uygun terapötikler ve sistemler ile formüle edilmesini içerir.

Bu projenin bir diğer amacı potansiyel membran bozucu ajan olarak yüksek molekül ağırlığına (>15,000 g/mol) sahip pH-duyarlı, kolesterol içeren polimerleri RAFT polimerizasyonu ile sentezlemek ve bu polimerlerin hücre membranlarıyla etkileşimlerini incelemektir. Bu amaçla, kolesteril metakrilat (CMA) ve 2-((tert-bütoksikarbonil)(2-((tert-bütoksikarbonil) amino) etil) amino) etil metakrilat monomerler olarak sentezlenmişlerdir. Amaçlandığı gibi farklı molekül ağırlıklarda (4-60 kDa) ve kompozisyonlarda (% 2, 4, 8 ve 10 mol) CMA ve t-bütül metakrilat (t-BMA) kopolimerleri RAFT polimerizasyonu ile sentezlenmişlerdir. Test edilen koşullarda RAFT-kontrollü kopolimerizasyonların gerçekleştiği, GPC ve NMR analizleri ile kanıtlanmıştır. Sentezlenmiş bu kopolimerler, kolesteril metakrilat-ko-metakrilik asit p(MAA-ko-CMA) kopolimerlerine hidroliz edilerek suda çözünür, pH-duyarlı polianyonlar elde edilmeye çalışılmıştır. Hidroliz sonrası, %10 mol CMA içeren kopolimerlerin molekül ağırlıkları farketmeksizin suda çözünür olmadıkları gözlemlenmiştir. UV-Vis spektroskopisi ve DLS ölçümleri üretilen kopolimerlerin pH'ya duyarlı davranışlarının bulunduğunu göstermişlerdir. DLS ve hemoliz deney sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, kopolimer zincirlerinin molekül ağırlığı, solüsyonun pH'sı ve solüsyondaki kopolimer konsantrasyonuna bağlı olarak, kolesterol birimleri nedeniyle zincir içi ve zincirler arası etkileşimlerinin oluştuğu ve bu durumun membran aktivitesini güçlü bir şekilde azalttığı sonucuna varılmıştır. Hücre canlılığı deneylerinin sonuçları, 250 µM konsantrasyondaki p(MAA-ko-CMA) kopolimerlerinin NIH3T3 fibroblast hücre hattı üzerinde toksik etki göstermediğini ortaya çıkarmıştır. Akış sitometrisi ile P(MAA-ko-CMA) (20 ve 70 kDa, %2 CMA) kopolimerlerinin NIH3T3 hücreleri tarafından kayda değer bir alım göstermediği sonucuna ulaşılmıştır. Bu sonuçlar polimerlerin hemolitik aktivite göstermemiş olmaları ile uyumlu bulunmuştur.

P(MAA-ko-CMA) kopolimerleri ile ileride yapılacak çalışmalar bu kopolimerlerin molekül ağırlığı ve çözelti konsantrasyonunu içeren optimizasyon çalışmalarının yapılarak hemolitik aktivite için optimum polimer özelliklerinin belirlenmesini içerebilir.

Proje önerisinde hedeflenen P(MAA-ko-CMA) kopolimerlerinin hemolitik aktivite göstermediklerinin ve hücre içine alınmadıklarının anlaşılması nedeniyle, ara raporlarda belirtildiği üzere, alternatif olarak kolesterol içeren polikasyon üretimi için 2-((tert-bütoksikarbonil)(2-((tert-bütoksikarbonil) amino) etil) amino) etil metakrilat ile CMA RAFT tekniği kullanılarak kopolimerleştirilmiştir. Amin grupları korunmuş farklı CMA içerikli (%10, 20 ve 40) RAFT-kontrollü kopolimerler başarıyla sentezlenmiştir. Kopolimerizasyonlarda CMA içeriğinin artışı, RAFT kontrollü polimerizasyon mekanizmasının kısmi kaybedildiğini göstermiştir. Bir sonraki adımda katyonik kopolimerlerin elde edilmesi için, kopolimerlerin amin korumaları kaldırılmıştır. Molce %40 CMA içerikli kopolimerlerin suda çözünürlüğünün olmadığı gözlemlenmiştir. Farklı molekül ağırlıklı ve farklı CMA içerikli (molce %10 ve 20) kopolimerlerin 250 µg/ml konsantrasyonda NIH3T3 ve A549 hücre hatlarında toksik etkilerinin olmadığı gözlemlenmiştir. Hücre alım deneyleri katyonik kopolimerlerin A549 hücreleri tarafından belirgin bir şekilde hem 4°C hem de 37°C'de alındığını göstermiştir. Bu sonuç katyonik kolesterol polimerlerinin arjinin polimerlerine benzer şekilde enerji gerektirmeyen şekilde, endositoz dışındaki yollardan da hücreler tarafından alındığına işaret etmektedir. Endositoz inhibitörleri ile yapılan deneylerde inhibitörler varlığında dahi kopolimerin A549 hücreleri ile 37°C'de 1 saatlik inkübasyon sonucu hücreler tarafından alındığı gözlenmiştir. Bu sonuç, katyonik kolesterol polimerinin hücreler tarafından alımının endositozun yanı sıra pasif mekanizmalarla da gerçekleştiğini güçlü bir şekilde önermektedir. Nokadozal varlığında alımda görülen hafif düşüş endositoz mekanizmasının mikrotübüller üstünden gerçekleştiğini işaret edebilir.

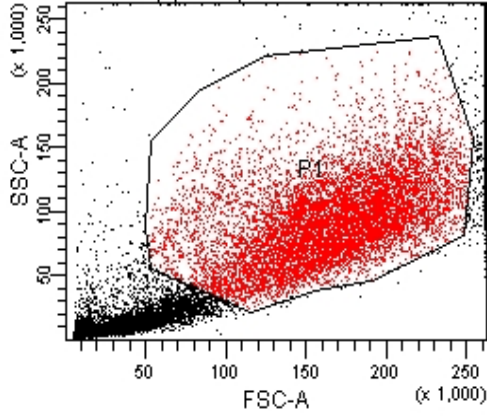
Proje önerisi kapsamında olmayan ancak projenin ilerleyen aşamasında anyonik kolesterol kopolimerlerine alternatif olarak önerilmiş olan katyonik kolesterol kopolimerleri ile ileride gerçekleştirilecek çalışmalar, bu kopolimerlerin endositoz yolaklarını inhibe eden ajanlar varlığında hücre alımı ve hücre içi dağılımı deneylerini içerebilir.

Sonuç olarak, TÜBİTAK desteği ile gerçekleştirilmiş olan bu proje ile, literatürde henüz yer almayan yeni polimerler üretilmiştir. Bu polimerler amino asit, peptit, yağ aside ve kolesterol gibi biyolojik ve sentetik bileşenlerden oluşan fonksiyonel hibrid yapılardır. Üretilmiş olan bu yapılar arasından potansiyel olarak hücre membranları ile etkileşebilecek ve hücre içine ilaç taşıyabilecek polimerler belirlenmiştir. Gelecekte bu proje kapsamında belirlenmiş yapıların hücre içi ilaç taşıma sistemlerinin bileşenleri olarak kullanılmasını hedefleyen çalışmaların yapılması planlanmaktadır.

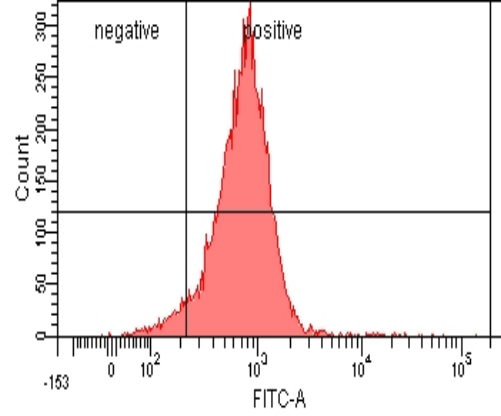
EKLER

EK A. HÜCRE ALIMI ÖRNEK ANALİZİ

A)



B)



C)

Population	#Events	%Parent	FSC-A Mean	FSC-A Max	FSC-A Min	FITC-A Mean
All Events	17,359	####	115,951	262,143	4,074	659
P1	9,390	54.1	163,827	253,702	50,238	888
negative	447	4.8	116,697	235,632	50,238	160
positive	8,937	95.2	166,217	253,702	51,046	925

D)

$$\% \text{ Hücre Alımı} = \frac{\text{OG ortalama}_{\text{Positive}} * \text{Hücre Sayısı}_{\text{Positive}}}{\text{OG ortalama}_{\text{P1}} * \text{Hücre Sayısı}_{\text{P1}}}$$

$$\text{Ortalama Floresans Şiddeti} = \text{FITC_A}_{\text{mean}}$$

Şekil A.1. 50 µM p(AMME) polimerinin A549 hücreleri tarafından 3 saat sonucunda alımı. A) Saçılım diyagramı B) Histogram C) İstatiksel analiz D) Hücre alımı denklemi.



KAYNAKLAR

Abdullah, S., Wendy-Yeo, W. Y., Hosseinkhani, H., Hosseinkhani, M., Masrawa, E., Ramasamy, R., Rosli, R., Rahman, S. A., Domb, A. J. 2010. "Gene Transfer into the Lung by Nanoparticle Dextran-Spermine/Plasmid DNA Complexes", *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 1-10.

Ali, M., Brocchini, S. 2006. "Synthetic approaches to uniform polymers", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 1671.

Almeida, H., Amaral, M. H., Lobão, P. 2012. "Temperature and pH stimuli-responsive polymers and their applications in controlled and selfregulated drug delivery", *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(6), 1.

Alshamsan, A., Haddadi, A., Incani, V., Samuel, J., Lavasanifar A., Uludag H. 2008. "Formulation and delivery of siRNA by oleic acid and stearic acid modified polyethylenimine", *Molecular pharmaceutics*, 6(1), 121-133.

Batz, H., Franzmann, G., Ringsdorf, H. 1973. "Pharmakologisch aktive polymere, modellreaktionen zur umsetzung von pharmaka und enzymen mit monomeren und polymeren reaktiven estern", 172, 27-47.

Biswas, S., Deshpande, P. P., Perche, F., Dodwadkar, N. S., Sane, S. D., Torchilin, V. P. 2012. "Octa-arginine-modified pegylated liposomal doxorubicin: an effective treatment strategy for non-small cell lung cancer", *Cancer Lett.*, 335(1), 191-200.

Boyer, C., Bulmus, V., Davis, T. P., Ladmiral, V., Liu, J. Q., Perrier, S. 2009. "Bioapplications of RAFT Polymerization", *Chemical Reviews*, 109(11), 5402-5436.

Boyer, C., Granville, A., Davis, T.P., Bulmus, V. 2009. "Modification of RAFT-Polymers via Thiol-Ene Reactions: A General Route to Functional Polymers and New Architectures.", *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry*, 47(15), 3773-3794.

Boyer, C., Liu, J., Bulmus, V., Davis, T.P. 2009b. "RAFT Polymer End-Group Modification and Chain coupling/Conjugation Via Disulfide Bonds", *Australian Journal of Chemistry*, 62 (8), 830-847.



Boyer, C., Bulmus, V., Davis, T.P. 2009c. " Efficient Usage of Thiocarbonates for Both the Production and the Biofunctionalization of Polymers ", *Macromolecular Rapid Communications*, 30, 493-497.

Bulmus, V. 2005. "Biomembrane active molecular switches as tools for intracellular drug delivery", *Australian Journal of Chemistry*, 58, 411.

Bulmus, V. 2011. "RAFT polymerization mediated bioconjugation strategies", *Polymer Chemistry*, 2(7), 1463-1472.

Bulmus, V., Woodward M., Lin L., Murthy N., Stayton P., Allan H. 2003. "A new pH-responsive and glutathione-reactive, endosomal membrane-disruptive polymeric carrier for intracellular delivery of biomolecular drugs", *Journal of Controlled Release*, 93(2), 105-120.

Caliceti, P., Veronese, F. M. 2003. "Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55, 1261.

Convertine, A. J., Benoit, D. S. W., Duvall, C. L., Hoffman, A.S., Stayton, P.S. 2009. "Development of a novel endosomolytic diblock copolymer for siRNA delivery", *Journal of Controlled Release*, 133, 221.

Desroches, M., Caillol, S., Lapinte, V., Auvergne, R. M., Boutevin, B. 2011. "Synthesis of biobased polyols by thiol- ene coupling from vegetable oils", *Macromolecules*, 44(8), 2489-2500.

Du, Z., Chen M., He Q., Zhou Y., Jin T. 2012. "Polymerized spermine as a novel polycationic nucleic acid carrier system", *International Journal of Pharmaceutics*, 434(1), 437-443.

Eberhardt, M., Theato, P. 2005. "RAFT Polymerization of Pentafluorophenyl Methacrylate: Preparation of Reactive Linear Diblock Copolymers", *Macromol. Rapid Commun.*, 26, 1488-1493.

Fei, L.K., Ren, L., Zaro, J.L., Shen, W.C. 2011. "The influence of net charge and charge distribution on cellular uptake and cytosolic localization of arginine-rich peptides", *Journal Of Drug Targeting*, 19(8), 675-680.



Fonseca, S. B., Pereira, M. P., Kelley, S. O. 2009. "Recent advances in the use of cell-penetrating peptides for medical and biological applications", *Adv Drug Deliv Rev*, 61(11), 953-964.

Foster, S., Duvall, C.L., Crownover, E.F., Hoffman, A. S., Stayton, P. S. 2010. "Intracellular delivery of a protein antigen with an endosomal-releasing polymer enhances CD8 T-cell production and prophylactic vaccine efficacy", *Bioconjugate Chemistry*, 21, 2205.

Funhoff, A. M., Van Nostrum, C. F., Lok, M. C., Kruijtzter, J. A. W., Crommelin, D. J. A., Hennink, W. E. 2005. "Cationic polymethacrylates with covalently linked membrane destabilizing peptides as gene delivery vectors", *Journal of Controlled Release*, 101, 233.

Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., Yagami, T., Tanaka, S., Ueda, K., Sugiura, Y. 2001. "Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery", *J Biol Chem.*, 276(8), 5836-5840.

Futaki, S. 2005. "Membrane-permeable arginine-rich peptides and the translocation mechanisms", *Adv Drug Deliv Rev*, 57(4), 547-558.

Gao, W. P., Liu, W. G., Christensen, T., Zalutsky, M. R., Chilkoti, A. 2010. "In situ growth of a PEG-like polymer from the C terminus of an intein fusion protein improves pharmacokinetics and tumor accumulation", *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, 107(38), 16432-16437.

Gao, W. P., Liu, W. G., Mackay, J. A., Zalutsky, M. R., Toone, E. J., Chilkoti, A. 2009. "In situ growth of a stoichiometric PEG-like conjugate at a protein's N-terminus with significantly improved pharmacokinetics", *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, 106(36), 15231-15236.

Gibson, M. I., Fröhlich, E., & Klok, H.-A. 2009. "Postpolymerization modification of poly(pentafluorophenyl methacrylate): Synthesis of a diverse water-soluble polymer library", *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 47(17), 4332-4345.

Godbey, W.T., Wu K.K., Mikos A.K. 1999. "Size matters: molecular weight affects the efficiency of poly (ethyleneimine) as a gene delivery vehicle", *Journal of Biomedical Materials Research*, 45(3), 268-275.

Grube, S., Wolfrum, U., Langguth, P. 2008. "Characterization of the epithelial permeation enhancing effect of basic butylated methacrylate copolymer - In vitro studies", *Biomacromolecules*, 9, 1398.

Gunasekaran, K., Nguyen, T. H., Maynard, H. D., Davis, T. P., Bulmus, V. 2011. "Conjugation of siRNA with Comb-Type PEG Enhances Serum Stability and Gene Silencing Efficiency", *Macromolecular Rapid Communications*, 32(8), 654-659.

Henry, S. M., El-Sayed, M. E. H., Pirie, C. M., Hoffman, A. S., Stayton, P. S. 2006. "pH-responsive poly(styrene-alt-maleic anhydride) alkylamide copolymers for intracellular drug delivery", *Biomacromolecules*, 7, 2407.

Herce, H., Garcia, A., Litt, J., Kane, R., Martin, P., Enrique, N., Milesi, V. 2009. "Arginine-rich peptides destabilize the plasma membrane, consistent with a pore formation translocation mechanism of cell-penetrating peptides", *Biophysical journal*, 97(7), 1917-1925.

Hoffman, A. S., Stayton, P. S., El-Sayed, M. E. H., Murthy, N., Bulmus, V., Lackey, C., Cheung, C. 2007. "Design of "Smart" Nano-Scale Delivery Systems for Biomolecular Therapeutics", *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 3, 213.

Huang, Z. H., Li, W. J., MacKay, J. A., Szoka Jr, F.C. 2005. "Thiocholesterol-based lipids for ordered assembly of bioresponsive gene carriers", *Molecular Therapy*, 11, 409.

Iacopetta, B. J., Morgan, E. H. 1983. "The kinetics of transferrin endocytosis and iron uptake from transferrin in rabbit reticulocytes.", *J Biol Chem.*, 258(15), 9108- 9115.

Johnson, R.N., Burke, R.S., Convertine, A.J., Hoffman, A. S., Stayton, P. S., Pun, S. H. 2010. "Synthesis of Statistical Copolymers Containing Multiple Functional Peptides for Nucleic Acid Delivery", *Biomacromolecules*, 11, 3007.

Jones, A.T, Gumbleton, M., Duncan, R. 2003. "Understanding endocytic pathways and intracellular trafficking: a prerequisite for effective design of advanced drug delivery systems", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55, 1353.



Kim, Y., Binauld, S., Stenzel, M. H. 2012. "Zwitterionic guanidine-based oligomers mimicking cell-penetrating peptides as a nontoxic alternative to cationic polymers to enhance the cellular uptake of micelles", *Biomacromolecules*, 13(10), 3418-3426.

Khalil, I. A., Kogure, K., Akita, H., Harashima, H. 2006. "Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery.", *Pharmacol Rev.*, 58(1), 32-45.

Kurtulus, I., Yılmaz, G., Ucuncu, M., Emrullahoglu, M., Becer, R., Bulmus, V. 2014. "A new proton sponge polymer synthesized by RAFT polymerization for intracellular delivery of biotherapeutics", *Polymer Chemistry*, 5, 1593-1604.

Lee, E.S., Gao, Z.G., Kim, D., BAE, Y. H. 2008. "Doxorubicin loaded pH-sensitive micelle targeting acidic extracellular pH of human ovarian A2780 tumor in mice", *Journal of Controlled Release*, 129, 228.

Li, L., Zahner, D., Su, Y., Gruen, C., Davidson, G., Levkin, P. A. 2012. "A biomimetic lipid library for gene delivery through thiol-yne click chemistry", *Biomaterials*, 33(32), 8160-8166.

Li, W. J., Nicol, F., Szoka, F. C. 2004. "GALA: a designed synthetic pH-responsive amphipathic peptide with applications in drug and gene delivery", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 967-85.

Mager, I. E., Eiriksdottir, E., Langer, K., Andaloussi, A. E. L., Langel, Ü. 2010. "Assessing the uptake kinetics and internalization mechanisms of cell-penetrating peptides using a quenched fluorescence assay.", *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1798(3), 338-343.

Meier, M. A., Metzger, J. O., Schubert, U. S. 2007. "Plant oil renewable resources as green alternatives in polymer science", *Chemical Society Reviews*, 36(11), 1788-1802.

Meyer, M., Philipp, A., Oskuee, R., Schmidt, C., Wagner E. 2008. "Breathing Life into Polycations: Functionalization with pH-Responsive Endosomolytic Peptides and Polyethylene Glycol Enables siRNA Delivery", *Journal of the American Chemical Society*, 130, 3272.

Min, S. H., Lee, D. C., Lim, M. J., Park, H. S., Kim, D. M., Cho, C. W., Yoon do, Y., Yeom, Y. I. 2006. "A composite gene delivery system consisting of polyethylenimine and an amphipathic peptide KALA", *Journal of Gene Medicine*, 8, 1425.

Morrissey, J. H., 2001. Morrissey Laboratory Protocol for Preparing 872 Phospholipid Vesicles (SUV) by Sonication; Department of Biochemis- 873 try, University of Illinois: Urbana-Champaign, Urbana, IL 61801, 874.

Moad, G., Chong, Y.K., Postma, A., Rizzardo, E., Thang, S.H. 2004. "Advances in RAFT polymerization: the synthesis of polymers with defined end-groups", *Polymer*, 46, 8458–8468.

Moad, G., Rizzardo, E., Thang, S. H. 2009. "Living Radical Polymerization by the RAFT Process – A Second Update", *Australian Journal of Chemistry*, 62, 1402.

Mukherjee, S., Ghosh, R. N., Maxfield, F. R. 1997. Endocytosis. *Physiological Reviews*, 77, 759.

Murthy, N., Robichaud J.R., Tirrell D.A., Stayton P.S., Hoffman A.S. 1999. "The design and synthesis of polymers for eukaryotic membrane disruption", *Journal of Controlled Release*, 61(1), 137-143.

Nuhn, L., Hirsch, M., Krieg, B., Koynov, K., Fischer, K., Schmidt, M., Zentel, R. 2012. "Cationic nanohydrogel particles as potential siRNA carriers for cellular delivery", *ACS nano*, 6(3), 2198-2214.

O'Donnell, A., Moollan, A., Baneham, S., Ozgul, M., Pabari, M. R., Cox, D., Kirby, B. P., Ramtoola, Z. 2015. "Intranasal and intravenous administration of octa-arginine modified poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles facilitates central nervous system delivery of loperamide", *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67(4), 525-536.

Ozer, I. 2014. "The Effect of Architecture and Molecular Weight on Cell Uptake and Intracellular Distribution of Poly(Ethylene Glycol)", İzmir Yüksek teknoloji Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.

Pack, D. W., Hoffman, A. S., Pun, S., Stayton, P.S. 2005. "Design and development of polymers for gene delivery", *Nature Reviews Drug Discovery*, 4, 581.

Pissuwan, D., Boyer, C., Gunasekaran, K., Davis, T.P. and Bulmus, V. 2010. "In vitro cytotoxicity of RAFT polymers", *Biomacromolecules*, 11 (2), 412-420.

Ranucci, E., Suardi, M. A., Annunziata, R., Ferruti, P., Chiellini, F., Bartoli, C. 2008. "Poly(amidoamine) Conjugates with Disulfide-Linked Cholesterol Pendants Self-Assembling into Redox-Sensitive Nanoparticles", *Biomacromolecules*, 9, 2693.

Saha, K., Kim, S. T., Yan, B., Miranda, O. R., Alfonso, F. S., Shlosman, D., Rotello, V. M. 2013. "Surface functionality of nanoparticles determines cellular uptake mechanisms in mammalian cells.", *Small*, 9(2), 300-305.

Sevimli, S., Inci F., Zareie H.M., Bulmus V. 2012. "Well-defined cholesterol polymers with pH-controlled membrane switching activity", *Biomacromolecules*, 13(10), 3064-3075.

Shamay, Y., Shpirt, L., Ashkenasy, G., David, A. 2014. "Complexation of cell-penetrating peptide-polymer conjugates with polyanions controls cells uptake of HPMA copolymers and anti-tumor activity", *Pharm Res.*, 31(3), 768-779.

Stewart, K. M., Horton, K. L., Kelley, S. O. 2008. "Cell-penetrating peptides as delivery vehicles for biology and medicine", *Organic & Biomolecular Chemistry*, 6, 2242.

Subbarao, N. K., Parente, R. A., Szoka, F. C., Nadasdi, L., Pongracz, K. 1987. "The pH-dependent bilayer destabilization by an amphipathic peptide", *Biochemistry*, 26, 2964.

Szabo, R., Banoczi, Z., Mezo, G., Lang, O., Kohidai, L., Hudecz, F. 2010. "Daunomycin-polypeptide conjugates with antitumor activity", *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1798(12), 2209.

Tonge, S. ve Tighe B., 2001. "Responsive hydrophobically associating polymers: a review of structure and properties", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 53(1), 109-122.

Torchilin, V. P. 2008. "Cell penetrating peptide-modified pharmaceutical nanocarriers for intracellular drug and gene delivery", *Biopolymers*, 90, 604.

Treat, J. N., Smith, D., Teng, C., Flores, J. D., Abel, B. A., York, A. W., Huang, F., McCormick, C. L. 2011. "Guanidine-Containing Methacrylamide (Co)polymers via aRAFT: Toward a Cell-Penetrating Peptide Mimic", *ACS Macro Lett.*, 1 (1), 100–104.



Turunç, O. ve Meier, M. A. 2010. "Fatty Acid Derived Monomers and Related Polymers Via Thiol- ene (Click) Additions", *Macromolecular rapid communications*, 31(20), 1822-1826.

Wagstaff, K. M., Jans, D. A. 2006. "Protein Transduction: Cell Penetrating Peptides and Their Therapeutic Applications", *Current Medicinal Chemistry*, 13, 1371-1387.

Wang, Y., Liu, Y., Liu, Y., Wang, Y., Wu, J., Li, R., Yang, J., Zhang, N. 2014. "pH-sensitive pullulan-based nanoparticles for intracellular drug delivery", *Polym. Chem.*, 5, 423-432.

Wolfrum, C., Shi, S., Jayaprakash, K. N., Jayaraman, M., Wang, G., Pandey, R. K., Rajeev, K, G., Nakayama, T., Charrise, K., Ndungo, E. M., Zimmermann, T., Kotliansky, V., Manoharan, M., Stoffel, M. 2007. "Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs", *Biotechnology*, 25, 1149.

Wolfrum, C., Shi, S., Jayaprakash, K. N., Jayaraman, M., Wang, G., Pandey, R. K., Rajeev, K. G., Nakayama, T., Charrise, K., Ndungo, E. M., Zimmermann, T., Kotliansky, V., Manoharan, M., Stoffel, M. 2007. "Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs", *NatBiotechnology*, 25(10), 1149-1157.

Yessine, M. A., Dufresne, M. H., Meier, C, Petereit, H. U., Leroux, J. C. 2007. "Proton-actuated membrane-destabilizing polyion complex micelles", *Bioconjugate Chemistry*, 18, 1010.

Yin, H.Q., Bae, Y.H. 2009. "Physicochemical aspects of doxorubicin-loaded pH-sensitive polymeric micelle formulations from a mixture of poly(L-histidine)-*b*-poly(L-lactide)-*b*-poly(ethylene glycol)", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71, 223.

Yusa, S. I., Fukuda, K., Yamamoto, T., Ishihara, K., Morishima, Y. 2005. "Synthesis of well-defined amphiphilic block copolymers having phospholipid polymer sequences as a novel biocompatible polymer micelle reagent", *Biomacromolecules*, 6(2), 663-670.

Vercauteren, D., Vandenbroucke, R. E., Jones, A. T., Rejman, J., Demeester, J., De Smedt, S. C., Sanders, N. N., Braeckmans, K. 2010. " The Use of Inhibitors to Study Endocytic Pathways of Gene Carriers: Optimization and Pitfalls", *Molecular Therapy*, 18(3), 561-569.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. ESMA VOLGA BULMUŞ ZAREİE
Proje No:	111T960
Proje Başlığı:	Biyosentetik Hibrit Polimerlerin RAFT Polimerizasyonu İle Üretilmesi ve Hücre Membraniyla Etkileşimlerinin Vücut Dışında Değerlendirilmesi
Proje Türü:	1001 - Araştırma
Proje Süresi:	36
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENS. MÜHENDİSLİK F.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/04/2012 - 01/04/2015
Onaylanan Bütçe:	414453.0
Harcanan Bütçe:	385548.77
Öz:	<p>Gen terapisi, gen sessizleştirme terapisi, DNA aşırı ve kanser kemoterapisi gibi çok sayıda önemli tedavi stratejisinde kullanılan etken maddelerin ve ilaç taşıma sistemlerinin birçoğu hücrelerin membranlarından yeterli miktarlarda geçemezler ve tedavi edici aktivitelerini göstermeden bozunurlar. Bu durum çok sayıda önemli tedavi stratejisinin, klinikte insanlar ve hayvanlar üzerinde uygulanabilen gerçek tedavilere dönüşmesini önemli ölçüde sınırlamaktadır.</p> <p>Önerilen proje ile hücre sitozolüne etken maddelerin taşınmasını kolaylaştıracak, endozom ve/veya lizozom membranının yapısal kararlılığını veya bütünlüğünü bozabilen, iyi tanımlanmış, amino asit, peptit veya lipid içeren biyosentetik hibrit polimerlerin Tersinir Katılma Ayrıştırma Zincir Transfer (RAFT) polimerizasyon yöntemiyle üretilmesi, bu polimerlerin membran aktivitesinin bilinen ve yeni geliştirilecek olan yöntemlerle karakterize edilmesi ve polimerlerin hücre alımlarının ve hücre-içi dağılımlarının in vitro deneyler ile belirlenmesi amaçlanmıştır.</p> <p>Bu amaçla, molekül ağırlıkları iyi kontrol edilmiş dar molekül ağırlığı dağılımına sahip arjinin amino asidi, oktaarjinin peptidi, undekanoik asit veya kolesterol içeren metakrilat (ko)polimerleri RAFT polimerizasyonu ile üretilmiştir. Üretilen polimerlerin çeşitli teknikler ile ayrıntılı olarak fizikokimyasal karakterizasyonu yapıldıktan sonra hücre membranlarıyla etkileşimleri, literatürde bu amaç için yaygın olarak kullanılan hemoliz deneyleriyle ve ayrıca yüzey plazmon rezonans (SPR) kullanılarak yeni geliştirilen bir yöntem ile incelenmiştir. Bunlara ek olarak in vitro hücre kültürlerinde, üretilen kopolimerlerin hücre canlılığına etkileri, hücreler tarafından alımları ve hücre içinde dağılımları belirlenmiştir. Tüm deneylerin sonucunda elde edilen bulgular; arjinin veya undekanoik asit içeren polimerlerin hücre canlılığına belirgin bir etki göstermeden hücre içine alınabildiğini, hücre/endozom membranı ile etkileşebildiğini ve hücre sitozolüne yayılabildiğini göstermiştir.</p> <p>Sonuç olarak, potansiyel olarak hücre içine etkili bir şekilde ilaç taşınımı mümkün kılacak polimerler üretilmiştir. Böylece çok sayıda potansiyel tedavi stratejisinin gerçek tedavilere dönüşmesine bir adım daha yaklaşılmıştır.</p>
Anahtar Kelimeler:	RAFT Polimerizasyonu, Endozomolitik Polimerler, Hücre içi İlaç Salım, Gen Terapisi
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır

Projenin Yapılan Yayınlar:	<p>1- Polymer-biomolecule hybrids for potential nanomedicine applications (Bildiri),</p> <p>2- Stimulus-sensitive polymer bioconjugates for nanomedicine applications (Bildiri),</p> <p>3- Biosynthetic Polymers for Delivery of Therapeutics (Bildiri),</p> <p>1- Well-Defined Cholesterol Polymers with pH-Controlled Membrane Switching Activity (Makale/Kitap/Kitapta Bölüm)2- SYNTHESIS OF WELL-DEFINED FATTY ACID POLYMERS AS POTENTIAL CELL MEMBRANE-DESTABILIZING AGENTS (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),</p> <p>3- DEVELOPMENT OF ARGININE CONTAINING WELL-DEFINED POLYMERS AND INVESTIGATION OF COMPLEXATION WITH DNA (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),</p> <p>4- SYNTHESIS OF pH-SENSITIVE CHOLESTEROL POLYMERS AND IN VITRO INVESTIGATION OF INTERACTIONS WITH CELL MEMBRANE (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum),</p> <p>5- SYNTHESIS OF pH-SENSITIVE CHOLESTEROL POLYMERS AND in vitro INVESTIGATION OF INTERACTIONS WITH CELL MEMBRANE (Tez (Araştırmacı Yetiştirilmesi) - Yüksek Lisans Tezi),</p> <p>6- DEVELOPMENT OF ARGININE-CONTAINING WELL-DEFINED POLYMERS (Tez (Araştırmacı Yetiştirilmesi) - Yüksek Lisans Tezi),</p> <p>7- SYNTHESIS AND RAFT POLYMERIZATION OF AN ARGININE CONTAINING MONOMER TO INVESTIGATE CELL MEMBRANE TRANSLOCATION (Tez (Araştırmacı Yetiştirilmesi) - Yüksek Lisans Tezi),</p> <p>8- SYNTHESIS OF WELL-DEFINED FATTY ACID POLYMERS AS POTENTIAL MEMBRANE DESTABILIZING AGENTS (Tez (Araştırmacı Yetiştirilmesi) - Yüksek Lisans Tezi),</p>
----------------------------	--

TÜBİTAK