



**Tarak-tipi ve Lineer Etilen Glikol Polimerlerinin Hücrelerle
In Vitro Etkileşimlerinin İncelemesi**

Program Kodu: 1002

Proje No: 113Z823

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. Esmâ Volga BULMUŞ ZAREİE

NİSAN 2015
İZMİR



ÖNSÖZ

Polimer esaslı ilaç salım sistemlerinde bugüne kadar en çok kullanılan polimerlerden biri lineer poli(etilen glikol) (L-PEG)'dür. L-PEG, biyomolekül esaslı tedavi edici ajanlar, lipozom, polimerik ve inorganik nanopartikül sistemlerinin kan akışında uzun süre sirküle edebilmelerini sağlamak amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak L-PEG'in hidrofilik yapısı ve geniş hidrodinamik hacmi nedeniyle, L-PEG ile modifiye edilmiş biyomolekül veya nanopartikül sistemlerinin hücreler tarafından tanınması ve alımının diğer polimer esaslı sistemlere göre daha düşük olduğu literatürde bilinmektedir. Hücre-dışı uygulamalar için bir avantaj teşkil eden bu durum, hücre-içi ilaç salım sistemlerinde L-PEG'in kullanımını kısıtlayan önemli bir dezavantajdır.

Yakın zamanda yapılan araştırmalar, farmakolojik uygulamalar için L-PEG'e bir alternatif olarak tarak-tipi poli(etilen glikol) (T-PEG)'ü öne çıkarmaktadır. T-PEG'in vücut içinde bozunabilen ester yan zincirlerine sahip olması, şemsiye-benzeri konformasyonu, yaşayan/kontrollü polimerizasyon teknikleri ile istenilen uç gruba ve mimariye sahip olarak sentezlenebilmesi, T-PEG'in L-PEG'e göre avantajları arasında sayılmaktadır. Ancak T-PEG'in hücresel düzeyde L-PEG'e kıyasla avantaj ve/veya dezavantajlarını ortaya koyan herhangi bir çalışma literatürde bildiğimiz kadarıyla henüz yoktur.

Bu projenin amacı, L-PEG ile karşılaştırmalı olarak T-PEG'in, vücut dışında kültür edilmiş hücreler ile etkileşimini sistematik ve detaylı olarak incelemektir. Bu amaçla, öncelikle değişen molekül ağırlıklarında T-PEG polimerleri sentezlenmiş ve eşdeğer molekül ağırlığa sahip L-PEG'lerle karşılaştırmalı olarak, fizikokimyasal özellikleri, hücre canlılığına ve membranına etkileri, hücreler tarafından alım miktarları ve alım mekanizmaları, hücre içi dağılımları çeşitli teknikler kullanarak belirlenmiştir. Ayrıca iki polimer mimarisinin konjuge edilmiş hedefleyici bir molekülü perdeleme etkisi hücre alımı deneyleri ile karşılaştırılmıştır. PEG türevlerinin ilaç salım sistemlerinde daha rasyonel kullanımını mümkün kılmaya yönelik önemli bulgular sağlamış olan bu proje kapsamında yapılan bütün çalışmalar TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.



İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	8
3.1 Kullanılan Kimyasallar	8
3.2 Tarak-tipi PEG'in Sentezi ve Karakterizasyonu	9
3.2.1 Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Analizi ile Kimyasal Yapı Analizi	10
3.2.2 Jel Geçirgenlik Kromatografisi Yöntemi ile Moleküler Ağırlık Analizi	10
3.2.3 Dinamik Işık Saçılımı Yöntemi ile Hidrodinamik Çap Analizi.....	10
3.2.4 Atomik Kuvvet Mikroskobu ile Moleküllerin Morfoloji ve Konformasyon Analizi ..	11
3.3 Tarak- tipi ve Lineer PEG Polimerlerinin Uç Grup Modifikasyonları.....	11
3.3.1 Tiyokarboniltiyo RAFT Uç Grubunun Uzaklaştırılması ve Tiyol Uç Grubunun Deaktivasyonu	11
3.3.2 Polimerlerin Floresan Boya ile Etiketlenmesi.....	13
3.3 Hücre Kültürü Deneyleri.....	14
3.3.1 Polimerlerin Sitotoksitesinin Belirlenmesi.....	14
3.3.2 Polimerlerinin Hücre Zarına Etkilerinin Belirlenmesi	15
3.3.3 Hücre Alımı Deneyleri	16
3.3.4 Polimerlerin Hücre İçi Dağılımı.....	17
3. 4 Polimerlere Cys-RGD Peptidinin Bağlanması	18
4. BULGULAR.....	22
4.1 Tarak-tipi PEG (poli(polietilenglikol metil eter metakrilat)'ın Sentezi ve Karakterizasyonu.....	22
4.1.1 Kimyasal Yapı ve Molekül Ağırlık Karakterizasyonu.....	22
4.1.2 Hidrodinamik Büyüklük (Hidrodinamik Çap-(D _n)) Karakterizasyonu.....	24
4.1.3 Moleküler Konformasyon Karakterizasyonu	25
4.2 Polimerlerin Sitotoksitesinin Belirlenmesi	26
4.2.1 RAFT Uç Grubunun Uzaklaştırılması ve Tiyol Grubunun Deaktivasyonu	26
4.2.2 Tarak-tipi ve Lineer PEG'in Hücre Canlılığına Etkisi.....	28
4.3 Polimerlerinin Hücre Zarına Etkilerinin Belirlenmesi	31
4.4 Polimerlerin Floresan Boya ile Etiketlenmesi	32
4.5 Polimerlerin Hücre İçine Alımı.....	35
4.5.1 Polimerlerin Hücre İçine Alımında Enerjiye Bağımlı Mekanizmaların Rolü	35
4.5.2 Hücre Alımlarında Polimer Konsantrasyonu ve İnkübasyon Süresinin Etkisi	36
4.5.3 Polimerlerin Hücre İçine Alım Mekanizmalarının Belirlenmesi	37
4.6 Polimerlerin Hücre İçi Dağılımının Belirlenmesi	40
4.7 Polimerlere RGD Peptidinin Bağlanması	41
4.8 RGD-Konjuge Polimerlerin Hücre Alımının Belirlenmesi	46
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	48



EKLER	52
EK A. HÜCRE ALIMI ÖRNEK ANALİZİ	52
EK B. HÜCRE İÇİ DAĞILIM GÖRÜNTÜLERİ	53
EK C. POLİMER KARAKTERİZASYONU	54
KAYNAKLAR.....	55

ŞEKİL LİSTESİ

Sekil

Sayfa Numarası

Şekil 2. 1. Lineer (L-PEG) ve tarak-tipi (T-PEG) polimerlerinin kimyasal yapıları	5
Şekil 3.1 Tarak-tipi PEG polimerinin sentez reaksiyonu şeması.	9
Şekil 3.2. Tarak-tipi PEG polimerinin aminoliz reaksiyonu şeması.	12
Şekil 3.3. Tarak-tipi PEG polimerinin tiyol grubunun deaktive edilmesi.	12
Şekil 3.4. Tarak-tipi PEG'in karboksilik asit uç grubunun aktifleştirilmesi ve amin grubuna dönüştürülmesi	19
Şekil 3.5. Amin uç grubuna sahip tarak-tipi PEG'in GMBS bağlantı ajanı ile reaksiyonu	20
Şekil 3.6. Tarak-tipi PEG polimerinin Cys-RGD peptidi ile reaksiyonu	21
Şekil 4.1. Çalışmada sentezlenen T-PEG (p(PEG-MA))'in (Mn 10,000 g/mol) saflaştırma sonrası alınmış ¹ H-NMR spektrumu.....	23
Şekil 4.2. Çalışmada sentezlenen T-PEG (p(PEG-MA))'in (Mn 20,000 g/mol) saflaştırma sonrası alınmış ¹ H-NMR spektrumu	23
Şekil 4.3. (a) Tarak-tipi PEG'in (10,000 g/mol) (b) Tarak-tipi PEG'in (20,000 g/mol) (c) Lineer PEG'in (10,000 g/mol) (d) Lineer PEG'in (20,000 g/mol) dinamik ışık saçılımı (DLS) yöntemi ile belirlenmiş farklı ortamlardaki hidrodinamik çapları (D _h).	25
Şekil 4.4. (a) Tarak-tipi PEG (20,000 g/mol) ve (b) Lineer PEG'in (20,000 g/mol) atomik kuvvet mikroskobu görüntüleri.	26
Şekil 4.5. Aminoliz reaksiyonu ile RAFT uç grubu uzaklaştırılmış 10,000 g/mol ağırlığındaki T-PEG'in ¹ H-NMR spektrumu.....	27
Şekil 4.6. Tiyol-en reaksiyonu sonucunda elde edilen ve toksisite deneylerinde kullanılan 10,000 g/mol ağırlığındaki T-PEG'in ¹ H-NMR spektrumu	27
Şekil 4.7. Tiyol-en reaksiyonu sonucunda elde edilen ve toksisite deneylerinde kullanılan 10,000 g/mol ağırlığındaki L-PEG'in ¹ H-NMR spektrumu	28
Şekil 4.8. MTT yöntemi ile BEAS-2B ve A549 hücreleri için oluşturulan kalibrasyon grafiği. MTT yöntemi ile hücre sayısına bağlı olarak elde absorbans değişimi.	29
Şekil 4.9. Tarak-tipi ve lineer PEG polimerlerinin (a) A549 hücrelerinin canlılığına 24 saat (b) A549 hücrelerinin canlılığına 72 saat (c) BEAS-2B hücrelerinin canlılığına 24 saat (d) BEAS-2B hücrelerinin canlılığına 72 saat inkübasyon sonucundaki etkisi.	30
Şekil 4.10. T-PEG ve L-PEG polimerleri ile 24 ve 72 saat inkübasyon sonrasında A549 hücrelerinin membranından LDH enzimi salınımındaki artış (polimerler ile etkileştirilmeyen hücrelere kıyasla).	31

Şekil 4.11. T-PEG ve L-PEG polimerleri ile 24 ve 72 saat inkübasyon sonrasında BEAS-2B hücrelerinin membranından LDH enzimi salınımındaki artış (polimerler ile etkileştirilmeyen hücrelere kıyasla).	31
Şekil 4.12. T-PEG 10K polimerine Oregon Green 488-maleimid floresan etiketinin bağlanması sonrasında alınmış ¹ H-NMR spektrumu.....	33
Şekil 4.13. Lineer PEG 10K polimerine Oregon Green 488-maleimid floresan etiketinin bağlanması sonrasında alınmış ¹ H-NMR spektrumu.....	33
Şekil 4.14. Oregon Green 488 Maleimid ile işaretlenmiş polimerlerin UV-Vis spektrumları (Polimer örnekleri 33 µM konsantrasyonda ultra-saf suda çözülerek hazırlanmıştır.) ...	34
Şekil 4.15. Tarak-tipi ve lineer PEG polimerlerinin (a) A549 hücreleri (b) BEAS-2B tarafından 4°C ve 37°C alımları	35
Şekil 4.16. Tarak-tipi ve lineer PEG polimerlerinin A549 hücreleri tarafından alımları: Polimer konsantrasyonu ve inkübasyon süresinin etkisi.....	36
Şekil 4.17. Tarak-tipi ve lineer PEG polimerlerinin BEAS-2B hücreleri tarafından alımları: Polimer konsantrasyonu ve inkübasyon süresinin etkisi.....	37
Şekil 4.18. A549 ve BEAS-2B hücrelerinin değişen konsantrasyonlarda (a) nokodazol (b) sitokalsin D (c) her iki transport inhibitörü ile (20 µM) 2 saat inkübasyon sonucunda canlılık değerleri	39
Şekil 4.19. T-PEG 10K (a), T-PEG 20K (b), L-PEG 10K (c) ve L-PEG 20K (d) polimerlerinin 12.5 µM konsantrasyonda 1 saat inkübasyon sonucunda A549 ve BEAS-2B hücreleri tarafından transport inhibitörleri varlığında alım değerleri.....	40
Şekil 4.20. A549 hücrelerinin Oregon Green ile işaretlenmiş T-PEG 20K ile inkübasyonun ardından çekilmiş floresan mikrografları. (a) Hoechst 33342 ile boyanmış nükleus (b) T-PEG 20K (c)Lysotracker Red DND-99 ile boyanmış lizozom (d) Farklı kanallarla çekilmiş a, b ve c mikrograflarının karşılaştırılması.....	42
Şekil 4.21. BEAS-2B hücrelerinin Oregon Green ile işaretlenmiş T-PEG 20K ile inkübasyonun ardından çekilmiş floresan mikrografları. (a) Hoechst 33342 ile boyanmış nükleus (b) T-PEG 20K (c)Lysotracker Red DND-99 ile boyanmış lizozom (d) Farklı kanallarla çekilmiş a, b ve c mikrograflarının karşılaştırılması.....	42
Şekil 4.22. Oregon Green etiketli tarak- tipi PEG 10K polimerinin EDC/NHS aktivasyonu ve etilendiamin bağlanması ve saflaştırma sonrası alınmış ¹ H-NMR spektrumu.....	43
Şekil 4.23. Oregon Green etiketli, amin uç gruplu tarak- tipi PEG 10K polimerinin GMBS bağlanması ve saflaştırma sonrası alınmış ¹ H-NMR spektrumu.....	43
Şekil 4.24. Oregon Green etiketli, maleimid uç gruplu tarak- tipi PEG 10K polimerinin RGD peptidinin bağlanması ve saflaştırma sonrası alınmış ¹ H-NMR spektrumu.....	44



- Şekil 4.25. Oregon Green etiketli, amin uç gruplu lineer PEG 10K polimerinin GMBS bağlanması ve saflaştırma sonrası alınmış ¹H-NMR spektrumu..... 44
- Şekil 4.26. Oregon Green etiketli, maleimid uç gruplu lineer PEG 10K polimerinin RGD peptidinin bağlanması ve saflaştırma sonrası alınmış ¹H-NMR spektrumu..... 45
- Şekil 4.27. A549 hücrelerinin 12.5 µM konsantrasyonda 1 saat inkübasyon sonucunda taraktipi ve lineer PEG'leri ve RGD konjugatlarını alım değerleri..... 46



TABLO LİSTESİ

Tablo

Sayfa Numarası

Tablo 3.1. Dinamik ışık saçılımı ölçümlerinde kullanılan çözücülerin kırılma indisi ve viskoziteleri.....	11
Tablo 4.1. Sentezlenen p(PEG-MA) polimerlerinin molekül ağırlığı ve moleküler ağırlık dağılımı değerleri.....	22
Tablo 4.2. T-PEG ve L-PEG polimerlerinin floresan boya (OG) ile işaretlenme derecesi	34



ÖZET

Polietilen glikol (PEG), ilaç taşıma sistemlerinde geniş bir kullanım alanına sahiptir. PEG, biyomolekül esaslı ilaçlarla konjugat halinde kullanılmasının yanı sıra, lipozom, polimerik ve inorganik nanopartiküllerin kan akışında uzun süre kalabilmelerini sağlamak amacıyla bu sistemlerin formülasyonunda da sıklıkla kullanılmaktadır. Uygulamalarda genellikle lineer veya lineer PEG'den türetilmiş çift dallı PEG yapıları kullanılmaktadır. Yakın zamanda yapılan araştırmalar, farmakolojik uygulamalar için lineer PEG (L-PEG)'e bir alternatif olarak tarak tipi poli(etilen glikol) (T-PEG)'ü öne çıkarmıştır. T-PEG'in vücut içinde bozunabilen ester yan zincirlere sahip olması, şemsiye-benzeri konformasyonu, yaşayan/kontrollü polimerizasyon teknikleri ile istenilen uç gruba ve mimariye sahip olarak sentezlenebilmesi, T-PEG'in L-PEG'e göre avantajları arasındadır.

Bu projenin ana amacı T-PEG'in *in vitro* ortamda hayvan hücreleri ile etkileşimlerini lineer eşlenikleri ile karşılaştırmalı olarak incelemek ve böylece T-PEG'in hücresel düzeyde L-PEG'e kıyasla avantaj ve/veya dezavantajlarını ortaya koymaya yönelik bulgular elde etmektir.

Bu amaçla, farklı molekül ağırlıklarda T-PEG (10,000 g/mol (10K) ve 20,000 g/mol (20K)) polimerleri sentezlendi. Eş molekül ağırlığa sahip L-PEG polimerleri ticari kaynaklardan temin edildi. Polimerlerin fizikokimyasal özellikleri, NMR, GPC, AFM ve DLS gibi farklı teknikler ile belirlendi. T-PEG polimerlerinin hidrodinamik çapları L-PEG'e göre daha küçük gözlenirken, T-PEG'in su içinde nanopartiküller, L-PEG'in ise tek birim zincirler halinde bulunduğu belirlendi. Polimerlerin hücreler ile etkileşimi kanserojenik A549 ve sağlıklı BEAS- 2B insan akciğer hücreleri kullanılarak incelendi. Polimerler hücreler üzerinde sitotoksik veya hücre membran geçirgenliğini artırıcı özellik göstermedi. Heriki PEG mimarisinin de hücreye enerji bağımlı yollarla alındığı ve alımlarında hücre iskeleti elemanlarının aktif rol oynadığı gözlemlendi. Önemli olarak, T-PEG'in L-PEG'e göre hücreler tarafından daha hızlı alındığı belirlendi. Ayrıca $\alpha_v\beta_3$ integrin pozitif hücreleri hedefleyebilen RGD peptidi T-PEG polimerine (10K) bağlandığında, polimerin A549 hücreleri tarafından alımının arttığı, RGD bağlanmış L-PEG polimerinin ise aynı hücreler tarafından alımının azaldığı gözlemlendi.

Sonuç olarak, bu proje ile T-PEG'in terapötik uygulamalarda L-PEG'e alternatif kullanılabilirliğinin anlaşılması yönünde önemli bulgular elde edilmiştir.



ABSTRACT

Poly(ethylene glycol) (PEG) has been widely used in drug delivery systems. In addition to its use as conjugates of biomolecular therapeutics, PEG has been widely used in formulations of nanocarriers to prolong the blood circulation half-life of these systems. In general, linear PEG (L-PEG) or its derivatives, branched PEGs have been used in biomolecule conjugates and particle-based drug carrier systems. However, recent studies have revealed comb-type PEG (T-PEG) as an alternative to L-PEG for pharmacological applications.

The overall aim of this project was to investigate interactions of T-PEG with in vitro cultured cells and compare to L-PEG counterparts, and hence to obtain findings revealing advantages and/or disadvantages of T-PEG, in comparison with L-PEG, at cellular level.

For this aim, T-PEGs (10,000 g/mol (10K) and 20,000 g/mol (20K)) were synthesized. The L-PEG counterparts were purchased. Physicochemical characteristics of polymers were determined via a variety of techniques including NMR, GPC, AFM and DLS. The hydrodynamic diameter of T-PEGs was smaller than that of L-PEGs. In water, T-PEG self-organized into nanoparticles and L-PEG presented as unimeric chains. Human lung cancer A549 and healthy BEAS-2B cell lines were used to determine polymer-cell interactions. Polymers did not show cytotoxic or cell membrane permeability enhancing properties. Both PEG architectures were observed to be taken up by cells through energy-dependent pathways and cytoskeleton components appeared to take role in the uptake of polymers. Importantly, T-PEGs were internalized by cells faster when compared with L-PEGs. Additionally, when RGD peptide targeting $\alpha_v\beta_3$ integrin positive cells was conjugated to T-PEG (10K), the uptake of the polymer by A549 increased, whereas L-PEG conjugated with RGD was taken up significantly less by the same cells.

As conclusion, in this Project, significant findings towards gaining better understanding of the availability of T-PEG as an alternative to L-PEG in pharmaceutical applications were obtained.



1. GİRİŞ

Poli(etilen glikol) (PEG) amfifilik, suda çözünebilir, inert, düşük immünojen ve düşük sitotoksik özelliklerinden dolayı biyomedikal alanda yoğun kullanıma sahip bir polimerdir (Hamidi vd., 2006; Knop vd., 2010). 1970'lerde Davis ve Abuchowsky tarafından önerildiğinden bu yana, biyomolekül-konjugatlarında ve diğer partikül-esaslı ilaç salım sistemlerinde en çok kullanılan polimer haline gelmiştir (Hamidi vd., 2006; Veronese vd., 2005).

Biyomoleküllerin diğer partikül-esaslı ilaç salım sistemlerinin PEG ile bağlanması, biyomolekülün farmakolojik ve farmakokinetik özelliklerinde serbest (bağlı olmayan) proteinlere göre iyileşmelere neden olmaktadır. Yapıların artan hidrodinamik hacimden dolayı, biyomoleküller kan akışında daha uzun süre kalabilmektedir. PEG ile modifiye edilmesi, nanopartikül ve biyomolekül esaslı sistemleri vücudun retiküloendotelial sistemi tarafından tanınmaz hale getirir (Hamidi vd., 2006; Veronese vd., 2005).

Biyomoleküllerin ve diğer partikül-esaslı ilaç salım sistemlerinin PEG ile bağlanmasının avantajlarının yanında dezavantajları da bulunmaktadır. Bu dezavantajlar arasında biyomolekül kararlılığını daha etkili şekilde arttıran yüksek molekül ağırlıklı L-PEG'in vücutta bozunabilir olmayan yapısından dolayı karaciğerde birikme problemi, L-PEG kullanılarak üretilen konjugatlarda heterojenite olabilmesi ve L-PEG yapılarının hücreler tarafından alımı azaltması sayılabilir (Bailon vd., 2001; Boudadijne vd. 2009; Knop vd., 2010; Kunath vd., 2003; Ryan vd., 2008; Veronese vd., 2005).

Son birkaç yıldır, L-PEG'e bir alternatif olarak, tarak-tipi PEG (T-PEG) öne çıkmaktadır. T-PEG, çok sayıda lineer kısa PEG veya oligoetilenglikol zincirinin bir poli(akrilat) veya poli(metakrilat) ana zincirinin üzerinde tekrarlanmasıyla oluşan "aşı" (graft) tipi bir polimerdir (Sayers vd., 2009). Vücut içinde bozunabilen ester yan zincirlerine sahip olması T-PEG'in, L-PEG'e göre en büyük avantajı sayılabilir. Böylece farmakolojik faydayı arttıracak şekilde yüksek molekül ağırlığına sahip T-PEG'ler uygulamalarda karaciğer birikimine yol açmadan kullanım bulabilir. Eş molekül ağırlıklı L-PEG ile T-PEG'i kıyasladığımızda, T-PEG'in şemsiyeye benzeyen konformasyonu nedeniyle metabolik enzimlere karşı daha güçlü bir koruma sağladığı belirtilmiştir. L-PEG'e göre T-PEG'in diğer önemli avantajı ise Tersinir Katılma- Ayrışma Zincir Transfer (RAFT-Reversible Addition-Fragmentation chain Transfer) Polimerizasyonu ve Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu (ATRP-Atom Transfer Radical Polymerization) gibi yaşayan/kontrollü polimerizasyon teknikleriyle kolayca elde edilebilmesidir (Boyer vd., 2009; Lundy vd., 2013; Moad vd., 2009; Pissuwan vd., 2010).

Bilindiği kadarıyla literatürde lineer ve tarak-tipi PEG'in hücre içi ilaç salım sistemlerinde karşılaştırıldığı sadece üç tane çalışma vardır. Ancak, bu yayınların hiçbiri doğrudan L-PEG ve T-PEG'in hücreler ile etkileşimleri hakkında karşılaştırmalı bir bilgi vermemektedir. Bu projenin amacı, L-PEG ile karşılaştırmalı olarak T-PEG'in, vücut dışında kültür edilmiş hücreler ile etkileşimini sistematik ve detaylı olarak incelemektir.

Bildiğimiz kadarıyla literatürde bir ilk olan bu çalışmanın kapsamında öncelikle değişen molekül ağırlıklarda ve dar molekül ağırlığı dağılımına sahip ($PDI < 1.2$) T-PEG'ler Tersinir Katılma-Ayrışma Zincir Transfer (RAFT) Polimerizasyonu ile sentezlenmiştir. T-PEG'lerin, eşdeğer molekül ağırlığına sahip L-PEG'lerle karşılaştırmalı olarak, hidrodinamik büyüklük, morfoloji ve konformasyon gibi fizikokimyasal özellikleri çeşitli teknikler kullanarak belirlenmiştir. Bu karşılaştırmalı inceleme, bildiğimiz kadarıyla literatürde bir ilk olarak gerçekleştirilmiştir. Buradan elde edilen bilgiler, sonraki adımlarda incelenmiş olan hücre etkileşimlerini yorumlamaya yardımcı olmuştur. Fizikokimyasal özellikleri belirlenmiş T-PEG'lerin, eşdeğeri L-PEG'lerle karşılaştırmalı olarak, vücut-dışında (*in vitro*) büyütülmüş normal ve kanserli hücreler üzerine toksik etkileri, hücreler tarafından alımları, hücre içinde dağılımları, hücre alım mekanizmaları ve hücre membranına etkileri incelenmiştir. Böylelikle tarak ve lineer yapıdaki PEG esaslı polimerlerin, molekül ağırlıklarına bağlı olarak, normal ve kanserli hücreler ile etkileşimlerindeki farklılıklar ve benzerlikler ortaya konulmaya çalışılmıştır.

Son olarak, polimer-esaslı ilaç salım sistemlerinde daha önceden kullanılmış ve hücre içine polimer alımını kolaylaştırdığı ispatlanmış, $\alpha_v\beta_3$ integrin reseptörü olan RGD (arjinin-glisin-aspartik asit) peptidi, polimerlerin zincir uçlarına bağlanmış ve elde edilen konjugatların kanserli hücreler tarafından alımı, RGD bağlanmamış polimerler ile karşılaştırmalı bir şekilde nicel olarak belirlenmiştir. Böylece, L-PEG ile T-PEG'in, uç gruplarına konjuge edilmiş hedefleyici molekülü perdeleme etkisi bir ön çalışma ile incelenmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

İlaç taşıyım ve salım sistemlerinde modern yaklaşımlar nanopartiküllerin, lipozomların ve polimer esaslı sistemlerin kullanımını içermektedir. Suda çözünen, polar, yüksüz bir poli(eter) olan polietilen glikol (PEG) (Şekil 1), nanopartiküller, lipozomlar ve polimerik sistemlerin tümünde, düşük toksisitesi, çok düşük protein adsorplama özelliği, immünojenik olmaması, kan akışı içinde uzun süre kalabilmesi sayesinde geniş bir kullanım alanına sahiptir (Hamidi vd. 2006; Veronese vd., 2005).

PEG'in ilaç sanayindeki önemli kullanım alanlarından biri terapötik protein-PEG konjugatlarıdır. 5000 – 40000 g/mol molekül ağırlığında lineer veya lineer PEG'den türetilmiş çift dallı PEG bağlanmış proteinlerin vücut içindeki farmakokinetik profillerinin, serbest (bağlı olmayan) proteinlere göre iyileşmiş olduğu literatürde bilinmektedir (Jokerst vd., 2011; Veronese vd., 2005). Buna ek olarak, lineer PEG'in bağlandığı moleküllerin immünojenikliğinin de PEG'in sağladığı perdeleme etkisi dolayısıyla azaldığı da rapor edilmiştir (Hamidi vd., 2006; Knop vd., 2010). Yaklaşık son yirmi yıldır, terapötik protein-PEG konjugatlarından oluşan 12 farklı ticari ürün, hepatit C ve kanser gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde ilaç olarak kullanılmaktadır (Knop vd., 2010). Ayrıca son yıllarda çok çeşitli hastalıkların tedavisi için büyük umutlar bağlanan kısa inhibe edici RNA (short interfering RNA) (siRNA) ile PEG konjugatları hazırlanmıştır. Kısa inhibe edici RNA'ya PEG'in kovalent olarak bağlanması biyolojik molekül proteaz ve nükleaz gibi metabolik enzimlere karşı korur, biyomolekülün kan ve vücut içindeki kararlılığını artırır, immünojenik özelliklerini azaltır, kan akışında yarılanma ömrünü uzatır ve vücut-içinde dağılımını değiştirir (Knop vd., 2010; Veronese vd., 2005). Böylece farmakokinetik özellikleri iyileştirilmiş terapötik biyomoleküller tedavi için yararlı hale getirilir.

Benzer şekilde birçok lipozom veya nanopartikül esaslı ilaç salım sistemlerinde, bu sistemlerin kan akışında uzun süre kalabilmesini sağlayabilmek için molekül ağırlıkları 1000 ila 20000 g/mol aralığında değişen lineer veya dallanmış PEG'ler kullanılmıştır (Hamidi vd., 2006; Jokerst vd., 2011; Knop vd., 2010; Torchilin vd., 2007; Veronese vd., 2005). PEG ile modifiye edilmesi, nanopartikül esaslı sistemleri vücudun retikuloendotelial sistemi tarafından tanınmaz hale getirir (Hamidi vd., 2006; Jokerst vd., 2011; Knop vd., 2010).

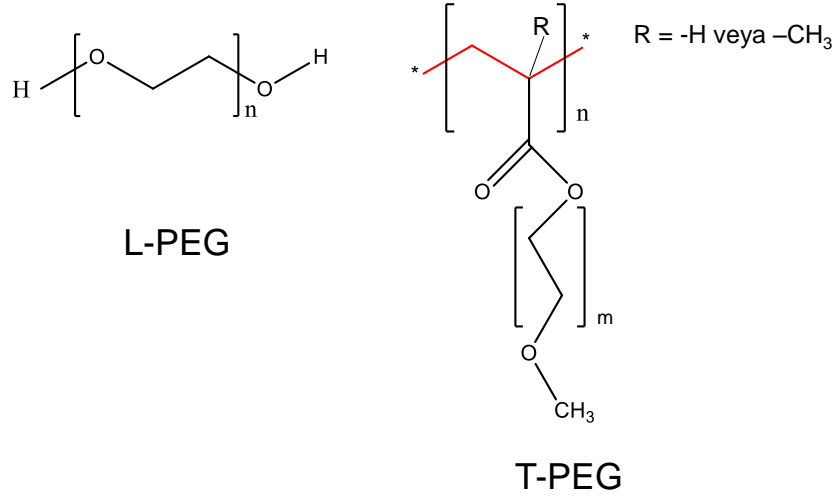
L-PEG'in, biyomolekül-konjugatlarına ve diğer partikül-esaslı ilaç salım sistemlerine sağladığı çok sayıda avantajın yanı sıra dezavantajları da vardır. Bu dezavantajlar arasında biyomolekül stabilitesini daha etkili şekilde arttıran yüksek molekül ağırlıklı L-PEG'in vücutta bozunabilir olmayan yapısından dolayı karaciğerde birikme problemi, L-PEG kullanılarak üretilen konjugatlarda heterojenite olabilmesi ve L-PEG yapılarının hücreler tarafından alımı azaltması sayılabilir.

Molekül ağırlığı arttıkça L-PEG'in kan sirkülasyon süresinin ve konjuge olduğu biyomolekülün sirkülasyon süresini arttırdığı bilinmektedir (Caliceti ve Veronese, 2003; Veronese vd., 2005). Bununla birlikte, 20 kDa'nun üstünde molekül ağırlığına sahip L-PEG'ler zamanla karaciğerde birikim yapıp makromoleküler sendroma sebep olurlar (Bouladijne vd., 2009; Knop vd., 2010; Veronese vd., 2005). Benzer şekilde, yüksek molekül ağırlığına sahip L-PEG, bağlı olduğu biyomolekül terapötiklerini dış etmenlere karşı daha iyi korurken, karaciğerde birikim problemi yüksek molekül ağırlıklı L-PEG kullanımını kısıtlar.

PEG'in konjugatlarının hazırlanabilmesi veya PEG'in nanopartikül yüzeylerine bağlanabilmesi için, L-PEG zincirinin monofonksiyonel olması gerekir. Yani polimer zincirinin sadece bir ucunda kovalent bağlanmayı mümkün kılacak fonksiyonel bir kimyasal gruba sahip olması gerekir. Ancak özellikle 5000 g/mol'ün üzerinde molekül ağırlığına sahip L-PEG'ler genellikle fonksiyonel olmayan, monofonksiyonel olan ve bifonksiyonel olan zincirlerin bir karışımından oluşur. Bu durum konjugasyon basamağından sonra ekstra saflaştırma işlemlerini gerektirir (Ryan vd., 2008).

L-PEG'in diğer önemli dezavantajı çok hidrofilik ve geniş hidrodinamik hacmi nedeniyle hücreler tarafından tanınması ve alımının az olmasıdır. Bu dezavantaj PEG'in özellikle hücre içi ilaç salım sistemlerinde kullanıldığı durumlarda önemli bir sorun teşkil etmektedir. SiRNA gibi hücre içinde aktivitesini göstermesi gereken aktif biyomoleküllerin PEG ile konjugatları, farmakokinetik açıdan önemli avantajlar sağlamasına rağmen bu konjugatların hücre içine az miktarlarda alınmaları uygulamada önemli bir problemdir (Caliceti ve Veronese, 2003; Kunath vd., 2003). Yüksek derecede hidrofilik ve nötr bir makromolekül olan PEG'in veya PEG-kaplanmış sistemlerin hücre alımını arttırmak için PEG ile birlikte membran-fuzojenik peptidler veya pozitif yüklü polimerler ile kopolimerleri kullanılmaktadır (Eto vd., 2005; Jokerst vd., 2011; Knop vd., 2010; Lee vd., 2001; Lee vd., 2002; Torchilin vd., 2007). Ancak PEG'in bu molekülleri perdelediği (shielding), bu nedenle bu moleküllerin bile hücre-içine alımlarının azaldığı literatürde rapor edilmiştir (Bailon vd., 2001; Eto vd., 2005; Kunath vd., 2003; Ryan vd., 2008; Veronese vd., 2005).

Son birkaç yıldır, L-PEG'e bir alternatif olarak, tarak-tipi PEG (T-PEG) öne çıkmaktadır (Heredia vd., 2008; Ryan vd., 2009). T-PEG, çok sayıda lineer kısa PEG veya oligoetilenglikol zincirinin bir poli(akrilat) veya poli(metakrilat) ana zincirinin üzerinde tekrarlanmasıyla oluşan "graft" tipi bir polimerdir (Şekil 1).



Şekil 2. 1. Lineer (L-PEG) ve tarak-tipi (T-PEG) polimerlerinin kimyasal yapıları

Vücut içinde bozunabilen ester yan zincirlerine sahip olması T-PEG'in, L-PEG'e göre en büyük avantajı sayılabilir. Böylece farmakolojik faydayı arttıracak şekilde yüksek molekül ağırlığına sahip T-PEG'ler uygulamalarda karaciğer birikimine yol açmadan kullanım bulabilir. Eş molekül ağırlıklı L-PEG ile T-PEG'i kıyasladığımızda, T-PEG'in şemsiyeye benzeyen konformasyonu nedeniyle metabolik enzimlere karşı daha güçlü bir koruma sağladığı ispatlanmıştır. L-PEG'e göre T-PEG'in diğer önemli avantajı Tersinir Katılma- Ayrışma Zincir Transfer (RAFT-Reversible Addition-Fragmentation chain Transfer) Polimerizasyonu ve Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu (ATRP-Atom Transfer Radical Polymerization) gibi yaşayan/kontrollü polimerizasyon teknikleriyle elde edilebilmesidir. Bu teknikler, L-PEG'in sentez tekniklerinin aksine özel deney düzenekleri gerektirmez ve bu nedenle her türlü kimya laboratuvarında gerçekleştirilebilecek pratik polimerizasyon teknikleridir. Ayrıca bu teknikler ile sentezlenen polimerlerin molekül ağırlıkları ve molekül ağırlığı dağılımları kontrol edilebilir. Daha da önemlisi polimer zincir uç grupları istenen fonksiyonel gruplar ile verimli bir şekilde donanabilir. Sonuç olarak bu gibi özellikler sayesinde, RAFT ve ATRP teknikleri ile üretilen polimerler terapötik amaçlı biyomolekül-polimer konjugatları veya polimerik ilaç salım sistemleri üretmek için son derece elverişli bir platform oluştururlar (Boyer vd., 2009; Lundy vd., 2013; Moad vd., 2009; Pissuwan vd., 2010).

Yakın zamanda grubumuz tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada literatürde ilk defa siRNA'nın serum ve nükleazlara karşı kararlılığının T-PEG ile konjuge edildikten sonra önemli ölçüde arttığı rapor edilmiştir (Gunasekaran vd., 2011). Aynı şekilde yakın zamanda farklı gruplar tarafından yayınlanmış çalışmalarda T-PEG'in protein konjugatlarının, serbest proteine göre daha iyi farmakokinetik özelliklere sahip olduğu vücut-dışı (*in vitro*) ve vücut-içi (*in vivo*) deneylerle ispatlanmıştır (Gao vd., 2010; Gao vd., 2009; Mathew vd., 2012; Ryan

vd., 2009; Ryan vd., 2011). Örneğin, Gao vd. doğal ve rekombinant proteinlerin T-PEG ile konjugatlarını hazırlamışlar ve bu konjugatların modifiye edilmemiş proteine göre vücut içindeki farmakokinetik özelliklerinin daha iyi olduğunu yaptıkları fare deneylerinde gözlemişlerdir. Bu araştırmacılar, lineer ve çift dallı PEG' e göre T-PEG'in biyolojik sıvılarda çözünürlüğünün daha farklı olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca T-PEG-protein konjugatlarının hücrede uzun süre kalarak bozunma hızının daha düşük olduğunu rapor etmişlerdir. T-PEG-rekombinant-protein konjugatlarının, fare tümör hücrelerinde daha çok biriktiği gözlenmiş ve bu durum T-PEG'in proteinin yarı ömrünü daha fazla uzatmasına bağlanmıştır (Gao vd., 2010; Gao vd., 2009). Ryan vd. (2009, 2011) ise L-PEG ve T-PEG'i kemik dokusunun oluşumunda rol alan kalsitonin hormonuna bağlamışlar ve L-PEG ile kıyaslandığında, T-PEG'in 'şemsiye' şekli konformasyonu dolayısıyla kalsitonin'in proteolitik dirençliliğini daha fazla arttırdığını ve vücut tarafından tanınmasını daha fazla engellediğini belirtmişlerdir. Daha da önemlisi T-PEG konjugatının L-PEG konjugatına göre kalsitoninin biyolojik aktivitesini %35 daha fazla koruduğu gözlenmiştir.

Biyomolekül konjugatları dışında T-PEG, kontrollü ilaç salım için hazırlanan nanopartikül ve misellerin yüzeylerinde de hidrofilik bir kabuk olarak yakın zamanda yayınlanan sınırlı sayıda çalışmada kullanılmıştır (Desphande vd., 2004; Desphande vd., 2002; Mathew vd., 2012; Srividhya vd., 2006). Bu çalışmalardan bir tanesinde T-PEG'in hidrofobik monomerlerle hazırlanan kopolimerlerinden oluşan misellerin içine kanser ilacı yüklenerek yumurtalık kanseri hücreleri öldürülmeye çalışılmıştır (Kim vd., 2011). Bu çalışmada yüzeyleri T-PEG kaplı nanopartikül sistemin partikül konsantrasyonuna bağlı bir şekilde hücreler tarafından alındığı not edilmiştir. Aynı çalışmada, bazı kanser hücrelerinin yüzeyinde normalden fazla miktarda üretilen $\alpha\beta 3$ integrinlerinin ligandı olan RGD (arjinin-glisin-aspartik asit) peptidinin T-PEG kaplı nanopartikül sistemin yüzeyine tutturulmasıyla hücreler tarafından alınımının arttığı gözlenmiştir (Kim vd., 2011). Tedja vd., (2012) titanyum oksit nanopartiküllerin yüzeylerini PEG monomeri (M_n : 475 g/mol) ve T-PEG ile modifiye etmişler ve daha sonra nanopartiküllerin A549 ve H1299 hücre hatları tarafından alınımını incelemişler ve yüzeyi sadece silan ile modifiye olmuş nanopartiküllerin alınımına göre oldukça düşük olduğunu tespit etmişlerdir.

Bilinen kadarıyla literatürde lineer ve tarak-tipi PEG'in hücre içi ilaç salım sistemlerinde karşılaştırıldığı sadece üç tane çalışma vardır (Deshpande vd., 2004; Deshpande vd., 2002; Venkataraman vd., 2011). Bu çalışmaların hepsi DNA-polielektrolit komplekslerinden oluşan poliplekslerin hücre içindeki transfeksiyon aktivitelerinde ve hücre alınımında PEG moleküler mimarisinin etkilerini incelemiştir. Bu çalışmalarda PEG içeren kopolimer poliplekslerinin tümünün, sadece poli(kasyon) ve DNA'dan oluşan poliplekslere göre hücre alınımının daha az olduğu rapor edilmiştir. Bununla birlikte L-PEG ve (7-8 adet

etilenglikol tekrarı içeren) kısa PEG graflarına sahip T-PEG'den oluşan kopolimerlerin benzer oranlarda transfeksiyon aktivitesi ve hücre alımı olduğu gösterilmiştir. Buna karşılık (45 adet etilen glikol tekrarı içeren) uzun PEG graflarına sahip T-PEG'den oluşan kopolimerlerin poliplekslerinin belirgin şekilde daha düşük hücre alımı ve transfeksiyon aktivitesi olduğu gözlenmiştir. Ancak bu çalışmalara konu olan poliplekslerin hücre alımları; sadece içeriklerindeki PEG'in moleküler mimarisinden değil oluşan nanopartikül boyutları ve nanopartikül yüzey yükünden de önemli ölçüde etkilenmektedir. Dolayısıyla bu yayınların hiçbiri doğrudan L-PEG ve T-PEG'in etkileri hakkında karşılaştırmalı bir bilgi vermemektedir.

RGD peptidi ve L-PEG'in birlikte kullanılması ve L-PEG'in dezavantajlarından birini ortaya koyması açısından güzel bir örnek, alanda önde gelen bir isim olan Kissel vd. tarafından not edilmiştir. Bu çalışmada RGD peptidi bağlanmış poli(etilenimin)'in kanser hücreleri tarafından alımında RGD-bağlı olmayan polimere göre artış görülürken, PEG'in RGD ile bağlanması hücre içine alımda olumlu sonuç vermemiştir (Kunath vd., 2003). Bu durum L-PEG'in bağlı olduğu molekülleri perdeleme (shielding) etkisinden kaynaklanmaktadır. T-PEG içeren taşıyıcı sistemler üzerine yapılan bazı yeni çalışmalarda, hücre tanıyıcı ligandların bu sistemlerin hücre alımını spesifik olarak arttırdığı rapor edilmiştir. Örneğin, T-PEG ile oluşturulmuş amfifilik blok kopolimer misellerinin yumurtalık kanser hücreleri tarafından doza bağlı hücre alımı nicel olarak belirlenmiş olup, hücre alımının misel yüzeylerine RGD peptid eklendikten sonra arttığı rapor edilmiştir (Kim vd., 2011). Literatürde T-PEG ve L-PEG'i, bağlandıkları hedefleyici molekülü perdeleme açısından karşılaştırılan herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Kimyasallar

Oligo(etilen glikol) metil eter metakrilat (OEGMA) monomeri (M_n :475 g/mol) ve 4-Cyano-4-(fenilkarbontiyoyliyo) pentanoik asit (CPADB) zincir transfer ajanı Aldrich'den satın alınmışlardır. L-PEG 20K (O-[2-(3-mercaptopropinoilaminoetil)-O-metil polietilen glikol (20,000 g/mol, PDI< 1.08)) Fluka'dan, L-PEG 10K (mPEG-SH (M_n :10,000 g/mol, PDI<1.08)) ise NanoCS'den temin edilmiştir. RAFT polimerizasyon başlatıcısı olan 2,2,azoisobütironitril (AIBN) kullanılmadan önce iki kez metanol kullanılarak kristalize edilmiştir. Dietileter, asetonitril, N,N-Dimetilformamid (DMF), tris(2-karboksietil) fosfin hidroklorür (TCEP), N-Hidroksisüksinimid (NHS), N'-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilkarbonimide hidroklorür (EDC), heksilamin (HEA), trietilamin (TEA) kimyasalları Sigma'dan satın alınmıştır. N- γ -maleimidobütiril-oksiksüksinimid ester (GMBS) bağlantı ajanı ve poliakrilamid jel filtrasyon kolonları (1.8kDa) Pierce'dan satın alınmıştır. MWCO değeri 1000 ve 3500 Da olan diyaliz membranları Spectrum Laboratories'den temin edilmiştir. Jel filtrasyon kromatografisinde hareketli faz olarak kullanılan N'-N-dimetilasetamid (DMAc) VWR BDH Prolabo'dan satın alınmıştır. Proje boyunca kullanılan deutere kloroform, su ve DMSO Merck'den temin edilmiştir. Cys-RGD peptidi ise Bachem'den satın alınmıştır.

RPMI-1640 ve DMEM hücre kültür ortamları, sığır serumu ve tripsin enzimi Biological Industries'den temin edilmiştir. 3-(4,5-dimetil-2-thiazol)-2,5-difenil-2H-tetrazolyum bromid (MTT), nokadazol, sitokalsin D, dimetilsülfoksit (DMSO) ve gentamisin Sigma'dan satın alınmıştır. Oregon Green® maleimide, Hoechst 33342 (3,5'-Bi-1H-benzimidazol, 2'-(4-etoksifenil)-5-(4-metil-1-piperazinil), Lysotracker Red DND-99® floresan boyaları Invitrogen-Molecular Probes'dan, Laktat dehidrogenaz (LDH) testi ise Promega'dan temin edilmiştir.

BEAS-2B ve A549 hücrelerinin stokları sırasıyla Prof. Dr. Serdar Özçelik ve İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyomühendislik ve Biyoteknoloji Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir.

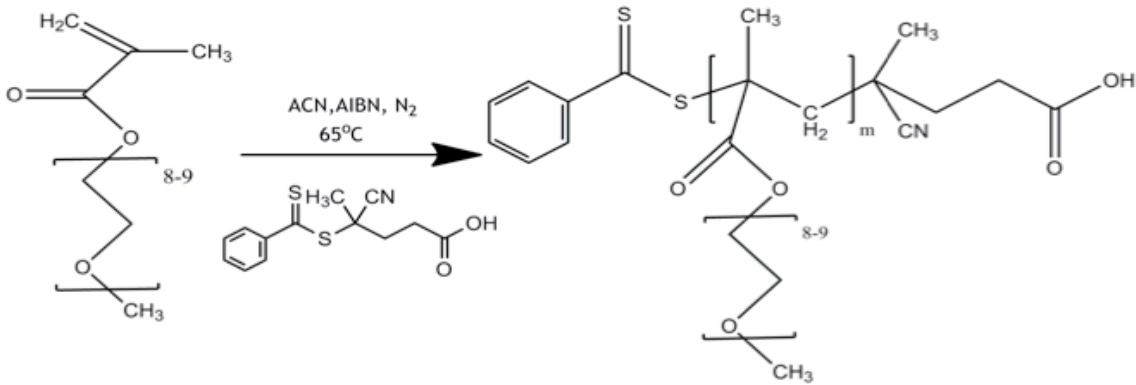
Nükleer Manyetik Rezonans ölçümleri İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü'nde bulunan Varian VNMRJ 400 spektrometresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Jel filtrasyon kromatografisi deneyleri için laboratuvarımızda bulunan RID-10A kırılma indisi dedektörü içeren Shimadzu moduler sistem kullanılmıştır. Dinamik ışık saçılımı deneyleri İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü'nde bulunan Malvern Zetasizer Nano ZS cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Atomik kuvvet mikroskobu deneylerinde İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü'nde bulunan NT-MDT Nanomagnetics Instruments Solver Pro 7 cihazı kullanılmıştır. UV-Vis spektroskopi analizleri laboratuvarımızda bulunan Thermo Scientific

Evolution 201 ve İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyomühendislik ve Biyoteknoloji Araştırma Merkezi'nde bulunan Thermo Electron Corporation Microplate Reader ile gerçekleştirilmiştir. Polimerlerin hücre alımını ve hücre içi lokalizasyonu belirleme deneylerinde sırasıyla İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyomühendislik ve Biyoteknoloji Araştırma Merkezi'nde bulunan BD FACSCanto™ akış sitometrisi ve İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü'nde bulunan Olympus IX81 floresan mikroskobu kullanılmıştır.

3.2 Tarak-tipi PEG'in Sentezi ve Karakterizasyonu

İki farklı molekül ağırlıkta (10,000 g/mol ve 20,000 g/mol) ve dar molekül ağırlığı dağılımına (<1.2) sahip tarak-tipi PEG polimerleri, polietilen glikol metil eter metakrilat ($M_n=475$ g/mol, $n=8-9$) monomerinin RAFT polimerizasyonu ile sentezlenmiştir (Şekil 3.1).

RAFT zincir transfer ajanı (CPADB) ve polietilen glikol metil eter metakrilat monomeri asetonitril içinde çözülmüşlerdir. Polimerizasyon başlatıcısı olarak azo-başlatıcısı (2,2'-azobisisobutironitril (AIBN)) kullanılmıştır. [CPADB]/[AIBN]/[Monomer] oranı ve monomer konsantrasyonu sırasıyla 50/1/0.25 ve 1 M'dir. Çözeltiden oksijeni uzaklaştırabilmek için buz üzerinde 30 dakika süre ile azot gazı ile çözelti süpürülmüş ve sonrasında polimerizasyon 65°C sıcaklıkta başlatılmıştır. Yapılan seri denemeler ile 10,000 g/mol molekül ağırlığa sahip tarak-tipi PEG polimerini elde etmek için gerekli reaksiyon süresi 100 dakika, 20,000 g/mol molekül ağırlığa sahip polimeri elde etmek için gerekli reaksiyon süresi 225 dakika olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.1 Tarak-tipi PEG polimerinin sentez reaksiyonu şeması.

Polimerizasyon ortamında reaksiyona girmemiş olan monomer, başlatıcı ve RAFT ajanının saflaştırılması için öncelikle reaksiyon çözgeni asetonitril vakum altında uzaklaştırılmıştır. 20,000 g/mol ağırlığındaki tarak-tipi PEG polimeri soğuk dietileter kullanılarak çöktürülmüştür. 10,000 g/mol molekül ağırlığa sahip tarak-tipi PEG polimeri ise

MWCO değeri 3500 Da olan diyaliz membranı kullanılarak 5 gün süre ile diyaliz edilmiş ve sonrasında dondurularak kurutulmuştur.

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

Proton nükleer manyetik rezonans ($^1\text{H-NMR}$) spektroskopisi sentezlenen polimerlerin kimyasal yapısını, teorik moleküler ağırlıklarını ve saflıklarını analiz etmek üzere kullanılmıştır. NMR örnekleri 8 mg/ml konsantrasyonda deutere çözügen içinde (CdCl_2 , DMSO veya D_2O) çözülmüş ve Varian VNMRJ 400 cihazı kullanılarak 64 spin sayısında ölçülmüştür. 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 $^\circ$ ve 100 A $^\circ$ (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.

3.2.3 Dinamik Işık Saçılımı Yöntemi ile Hidrodinamik Çap Analizi

Polimerlerin molekül büyüklükleri (bir başka deyişle hidrodinamik çapları) hücre alımını etkileyen önemli parametrelerden biridir. Sentezlenen T-PEG'ler ve satın alınan L-PEG'lerin hidrodinamik çapları, farklı ortamlarda (su, fosfat tamponu, hücre kültür ortamı, ve %10 serum içeren hücre kültür ortamı) dinamik ışık saçılımı (dynamic light scattering, DLS) tekniği ile ölçülmüş ve moleküler mimarinin hidrodinamik boyutlara etkisi belirlenmiştir. İstatiksel analiz iki yönlü T-test ile gerçekleştirilmiştir.

Polimer solüsyonları 0.05 mM konsantrasyonda farklı ortamlarda (su, fosfat tamponu, hücre kültür ortamı (DMEM ve RPMI) ve %10 serum içeren hücre kültür ortamı (DMEM ve RPMI)) hazırlanmışlar ve 0.22 μm filtre ile filtre edilmişlerdir. 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. Kullanılan çözücülerin kırılma indisi ve viskoziteleri Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Dinamik ışık saçılımı ölçümlerinde kullanılan çözücülerin kırılma indisi ve viskoziteleri

Çözücü	Kırılma Indisi	Viskozite (cP)	Referans
Su	1.333	0.880	(Abilez vd., 2006)
Fosfat tamponu (PBS)	1.338	0.899	(Abilez vd., 2006)
PBS + %10 Serum	1.338	0.899	(Abilez vd., 2006)
RPMI	1.330	1.010	(Yunus vd., 1988)
RPMI + %10 Serum	1.330	1.100	(Yunus vd., 1988)
DMEM	1.345	1.010	(Dardik vd., 2005)
DMEM + %10 Serum	1.520	1.100	(Gauggel vd., 2012)

3.2.4 Atomik Kuvvet Mikroskobu ile Moleküllerin Morfoloji ve Konformasyon Analizi

Tarak-tipi ve lineer PEG polimerlerinin morfolojileri ve konformasyonlarının analizi atomik kuvvet mikroskobu (AFM) aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Polimerlerin sıvı ortamdaki morfolojilerini belirlemek için $2 \cdot 10^{-9}$ M konsantrasyonda hazırlanan polimer örneklerinden 10 μ l solüsyon mika yüzey üzerine damlatılmış, polimerlerin yüzey ile etkileşime geçmeleri için 30 dakika bekletilmiş ve daha sonra yüzeye 100 μ l su damlası bırakılmıştır. Örneklerin faz-kontrast ve topografik mikroskop görüntüleri Nanosurf Instrument Taramalı Prob Mikroskobu kullanılarak hafifçe dokunma modunda (tapping mode) elde edilmiştir.

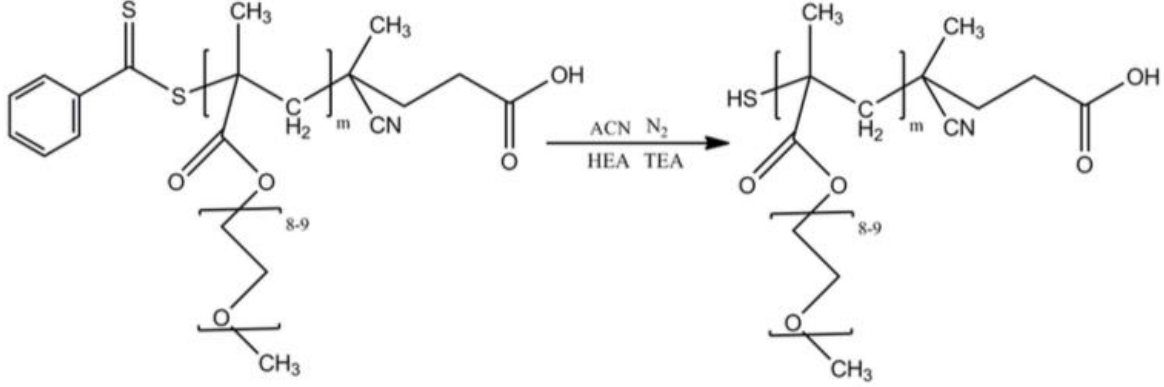
3.3 Tarak- tipi ve Lineer PEG Polimerlerinin Uç Grup Modifikasyonları

3.3.1 Tiyokarboniltiyo RAFT Uç Grubunun Uzaklaştırılması ve Tiyol Uç Grubunun Deaktivasyonu

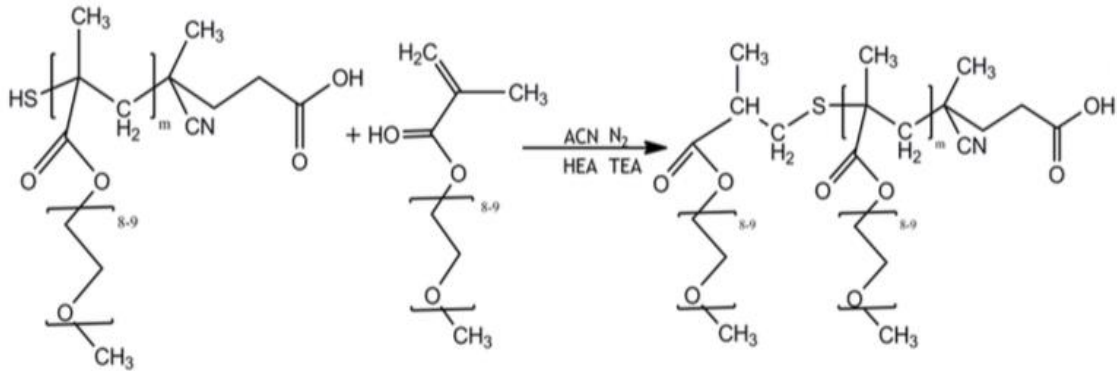
RAFT zincir transfer ajanının reaktif tiyokarboniltiyo grubunun önemli bir sitotoksikite kaynağı olduğu ve bu grubunun uzaklaştırılması için birçok yöntem literatürde belirtilmiştir (Barner-Kowollik, 2008).

Bu çalışmada, tarak-tipi PEG polimerlerinin reaktif tiyokarboniltiyo uç grubunun polimerden uzaklaştırılması amin varlığında yürütülen ve tiyol grubunun oluşmasıyla sonuçlanan aminoliz yöntemiyle gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2). Oksijensiz ortamda gerçekleştirilen aminoliz reaksiyonuna takiben ortama PEG-metakrilat monomeri eklenerek aynı zamanlı olarak tiyol gruplarına Michael katılması ile bir monomer ünitesi daha eklenmiş

ve oluşan aktif tiyol uç grubu kapatılmıştır (Şekil 3.3). Benzer şekilde lineer PEG polimerlerinin tiyol uç grubu da PEG-metakrilat monomeri ile kapatılmıştır.



Şekil 3.2. Tarak-tipi PEG polimerinin aminoliz reaksiyonu şeması.



Şekil 3.3. Tarak-tipi PEG polimerinin tiyol grubunun deaktive edilmesi.

Bu reaksiyon için, tiyolkarboniltiyo grubu içeren tarak-tipi PEG polimeri, PEG-metakrilat monomeri, trietilamin (TEA) ve heksilamin (HEA) asetonitril içinde sırasıyla 1/5/10/10 mol oranında çözülmüşlerdir. Polimer konsantrasyonu 4 mM olarak kullanılmıştır. Reaksiyon azot altında ve oda sıcaklığında 2 saat sürdürülmüştür. Reaksiyon sonunda asetonitril vakum altında uçurulmuştur. Reaksiyon karışımı soğuk dietileter içinde çöktürülerek saflaştırılmıştır. Saflaştırılan polimerlerde bulunan eser miktarda eter vakum altında uzaklaştırılmış ve polimerlerin saflığı $^1\text{H-NMR}$ ile belirlenmiştir.

Lineer PEG polimerlerinin aktif tiyol grubunu kapatmak için gerçekleştirilen reaksiyonda polimer öncelikle tris(2-karboksietil) fosfin hidroklorür (TCEP) varlığında PEG-metakrilat monomeri ile reaksiyona sokulmuştur. Bu amaçla polimer, TCEP ve PEG-

metakrilat fosfat tamponunda (pH 7.1, 0.5 M) sırasıyla 1/20/20 oranında çözülmüşlerdir. Polimer konsantrasyonu 10 mM olarak kullanılmıştır. Reaksiyon 20 saat boyunca oda sıcaklığında azot altında sürdürüldükten sonra ortama 0.2 M TCEP eklenmiş ve reaksiyon 4 saat daha devam ettirilmiştir. Reaksiyon sonunda solüsyon MWCO değeri 3500 Da olan diyaliz membranı kullanılarak 4 gün boyunca suya karşı diyaliz edilmiştir.

3.3.2 Polimerlerin Floresan Boya ile Etiketlenmesi

T-PEG ve L-PEG'lerin hücre alımlarının ve hücre içi dağılımlarının akış sitometresi ve floresan mikroskopu ile incelenebilmesi için öncelikle polimerlerin 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.

Maleimid uç grubu fonksiyonelliğine sahip olan Oregon Green etiketinin tarak-tipi PEG'lere bağlanması polimerin uç grup olarak taşıdığı RAFT ajanının kırılması ile oluşan tiyol grubunun etiketin maleimid grubu ile katılma reaksiyonuna girmesi ile gerçekleştirilmiştir (Boyer vd., 2009a; 2009b, 2009c). Uç grup tiyol-fonksiyonel L-PEG'ler (10,000 ve 20,000 g/mol) de benzer şekilde maleimid uç grup fonksiyonelliğine sahip Oregon Green floresan etiket ile işaretlenmiştir.

Etiketin polimerlere bağlanma reaksiyonu için Oregon Green boyası 100 mM konsantrasyonda DMF ile çözülmüştür. Tiyol uç grup fonksiyonelliğine sahip tarak-tipi veya lineer PEG polimerleri, 0.1 mM konsantrasyonda fosfat tamponunda (pH: 7.1, 0.5 M) çözülmüş ve 5 dakika süre ile TCEP (0.02 M) ile reaksiyona sokulmuşlardır. DMF içinde çözülmüş boya solüsyonu (100 mM) polimer çözeltisine damla damla ve final boya konsantrasyonu 0.5 mM olacak şekilde karıştırma altında eklenmiştir. Reaksiyon azot altında 2 saat süre ile gerçekleştirilmiş ve bu sürenin sonunda solüsyona azot altında 0.01 M TCEP eklenmiştir. Bunu takiben reaksiyona gece boyunca devam edilmiştir.

İnkübasyon süresinin sonunda elde edilen çözelti MWCO 3500 Da diyaliz membranı kullanılarak 5 gün boyunca diyaliz edilmiş ve sonrasında dondurularak kurutulmuştur. Polimer zincirlerinin floresan etiketlerce işaretlenme oranı 33 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 absorpsiyon 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.



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

3.3 Hücre Kültürü Deneyleri

Hücre kültürü deneylerinde insan bronş epitelyum sağlıklı hücre hattı (BEAS-2B) ve insan akciğer adenokarsinom epitelyum hücre hattı (A549) kullanılmıştır. BEAS-2B hücreleri %4.5 glukoz, % 10 sığır serumu ve %1 gentamisin içeren DMEM ortamında büyütülürken, A549 hücrelerinin büyütülmesinde RPMI-1640 hücre kültür ortamına ek olarak % 10 sığır serumu ve %1 gentamisin kullanılmıştır. Hücreler yüzeyi % 90 oranında kapladıklarında EDTA içeren tripsin enzimi kullanılarak yüzeyden kaldırılmışlar ve belirlenen oranlarda yeni yüzeylere aktarılmıştır.

3.3.1 Polimerlerin Sitotoksitesinin Belirlenmesi

Farklı molekül ağırlıklarındaki T-PEG ve L-PEG polimerlerinin hücreler üzerindeki toksik özelliklerinin karşılaştırmalı olarak 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 10^4 hücre/hane konsantrasyonda A549 veya BEAS-2B hücreleri uygun besi ortamı içinde yerleştirilmiş ve 24 saat boyunca 37°C ve %5'lik CO_2 atmosferinde büyütülmüşlerdir. Tarak-tipi ve lineer PEG polimerleri etanol ile sterilize edildikten ve etanol kurutulduktan sonra fosfat tamponunun içinde 25, 50, 100 ve 200 μM konsantrasyonda hazırlanmışlardır. 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 CO_2 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 CO_2 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. Belirtilen dalga boylarında A549 ve

BEAS-2B için önceden belirlenmiş değişen hücre sayılarına denk gelen absorbands değerlerini içeren kalibrasyon eğrisi aracılığıyla canlı hücre sayısı belirlenmiştir. Canlı hücre sayısının toplam hücre sayısına oranı ile yüzde hücre canlılık değeri hesaplanmıştır. İstatiksel analiz iki yönlü t-test ile gerçekleştirilmiştir.

3.3.2 Polimerlerinin Hücre Zarına Etkilerinin Belirlenmesi

Hücre zarı bütünlüğü, hücrenin canlılığı açısından en önemli parametredir ve bazı polimerler membranın geçirgenliğini artırarak veya daha ileri bir etki olarak membranın bütünlüğünü yitirmesine neden olarak hücreye zarar vermektedir. Tarak- tipi ve lineer PEG polimerlerinin hücre zarının geçirgenliğine olan etkisinin belirlenmesi, sitozolik enzimlerin hücre dışına salınmasını membran geçirgenliğinin artışı ile ilişkilendiren testlerden biri olan Laktat Dehidrogenaz Enzimi (LDH)'nin belirlenmesine dayanan test ile gerçekleştirilmiştir.

96-haneli mikropalakaya 10^4 hücre/hane konsantrasyonda A549 veya BEAS-2B hücreleri uygun besi ortamı içinde yerleştirilmiş ve 24 saat boyunca $37\text{ }^\circ\text{C}$ ve %5'lik CO_2 atmosferinde büyütülmüşlerdir. Tarak-tipi ve lineer PEG polimerleri etanol ile sterilize edildikten ve etanol kurutulduktan sonra fosfat tamponunun içinde 25, 50, 100 ve 200 μM konsantrasyonda hazırlanmışlardır. Polimerler her bir haneye belirlenen konsantrasyonları oluşturacak şekilde, fosfat tamponunun hücre kültür ortamındaki oranı %0.5 hacim/hacim değerini geçmeyecek şekilde aktarılmışlardır. Spontane LDH salınımını ve maksimum LDH salınımını belirlemek amacı ile bazı hanelere polimer eklenmemiştir. Maksimum LDH salınımı ise belirli hanelerdeki hücrelerin membranlarının patlatılıp, tüm LDH enzimlerinin ortama dağılması ile elde edilmiştir. Her bir hanenin son hacim değeri 200 μl olarak ayarlanmıştır. Hücreler 24 ve 72 saat boyunca $37\text{ }^\circ\text{C}$ ve %5'lik CO_2 atmosferinde inkübe edilmişlerdir.

İnkübasyon sonrasında LDH testi üreticisinin protokolü uygulanmış ve 490 nm dalga boyunda, Varioskan Flash, Thermo Electron Corporation cihazı kullanılarak spektroskopik ölçüm gerçekleştirilmiştir. Toplam LDH salınımı artış değeri aşağıdaki belirtilen Denklem 3.2'ye göre gerçekleştirilmiştir. İstatiksel analiz iki yönlü t-test ile gerçekleştirilmiştir.

$$\Delta\%LDH \text{ salınım artışı} = \left[\frac{Abs_x - Abs_s}{Abs_{max}} \right] \quad (\text{Denklem 3.2})$$

Denklem 3.2'de Abs_x hücrelerin absorbands değerlerini, Abs_s spontan olarak gerçekleşen LDH enziminin absorbands değerini ve Abs_{max} belirli sayıda hücreden gerçekleşen en fazla LDH enzimi salınımının absorbands değerini göstermektedir.

3.3.3 Hücre Alımı Deneyleri

Floresan boya ile işaretlenmiş polimerlerin hücre hatları tarafından alımları akış sitometresi yöntemi ile belirlenmiştir. 2-haneli mikropalakaya 10^5 hücre/hane konsantrasyonda A549 veya BEAS-2B hücreleri uygun besi ortamı içinde yerleştirilmiş ve 24 saat boyunca 37°C ve %5'lik CO_2 atmosferinde büyütülmüşlerdir. Floresan boya ile işaretlenmiş tarak-tipi ve lineer PEG polimerleri her bir haneye 12.5 ve 25 μM 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 ve BEAS-2B hücre hatları tarafından alımlarının enerjiye bağımlılığının belirlendiği deney setinde, hücrelerin membran aktivitelerini durdurabilmek için mikropalakalar 1 saat 4°C 'da inkübe edilmişler ve daha sonra floresan boya ile işaretlenmiş polimerler 12.5 veya 25 μM konsantrasyonda 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 veya 3 saat boyunca 4°C ve %5'lik CO_2 atmosferinde inkübe edilmişlerdir.

Floresan boya ile işaretlenmiş polimerlerin A549 ve BEAS-2B hücre hatları 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 12.5 veya 25 μM konsantrasyonda 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 37°C ve %5'lik CO_2 atmosferde inkübe edilmişlerdir.

Floresan boya ile işaretlenmiş ve Cys-RGD peptidi bağlanmış polimerlerin A549 hücre hattı tarafından alımlarının belirlenmesi deney setinde, 12-haneli mikropalakaya 10^5 hücre/hane konsantrasyonda A549 veya BEAS-2B hücreleri uygun besi ortamı içinde yerleştirilmiş ve 24 saat boyunca 37°C ve %5'lik CO_2 atmosferinde büyütülmüşlerdir. Floresan boya ile işaretlenmiş ve Cys-RGD peptidi bağlanmış tarak-tipi veya lineer PEG polimerleri her bir haneye 25 μM konsantrasyonda 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 ve hücreler 1 saat boyunca 37°C ve %5'lik CO_2 atmosferinde 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, 4°C'da 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 data Denklem 3.3'e göre analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.2'deki normalizasyon katsayıları kullanılarak normalize edilmiştir. Polimerlerin hücreler tarafından alınımının ayrıntılı hesap yöntemi Ek A'da verilmiştir. İstatiksel analiz iki yönlü t-test ile gerçekleştirilmiştir.

$$\% \text{ Hücre Alımı} = \frac{OG \text{ ortalama}_{P_3} * \text{Hücre Sayısı}_{P_3}}{OG \text{ ortalama}_{P_1} * \text{Hücre Sayısı}_{P_1}} \quad (\text{Denklem 3.3})$$

3.3.4 Polimerlerin Hücre İçi Dağılımı

T-PEG ve L-PEG polimerlerinin hücre içi dağılımı floresan mikroskobu (Olympus IX81) kullanılarak belirlenmiştir. Hücrelerin nükleus ve lizozomları, sırasıyla mavi renkte Hoechst 33342 (3,5'-bi-1H-benzimidazol, 2'-(4-etoksifenil)-5-(4-metil-1-piperazinil) ve kırmızı renkte Lysotracker DND-99 floresan boyası ile işaretlenmiştir.

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, BEAS-2B hücreleri için ise poli-L-lizin 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. Poli-L-lizin ile yüzey modifikasyonu için 0.1 mg/ml konsantrasyondaki poli-L-lizin proteini steril su ile seyreltilerek 4 µg/cm² konsantrasyonda cam haneli plakanın yüzeyini kaplayacak şekilde konulur. Cam yüzeyli plaka üzerinde 5 dakika boyunca inkübe edilen poli-L-lizin solüsyonu, bu süre sonunda boşaltılır ve yüzey steril su ile yıkanır. Cam yüzeyli plaka daha sonra en az 2 saat boyunca steril hava akışına bırakılır ve yüzeyin kuruması sağlanır.

Cam yüzeylerin modifikasyonundan sonra 3.10⁴ hücre/hane konsantrasyonda A549 veya BEAS-2B hücreleri uygun besi ortamı içinde yerleştirilmiş ve 24 saat boyunca 37 °C ve %5'lik CO₂ atmosferinde büyütülmüşlerdir. Floresan boya ile işaretlenmiş tarak-tipi veya lineer PEG polimerleri her bir haneye 50 µM konsantrasyonda olacak ve fosfat tamponunun

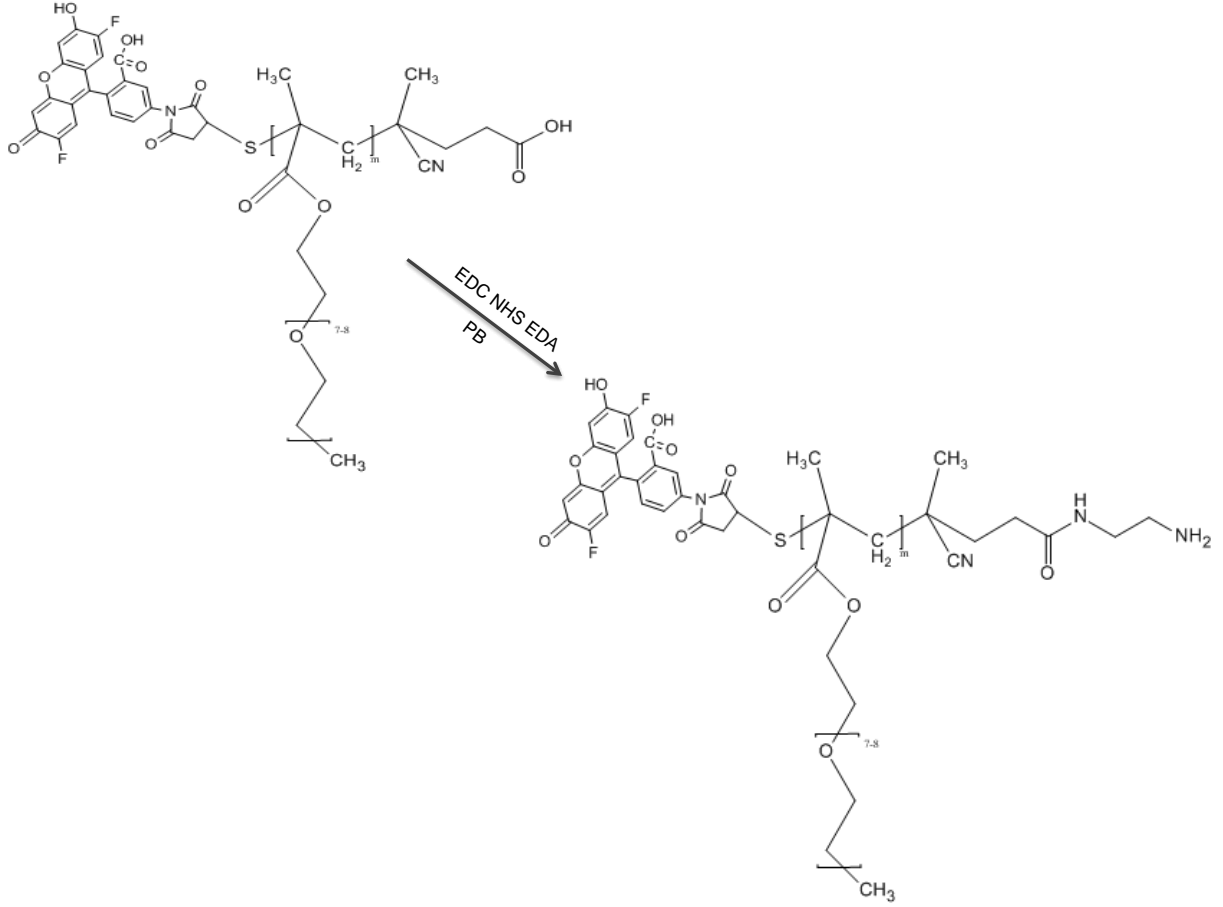
hücre kültür ortamındaki oranı %0.5 hacim/hacim değerini geçmeyecek şekilde aktarılmışlardır. Her bir hanenin son hacim değeri 200 µl olarak ayarlanmıştır ve hücreler 1 saat boyunca 37°C ve %5'lik CO₂ atmosferinde inkübe edilmişlerdir. Hücrelerin polimerler ile inkübasyonu sonrasında haneler steril PBS ile iki defa yıkanmışlardır. Daha sonra Hoechst 33342 nükleus spesifik boyası 1 µg/ml final konsantrasyonda olacak şekilde 200 µl hücre kültür ortamı içeren haneye aktarılmış ve 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında haneler steril PBS ile iki defa yıkanmışlardır. Son olarak lizozom organelli spesifik LysoTracker DND-99 boyası 50 nM final konsantrasyonda olacak şekilde 200 µl hücre kültür ortamı içeren haneye aktarılmış ve 5 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında haneler steril PBS ile iki defa yıkanmışlardır.

Yapılan boyama işlemi sonrasında cam yüzeyli hanelere hücre kültür ortamı eklenmiştir ve görüntüleme boyunca 37°C'de inkübe edilmişlerdir. Hoechst 33342, LysoTracker DND-99 ve Oregon Green boyalarının sönme ve emisyon dalga boyu değerleri sırasıyla 358-461 nm, 577-590 nm ve 496-524 nm'dir. Floresan mikroskobu ile belirtilen sönme ve emisyon değerlerine uygun filtreler kullanılarak çekilen fotoğraflar, CellSense™ Olympus programı kullanılarak birleştirilmiştir.

3. 4 Polimerlere Cys-RGD Peptidinin Bağlanması

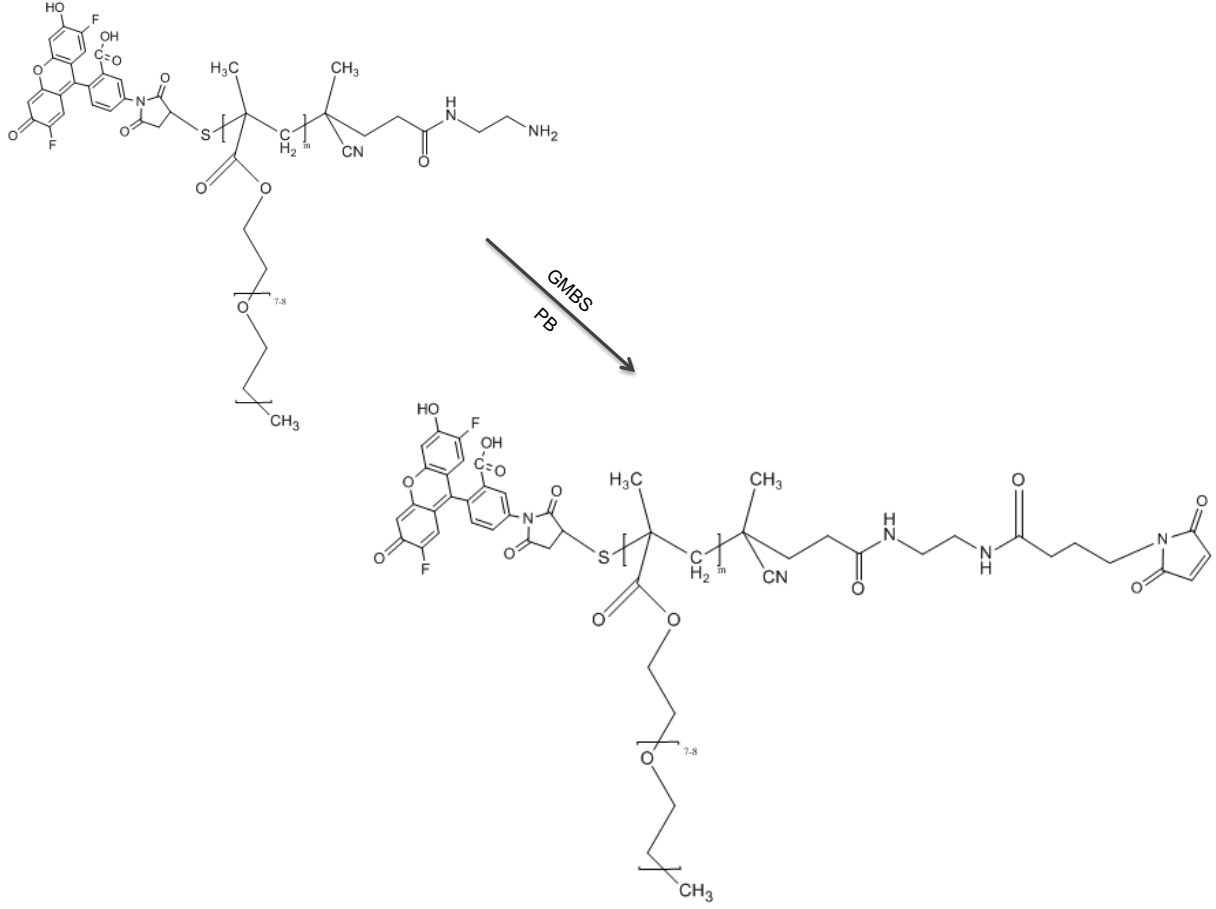
Cys-RGD peptidinin tarak-tipi ve lineer PEG polimerlerine bağlanması bir dizi kimyasal reaksiyon ile gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyonlar süresince iki ucunda farklı fonksiyonel gruplar içeren (heterotelekelik) T-PEG (10,000 g/mol) ve L-PEG (10,000 g/mol) kullanılmıştır.

Omega uç grubununun modifikasyonu ile Oregon Green floresan etiket bağlanan tarak-tipi PEG polimerine Cys-RGD peptidinin bağlanması için, alfa uç grubunda bulunan karboksilik asit grubu öncelikle EDC/NHS reaksiyonu ile aktifleştirilmiş ve etilendiamin ile amin grubuna dönüştürülmüştür. Karboksilik asit grubu içeren, floresan etiket bağlı polimer (1 mM) fosfat tamponunda (0.5 M, pH 7.1) çözülmüştür. EDC (2 mM) ve NHS (5 mM) kimyasalları polimer çözeltisine katılmıştır. EDC ve NHS ile karboksil grubunun aktifleştirilmesi 10 dakika boyunca sürdürülmüş ve aktifleşen uç grubu amin uç grubuna dönüştürmek için etilendiamin (10 mM) reaksiyon ortamına eklenmiştir (Şekil 3.4). Oda sıcaklığında 5 saat sürdürülen bu reaksiyon sonrasında reaksiyona girmemiş moleküllerin uzaklaştırılması için MWCO değeri 3500 Da olan diyaliz membranı ile 5 gün suya karşı diyaliz gerçekleştirilmiştir. Diyaliz sonunda polimer çözeltisi dondurularak kurutulmuş ve kimyasal yapı ¹H-NMR ile analiz edilmiştir.



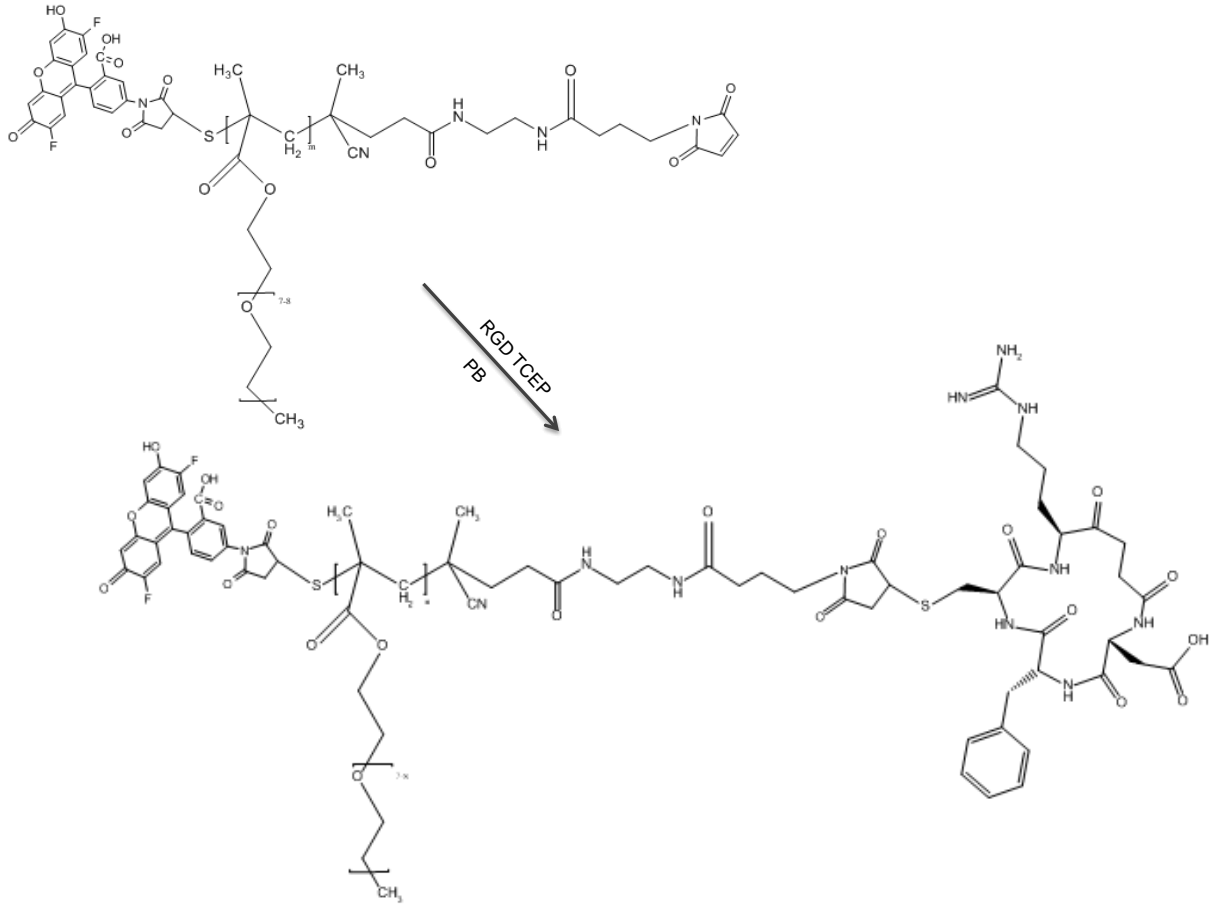
Şekil 3.4. Tarak-tipi PEG'in karboksilik asit uç grubunun aktifleştirilmesi ve amine dönüştürülmesi

Amin uç grubuna sahip tarak-tipi ve lineer PEG polimerlerine sistein içeren RGD siklik peptidinin bağlanabilmesi için, polimerler öncelikle N- γ -maleimidobütiril-oksisüksinimid ester (GMBS) ajanı ile modifiye edilmiştir. Bunun için amin uç grubuna sahip polimerler (1 mM) fosfat tamponunda çözülmüş (pH 6.8, 0.5 M) ve GMBS (10 mM) ortama eklenmiştir (Şekil 3.5). Reaksiyon 4 saat sürdürüldükten sonra GMBS'in reaksiyon ortamından ayrılması için MWCO değeri 1800 Da olan jel filtrasyon kolonu ile saflaştırma gerçekleştirilmiştir. Kolonda mobil faz olarak asidik su (pH 6.8) kullanılmış ve fraksiyonlar dondurularak kurutulmuştur. Saflaştırılmış polimerlerin kimyasal yapısı $^1\text{H-NMR}$ ile tayin edilmiştir.



Şekil 3.5. Amin uç grubuna sahip tarak-tipi PEG'in GMBS bağlantı ajanı ile reaksiyonu

Son adımda Cys-RGD peptidi (10 mM) fosfat tamponunda çözülmüş (pH 7.1, 0.5 M) ve 5 dakika süre ile TCEP (0.1 M) ile reaksiyona sokulmuştur. Maleimid uç grubuna sahip polimer reaksiyona eklenmiştir. Reaksiyon azot altında 2 saat sürdürülmüştür. Bu sürenin sonunda çözeltiye azot altında 0.05 M TCEP eklenmiş ve reaksiyon gece boyunca, karıştırma sağlanarak sürdürülmüştür (Şekil 3.6). Reaksiyon sonrasında reaksiyona girmemiş reaktantların uzaklaştırılması için MWCO değeri 3500 Da olan diyaliz membranı ile 3 gün diyaliz gerçekleştirilmiştir. Diyaliz sonunda polimer çözeltisi dondurularak kurutulmuş ve kimyasal yapı $^1\text{H-NMR}$ ile analiz edilmiştir.



Şekil 3.6. Tarak-tipi PEG polimerinin Cys-RGD peptidi ile reaksiyonu

4. BULGULAR

4.1 Tarak-tipi PEG (poli(poli(etilenglikol metil eter metakrilat)'ın Sentezi ve Karakterizasyonu

Tarak-tipi PEG (poli(poli(etilenglikol metil eter metakrilat) (p(PEG-MA) (T-PEG) iki farklı molekül ağırlığı (10,000 g/mol ve 20,000 g/mol) ve dar molekül ağırlığı dağılımına (<1.2) sahip olacak şekilde, ticari kaynaklardan temin edilen polietilen glikol metil eter metakrilat (p(PEGMA) ($M_n = 475$ g/mol, $n=8-9$)) monomerinin RAFT polimerizasyonu ile sentezlenmiştir. Sentezlenen polimerlerin kimyasal yapı, moleküler ağırlık, moleküler büyüklük (hidrodinamik hacim) ve konformasyonları aşağıda açıklandığı şekilde karakterize edilmiştir.

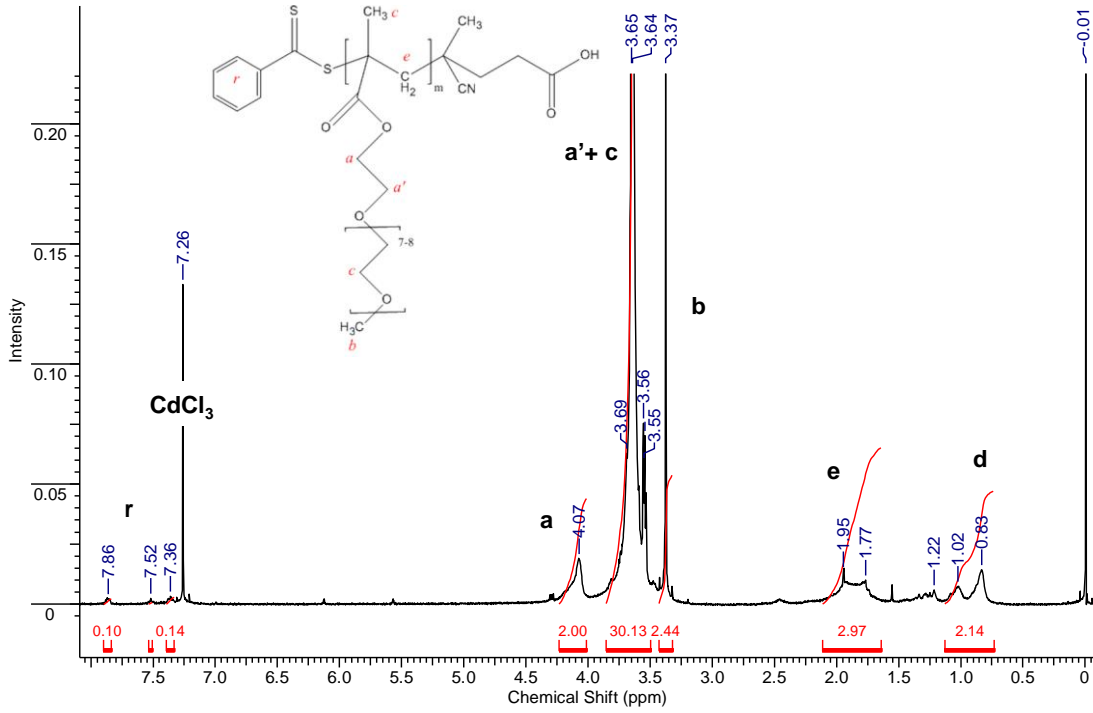
4.1.1 Kimyasal Yapı ve Molekül Ağırlık Karakterizasyonu

Sentezlenen polimerlerin kimyasal yapısı nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi yöntemi ile belirlenmiştir (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2). $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda 4.00 ve 4.4 ppm değerleri arasında tespit edilen sinyallerin oligo(etilen glikol) yan zincirlerindeki metilen grubunun iki protonunu, 7.4, 7.5 ve 7.9 ppm değerlerinde tespit edilen sinyallerin ise RAFT ajanının beş protonunu temsil ettiği belirlenmiştir.

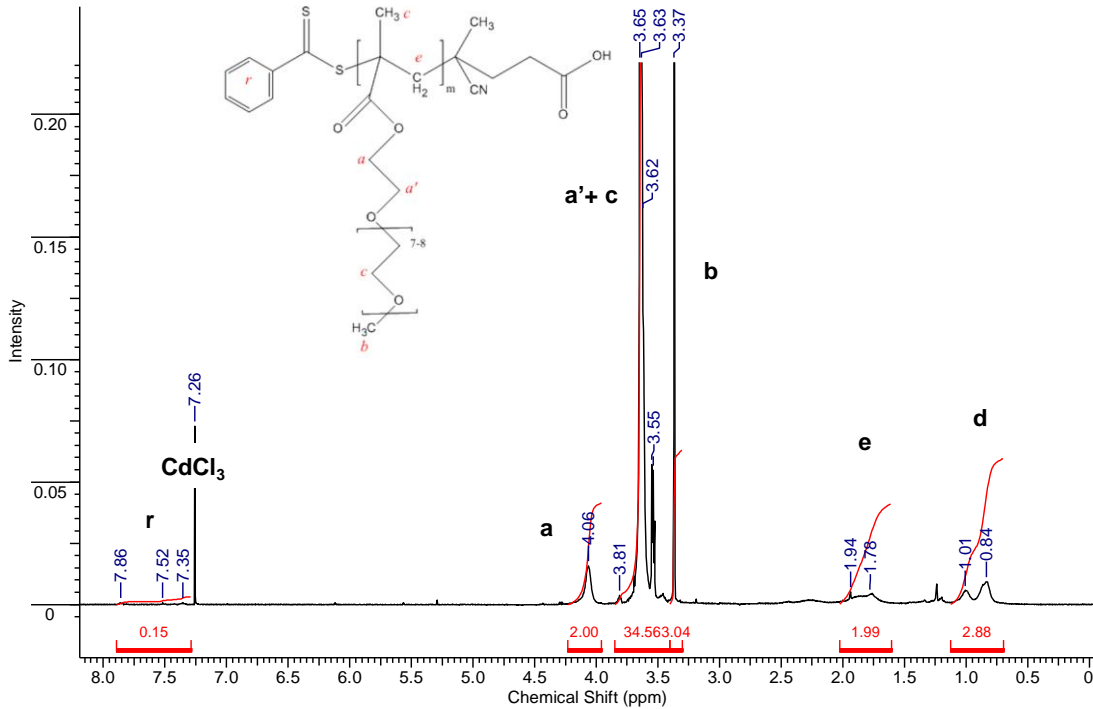
Sentezlenen polimerlerin sayıca ortalama molekül ağırlıkları (M_n) ve moleküler ağırlık dağılımları (PDI) jel geçirgenlik kromatografisi ile belirlenmiştir. Analiz sonucunda tespit edilen molekül ağırlık değerleri Tablo 4.1'de belirtilmiştir. Ek olarak 10,000 ve 20,000 g/mol molekül ağırlığına sahip olan T-PEG polimerlerinin düşük moleküler ağırlık dağılımına sahip olduğu (PDI < 1.2) belirlenmiştir.

Tablo 4.1. Sentezlenen p(PEG-MA) polimerlerinin molekül ağırlığı ve moleküler ağırlık dağılımı değerleri

Polimer Numarası	Polimer Tipi	M_n^{GPC} (g/mol)	PDI
1	10K	9700	1.12
2	20K	20300	1.18



Şekil 4.1. Çalışmada sentezlenen T-PEG (p(PEG-MA))'in (Mn 10,000 g/mol) saflaştırma sonrası alınmış ¹H-NMR spektrumu



Şekil 4.2. Çalışmada sentezlenen T-PEG (p(PEG-MA))'in (Mn 20,000 g/mol) saflaştırma sonrası alınmış ¹H-NMR spektrumu

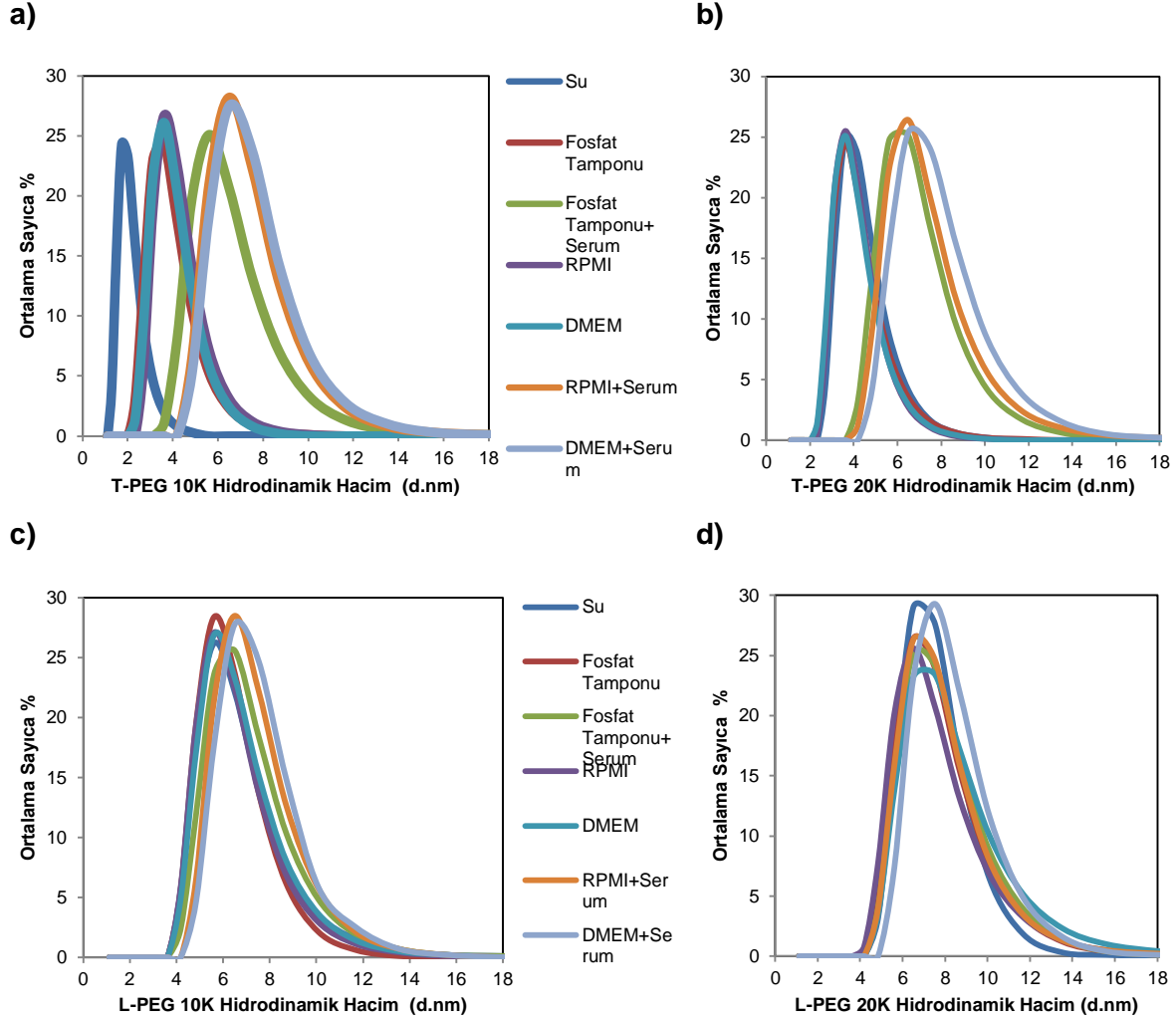
4.1.2 Hidrodinamik Büyüklük (Hidrodinamik Çap-(D_h)) Karakterizasyonu

Polimerlerin hidrodinamik çapları (D_h), polimerlerin hücreler ile etkileşimlerini belirlemede en önemli faktörlerden biridir (Armstrong vd., 2004). Tarak- tipi ve L-PEG polimerlerinin farklı ortamlarda (fosfat tamponu, hücre kültür ortamı (RPMI ve DMEM), ve %10 serum içeren hücre kültür ortamı) hidrodinamik çapları dinamik ışık saçılımı (dynamic light scattering, DLS) tekniği ile ölçülmüş ve moleküler mimarinin hidrodinamik büyüklüğe etkisi belirlenmiştir. Farklı moleküler ağırlıklardaki (10,000 ve 20,000 g/mol) tarak-tipi ve lineer PEG'lerin farklı ortamlardaki hidrodinamik çapları nanometre (nm) biriminde Şekil 4.3' de gösterilmiştir.

Su ortamında, aynı moleküler ağırlıktaki tarak- tipi PEG'in hidrodinamik çapın, L-PEG'in hidrodinamik çapından belirgin bir şekilde küçük olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$ - t-test). İki farklı mimarideki polimerlerin hidrodinamik çaplarında tespit edilen bu fark, T-PEG'in L-PEG'e göre daha yoğun yapıya sahip olmasına atfedilmiştir. Su ortamında farklı moleküler ağırlıklara (10,000 ve 20,000 g/mol) sahip tarak-tipi ve L-PEG polimerlerinin hidrodinamik çaplarında, çalışılan aralıkta moleküler ağırlığın belirgin bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir ($p > 0,05$ - t-test).

Fosfat tamponu ve hücre kültür ortamlarında tarak-tipi ve L-PEG polimerlerinin hidrodinamik çaplarında, polimerlerin yüksüz olması nedeniyle önemli bir değişim gözlenmemiştir ($p > 0,05$ - t-test).

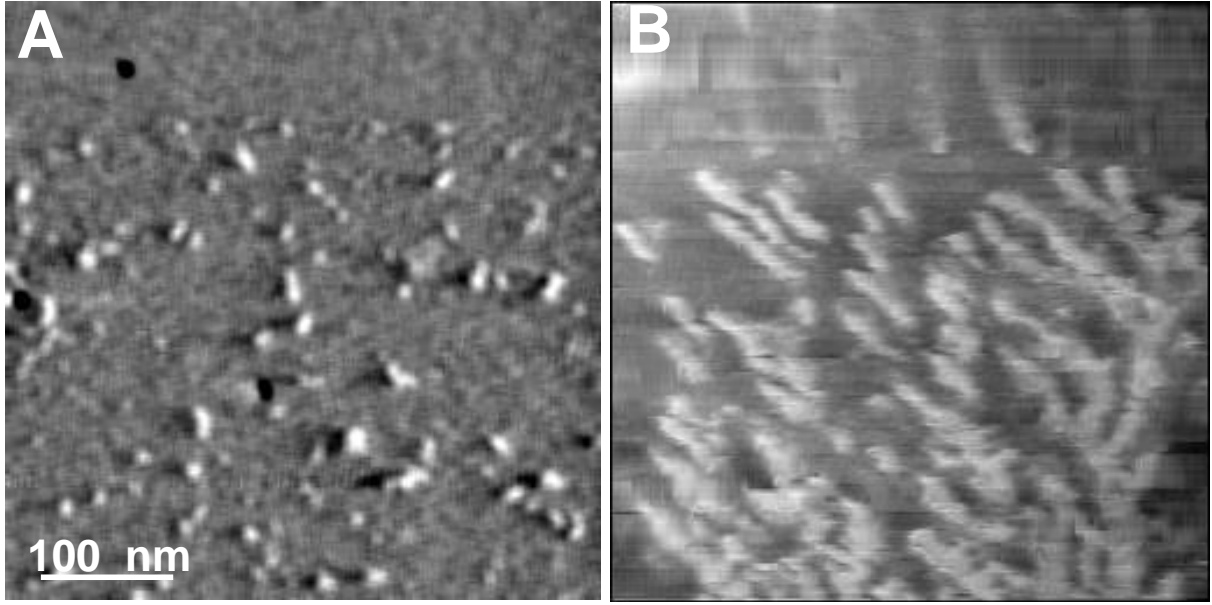
%10 serum içeren ortamda yapılan DLS deneyleri sonucu, serumun T-PEG'in hidrodinamik hacmi üzerinde önemli bir etkiye sahip iken ($p < 0,05$ - t-test), L-PEG'in hidrodinamik hacmi üzerinde etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir. T-PEG'in, sahip olduğu hidrofobik metakrilat ana zincirinden dolayı serum proteinleriyle hidrofobik kuvvetler aracılığıyla etkileştiği ve bunun sonucunda da serum varlığında hidrodinamik çaplarının arttığı düşünülmektedir. L-PEG'in proteinlerle etkileşmediği literatürde de yaygın olarak bilinmektedir. Dolayısı ile L-PEG'e ait sonuç literatür bilgileri ile uyumludur. Ek olarak, serum içeren ortamda moleküler ağırlığın, tarak- tipi ve L-PEG'in hidrodinamik hacmine çalışılan aralıkta etkisi olmadığı belirlenmiştir ($p > 0,05$ - t-test).



Şekil 4.3. (a) Tarak-tipi PEG'in (10,000 g/mol) (b) Tarak-tipi PEG'in (20,000 g/mol) (c) Lineer PEG'in (10,000 g/mol) (d) Lineer PEG'in (20,000 g/mol) dinamik ışık saçılımı (DLS) yöntemi ile belirlenmiş farklı ortamlardaki hidrodinamik çapları (D_h).

4.1.3 Moleküler Konformasyon Karakterizasyonu

Tarak-tipi ve lineer PEG'lerin (20,000 g/mol) moleküler konformasyonları atomik kuvvet mikroskopisi yöntemi ile belirlenmiştir (Şekil 4.4). Tarak-tipi PEG'ler sahip oldukları hidrofobik iskelet ve tekrarlayan hidrofilik PEG zincirlerin sıvı ortamda üç boyutlu olarak düzenlenmesi sonucunda partikül benzeri yapı göstermiştir (Şekil 4.4a). Lineer PEG'ler ise sadece tekrarlayan hidrofilik PEG birimlerinin, sıvı ortamda üç boyutlu olarak düzenlenmesi sonucunda düz zincirler olarak gözlemlenmişlerdir (Şekil 4.4b).

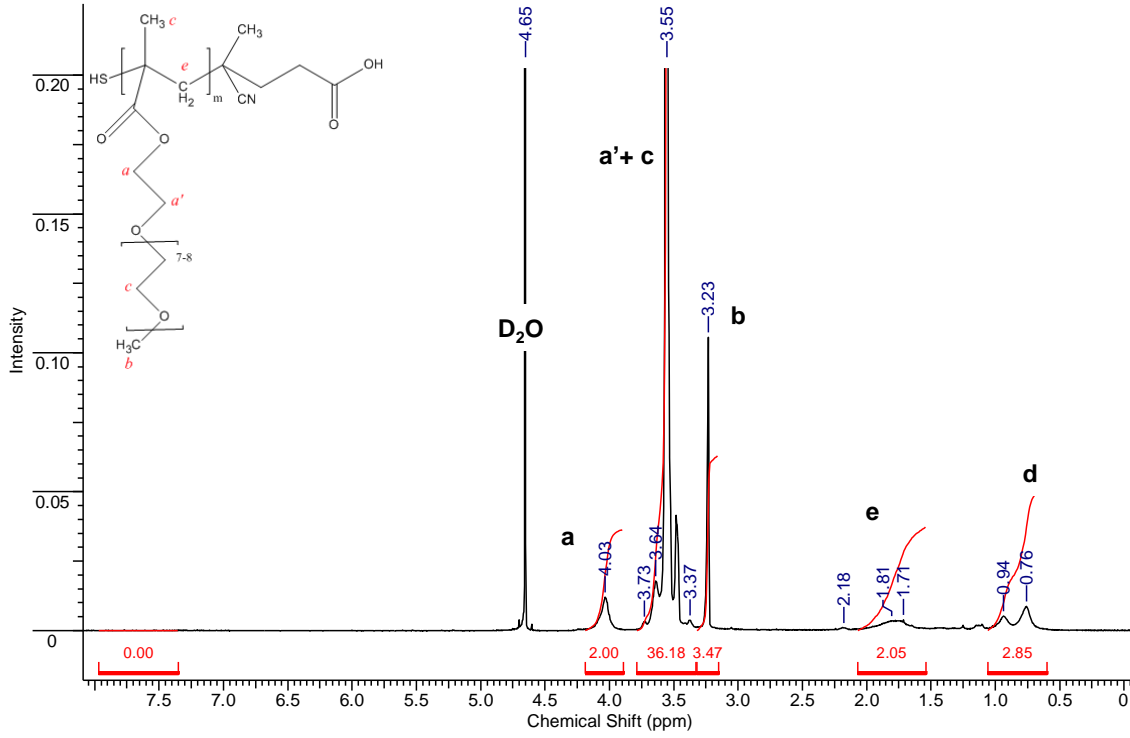


Şekil 4.4. (a) Tarak-tipi PEG (20,000 g/mol) ve (b) Lineer PEG'in (20,000 g/mol) atomik kuvvet mikroskobu görüntüleri. Skala 100 nanometredir.

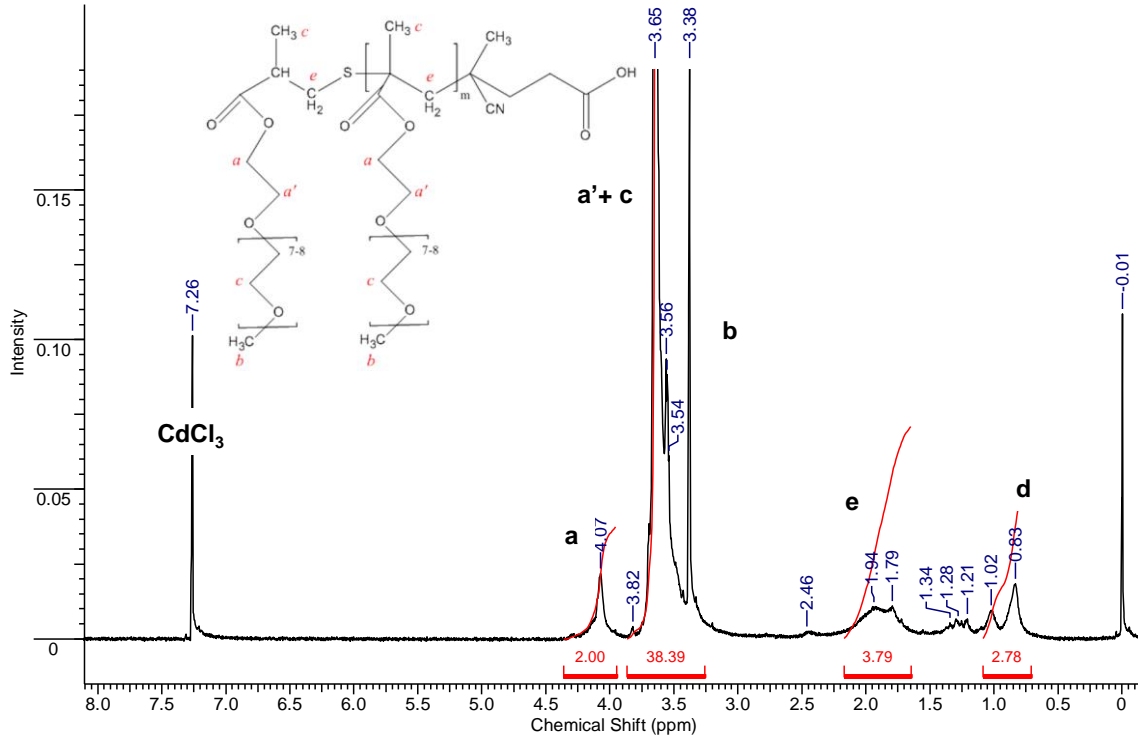
4.2 Polimerlerin Sitotoksitesinin Belirlenmesi

4.2.1 RAFT Uç Grubunun Uzaklaştırılması ve Tiyol Grubunun Deaktivasyonu

RAFT polimerizasyonu ile sentezlenmiş polimerlerin zincir ucunda taşıdıkları tiyokarboniltiyo aktif grubunun reaktivitesi ve dekompozisyonu nedeniyle hücreler üzerinde önemli bir sitotoksik etkisi bulunmaktadır (Pissuwan vd., 2010; Wilcock vd., 2010). RAFT polimerizasyonu ile sentezlenmiş T-PEG'de oluşabilecek bu potansiyel etkiyi ortadan kaldırmak ve sadece polimerik yapının sitotoksitesini belirleyebilmek için, T-PEG'den aminoliz yöntemi ile tiyokarboniltiyo grupları sitotoksite deneyleri öncesinde uzaklaştırılmıştır. 10,000 g/mol molekül ağırlığındaki T-PEG polimerinin aminolizi sonucunda elde edilen ¹H-NMR analizi sonucu Şekil 4.5'de gösterilmiştir. Tiyokarboniltiyo grubunun uzaklaştırıldığı, 7.3- 7.9 ppm aralığındaki sinyalin ortadan kaybolması ile ispatlanmıştır. Tiyokarboniltiyo grubunun uzaklaştırıldığı pembe renkli polimer solüsyonunun sarı renk alması ile görsel olarak da kanıtlanmıştır.

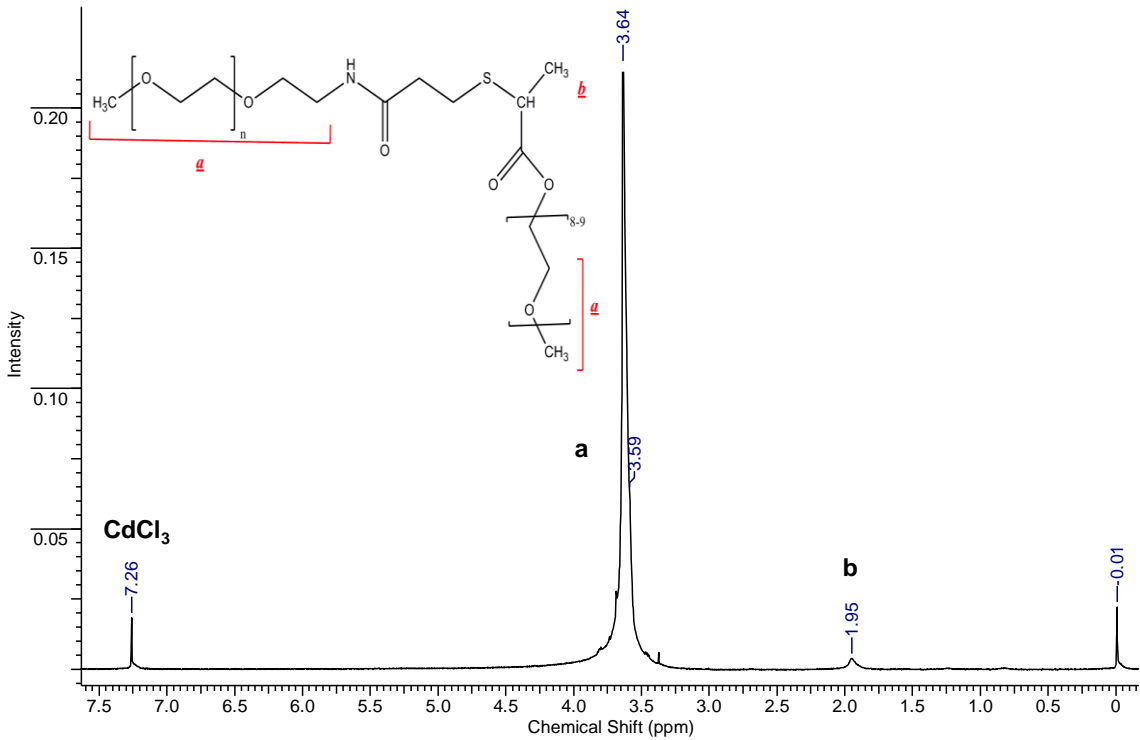


Şekil 4.5. Aminoliz reaksiyonu ile RAFT uç grubu uzaklaştırılmış 10,000 g/mol ağırlığındaki T-PEG'in $^1\text{H-NMR}$ spektrumu



Şekil 4.6. Tiyol-en reaksiyonu sonucunda elde edilen ve toksisite deneylerinde kullanılan 10,000 g/mol ağırlığındaki T-PEG'in $^1\text{H-NMR}$ spektrumu

T-PEG polimerlerinin aminoliz sonucunda oluşan reaktif tiyol uç grupları, tiyol-en reaksiyonu ile polimere bir monomerik birim daha eklenerek etkisiz hale getirilmiştir. Böylece test edilecek polimerlerin zincir uçlarında ana zincirde yer alan monomer birimin aynısı yer almıştır. Ticari olarak temin edilmiş reaktif tiyol grubu taşıyan L-PEG polimerlerine ise benzer şekilde tiyol-en reaksiyonu ile PEG-metakrilat monomer birimi eklenmiştir. Tiyol grubunun monomerik birim ile kapatılması $^1\text{H-NMR}$ spektroskopisi yöntemiyle kanıtlanmıştır (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Tiyol-en reaksiyonu sonucunda elde edilen ve toksisite deneylerinde kullanılan 10,000 g/mol ağırlığındaki L-PEG'in $^1\text{H-NMR}$ spektrumu

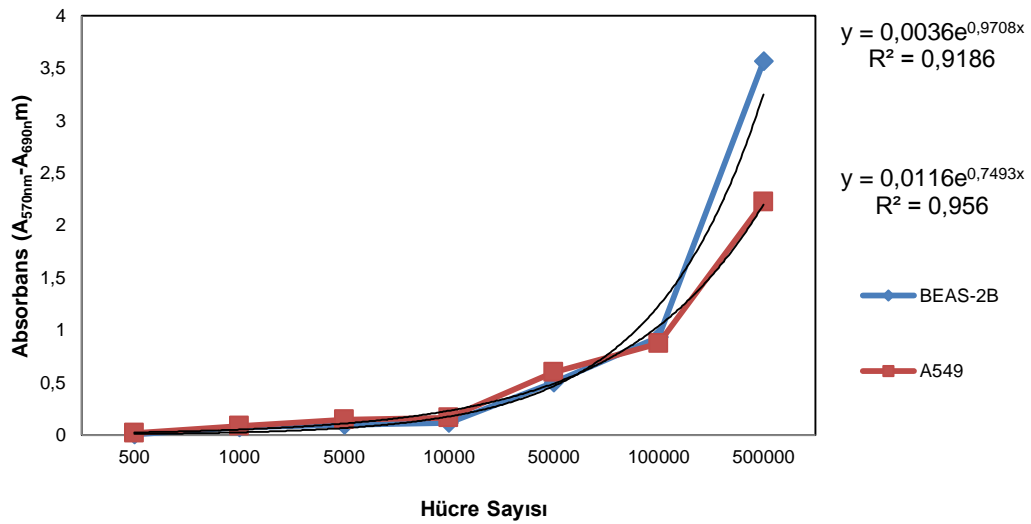
4.2.2 Tarak-tipi ve Lineer PEG'in Hücre Canlılığına Etkisi

Polimerlerin sitotoksisitelesinin belirlenmesinde ve diğer hücre kültürü deneylerinde insan akciğer adenokarsinom epitel hücreleri (A549) ve sağlıklı eşlenikleri olan insan bronş epitel hücreleri (BEAS-2B) kullanılmıştır. Bu hücre hatları özellikle akciğer kanserinin ülkemizde en yaygın görülen kanser türlerinden biri olduğu ve PEG esaslı bir ilaç salım sisteminin akciğer kanserine yönelik tasarlanması gözönüne alınarak seçilmiştir. Buna ek olarak, projede hedefleyici ligand olarak seçilen RGD peptidinin A549 hücreleri tarafından alımı (Meng vd., 2011; Renigunta vd., 2006; Ye vd., 2012) ve PEG'in RGD'yi perdeleme etkisi (Kunath vd., 2003) literatürde daha önce rapor edilmiştir. Dolayısıyla T-PEG'in konjuge

olduğu ligandı perdeleme etkisinin belirlenmesi amacıyla A549 hücrelerinin model olarak bu projede kullanılması uygun bulunmuştur.

Farklı molekül ağırlıklardaki T-PEG ve L-PEG'in hücreler üzerindeki toksik özelliklerinin karşılaştırmalı olarak 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 tetrazolium boyasını indirgemesine dayanır ve enzimlerin konsantrasyonu reaksiyon sonucu oluşan renk yoğunluğu ile doğru orantılıdır.

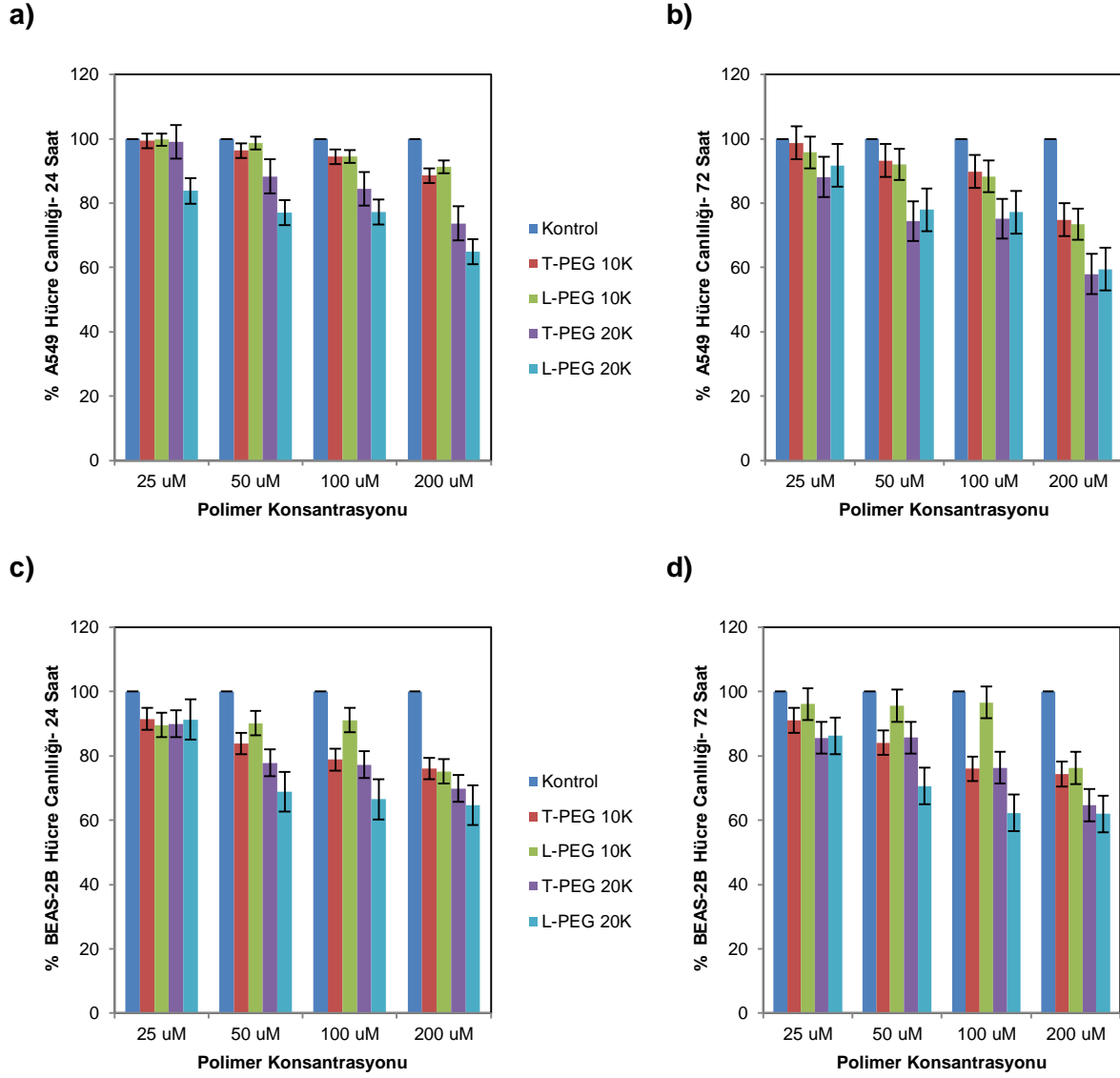
Öncelikle belirli sayıda A549 ve BEAS-2B hücrelerinin MTT yöntemi ile 570 nm ve 690 nm dalga boylarındaki absorbans farklarına dayanan kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 4.8). Oluşturulan bu kalibrasyon eğrisi ölçülen absorbans değerinden, hücre sayısının belirlenmesinde kullanılmıştır.



Şekil 4.8. MTT yöntemi ile BEAS-2B ve A549 hücreleri için oluşturulan kalibrasyon grafiği. MTT yöntemi ile hücre sayısına bağlı olarak elde absorbans değişimi.

10,000 ve 20,000 g/mol molekül ağırlığa sahip T-PEG ve L-PEG polimerlerinin 24 saat ve 72 saat inkübasyon sonucunda BEAS-2B ve A549 hücrelerinin canlılığına etkileri Şekil 4.9' da gösterilmiştir. Elde edilen bulgular polimerlerin hücre canlılığına etkisinin polimer konsantrasyonu ve inkübasyon süresi ile orantılı olarak arttığını göstermiştir. ($p < 0.05$ - t-test). 20,000 g/mol molekül ağırlığına sahip T-PEG ve L-PEG polimerleri, 200 μ M konsantrasyonda ve 72 saat süre ile inkübe edildiklerinde hücre canlılığı her iki hücre hattında da önemli ölçüde düşmesine rağmen, hala %50'nin üzerinde bulunduğundan T-PEG ve L-PEG polimerlerinin A549 ve BEAS-2B hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır ($p < 0.05$ - t-test).

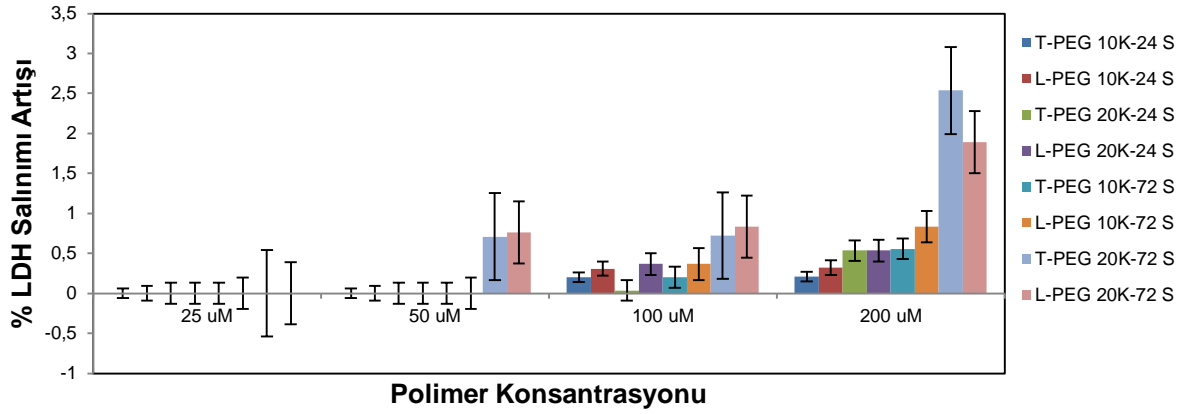
Serum içeren hücre kültür ortamında hidrodinamik hacimleri arasında istatistiksel olarak fark bulunmayan 10,000 g/mol ve 20,000 g/mol moleküler ağırlığa sahip T-PEG ve L-PEG polimerlerinden, 20,000 g/mol molekül ağırlığına sahip olanlar hücre canlılığını daha çok düşürmüştür. Bu durum 20,000 g/mol molekül ağırlığına sahip olan polimerlerin hücreler tarafından alımlarının daha yüksek olmasına atfedilmiştir. Aşağıda sunulan hücre alımı deneyleri bu hipotezi desteklemektedir.



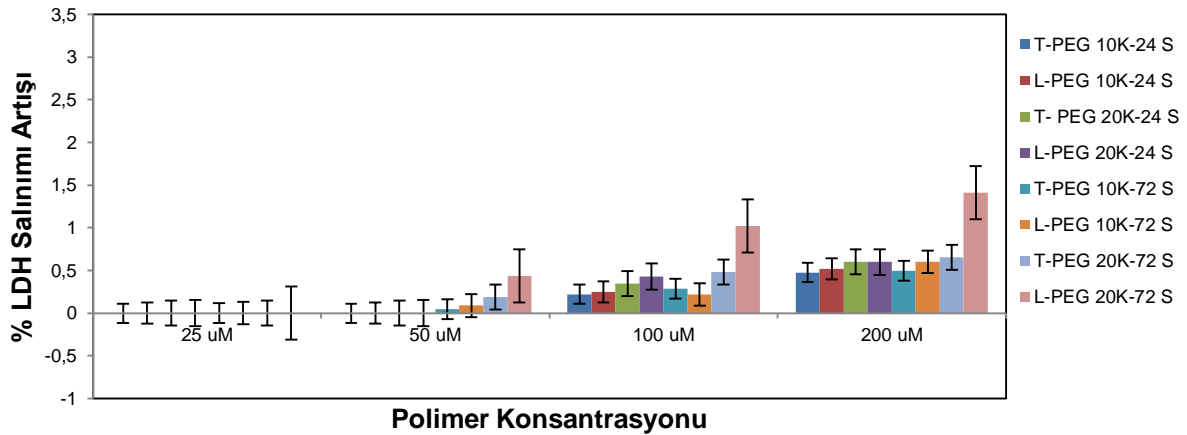
Şekil 4.9. Tarak-tipi ve lineer PEG polimerlerinin (a) A549 hücrelerinin canlılığına 24 saat (b) A549 hücrelerinin canlılığına 72 saat (c) BEAS-2B hücrelerinin canlılığına 24 saat (d) BEAS-2B hücrelerinin canlılığına 72 saat inkübasyon sonucundaki etkisi.

4.3 Polimerlerinin Hücre Zarına Etkilerinin Belirlenmesi

Hücre zarı bütünlüğü, hücrenin canlılığı açısından en önemli parametrelerden biridir. Bu çalışmada, tarak-tipi ve lineer PEG polimerlerinin hücre zarı geçirgenliğine olan etkisi belirlenmiştir. Tarak tipi ve lineer PEG polimerlerinin, hücreye toksik olmadığı bilinen 25 μ M-200 μ M konsantrasyon aralığında ve 24 ve 72 saat inkübasyon süreleri sonunda hücre zarı geçirgenliğine olan etkileri belirlenmiş ve sonuçlar Şekil 4.10- Şekil 4.11'de gösterilmiştir.



Şekil 4.10. T-PEG ve L-PEG polimerleri ile 24 ve 72 saat inkübasyon sonrasında A549 hücrelerinin membranından LDH enzimi salınımındaki artış (polimerler ile etkileştirilmeyen hücrelere kıyasla).



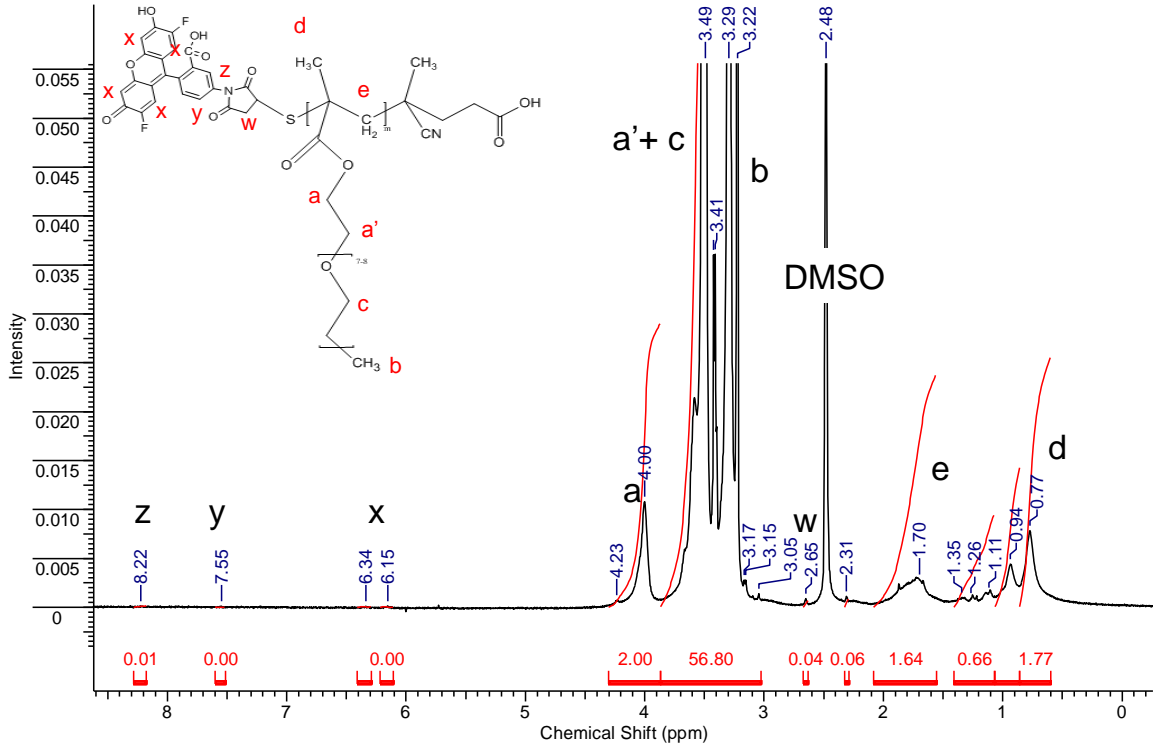
Şekil 4.11. T-PEG ve L-PEG polimerleri ile 24 ve 72 saat inkübasyon sonrasında BEAS-2B hücrelerinin membranından LDH enzimi salınımındaki artış (polimerler ile etkileştirilmeyen hücrelere kıyasla).

Tarak-tipi ve lineer PEG polimerleri, doza ve inkübasyon süresine bağlı olarak hücrelerden LDH salınımını arttırsa da, LDH enzimi salınımının artışı en yüksek %3 olarak gözlemlendiğinden, tarak-tipi ve lineer PEG polimerlerinin A549 ve BEAS-2B hücrelerinin membranlarının geçirgenliğinin üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadığı sonucuna varılmıştır ($p > 0.05$ - t-test). Tarak-tipi ve lineer PEG'in hücre membranı geçirgenliğine olan etkileri, hücre canlılığına olan etkileri ile uyumludur. Ayrıca LDH enziminin hücre dışı ortama salınımına bağlı olarak hücre membran geçirgenliğindeki değişimi ölçen bu testin sonuçları literatür bilgileri ile de uyum göstermektedir. T-PEG polimerine benzer yapıda olan PEG-akrilat'ın (p(PEG-A)) yüksek konsantrasyonda ($500 \mu\text{M}$) ve uzun inkübasyon süresinde (24 h) bile CHO-K1, NIH3T3 ve RAW264.7 hücrelerinin LDH salınımını sadece %0.4 - % 1 oranında arttırdığı belirtilmiştir (Pissuwan vd., 2010). Hidroksil grubu içeren Lineer PEG'in (16300 g/mol , PDI: 1,22) de yapay membranlarda delik oluşumuna neden olmadığı ve LDH salınımını arttırmadığı belirtilmiştir (Hong vd., 2006).

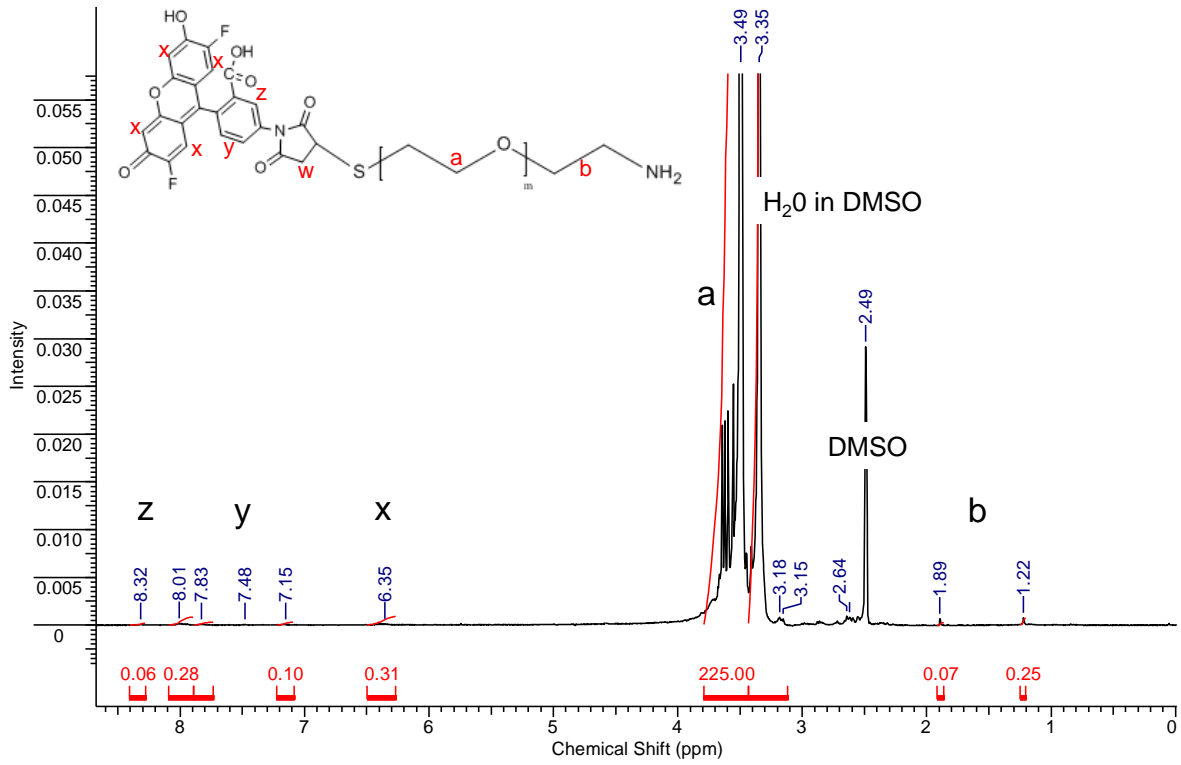
4.4 Polimerlerin Floresan Boya ile Etiketlenmesi

T-PEG ve L-PEG'lerin hücre alımlarının ve hücre içi dağılımlarının akış sitometresi ve floresan mikroskobu ile incelenebilmesi için öncelikle polimerler, Oregon Green 488 adlı floresan boya ile işaretlenmiştir. İşaretleme amacı ile maleimid fonksiyonelliğine sahip floresan boya, tiyol uç grubuna sahip polimerlere tiyol-en katılma reaksiyonu aracılığıyla kovalent olarak bağlanmıştır.

RAFT metodu ile sentezlenen T-PEG polimerlerinin ($10,000$ ve $20,000 \text{ g/mol}$) uç grubunda yer alan RAFT Z-grubu aminoliz ile aktif tiyol (-SH) gruplarına çevrilmiş ve maleimid grubu içeren floresan etiketi ile reaksiyona sokulmuştur. Uç grup tiyol-fonksiyonel L-PEG'ler ($10,000$ ve $20,000 \text{ g/mol}$) ticari olarak mevcut olduğundan satın alınmışlardır ve maleimid içeren floresan etiket ile işaretlenmişlerdir. T-PEG polimerine Oregon Green 488 Maleimid boyasının bağlanması ile ilgili analiz sonuçları Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'de gösterilmiştir.

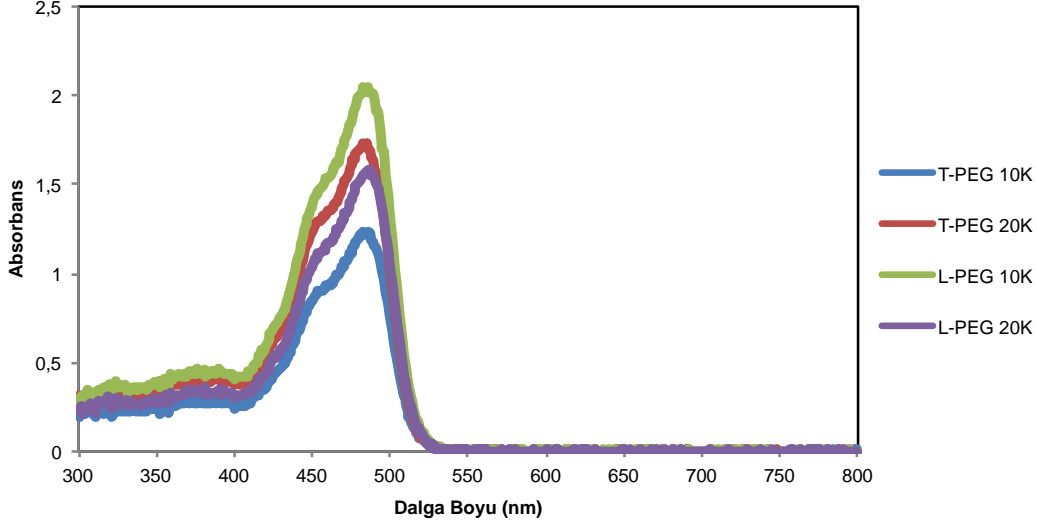


Şekil 4.12. T-PEG 10K polimerine Oregon Green 488-maleimid floresan etiketinin bağlanması sonrasında alınmış $^1\text{H-NMR}$ spektrumu



Şekil 4.13. Linear PEG 10K polimerine Oregon Green 488-maleimid floresan etiketinin bağlanması sonrasında alınmış $^1\text{H-NMR}$ spektrumu

Polimer zincirlerinin floresan etiketler ile işaretlenme derecesinin belirlenmesi polimerlerin hücre alımlarının nicel olarak belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Etiketlin polimerlere bağlanması, UV-Vis spektrometresi ile nicel olarak tayin edilmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Oregon Green 488 Maleimid ile işaretlenmiş polimerlerin UV-Vis spektrumları (Polimer örnekleri 33 μ M konsantrasyonda ultra-saf suda çözülerek hazırlanmıştır.)

Tarak-tipi ve lineer PEG polimerlerinin floresan ile işaretlenme derecesi, konjugatların sahip olduğu floresan işaret molar konsantrasyonlarının 491 nanometre dalga boyundaki absorbanlarının ölçülmesi ile belirlenmiştir. Kullanılan floresan işaretin molar sönmüleme katsayısı (ϵ), üreticisi tarafından $81000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ olarak belirtilmiştir. Polimerlerin floresan etiketlerce işaretlenme derecesi Tablo 4.2'de belirtilmiştir.

Tablo 4. 2. T-PEG ve L-PEG polimerlerinin floresan boya (OG) ile işaretlenme derecesi

Polimer	M_n^{GPC} (g/mol)	OG/Polimer Oranı (mol/mol)	OG/Polimer Oranı ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Normalizasyon Katsayısı
T-PEG 10K	9,700	0,426	20,350	0,638
T-PEG 20K	20,300	0,587	13,394	0,970
L-PEG 10K	10,000	0,717	33,243	0,391
L-PEG 20K	20,000	0,561	12,995	1,000

Floresan işaretli polimerler ile gerçekleştirilen hücre alımı deneylerinde hücre alımlarının nicel olarak tayini için, Tablo 4.2'de verilen normalizasyon katsayıları kullanılmıştır. Polimerlerin floresan boya ile işaretlenme derecesinin oranı olan

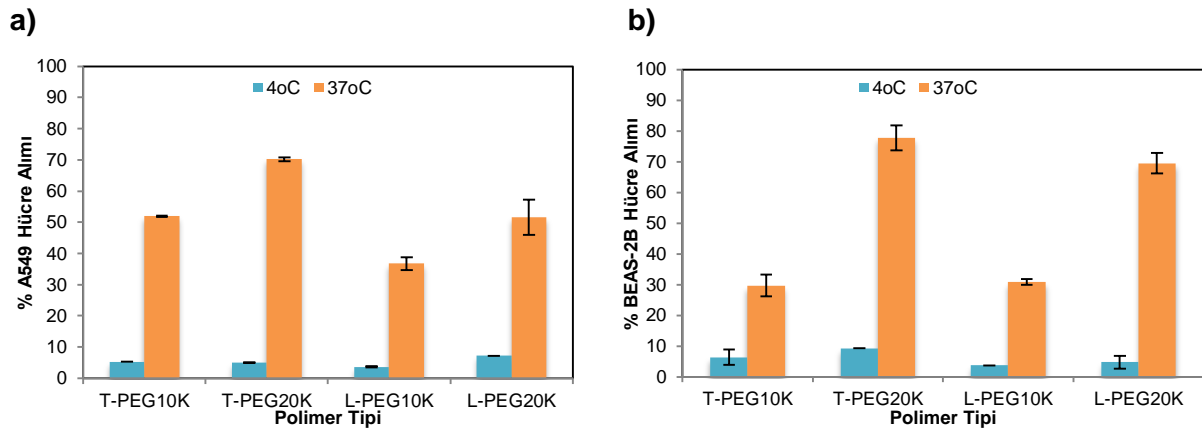
normalizasyon katsayısı, en az miktarda floresan etiket ile işaretlenen L-PEG 20K polimerinin işaretlenme derecesi temel alınarak, L-PEG 20K işaretlenme derecesinin her bir polimerin işaretlenme derecesine bölünmesi ile hesaplanmıştır.

4.5 Polimerlerin Hücre İçine Alımı

Polimerlerin hücre içine alınmasının nicel tayini ve alımda etkin olan yolağın belirlenmesi polimerlerin *in vitro* etkinliğini belirlemede oldukça önemli bir basamaktır. Oregon Green boyası ile işaretlenmiş tarak tipi ve lineer PEG polimerlerinin hücre içine alımları ve alım mekanizmaları akış sitometri yöntemi ile belirlenmiştir. Polimerlerin hücre içine alımında enerjiye bağlı mekanizmaların ve hücre iskeleti bileşenlerinin etkinliği araştırılmıştır. Tüm deneylerde polimerlerin hücre içine alım değeri, negatif kontrole (polimer ile inkübe edilmemiş hücrelere) göre ortalama floresan yüzde değeri olarak belirtilmiştir.

4.5.1 Polimerlerin Hücre İçine Alımında Enerjiye Bağımlı Mekanizmaların Rolü

İlk olarak polimerlerin hücreler tarafından alım mekanizmasının enerjiye bağımlılığı araştırılmıştır. Literatürde hücrelerin 37°C'den düşük sıcaklıklarda inkübasyonu sonucunda, enerjiye bağımlı endositoz olaylarının azaldığı bildirilmiştir (Iacopetta vd., 1983; Khalil vd., 2006). A549 ve BEAS-2B hücrelerinin floresan boya ile işaretli tarak-tipi ve lineer PEG polimerleri 4°C ve 37°C'de alım profilleri Şekil 4.15'de gösterilmiştir.



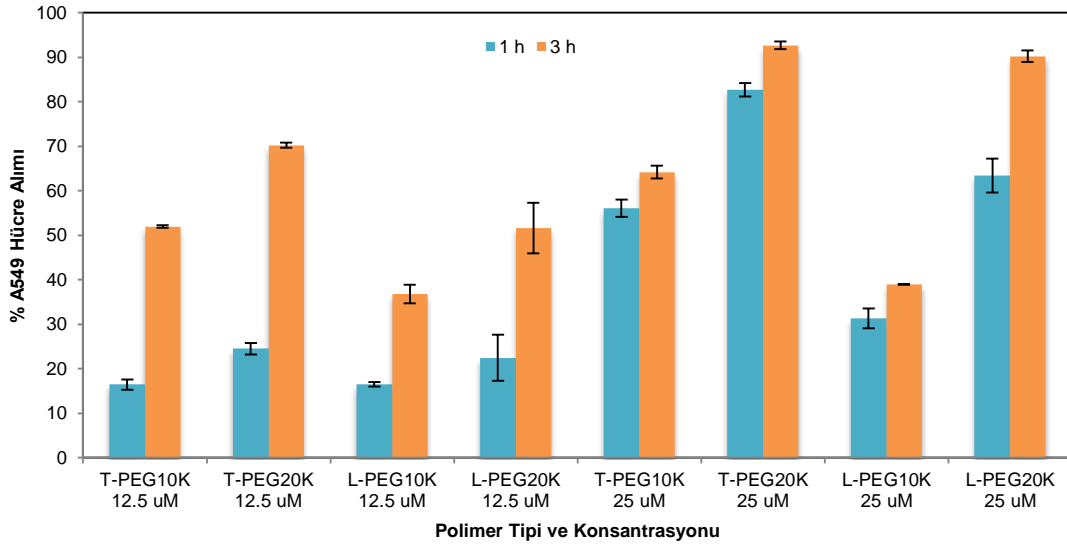
Şekil 4.15. Tarak-tipi ve lineer PEG polimerlerinin (a) A549 hücreleri (b) BEAS-2B tarafından 4°C ve 37°C alımları (Polimer konsantrasyonu 12.5 µM ve inkübasyon zamanı 3 saattir.)

Tarak-tipi ve lineer PEG polimerlerinin sağlıklı BEAS-2B ve kanserli A549 hücreleri tarafından alınımının, hücrelerin 4°C'de inkübasyonu sırasında enerjiye bağımlı membran aktivitelerinin inhibe olması sebebiyle önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Bu sonuca

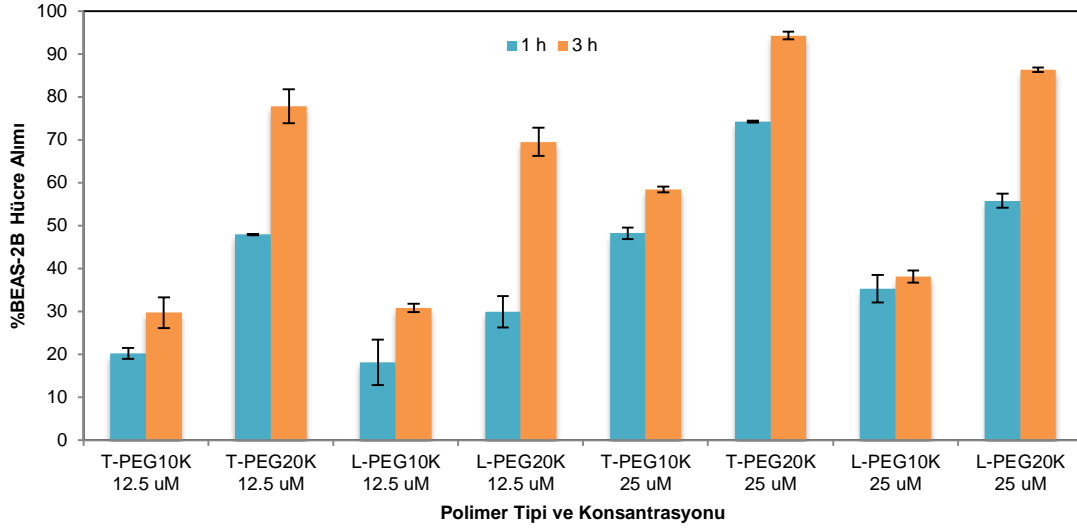
dayanarak hem tarak-tipi hem de lineer PEG polimerlerinin hücre içine alımlarının enerjiye bağımlı bir membran aktivitesi, bir başka deyişle endositoz aracılığı ile gerçekleştiği sonucuna varılmıştır. PEG polimerlerin mimarisinin (lineer ve tarak-tip) ve moleküler ağırlıklarının (10,000 ve 20,000 g/mol) polimerlerin hücre içine alım yöntemi üzerinde önemli bir faktör olmadığı tespit edilmiştir. Ulaşılan bu sonuçlar literatür bilgileri ile de uyum göstermektedir. Lineer PEG'in hücre içine alımının enerjiye bağımlı olduğu ve 4°C'de inkübasyon sırasında hücreler tarafından L-PEG alımının tamamen durduğu belirtilmiştir (Yu vd., 2004). Ayrıca polimerlerin molekül ağırlığının 37°C'de hücre alımına önemli etkisi olduğu görülmüştür. Yüksek molekül ağırlıklı polimerler (20,000 g/mol), mimariye bakmaksızın, hücreler tarafından daha fazla alınmıştır.

4.5.2 Hücre Alımlarında Polimer Konsantrasyonu ve Inkübasyon Süresinin Etkisi

Polimerlerin hücre içine alım miktarının, polimer konsantrasyonuna ve inkübasyon süresine bağlı değişimleri Şekil 4.16 ve 4.17'de gösterilmiştir.



Şekil 4.16. Tarak-tipi ve lineer PEG polimerlerinin A549 hücreleri tarafından alımları: Polimer konsantrasyonu ve inkübasyon süresinin etkisi



Şekil 4.17. Tarak-tipi ve lineer PEG polimerlerinin BEAS-2B hücreleri tarafından alımları: Polimer konsantrasyonu ve inkübasyon süresinin etkisi

Tarak- tipi ve lineer PEG polimerlerinin hücre içine alımlarının artan konsantrasyon ve inkübasyon süresi ile arttığı tespit edilmiştir. Bulgular, genel olarak tarak-tipi PEG polimerlerinin iki hücre hattı tarafından da lineer PEG'e göre daha fazla ve daha hızlı olarak alındığını göstermiştir ($p < 0.05$ - t-test).

4.5.3 Polimerlerin Hücre İçine Alım Mekanizmalarının Belirlenmesi

PEG polimerlerinin hücre içine alımında endositozun etkin rol oynadığı belirtilmiştir. 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). Bu sebeplerle, hücre iskeletinin temel iki bileşeni olan mikrotübül ve aktin filamentlerinin inhibiyonunun PEG polimerlerinin alımına olan etkisi incelenmiştir.

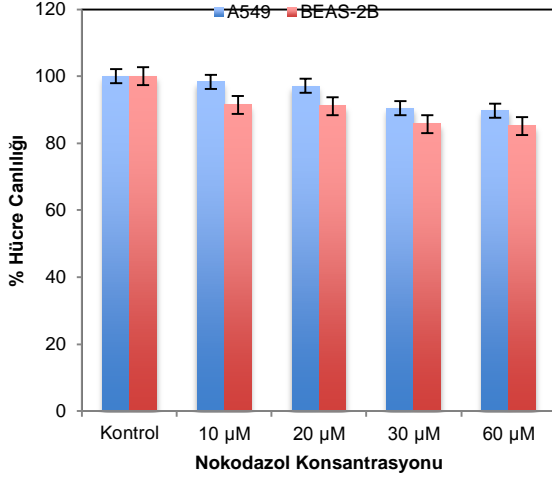
Transport inhibitörleri endositoz aktivitesi üzerinde inhibe edici etki gösterirken hücrelerin canlılığını düşürücü etkileri de olabilir. Bu sebeple transport inhibitörlerinin çalışma konsantrasyonlarının belirlenmesi öncesinde hücre canlılığına olan etkilerinin belirlenmesi oldukça önemlidir.

Transport inhibitörlerinin bazı hücre hatları üzerine olan toksik konsantrasyonları literatürde belirtilmiştir. A549 hücrelerinin 5 µg/ml sitokalsin A ve 20 µM nokodazol ile 30 dakika inkübasyonunun aktin polimerizasyonunu ve mikrotübül depolimerizasyonunu inhibe ettiği literatürde rapor edilmiştir (Santos vd., 2011). Belirtilen konsantrasyonlarda nokodazol ve sitokalsin A uygulamasından sonra hücre canlılığının yaklaşık %75 ve %97 oranında olduğu da belirtilmiştir. Literatürde insan solunum yolu epitel hücrelerinin mikrotübül yapısının 33 µM nokodazol ile 30 dakika inkübasyon sonunda depolimerize olurken, A549 hücrelerinin aktin yapısının 10 µg/ml sitokalsin D ile 1 saat inkübasyon sonucunda bloke olduğu da belirtilmiştir (Odrliin vd., 2001). Özetle, hücre canlılığı üzerine önemli ölçüde etki göstermeyecek transport inhibitörlerinin inkübasyon koşullarının öncelikle belirlenmesinin gerekli olduğu sonucuna varılmıştır.

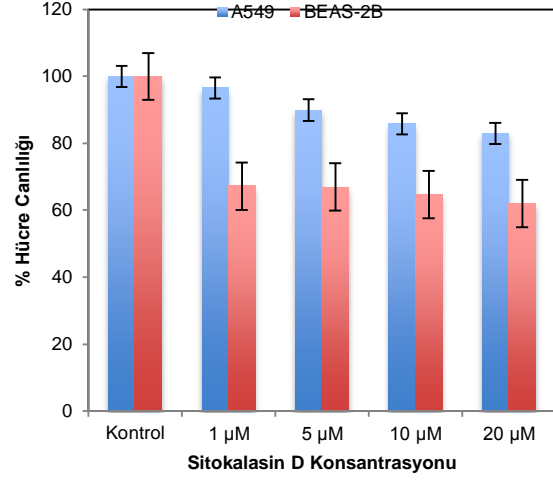
Değişen konsantrasyonlardaki transport inhibitörlerinin ve aynı konsantrasyon değerlerinde iki inhibitörün aynı anda hücre canlılığına olan etkileri 2 saat inkübasyon sonucunda belirlenmiştir (Şekil 4.18).

Nokodazol ve sitokalsin D A549 ve BEAS-2B hücrelerinin canlılığı üzerinde görüldüğü gibi doza bağımlı olarak etki göstermektedir. 60 µM nokodazol konsantrasyonunda dahi, A549 ve BEAS2B hücre canlılığı halen %90 ve %80 değerinden fazla olduğundan 20 µM nokodazol çalışma konsantrasyonu olarak seçilmiştir (Şekil 4.18a). BEAS-2B hücreleri üzerinde A549'A göre daha fazla toksik etki gösteren sitokalsin D'nin çalışma konsantrasyonu ise 20 µM olarak seçilmiştir (Şekil 4.18b). Her iki inhibitörün 20 µM konsantrasyonda ortamda bulunduğu durumda hücre canlılığının halen %50 değerinin üzerinde olması ve her iki hücre hattının canlılık değerlerinin birbirine çok yakın olmasından dolayı 20 µM sitokalsin D ve nokodazol çalışma konsantrasyonu olarak seçilmiştir (Şekil 4.18c).

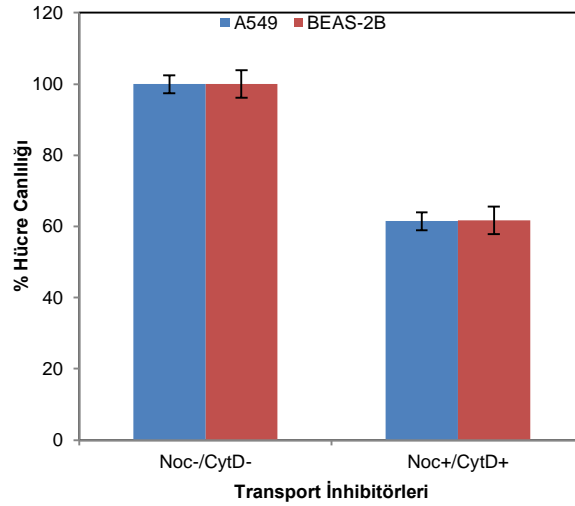
a)



b)

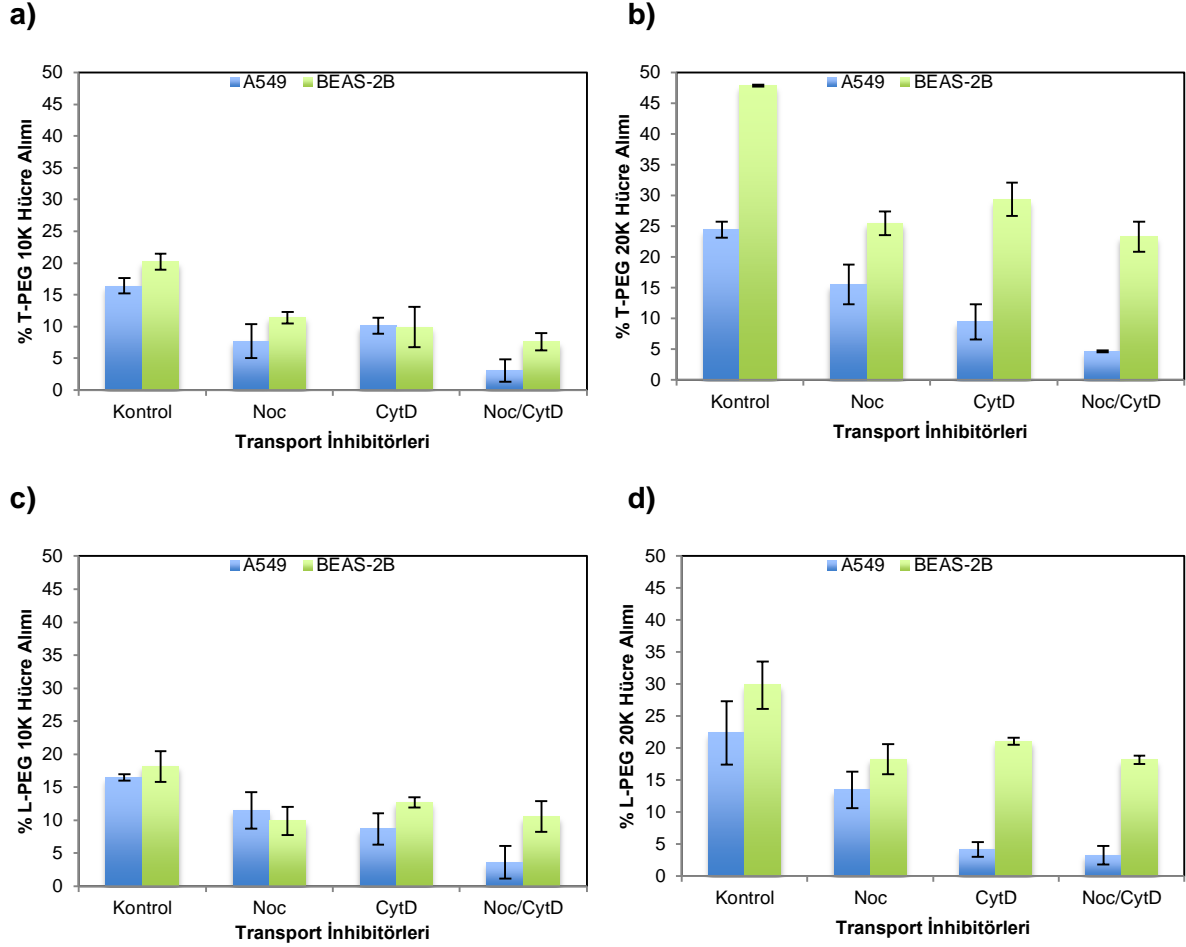


c)



Şekil 4.18. A549 ve BEAS-2B hücrelerinin değişen konsantrasyonlarda (a) nokodazol (b) sitokalsin D (c) her iki transport inhibitörü ile (20 µM) 2 saat inkübasyon sonucunda canlılık değerleri

Tarak- tipi ve lineer PEG'in hücreler tarafından transport inhibitörleri varlığında hücre alımları Şekil 4.19'da gösterilmiştir. Şekildeki kontrol deney grupları, hücrelerin inhibitör yokluğunda polimer alımlarını göstermektedir. Bulgular ışığında hücre iskeletinin aktin ve mikrotübül komponentlerinin polimerlerin endositoz ile hücre içine alınmasında aktif olarak görev aldığı sonucuna varılmıştır ($p < 0.05$). Aktin filamentlerinin ve mikrotübüllerin polimerlerin hücre içine alınmasında etkin rol oynaması, işlem sırasında aktif olan endositoz alt yolağının vezikül oluşumunu ve taşınmasını içerdiği sonucuna işaret etmektedir.



Şekil 4.19. T-PEG 10K (a), T-PEG 20K (b), L-PEG 10K (c) ve L-PEG 20K (d) polimerlerinin 12.5 µM konsantrasyonda 1 saat inkübasyon sonucunda A549 ve BEAS-2B hücreleri tarafından transport inhibitörleri varlığında alım değerleri.

Aktin ve mikrotübül inhibitörlerinin aynı anda ortamda bulunduğu durumda ise PEG polimerlerinin hücre içine alımı sadece A549 kanser hücre hattında istatistiksel olarak anlamlı azalma göstermiştir ($p < 0.05$). Bu durum, kanser hücre hattı A549 ve sağlıklı hücre hattı BEAS-2B arasında PEG polimerlerinin hücre içine alımında aktive olan endositoz alt yolağının farklılık gösterebileceğine işaret etmektedir. İki hücre hattında da endositoz alt yolağları açısından polimer mimarileri arasında belirgin bir farklılık gözlenmemiştir.

4.6 Polimerlerin Hücre İçi Dağılımının Belirlenmesi

Tarak tipi ve lineer PEG polimerlerinin hücre içinde dağılımları floresan mikroskopi yöntemi ile belirlenmiştir. Oregon Green boyası ile işaretli polimerler (yeşil renk) bu deneylerde kullanılmıştır. Nükleus mavi renkte ışımaya sahip olan Hoechst 33342 floresan boyası ile işaretlenirken lizozom organeli kırmızı renkte ışımaya sahip olan LysoTracker DND-

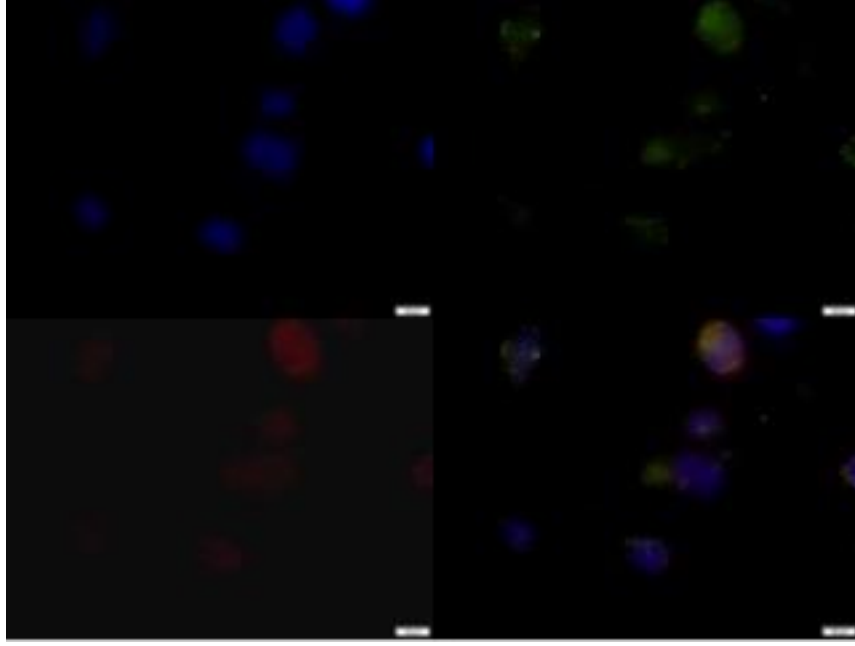
99 floresan boyası ile işaretlenmiştir. A549 ve BEAS-2B hücrelerinin tarak tipi ve lineer PEG ile inkübasyonu sonucunda alınan mikrograflar Şekil 4.20'de gösterilmiştir.

Floresan mikroskopi analizleri sonucunda yeşil renkte olan tarak-tipi ve lineer PEG polimerlerinin genel olarak sitoplazmada özellikle lizozomların içinde hapsediği belirlenmiştir. Hücre alımı mekanizmalarının incelendiği deney sonuçları ile uyumlu olan mikroskop sonuçları, PEG mimarisinin (tarak- tipi ve lineer) ve polimer moleküler ağırlığının (10,000 ve 20,000 g/mol) hücre içi dağılım açısından fark yaratan parametreler olmadığını göstermiştir.

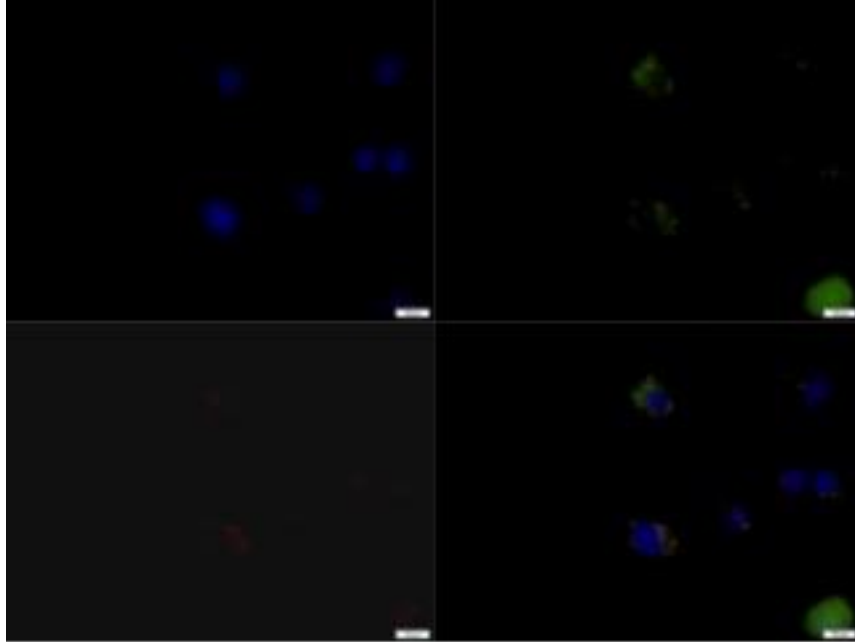
4.7 Polimerlere RGD Peptidinin Bağlanması

Tarak-tipi ve lineer PEG polimerlerinin uç grubuna bağlı ligandları “perdeleme” (“shielding”) etkileri arasındaki fark, 10,000 g/mol molekül ağırlıktaki polimerlerin uç grubuna RGD peptidi bağlanarak $\alpha_v\beta_3$ integrin pozitif hücreler tarafından alımlarının incelenmesi ile belirlenmeye çalışılmıştır. RGD peptidin polimerlere konjuge edilmesi birçok aşamadan oluşan sentetik bir yöntem takip edilerek gerçekleştirilmiş ve her bir sentetik aşama $^1\text{H-NMR}$ spektroskopisi ile izlenmiştir.

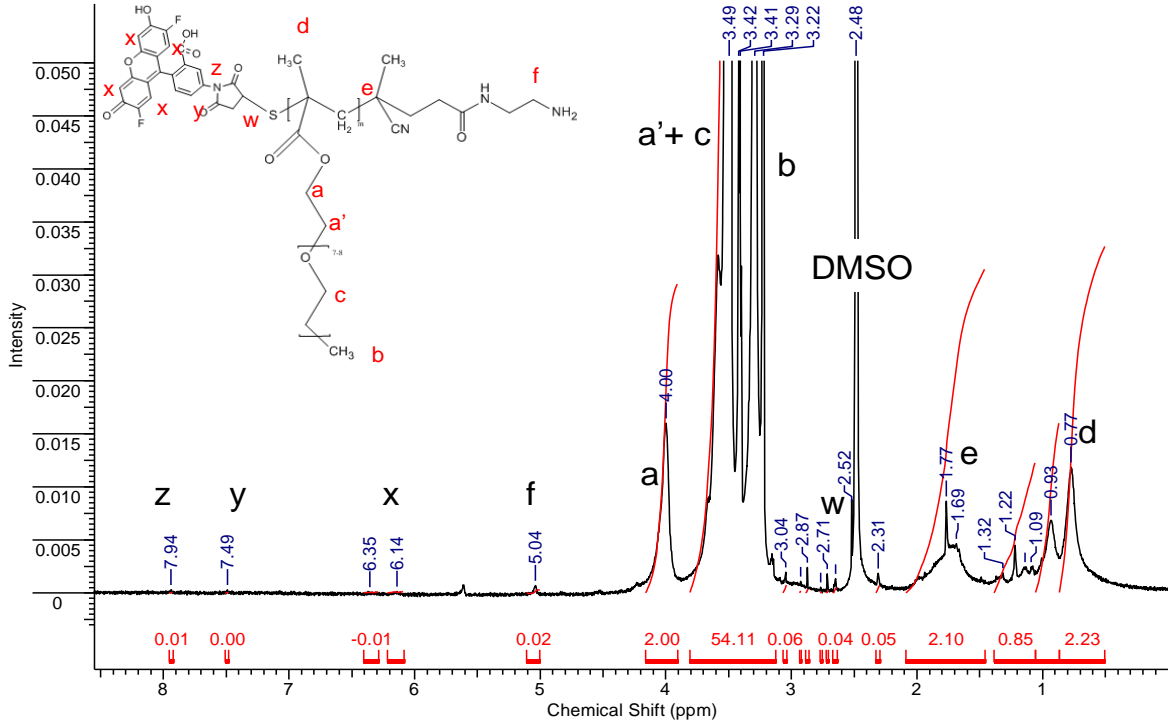
Oregon Green floresan molekülü ile işaretlenmiş tarak- tipi PEG polimerine RGD peptidinin bağlanmasında ilk aşama, RAFT ajanının R grubunun sahip olduğu karboksil (COOH) grubunun EDC/NHS kimyası aracılığıyla aktive edilmesi ve etilendiamin varlığında amin (NH_2) grubuna dönüştürülmesidir. Bu reaksiyon sonucunda oluşan ürünün $^1\text{H-NMR}$ spektrumu Şekil 4.22'de gösterilmiştir. 5.04 ppm değerinde elde edilen pik, polimerin ucunda oluşan amin ($-\text{NH}_2$) grubu protonlarından kaynaklanmaktadır. Bir sonraki aşamada, amin uç grubu üzerinden polimere maleimid ve NHS aktif gruplarına sahip bifonksiyonel bir ajan (GMBS) bağlanmıştır. Bu reaksiyon sonucunda oluşan ürünün $^1\text{H-NMR}$ spektrumu Şekil 4.23'de gösterilmiştir. 6.97 ppm'de bulunan pik maleimide grubunda çift bağda bulunan 2 protonu göstermektedir. En son adımda floresan ve maleimid fonksiyonelliğine sahip tarak-tipi polimere Cys-RGD siklik peptidi bağlanmıştır. Konjugasyon sonrası RGD peptidinin polimere bağlandığını gösteren $^1\text{H-NMR}$ spektrumu Şekil 4.24'de gösterilmiştir. 7.22-7.15 ppm arasında bulunan pik RGD peptidinde bulunan fenilalanin halkasındaki 5 protondan kaynaklanmaktadır. Şekil 4.24'de gösterilen $^1\text{H-NMR}$ spektrumundaki integrasyon değerlerini kullanarak polimer zinciri başına düşen RGD peptid sayısı hesaplanmıştır. Buna göre T-PEG 10K polimer zincirlerinin %24'ünün RGD peptidi ile bağlandığı anlaşılmıştır.



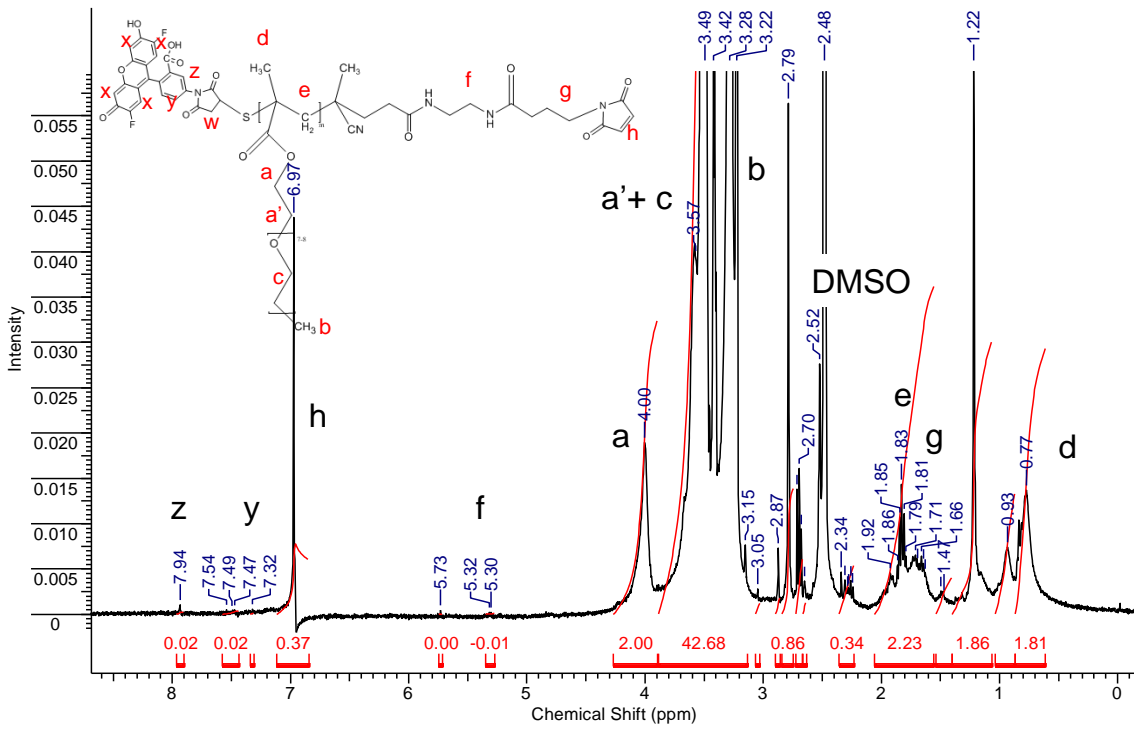
Şekil 4.20. A549 hücresinin Oregon Green ile işaretlenmiş T-PEG 20K ile inkübasyonun ardından çekilmiş floresan mikrografları. (a) Hoechst 33342 ile boyanmış nükleus (b) T-PEG 20K (c)Lysotracker Red DND-99 ile boyanmış lizozom (d) Farklı kanallarla çekilmiş a, b ve c mikrograflarının çakıştırılması. Skala uzunluğu 20 μm 'dir.



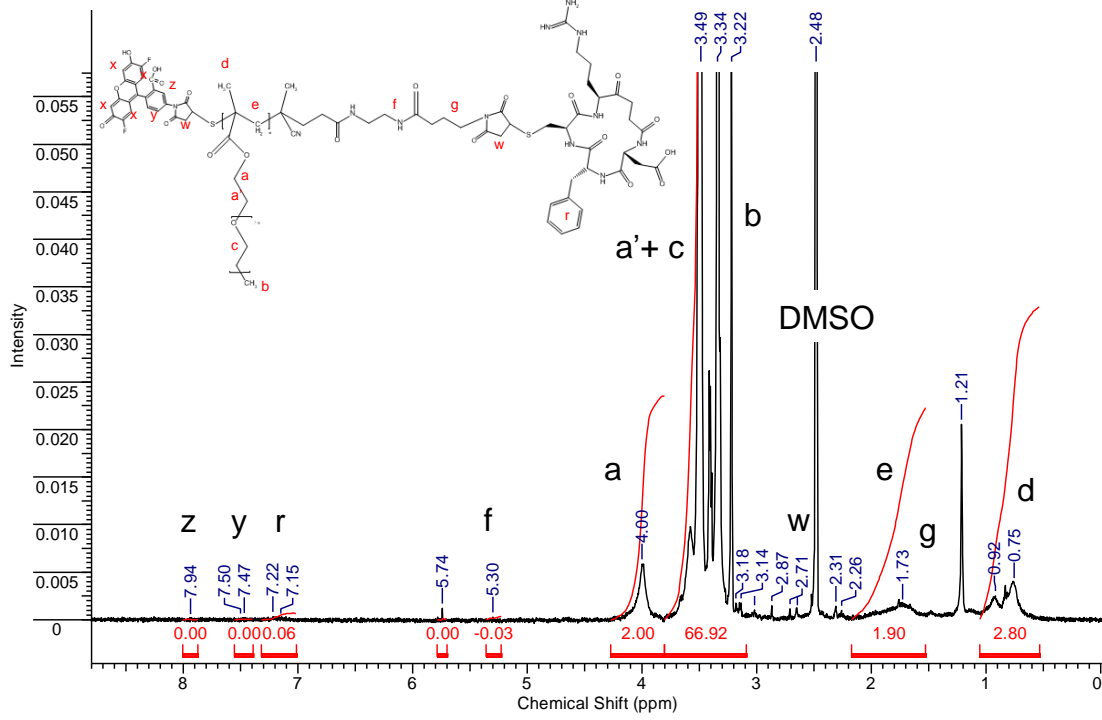
Şekil 4.21. BEAS-2B hücresinin Oregon Green ile işaretlenmiş T-PEG 20K ile inkübasyonun ardından çekilmiş floresan mikrografları. (a) Hoechst 33342 ile boyanmış nükleus (b) T-PEG 20K (c)Lysotracker Red DND-99 ile boyanmış lizozom (d) Farklı kanallarla çekilmiş a, b ve c mikrograflarının çakıştırılması. Skala uzunluğu 20 μm 'dir.



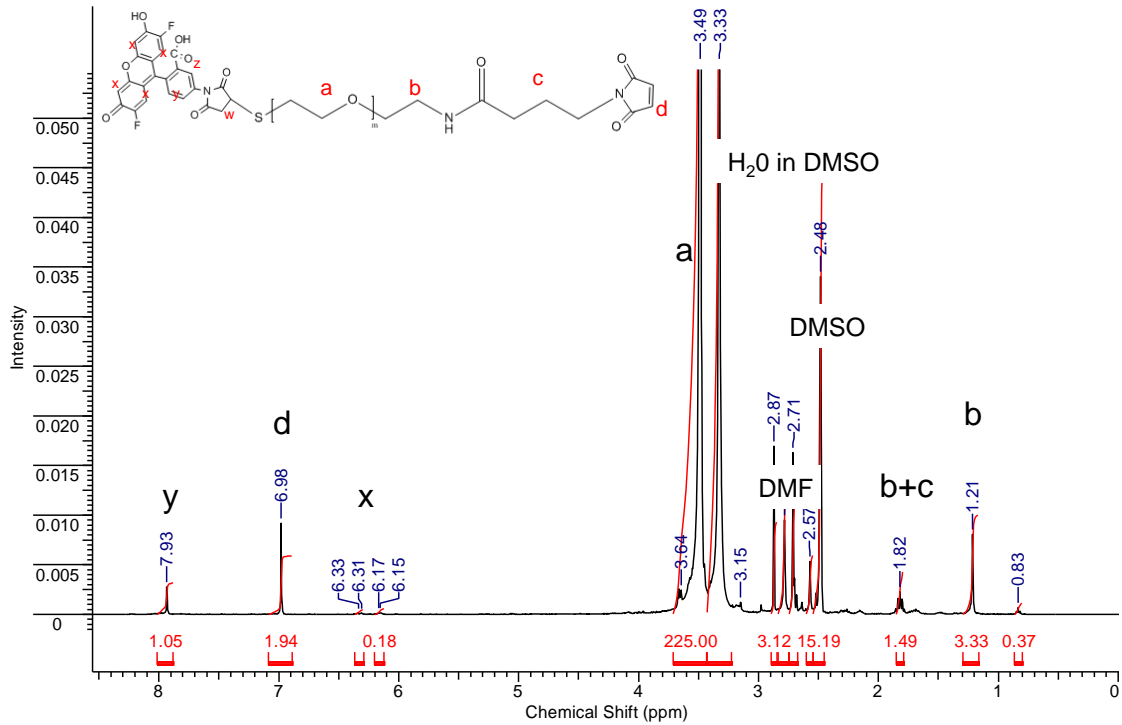
Şekil 4.22. Oregon Green etiketli tarak- tipi PEG 10K polimerinin EDC/NHS aktivasyonu ve etilendiamin bağlanması ve saflaştırma sonrası alınmış ¹H-NMR spektrumu



Şekil 4.23. Oregon Green etiketli, amin uç gruplu tarak- tipi PEG 10K polimerinin GMBS bağlanması ve saflaştırma sonrası alınmış ¹H-NMR spektrumu

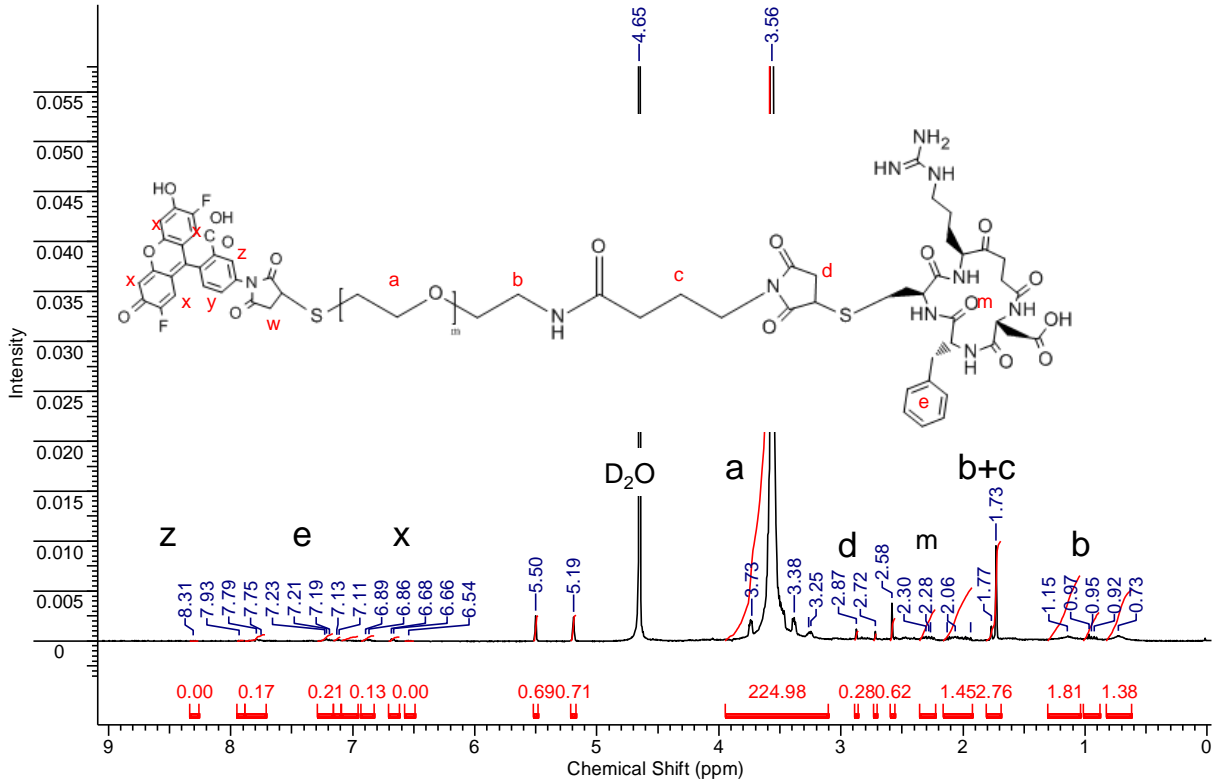


Şekil 4.24. Oregon Green etiketli, maleimid uç gruplu tarak- tipi PEG 10K polimerinin RGD peptidinin bağlanması ve saflaştırma sonrası alınmış ¹H-NMR spektrumu



Şekil 4.25. Oregon Green etiketli, amin uç gruplu lineer PEG 10K polimerinin GMBS bağlanması ve saflaştırma sonrası alınmış ¹H-NMR spektrumu

Linear PEG polimeri, heterobifonksiyonel olarak amin ve tiyol uç grupları içerecek şekilde ticari olarak temin edilmiştir. Polimerin tiyol uç grubu maleimide-fonksiyonel Oregon Green floresan boyası ile reaksiyona sokulmuştur (Şekil 4.13). Polimerin amin uç grubu ise, tarak-tipi polimerin modifikasyonunda da kullanılan NHS ester ve maleimide fonksiyonel uç grupları içeren bağlayıcı ajan (GMBS) ile reaksiyona sokulmuştur. Bu reaksiyon sonucunda oluşan ürünün $^1\text{H-NMR}$ spektrumu Şekil 4.25'de gösterilmiştir. 6.98 ppm değerinde görülen sinyal, polimerin ucunda oluşan maleimide grubundan kaynaklanmaktadır.



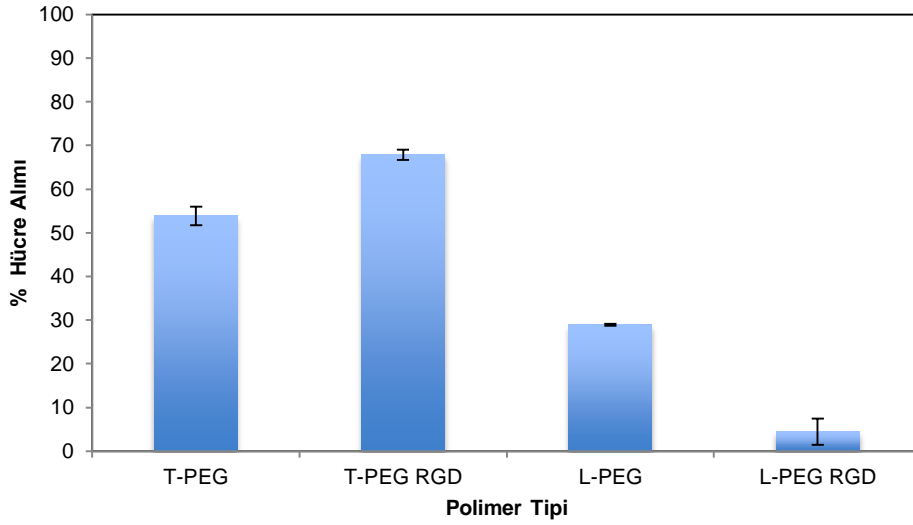
Şekil 4.26. Oregon Green etiketli, maleimid uç gruplu lineer PEG 10K polimerinin RGD peptidinin bağlanması ve saflaştırma sonrası alınmış $^1\text{H-NMR}$ spektrumu

Takip eden adımda maleimid uç grup fonksiyonelliğine sahip polimer, Cys-RGD peptidi ile konjuge edilmiştir. Bu reaksiyon sonucunda oluşan ürünün $^1\text{H-NMR}$ spektrumu Şekil 4.26'da gösterilmiştir. 7.23- 7.11 ppm arasında bulunan pik RGD peptidinde bulunan fenilalanin halkasındaki 5 protondan kaynaklanmaktadır. Şekil 4.26'de gösterilen $^1\text{H-NMR}$ spektrumundaki integrasyon değerlerini kullanarak polimer zinciri başına düşen RGD peptidi değeri hesaplanmıştır. Buna göre L-PEG 10K polimer zincirlerinin %73,4 RGD ile bağlandığı sonucuna ulaşılmıştır.

4.8 RGD-Konjuge Polimerlerin Hücre Alımının Belirlenmesi

Siklik yapıdaki RGD peptidinin integrin reseptörlerine sahip belirli hücre türlerinde polimer-esaslı sistemlerin alımını arttırdığı literatürde rapor edilmiştir (Kang vd., 2008; Kim vd., 2011; Lieb vd., 2005; Renigunta vd., 2006). Ayrıca literatürde, diğer hedefleyici moleküller gibi RGD peptidinin de L-PEG ile konjuge edildiğinde hücre reseptörleri tarafından tanınmasının azaldığı rapor edilmiştir (Kunath vd., 2003).

Lineer PEG ve tarak- tipi PEG polimerlerinin farklı mimarilere sahip olmaları nedeniyle hedefleyici moleküller üzerinde farklı etkilere sahip olabileceği düşünülmüştür. Literatürde T-PEG ile ilgili bu konuda bir bilgi henüz mevcut değildir. Bu nedenle, lineer PEG ve tarak-tipi PEG'in RGD molekülünün reseptör tanınması sırasında perdeleme (shielding) etkisinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bunun için, L-PEG ve T-PEG'in, yukarıda ayrıntıları verildiği şekilde siklik RGD ile konjuge edildikten sonra A549 hücre hattı tarafından alımları akış sitometresi yöntemi ile belirlenmiştir ve Şekil 4.26'da gösterilmiştir. A549 hücre hattının $\alpha_v\beta_3$ integrin pozitif olduğu literatürde bilinmektedir (Danhier vd., 2012).



Şekil 4.27. A549 hücrelerinin 12.5 μ M konsantrasyonda 1 saat inkübasyon sonucunda tarak-tipi ve lineer PEG'leri ve RGD konjugatlarını alım değerleri.

Şekil 4.26'da da görüldüğü gibi tarak-tipi PEG'in RGD ile konjuge olduğunda yüzeyinde integrin reseptörleri olan A549 hücresi tarafından alım değerlerinde %26 artış gerçekleşmiştir. Bu değer, T-PEG'in RGD ile konjugasyon derecesi olan %24 değerine oldukça yakındır. Dolayısıyla T-PEG'in alımında gerçekleşen bu artışın RGD konjugasyonundan kaynaklandığı sonucuna varılabilir. L-PEG'in hücre içine alım değerleri incelendiğinde ise, hücre alım değerinin yaklaşık % 31 değerinden RGD bağlanmasından sonra %5 değerine düştüğü görülmektedir. Bu düşüş, hücrelerin özelleşmemiş yollar



(nonspesifik) ile aldığı L-PEG polimerini, RGD bağlanmasından sonra reseptör aracılığıyla almasından kaynaklanabilir. Reseptör aracılığıyla alım miktarının, spesifik olmayan alıma göre daha düşük olması beklenen bir sonuçtur (Lodish vd., 2000).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu projenin amacı, lineer PEG (L-PEG) ile karşılaştırmalı olarak tarak-tipi PEG (T-PEG)'in, vücut dışında kültür edilmiş hücreler ile etkileşimini sistematik ve detaylı olarak incelemektir.

Bu amaçla T-PEG polimerleri Tersinir Katılma-Ayrışma Zincir Transfer (Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT)) Polimerizasyonu ile sentezlenmiştir. L-PEG ise ticari kaynaklardan temin edilmiştir. Polimerlerin molekül ağırlıkları, lineer PEG'in terapötik amaçlı kullanılan biyomolekül konjugatlarında yaygın olarak kullanılan molekül ağırlıkları dikkate alınarak 10,000 ve 20,000 g/mol olarak seçilmiştir.

Sentezlenen T-PEG'lerin ve eş molekül ağırlığa sahip L-PEG'lerin fizikokimyasal karakterizasyonu Nükleer Manyetik Rezonans (NMR), Jel Filtrasyon Kromatografisi (GPC), Dinamik Işık Saçılımı (DLS) ve Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) yöntemleri kullanılarak yapılmıştır. GPC ölçümlerinden ve NMR spektrumlarından elde edilen bilgiler ışığında, T-PEG'lerin hedeflenen molekül ağırlık (10,000 ve 20,000 g/mol) ve dar molekül ağırlık dağılımında (PDI<1.2) başarıyla sentezlendiği anlaşılmıştır. DLS deneyleri eş molekül ağırlıktaki T-PEG'lerin L-PEG'lere göre hidrodinamik çaplarının daha küçük olduğunu göstermiştir. Tarak benzeri mimari daha yoğun bir zincir yapısı oluşturduğu için T-PEG'in hidrodinamik çapının daha düşük olması beklenen bir sonuçtur. Buna ek olarak, T-PEG'in serum bileşenleri ile etkileştiği ve bunun sonucunda hidrodinamik çapında istatistiksel olarak önemli ($p<0.05$) artış gerçekleştiği görülmüştür. Buna karşılık, L-PEG'in serum bileşenleri ile etkileşmediği belirlenmiştir. T-PEG'in sahip olduğu hidrofobik anazincirin, çözelti içerisindeki proteinler ile hidrofobik olarak etkileşmesine neden olması beklenebilir. AFM deneyleri ile T-PEG ve L-PEG'lerin moleküler morfolojisi ve konformasyonu belirlenmiştir. Sıvıda alınmış AFM mikrografları eş molekül ağırlığa sahip T-PEG ve L-PEG polimerlerinin tamamen farklı konformasyona sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır. T-PEG'in muhtemelen zincir içi ve zincirler arası etkileşimler ile nanopartiküller oluşturduğu, buna karşılık L-PEG'in tek birimlik zincirler halinde bulunduğu gözlenmiştir.

T-PEG ve L-PEG polimerlerinin hücreler ile etkileşimlerinin *in vitro* incelenmesi amacıyla insan akciğer adenokarsinom epitel hücreleri (A549) ve bu hücrelerin sağlıklı eşlenikleri olan insan bronş epitel hücreleri (BEAS-2B) model hücreler olarak kullanılmıştır. Bu hücre hatları özellikle akciğer kanserinin ülkemizde en yaygın görülen kanser türlerinden biri olduğu dikkate alınarak ve ileride PEG esaslı bir ilaç salım sisteminin akciğer kanseri hücrelerine yönelik tasarlanması açısından uygun olduğu düşünüldükçe seçilmiştir. Buna ek olarak, projede hedefleyici ligand olarak seçilen RGD peptidinin A549 hücreleri tarafından alımı (Meng vd., 2011; Renigunta vd., 2006; Ye vd., 2012) ve PEG'in RGD'yi perdeleme

etkisi (Kunath vd., 2003) literatürde daha önce rapor edilmiştir. Dolayısıyla T-PEG'in konjuge olduğu ligandı perdeleme etkisinin belirlenmesi amacıyla A549 hücrelerinin model olarak bu projede kullanılması uygun bulunmuştur.

İlk olarak T-PEG ve L-PEG polimerlerinin A549 ve BEAS-2B hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri MTT deneyleri ile incelenmiştir. Polimerlerin hücreler üzerine olan sitotoksik etkilerinin, beklenildiği üzere, doza bağımlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, oldukça uzun inkübasyon süresi (72 saat) ve yüksek konsantrasyonda (200 μ M) dahi hücre canlılığı kontrol hücre canlılığının % 50'sinin üstünde olduğu için her iki mimarideki PEG'in, beklenildiği üzere, sitotoksik etki göstermediği sonucuna varılmıştır.

Polimerlerin hücre membranı geçirgenliğine olan etkileri LDH testi aracılığıyla karşılaştırılmıştır. Polimerlerin hücre membranı geçirgenliğini doza bağımlı olarak arttırdığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, oldukça uzun inkübasyon süresi (72 saat), yüksek polimer konsantrasyonu (200 μ M) ve yaklaşık % 60 hücre canlılığında dahi LDH salınımındaki artış, kontrol hücrelerin LDH salınımındaki artışın %3'ünün altında kalmıştır. Dolayısıyla, her iki mimarideki PEG'in hücre membranının geçirgenliğini artırıcı özellik göstermediği sonucuna varılmıştır.

Polimerlerin hücreler tarafından alımı floresan boya ile etiketlenmiş polimerler kullanılarak akış sitometresi aracılığıyla incelenmiştir. Deney sonuçları hücrelerin polimerleri almasında enerjiye bağımlı membran aktivitelerinin etkin olduğunu göstermiştir. Hücrelerin 37°C'deki alım miktarlarının konsantrasyona ve inkübasyon süresine bağılı olarak değişimi incelendiğinde, tüm polimerlerin hücre alımının polimer konsantrasyonu ve inkübasyon süresi ile arttığı tespit edilmiştir. Eş molekül ağırlığındaki T-PEG ve L-PEG karşılaştırıldığında, T-PEG'in hücreler tarafından daha fazla ve daha hızlı alındığı sonucuna ulaşılmıştır. T-PEG'in, AFM ve DLS deneylerinin sonuçları ışığında, nanopartikül yapıda olması ve serum proteinleri ile etkileşmesi hücreler tarafından algılanmasını kolaylaştırarak daha kolay alınmasına sebep olabilir. T-PEG ve L-PEG polimerlerinin farklı moleküler ağırlıklarının hücre alımı incelendiğinde, mimari ne olursa olsun, 20 000 g/mol molekül ağırlıktaki polimerlerin, 10 000 g/mol molekül ağırlıktaki polimerlere göre daha fazla alındığı görülmüştür. Uzun polimer zincirlerinin, daha fazla içerdikleri kıvrılmalar (entanglement) nedeniyle, hücrelerin farklı endositoz yollarını aktive etmeleri ve hücreler tarafından daha kolay algılanıp içlerine alınmaları mümkün olabilir.

PEG polimerlerinin hücre içine alımında endositozun etkin rol oynadığı hücre alımı deneyleri ile belirlenmiştir. 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. Hücre iskeletinin temel iki bileşeni olan mikrotübül ve aktin filamentlerin belirli ajanlar kullanılarak inhibisyonu sonucu PEG polimerlerinin hücreler tarafından alınımında değişiklikler olup olmadığı akış sitometresi ile ölçülmüştür. Bu deneyler, hücre iskeletinin aktin ve mikrotübül bileşenlerinin her iki polimer mimarisinin endositoz ile hücre içine alınmasında aktif olarak görev aldığını göstermiştir ($p < 0.05$). Aktin filamentlerin ve mikrotübüllerin polimerlerin hücre içine alınmasında etkin rol oynaması, işlem sırasında aktif olan endositoz alt yolağının vezikül oluşumunu ve taşınmasını içerdiğine işaret etmektedir. Burada, hücrelerin vezikül oluşumunu ve taşınmasını içeren ve içermeyen çok çeşitli farklı alım yollarını birbirine alternatif şekilde etkin hale getirip polimerleri alabileceği not edilmelidir. Bu yolların her iki polimer mimarisi için farklılık gösterip göstermediği ileride incelenmelidir.

Floresan mikroskop ile gerçekleştirilen incelemeler ise T-PEG ve L-PEG polimerlerinin genel olarak sitoplazmada özellikle lizozomların içinde hapsediğini göstermiştir. Hücre alımı mekanizmalarının incelendiği deney sonuçları ile uyumlu olan mikroskop sonuçları, PEG mimarisinin (tarak- tipi ve lineer) ve polimer moleküler ağırlığının (10,000 ve 20,000 g/mol) hücre içi dağılım açısından fark yaratan parametreler olmadığını göstermiştir.

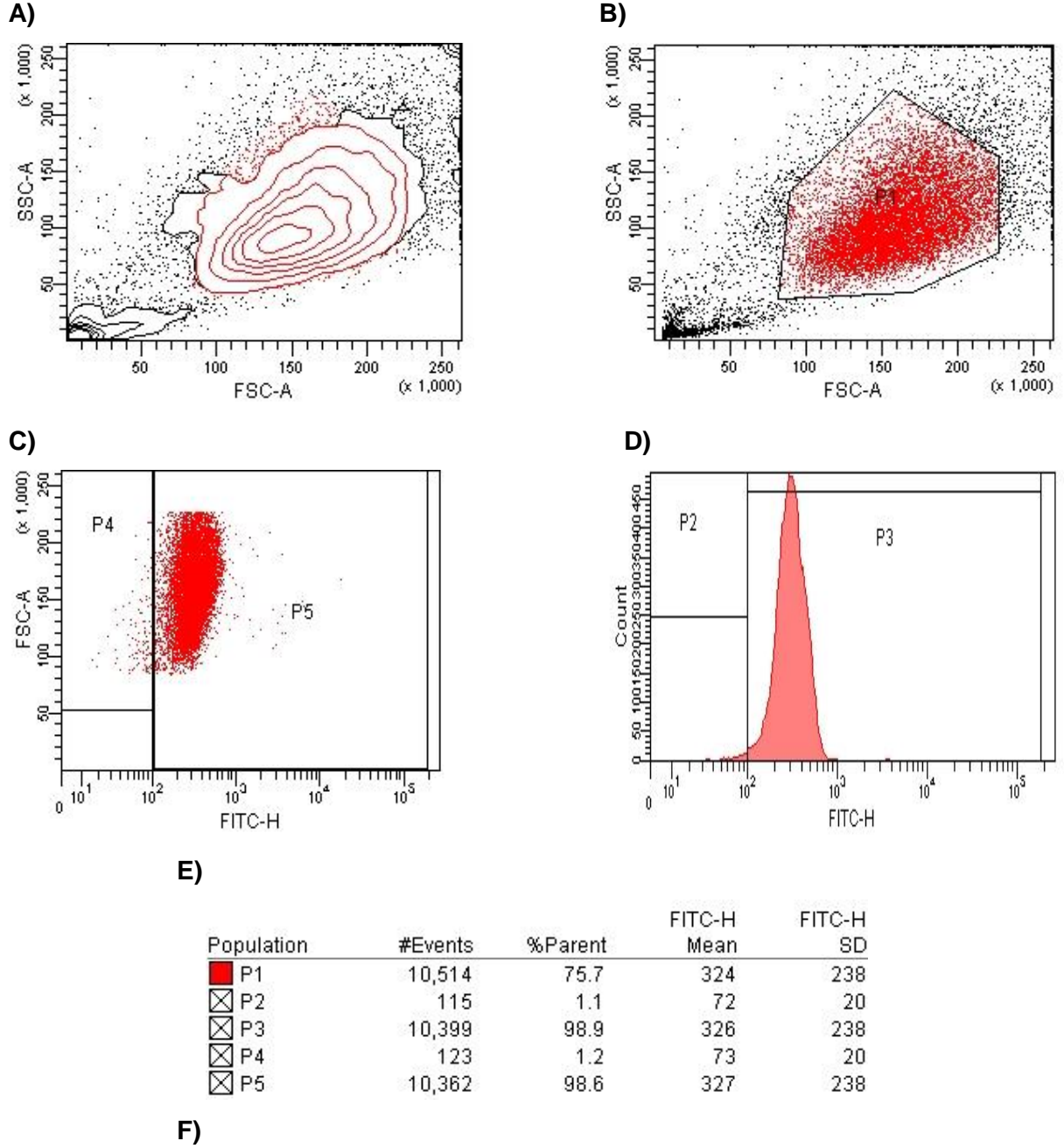
Literatürde L-PEG'in hedefleyici biyomoleküllere bağlandığında, molekülü perdeleyerek ("shielding"), hedefleme etkinliğini düşürdüğü yaygın olarak bilinmektedir. Bu çalışmada, RGD ile konjuge edilmiş T-PEG'in, hedefleyici molekül taşımayan T-PEG'e göre, $\alpha_v\beta_3$ integrin pozitif A549 hücreleri tarafından alınımının arttığı gözlenmiştir. Buna karşılık, RGD ile konjuge edilmiş L-PEG'in aynı hücreler tarafından alınımında önemli ölçüde azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu durumda L-PEG'in perdeleme etkisinin T-PEG'e göre daha fazla olduğu yorumu yapılabilir. Ancak, RGD bağlanmış L-PEG'in hücre alınımının, RGD ile bağlanmamış L-PEG'den daha az olması, RGD modifikasyonun L-PEG'in hücre alım mekanizmasında değişiklik yaratmış olabileceğini akla getirmektedir. RGD bağlı L-PEG'in hücre alınımındaki düşüş, hücrelerin özelleşmemiş (nonspesifik) yollar ile aldığı L-PEG polimerini, RGD bağlanmasından sonra reseptör aracılığıyla almasından kaynaklanabilir. Reseptör aracılığıyla alım miktarının, spesifik olmayan alıma göre daha düşük olması beklenen bir sonuçtur. Bu noktada T-PEG ve L-PEG polimerlerinin perdeleme etkisinin belirlenebilmesi için gelecekte hücreler üzerindeki RGD reseptörünün inhibe edilerek RGD-bağlı polimerlerin hücreler tarafından alınımı karşılaştırılmalıdır. Ayrıca RGD bağlı polimerler ile yapılan deneylerin sonuçları dolaylı olarak T-PEG ve L-PEG polimerlerinin hücreler tarafından alım mekanizmalarının farklılık gösterebileceğini öne sürmektedir. Bu mekanizmaların belirlenmesi ileride yapılacak çalışmaların odağında olacaktır.

Sonuç olarak, kısmen biyoparçalanabilir yapısı, istenilen mimaride, molekül ağırlıkta ve uç grup fonksiyonelliğe sahip olarak kolay sentezlenebilir olması gibi nedenler ile T-PEG, L-PEG'e alternatif olarak terapötik amaçlı biyomolekül konjugatlarında giderek artan bir şekilde incelenmektedir. Bu proje ile literatürde ilk defa T-PEG'in L-PEG'e göre kanser ve sağlıklı akciğer epitel hücreleri tarafından alımının daha hızlı ve hedefleyici molekül ile alımının daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

İleriki çalışmalarda, T-PEG ve L-PEG'lerin hücre içine hangi endositoz yolağı ile alındığı çeşitli inhibitörler yardımıyla incelenebilir. Böylelikle T-PEG ve L-PEG'in hücre alım profilindeki farklılıkların sebebi aydınlatılabilir. Buna ek olarak, L-PEG-RGD konjugatının alımının, RGD modifiye olmayan L-PEG'e göre düşük olmasının sebebinin aydınlatılabilmesi için, integrin reseptör inhibitörlerinin kullanıldığı durumda konjugatların hücre alımı incelenebilir. Tüm bu deneyler, T-PEG ve L-PEG polimerlerinin hücreler ile etkileşmesinde birbirinden ayrılan özelliklerinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır. Böylece T-PEG'in terapötik uygulamalarda L-PEG'e alternatif kullanılabilirliğinin anlaşılması yönünde önemli bulgular sağlanmış olacaktır.

EKLER

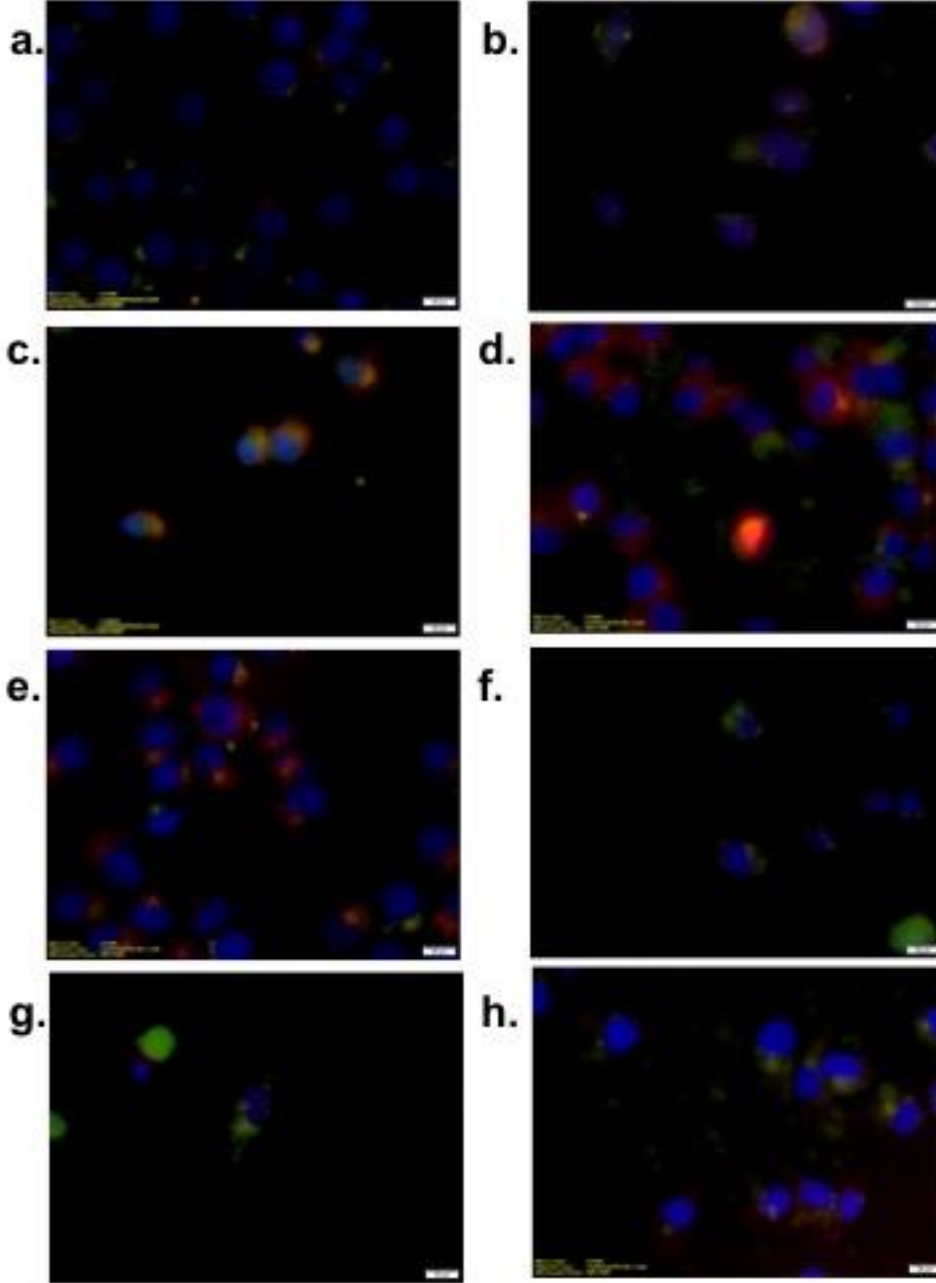
EK A. HÜCRE ALIMI ÖRNEK ANALİZİ



$$\% \text{ Hücre Alımı} = \frac{OG \text{ ortalama}_{P3} * \text{Hücre Sayısı}_{P3}}{OG \text{ ortalama}_{P1} * \text{Hücre Sayısı}_{P1}}$$

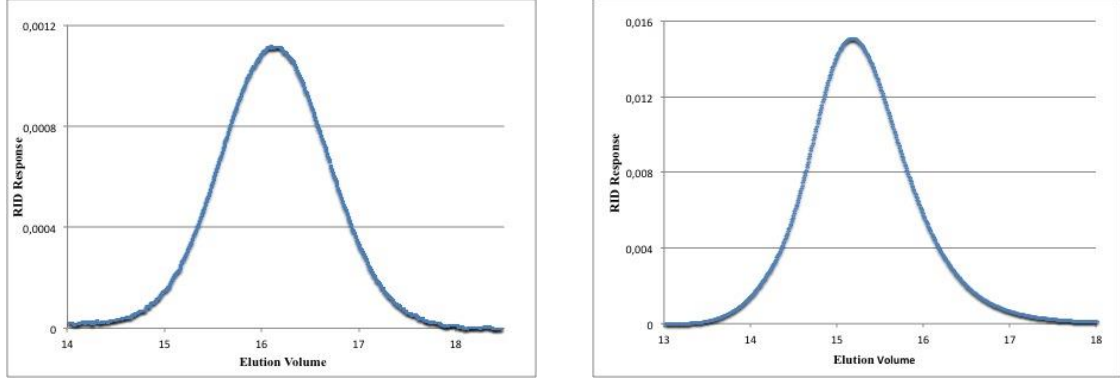
Şekil A.1. 25 µM T-PEG'in A549 hücreleri tarafından 1 saat sonucunda alımı. a) Contour plot b) Saçılım diyagramı c) Dot plot d) Histogram f) İstatiksel analiz g) Hücre alımı denklemi.

EK B. HÜCRE İÇİ DAĞILIM GÖRÜNTÜLERİ



Şekil B.1. Oregon Green ile işaretlenmiş polimerlerin floresan mikrografları. (a) A549 hücresi T-PEG 10K, (b) A549 hücresi T-PEG 20K, (c) A549 hücresi L-PEG 10K, (d) A549 hücresi L-PEG 20K, (e) BEAS-2B hücresi T-PEG 10K, (f) BEAS-2B hücresi T-PEG 20K, (g) BEAS-2B hücresi L-PEG 10K, (h) BEAS-2B hücresi L-PEG 20K. Nukleus mavi, lizozom kırmızı ve PEG polimerleri yeşil ile gösterilmiştir. Skala uzunluğu 20 μm 'dir.

EK C. POLİMER KARAKTERİZASYONU



Şekil C.1. T-PEG 10K ve 20K polimerlerinin GPC kromatogramı (a) T-PEG 10K elugramı ($M_n = 9700$ g/mol, PDI =1.12) b) T-PEG 20K elugramı ($M_n = 20\,300$ g/mol PDI = 1.18).



KAYNAKLAR

Abilez, O. 2006. "A novel culture system shows that stem cells can be grown in 3D and under physiologic pulsatile conditions for tissue engineering of vascular grafts.", *Journal of Surgical Research*, 132(2), 170-178.

Armstrong, J. K. 2004. "The hydrodynamic radii of macromolecules and their effect on red blood cell aggregation.", *Biophys J.*, 87(6), 4259-4270.

Bailon, P. 2001. "Rational design of a potent, long-lasting form of interferon: a 40 kDa branched polyethylene glycol-conjugated interferon alpha- 2a for the treatment of hepatitis C.", *Bioconjug Chem*, 12(2), 195-202.

Barner-Kowollik, C. 2008. *Handbook of RAFT Polymerization*. Darmstadt, Germany, WILEY-VCH.

Bouladjine, A. 2009. "New advances in nanocrystalline apatite colloids intended for cellular drug delivery.", *Langmuir*, 25(20), 12256-12265.

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

Boyer, C. 2009c. "Atom-Efficient Usage of Thiocarbonates for Direct Biofunctionalization of Polymers", *Macromolecular Rapid Communications*, 30, 493-497.

Caliceti, P. 2003. "Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates.", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(10), 1261-1277.

Danhier, F. 2012. "RGD-Based Strategies To Target Alpha(v) Beta(3) Integrin in Cancer Therapy and Diagnosis", *Mol. Pharmaceutics*, 9, 2961-2973.



Dardik, A. 2005. "Differential effects of orbital and laminar shear stress on endothelial cells.", *Journal of Vascular Surgery*, 41(5), 869-880.

Deshpande, M. C. 2004. "The effect of poly(ethylene glycol) molecular architecture on cellular interaction and uptake of DNA complexes.", *J Control Release*, 97(1), 143-156.

Deshpande, M. C. 2002. "Influence of polymer architecture on the structure of complexes formed by PEG-tertiary amine methacrylate copolymers and phosphorothioate oligonucleotide.", *Journal of Controlled Release* 81 (1-2), 185-199.

Eto, Y. 2005. "PEGylated adenovirus vectors containing RGD peptides on the tip of PEG show high transduction efficiency and antibody evasion ability.", *J Gene Med*, 7(5), 604-612.

Gao, W. 2010. "In situ growth of a PEG-like polymer from the C terminus of an intein fusion protein improves pharmacokinetics and tumor accumulation.", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(38), 16432-16437.

Gao, W. 2009. "In situ growth of a stoichiometric PEG-like conjugate at a protein's N-terminus with significantly improved pharmacokinetics.", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(36), 15231-15236.

Gauggel, S. 2012. "Characterization of biologically available wood combustion particles in cell culture medium.", *Altex-Alternatives to Animal Experimentation*, 29(2), 183-200.

Gunasekaran, K. 2011. "Conjugation of siRNA with Comb-Type PEG Enhances Serum Stability and Gene Silencing Efficiency.", *Macromolecular Rapid Communications*, 32(8): 654-659.

Hamidi, M. 2006. "Pharmacokinetic consequences of pegylation.", *Drug Delivery*, 13(6): 399-409.

Heredia, K. L. 2008. "Reversible siRNA-polymer conjugates by RAFT polymerization.", *Chemical Communications*, (28), 3245-3247.



Hong, S. P. 2006. "Interaction of polycationic polymers with supported lipid bilayers and cells: Nanoscale hole formation and enhanced membrane permeability.", *Bioconjugate Chemistry*, 17(3), 728-734.

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

Jokerst, J. V. 2011. "Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy.", *Nanomedicine (Lond)*, 6(4), 715-728.

Kang H. 2008, "Cellular Delivery and Biological Activity of Antisense Oligonucleotides Conjugated to a Targeted Protein Carrier", *Bioconjugate Chemistry*, 19, 2182- 2188.

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

Kim Y. 2011. "An Optimized RGD-Decorated Micellar Drug Delivery System for Albendazole for the Treatment of Ovarian Cancer: From RAFT Polymer Synthesis to Cellular Uptake", *Macromolecular Biosciences*, 11, 219- 233.

Knop, K. 2010. "Poly(ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives.", *Angewandte Chemie-International Edition*, 49(36), 6288-6308.

Kunath, K. 2003, "Integrin targeting using RGD-PEI conjugates for in vitro gene transfer", *The Journal of Gene Medicine*, 5, 588- 599.

Lee J. 2001. "Preparation, stability, and in vitro performance of vesicles made with diblock copolymers", *Biotechnology and Bioengineering*, 73: 135-145.

Lee W.K. 2002. "Investigation of the factors influencing the release rates of cyclosporin A-loaded micro- and nanoparticles prepared by high-pressure homogenizer.", *Journal of Controlled Release*, 84, 115.

Lieb, E., 2005. "Mediating specific cell adhesion to low-adhesive diblock copolymers by instant modification with cyclic RGD peptides.", *Biomaterials*, 26:2333-2341.



Lundy, B.B., 2013. "Neutral polymeric micelles for RNA delivery", *Bioconjugate Chemistry*, 24(3), 398-407.

Lodish, H. 2000. *Molecular Cell Biology (4th edition): Receptor-Mediated Endocytosis and the Sorting of Internalized Proteins*. New York: W. H. Freeman.

Mager, I. E. 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.

Mathew, A. 2012. "Hyperbranched PEGmethacrylate linear pDMAEMA block copolymer as an efficient non-viral gene delivery vector", *International Journal Of Pharmaceutics*, 434, 99-105.

Meng S. 2011. "Integrin-targeted paclitaxel nanoliposomes for tumor therapy", *Medical Oncology*, 28, 1180.

Moad, G., E. 2009. "Living Radical Polymerization by the RAFT Process - A Second Update.", *Australian Journal of Chemistry*, 62(11), 1402- 1472.

Odrliin, T. M. 2001. "Integrin alphavbeta3-mediated endocytosis of immobilized fibrinogen by A549 lung alveolar epithelial cells.", *Am J Respir Cell Mol Biol*, 24(1), 12-21.

Pissuwan, D. 2010. "In vitro cytotoxicity of RAFT polymers.", *Biomacromolecules*, 11(2), 412-420.

Renigunta, A. 2006. "DNA Transfer into Human Lung Cells Is Improved with Tat-RGD Peptide by Caveoli-Mediated Endocytosis", *Bioconjugate Chemistry*, 17, 327-334.

Ryan, S. M. 2008. "Advances in PEGylation of important biotech molecules: delivery aspects.", *Expert Opin Drug Deliv.*, 5(4), 371-383.

Ryan, S. M. 2009. "Conjugation of salmon calcitonin to a combed- shaped end functionalized poly(poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate) yields a bioactive stable conjugate.", *J Control Release*, 135(1), 51- 59.



Ryan, S. M. 2011. "PK/PD modelling of comb-shaped PEGylated salmon calcitonin conjugates of differing molecular weights.", *J Control Release*, 149(2), 126-132.

Saha, K. 2013. "Surface functionality of nanoparticles determines cellular uptake mechanisms in mammalian cells.", *Small*, 9(2), 300-305.

Santos, T. 2011. "Effects of Transport Inhibitors on the Cellular Uptake of Carboxylated Polystyrene Nanoparticles in Different Cell Lines.", *Plos One*, 6(9).

Sayers, C. T. 2009. "Site-specific N-terminus conjugation of poly(mPEG(1100)) methacrylates to salmon calcitonin: synthesis and preliminary biological evaluation." *Soft Matter*, 5(16), 3038-3046.

Srividhya M. 2006. "Sustained release of protein from poly(ethylene glycol) incorporated amphiphilic comb like polymers.", *Int J Pharm.*, 326(1-2), 119-127.

Tedja, R. S. 2012. "Effect of TiO₂ nanoparticle surface functionalization on protein adsorption, cellular uptake and cytotoxicity: the attachment of PEG comb polymers using catalytic chain transfer and thiol-ene chemistry.", *Polymer Chemistry*, 3, 2743-2751.

Torchilin, V. P. 2007. "Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging.", *AAPS J*, 9(2), E128-147.

Venkataraman, S. 2011. "The role of PEG architecture and molecular weight in the gene transfection performance of PEGylated poly(dimethylaminoethyl methacrylate) based cationic polymers.", *Biomaterials*, 32(9), 2369-2378.

Vercauteren, D. 2010. "The Use of Inhibitors to Study Endocytic Pathways of Gene Carriers: Optimization and Pitfalls", *Molecular Therapy*, 18(3), 561-569.

Veronese, F. M., 2005. "PEGylation, successful approach to drug delivery.", *Drug Discovery Today*, 10(21), 1451-1458.

Willcock, H. 2010. "End group removal and modification of RAFT polymers." *Polymer Chemistry*, 1(2), 149-157.



Ye Y.P. 2012. "Near-infrared Fluorescent Divalent RGD Ligand for Integrin $\alpha v\beta 3$ -targeted Optical Imaging", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22, 5405.

Yu, D. 2004. "Cellular penetration and localization of polyethylene glycol.", *ACR Meeting Abstracts*,

Yunus, W. M. B. 1988. "Refractive-Index of Solutions at High- Concentrations.", *Applied Optics*, 27(16), 3341-334.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. ESMA VOLGA BULMUŞ ZAREİE
Proje No:	113Z823
Proje Başlığı:	Tarak-Tipi ve Lineer Etilen Glikol Polimerlerinin Hücrelerle in Vitro Etkileşimlerinin İncelenmesi
Proje Türü:	1002 - Hızlı Destek
Proje Süresi:	12
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENS. MÜHENDİSLİK F.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/02/2014 - 15/02/2015
Onaylanan Bütçe:	29800.0
Harcanan Bütçe:	29783.97
Öz:	<p>Polietilen glikol (PEG), ilaç taşıma sistemlerinde geniş bir kullanım alanına sahiptir. PEG, biyomolekül esaslı ilaçlarla konjugat halinde kullanılmasının yanı sıra, lipozom, polimerik ve inorganik nanopartiküllerin kan akışında uzun süre kalabilmelerini sağlamak amacıyla bu sistemlerin formülasyonunda da sıklıkla kullanılmaktadır. Uygulamalarda genellikle lineer veya lineer PEG'den türetilmiş çift dallı PEG yapıları kullanılmaktadır. Yakın zamanda yapılan araştırmalar, farmakolojik uygulamalar için lineer PEG (L-PEG)'e bir alternatif olarak tarak tipi poli(etilen glikol) (T-PEG)'ü öne çıkarmıştır. T-PEG'in vücut içinde bozunabilen ester yan zincirlere sahip olması, s?emsiye-benzeri konformasyonu, yas?ayan/kontrollü? polimerizasyon teknikleri ile istenilen uc? gruba ve mimariye sahip olarak sentezlenebilmesi, T-PEG'in L-PEG'e go?re avantajları arasındadır.</p> <p>Bu projenin ana amacı T-PEG'in in vitro ortamda hayvan hu?creleri ile etkiles?imlerini lineer eşlenikleri ile karşılaştırmalı olarak incelemek ve böylece T-PEG'in hücresel düzeyde L-PEG'e kıyasla avantaj ve/veya dezavantajlarını ortaya koymaya yönelik bulgular elde etmektir.</p> <p>Bu amaç?la, farklı molekül? ağırlıklarda T-PEG (10,000 g/mol (10K) ve 20,000 g/mol (20K)) polimerleri sentezlendi. Eş molekül ağırlığa sahip L-PEG polimerleri ticari kaynaklardan temin edildi. Polimerlerin fizikokimyasal özellikleri, NMR, GPC, AFM ve DLS gibi farklı teknikler ile belirlendi. T-PEG polimerlerinin hidrodinamik çapları L-PEG'e göre daha küçük gözlenirken, T-PEG'in su içinde nanopartiküller, L-PEG'in ise tek birim zincirler halinde bulunduğu belirlendi. Polimerlerin hücreler ile etkileşimi kanserojenik A549 ve sag?lıklı BEAS- 2B insan akciğer hu?creleri kullanılarak incelendi. Polimerler hücreler üzerinde sitotoksik veya hücre membran geçirgenliğini artırıcı özellik göstermedi. Heriki PEG mimarisinin de hücreye enerji bağımlı yollarla alındığı ve alımlarında hücre iskeleti elemanlarının aktif rol oynadığı gözlemlendi. Önemli olarak, T-PEG'in L-PEG'e göre hücreler tarafından daha hızlı alındığı belirlendi. Ayrıca ?v?3 integrin pozitif hücreleri hedefleyebilen RGD peptidi T-PEG polimerine (10K) bağlandığında, polimerin A549 hücreleri tarafından alınımının arttığı, RGD bağlanmış L-PEG polimerinin ise aynı hücreler tarafından alınımının azaldığı gözlemlendi.</p> <p>Sonuç olarak, bu proje ile T-PEG'in terapötik uygulamalarda L-PEG'e alternatif kullanılabilirliğinin anlaşılması yönünde önemli bulgular elde edilmiştir.</p>
Anahtar Kelimeler:	Poli(etilen glikol); Hücre içi ilaç salım sistemleri; Biyomolekül-polimer konjugatları;
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır