T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOMOLEKÜL İÇEREN POLİELEKTROLİT KONJUGATLARI

SEVECEN TUĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
YARD. DOÇ. DR. ZEYNEP AKDESTE

İSTANBUL, 2012

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOMOLEKÜL İÇEREN POLİELEKTROLİT KONJUGATLARI

Sevecen TUĞLU tarafından hazırlanan tez çalışması 28.06.2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Yard. Doç. Dr. Zeynep AKDESTE

Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Yard. Doç. Dr. Zeynep AKDESTE

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof.Dr. İbrahim IŞILDAK

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Cemal ÖZEROĞLU

İstanbul Üniversitesi

ÖNSÖZ

Bizlere desteklerini esirgemeyen ve en iyi çalışma şartlarını sağlayan YTÜ-Biyomühendislik Bölüm Başkanlığı nezlinde Prof. Dr. İbrahim IŞILDAK hocamız ve saygıdeğer hocalarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca değerli öneri ve katkılarıyla beni yönlendiren, problemlere farklı açılardan bakmamı sağlayan, çalışmamın şekillenmesinde büyük emeği bulunan değerli hocamız Yrd. Doç. Dr. Zeynep AKDESTE' ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, laboratuvar çalışmalarımda her zaman yardım edip hiçbir konuda desteğini esirgemeyen Yrd.Doç.Dr. Mesut KARAHAN'a, GPC-Viscotek analizlerini gerçekleştiren Arş. Gör. Murat TOPUZOĞULLARI'na, HPLC analizlerini gerçekleştiren Dr.Kadriye KIZILBEY'e,

hayvan deneylerine ait çalışmalarımda bilgi, beceri ve tecrübesiyle sağladığı yardım ve desteklerinden dolayı Doç.Dr. Fatıma YÜCEL'e, yine tüm yardım ve güzel iş birliklerinden dolayı TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü çalışma ekibine ,

sitotoksisite testlerini gerçekleştiren Doç.Dr. Zübeyde AKIN POLAT'a ve Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı çalışma ekibine,

bizlere herzaman engin bilgi ve tecrübesiyle ortak araştırma imkanları sağlayan ve geliştiren değerli hocamız Prof. Dr. Nesrin EMEKLİ ve çalışma grubunda yer alan Medipol Üniversitesi ekibine,

antioksidan etkilerin incelenmesi çalışmalarında katkılarından dolayı Doç.Dr.Ayşegül PEKSEL'e,

tüm hayatım boyunca bana her türlü desteklerinden dolayı sevgili annem Nur TUĞLU ve babam Osman TUĞLU'ya

Bu tezde emeği geçmiş herkese sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Haziran, 2012

Sevecen TUĞLU

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ iiv

KISALTMA LİSTESİ x

ŞEKİL LİSTESİ xi

ÇİZELGE LİSTESİ xvi

ÖZET xvii

ABSTRACT xix

BÖLÜM 1

GİRİŞ 1

1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 1
1.3 Hipotez 3

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER 5

2.1 Biyopolimerler ve Polielektrolitler 5
2.2 Lineer Polimer Özellikteki Taşıyıcı Moleküller 8
2.3 Protein Özellikteki Taşıyıcı Moleküller 13
2.3.1 BSA (Bovin Serum Albumin) Proteini 14
2.3.2 HSA 15
2.3.3 KLH 16
2.3.4 OVA 16
2.4 Polimer Antijen Sistemlerinde Kullanılan Yöntemler 17
2.4.1 Polimer Antijen Sistemlerinde Elektrostatik Kompleks Oluşumu 17
2.4.1.1 Polielektrolit Komplekslerin ve Yapay Aşılarda Kullanımı 19
2.4.1.2 Üçlü Polielektrolit Kompleksler 21
2.4.2 Polimer Antijen Sistemlerinde Kovalent Bağlanma 23
2.5 Kovalent Bağlanmada Kullanılan Çapraz Bağlama Reaktifleri 23
2.5.1 Homobifonksiyonel Çapraz Baglayıcılar 24

2.5.2 Seçici Gruplara Göre Homobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri 25
2.5.2.1 Amino Grubuna Yönelen Homobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri 25
2.5.2.2 Sülfidril (Tiyol) Grubuna Yönelen Homobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri 26
2.5.2.3 Karboksil Grubuna Yönelen Homobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri 26
2.5.3 Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlayıcılar 26
2.5.3.1 Seçici Gruplara Göre Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri 28
2.5.4 Direkt (Zero-Length) Çapraz Bağlayıcılar 28
2.5.4.1 EDC 29
2.5.4.2 CMC 31
2.5.4.3 DCC 32
2.5.4.4 DIC 32
2.5.4.5 N,N-Karbonildiimidazol (CDI) 32
2.6 Biyomoleküller 33
2.6.1 Betulin 34
2.6.2 Estradiol 38
2.6.3 Progestron 40
2.7 Aşılar Hakkında Genel Bilgiler 43
2.7.1 Klasik (Konvansiyonel) Aşılar 43
2.7.2 Aktif (Canlı) Aşılar 43
2.7.3 İnaktif (Ölü) Aşılar 44
2.7.4 Biyoteknolojik Aşılar 44
2.7.4.1 İleri Teknoloji ile Hazırlanan Aşılar 44
2.7.4.2 Genetik Mühendisliği İle Hazırlanan Aşılar 46
2.7.5 Kanser Aşıları 47
2.7.5.1 Tümörün İmmün Özellikleri 48

BÖLÜM 3

KULLANILAN ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ 53

3.1 Moleküler Eleme Kromatografisi 53
3.2 Konjugatların Saflaştırılması 55
3.2.1 Santrifujlu Filtrasyon (Membranlı Santrifüj Tüpleri) 55
3.3 Elisa Yöntemi 56
3.4 Sitotoksisite 61
3.4.1 WST-1 Testi 63

BÖLÜM 4

DENEYSEL KISIM 65

4.1 Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler 65
4.1.1 Kullanılan Cihazlar 65
4.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler 66
4.2 Polivinilpirolidon-akrilik asit Kopolimeri Sentezi 68
4.2.1 VP – AA = 2:1 Kopolimeri Sentezi: 71

4.3 BSA proteininin poly(metil vinil eter-co-maleik anhidrid) kopolimeri ile EDC yönteminin konvensiyonel ve mikrodalga altında konjugasyonu.....71
4.3.1 Konjugasyonlarda Kullanılan Çözeltiler 71
4.3.2 Konvensiyonel ve MW Destekli Hazırlanan P(MVE-MA)-BSA Konjugatlarına Ait Hesaplamalar 71
4.3.3 Konvensiyonel Yöntem ile P(MVE-MA)-BSA Konjugatlarının Hazırlanışı 73
4.3.4 Mikrodalga Destekli Yöntem ile P(MVE-MA)-BSA Konjugatlarının Hazırlanışı 74
4.4 Betulin Biyomolekülünün Polielektrolitlerle Konjugatlarının Hazırlanması 76
4.4.1 Konjugasyonlarda Kullanılan Çözeltiler 77
4.4.2 Tiyanil Klorür Varlığında Sentezlenen PAA-Betulin Konjugatlarına Ait Hesaplamalar 77
4.4.3 Tiyanil Klorür Varlığında Sentezlenen PAA-Betulin Konjugatlarının Hazırlanışı.....77
4.4.4 CDI Çapraz Bağlayıcısı Varlığında Sentezlenen PAA-Betulin Konjugatlarına Ait Hesaplamalar 78
4.4.5 CDI Çapraz Bağlayıcısı Varlığında Sentezlenen PAA-Betulin Konjugatlarının Hazırlanışı 79
4.4.6 Tiyanil Klorür Varlığında Sentezlenen P(MVE-MA)-Betulin Konjugatlarına Ait Hesaplamalar 80
4.4.7 Tiyanil Klorür Varlığında Sentezlenen P(MVE-MA)-Betulin Konjugatlarının Hazırlanışı 81
4.4.8 CDI Çapraz Bağlayıcısı Varlığında Sentezlenen P(MVE-MA)-Betulin Konjugatlarına Ait Hesaplamalar 82
4.4.9 CDI Çapraz Bağlayıcısı Varlığında Sentezlenen P(MVE-MA)-Betulin Konjugatlarının Hazırlanışı 83
4.5 Estradiol Biyomolekülünün P(NIPAA-AA) Kopolimeri ile Konjugatının Hazırlanması.....85
4.5.1 Tiyanül Klorür Varlığında Sentezlenen P(NIPAA-AA)-Estradiol Konjugatlarına Ait Hesaplamalar 85
4.5.2 Tiyanül Klorür Varlığında Sentezlenen P(NIPAA-AA)-Estradiol Konjugatlarının Hazırlanışı 85
4.6 Progesteron Biyomolekülünün Polielektrolitlerle Konjugat ve Komplekslerinin Hazırlanması 87
4.6.1 EDC Varlığında Sentezlenen P(VP-AA) - Progesteron Konjugatlarına Ait Hesaplamalar.....87
4.6.2 EDC Varlığında Sentezlenen P(VP-AA)-Progesteron Konjugatlarının Hazırlanışı 87
4.6.3 EDC Varlığında Sentezlenen P(MVE-MA)-Progesteron Konjugatlarına Ait Hesaplamalar.....90
4.6.4 EDC Varlığında Sentezlenen P(MVE-MA)-Progesteron Konjugatlarının Hazırlanışı 90
4.6.5 EDC Varlığında Sentezlenen Polioksidonyum-Progesteron Konjugatına Ait Hesaplamalar 91
4.6.6 EDC Varlığında Sentezlenen Polioksidonyum-Progesteron Konjugatının Hazırlanışı 92

4.6.7 Polioksidonyum-Progesteron Kompleksinin Hazırlanmasına Ait Hesaplamalar 93
4.6.8 Polioksidonyum-Progesteron Kompleksinin Hazırlanışı 94
4.6.9 BSA – Progesteron Konjugatlarının Hazırlanmasına Ait Hesaplamalar 94
4.6.10 BSA – Progesteron Konjugatlarının Hazırlanışı 95
4.7 MAGE 3 (121-134) Peptidinin Polielektrolitlerle Konjugat ve Komplekslerinin Hazırlanması 96
4.7.1 Polioksidonyum-Peptid Konjugatlarına Ait Hesaplamalar 96
4.7.2 Polioksidonyum-Peptid Konjugatlarının Hazırlanışı 97
4.7.3 Polioksidonyum-Peptid İkili Komplekslerine Ait Hesaplamalar 98
4.7.4 Polioksidonyum-Peptid İkili Komplekslerinin Hazırlanışı 99
4.7.5 Polioksidonyum-Bakır-Peptid Üçlü Komplekslerinin Hesaplanması 99
4.7.6 Polioksidonyum-Bakır-Peptid Üçlü Komplekslerin Hazırlanışı 99
4.7.7 P(NIPAA-AA)-Peptid Konjugatlarına Ait Hesaplamalar 100
4.7.8 P(NIPAA/AA)-Peptid Konjugatlarının Hazırlanışı 100
4.7.9 P(NIPAA/AA) - Peptid İkili Komplekslerine Ait Hesaplamalar 102
4.7.10 P(NIPAA/AA) - Peptid İkili Komplekslerinin Hazırlanışı 102
4.7.11 P(NIPAA/AA) -Cu - Peptid Üçlü Komplekslerin Hesaplanması 103
4.7.12 P(NIPAA/AA) -Cu-Peptid Üçlü Komplekslerin Hazırlanışı 103
4.7.13 BSA –Peptid Konjugatlarının Hazırlanmasına Ait Hesaplamalar 104
4.7.14 BSA –Peptid Konjugatlarının Hazırlanışı 104

BÖLÜM 5

DENEY SONUÇLARI 106

5.1 VP – AA = 2:1 Kopolimeri Sentezine Ait Deney Sonuçları 106
5.2 MW Destekli ve Konvensiyonel Yöntemle EDC Çapraz Bağlayıcısı ile Hazırlanan P(MVE-MA)-BSA Konjugatlarına Ait Analiz Sonuçları 110
5.3 Tiyanil Klorür ve CDI Çapraz Bağlayıcısı ile Sentezlenmiş PAA-BETULİN Konjugatlarına Ait Analiz Sonuçları 117
5.4 CDI çapraz bağlayıcısı ile PAA-Betulin Konjugatının Sentezlenme Reaksiyon Mekanizması 126
5.5 Tiyanil Klorür Varlığında ve CDI Varlığında Sentezlenen P(MVE-MA)-Betulin Konjugatlarına Ait Analiz Sonuçları 130
5.6 P(NIPAA-AA)-Estradiol Konjugatına Ait Deney Sonuçları 136
5.7 Sitotoksisite Deneyleri 137
5.7.1 L929 Fare Fibroblast Hücrelerinin Çoğaltılması 138
5.7.2 Hücre Proliferasyon Deneyi 138
5.8 EDC Varlığında Sentezlenen P(VP-AA)-Progesteron Konjugatlarına Ait Analiz Sonuçları 142
5.8.1 Progesteron – $NHNH_2$'nin Hidrazon Reaksiyon Mekanizması 142
5.8.2 EDC Varlığında Sentezlenen P(VP-AA)-Progesteron Konjugatlarına Ait GPC Sonuçları 143
5.8.3 EDC Varlığında Sentezlenen P(MVE-MA)-Progesteron Konjugatlarına Ait GPC Sonuçları 146
5.9 EDC Varlığında Sentezlenen Polioksidonyum-Peptid Konjugatlarına Ait Analiz Sonuçları 148
5.9.1 Polioksidonyum – Peptid Konjugasyon Reaksiyonu 150

5.9.2 BSA-Peptid Konjugatlarına Ait Analiz Sonuçları 155
5.10 Hayvan Deneyleri 157
5.10.1 Fare Serumlarının Alınması.....159
5.10.2 Kullanılan Çözeltiler 160
5.10.2.1 Sodyum Sitrat Çözeltisi 160
5.10.2.2 0,5 M PBS Tamponu (pH=7,2).....160
5.10.2.3 Yıkama Tamponu 160
5.10.2.4 Substrat Tamponu 160
5.10.2.5 %0,1 Süt Tozu Çözeltisi 160
5.10.2.6 Polivalent İmmünoglobulin Alkalin Fosfataz Çözeltisinin Dilüsyonu.161
5.10.2.7 4-Nitrofenil Fosfat Substrat Çözeltisinin Hazırlanması 161
5.10.3 ELISA Deneyinin Yapılışı 161
5.10.4 Dolaylı Yoldan Enzim Bağlı İmmün Assay (ELISA) Yöntemi Kullanılarak Farelerden Alınan Serum Örneklerinde Kompleks ve Biyokonjugatlara Karşı Oluşan Antikor Miktar Tayini Sonuçları.....162
5.10.4.1 Polioksidonyum – Peptid Konjugat ve Komplekslerine Ait ELİSA Sonuçları.....162
5.10.4.2 (NIPAA-AA) – Peptid Konjugat ve Komplekslerine Ait ELİSA Sonuçları 163

BÖLÜM 6

SONUÇ VE ÖNERİLER 167

SİMGE LİSTESİ

g	Gram
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
n	Mol
°C	Santigrat derece
µl	Mikrolitre
µg	Mikrogram
mV	Milivolt
kDa	Kilodalton
c	Konsantrasyon
Cu^{2+}	Bakır elementi

KISALTMA LİSTESİ

Ag	Antijen
BSA	Bovin serum albümin
CDI	1,1'-Karbonildiimidazol
HCl	Hidroklorik Asit
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
NaCl	Sodyum klorür
$Na_2HPO_4.7H_2O$	Disodyum hidrojen fosfat heptahidrate
$NaH_2PO_4.2H_2O$	Sodyum dihidrojen fosfat dihidrate
NaN_3	Sodyum azid
PBS	Fosfat Tamponu
RI	Kırılma İndisi
SEC	Moleküler eleme kromatografisi
$SOCl_2$	Tiyanül Klorür
UV	Ultra Violet

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 Bir polianyonun tuz içermeyen çözeltideki durumları 7
Şekil 2.2 Tuz içeren ortamda polielektrolitlerin konformasyonundaki degisim.....7
Şekil 2.3 Taşıyıcı polimer olarak yaygın kullanılan katyonik polielektrolitler 10
Şekil 2.4 Taşıyıcı polimer olarak yaygın kullanılan anyonik polielektrolitler 10
Şekil 2.5 Sistein içeren peptidin polimerle olusturdugu konjugatın sematik gösterimi.....11
Şekil 2.6 Kısa zincirli peptid moleküllerinin lineer ve uzun zincirli polimerler ile oluşturdukları konjugatların sematik gösterimi.....11
Şekil 2.7 Taşıyıcı protein olarak BSA'nın biyomoleküller ile oluşturduğu konjugat 14
Şekil 2.8 Katyonize BSA oluşumu 15
Şekil 2.9 Polijen antijen sistemlerinin hazırlanmadında en sık kullanılan yöntemler .17
Şekil 2.10 CP makromolekülünün ve SA fonksiyonel gruplarının Cu2+ iyonları vasıtasıyla kompleks oluşumunun şematik gösterilmesi ve oluşan üçlü PMC'nin yapısı 22
Şekil 2.11 Homobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların şematik gösterimi 24
Şekil 2.12 Heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların şematik gösterimi 26
Şekil 2.13 EDC kullanılarak sentezlenen Peptid-BSA konjugasyon mekanizması.....31
Şekil 2.14 CDI ile amid bağı oluşum mekanizması 32
Şekil 2.15 CDI ile karbomat bağı oluşum mekanızması.....33
Şekil 2.16 Betulin ve/veya betulinik asidin moleküler yapısı 35
Şekil 2.17 Amino asidin betulin ve betulinik asit ile sübstitüsyon reaksiyonunun gösteriminde 1-koruma gruplu aminoasid – betulin molekülünün oluşumunu, 2- aminoasid – betulin molekülündeki amino asidin Boc koruma grubunun deprotectionını, 3- koruma gruplu aminoasid – betulinik asit molekülünün oluşumunu, 4- aminoasid – betulinik asit molekülündeki amino asidin Boc koruma grubunun deprotectionını göstermektedir 36
Şekil 2.18 Estradiolün moleküler yapısı 39
Şekil 2.19 Progesteronun moleküler yapısı.....40
Şekil 2.20 Pregnenolonun to Progesterona dönüşümü 40
Şekil 2.21 MAGE-3 121-134 (LLKYRAREPVTKAE) hidrofilik peptid dizisine ait amino asitlerin hidrofobik ve hidrofilik olarak gösterimi.....52
Şekil 3.1 SEC'in ayırma mekanizması 54
Şekil 3.2 Membranlı santrifüj tüpü kullanılarak konjugatların konsantre edilmesi ve

saflaştırılmasının şematik göserimi 56
Şekil 3.3 İndirekt Elisa Yöntemi.....60
Şekil 3.4 Enzim substratının ilavesinden sonra renk değişiminin görünümü.....61
Şekil 3.5 Sitotoksiste test yöntemleri[73] 62
Şekil 3.6 WST-1'in formazana dönüşümü [RS: mitokondriyal süksinat-tetrazolyum redüktaz sistem, EC: elektron alıcı ajan (electron coupling reagent)].....64
Şekil 4.1 Polimerizasyon işleminde kullanılan, vinil monomerleri olarak adlandırılan akrilik asit (AA) (a) ve vinil pirolidon (VP) (b) monomerlerinin moleküler yapıları. 69
Şekil 4.2 Radikalik polimerizasyonun başlaması (initiation) için kullanılan benzol peroksitin radikal halini alması. 69
Şekil 4.3 Reaksiyonun ilerlemesi için ilk monomerin radikale katılımı.....69
Şekil 4.4 Reaksiyonun ilerlemesi; monomerin zincirle birleşmesi. 70
Şekil 4.5 Sonlanma aşamasında (radikallerin ortadan kalkma aşaması) iki zincir birbiri ile birleşerek reaksiyonun sonlanması 70
Şekil 4.6 Akrilik asit-vinil pirolidon kopolimeri.....70
Şekil 4.7 Konvensiyonel Yöntem ile P(MVE-MA)-BSA Konjugatlarının Hazırlanış Şeması 74
Şekil 4.8 Mikrodalga Destekli Yöntem ile P(MVE-MA)-BSA Konjugatlarının Hazırlanış Şeması 76
Şekil 4.9 Tiyanil Klorür Varlığında Sentezlenen PAA-Betulin Konjugatlarının Hazırlanış Şeması 78
Şekil 4.10 CDI Çapraz Bağlayıcısı Varlığında Sentezlenen PAA-Betulin Konjugatlarının Hazırlanış Şeması 80
Şekil 4.11 Tiyanil Klorür Varlığında Sentezlenen P(MVE-MA)-Betulin Konjugatlarının Hazırlanış Şeması 82
Şekil 4.12 CDI Çapraz Bağlayıcısı Varlığında Sentezlenen P(MVE-MA)-Betulin Konjugatlarının Hazırlanış Şeması 84
Şekil 4.13 Tiyanül Klorür Varlığında Sentezlenen P(NIPAA-AA)-Estradiol Konjugatlarının Hazırlanış Şeması 86
Şekil 4.14 EDC Varlığında Sentezlenen P(VP-AA)-Progesteron Konjugatlarının Hazırlanış Şeması 89
Şekil 4.15 EDC Varlığında Sentezlenen P(MVE-MA)-Progesteron Konjugatlarının Hazırlanış Şeması 91
Şekil 4.16 EDC Varlığında Sentezlenen Polioksidonyum-Progesteron Konjugatlarının Hazırlanış Şeması 93
Şekil 4.17 Polioksidonyum-Progesteron Kompleksinin Hazırlanış Şeması.....94
Şekil 4.18 BSA – Progesteron Konjugatlarının Hazırlanış Şeması.....96
Şekil 4.19 Polioksidonyum-Peptid Konjugatlarının Hazırlanış Şeması 98
Şekil 4.20 Polioksidonyum-Peptid İkili Komplekslerinin Hazırlanış Şeması 99
Şekil 4.21 Polioksidonyum-Cu-Peptid Üçlü Komplekslerin Hazırlanış Şeması 100
Şekil 4.22 P(NIPAA-AA)-Peptid Konjugatlarının Hazırlanış Şeması 101
Şekil 4.23 P(NIPAA/AA) - Peptid İkili Komplekslerinin Hazırlanış Şeması.....102
Şekil 4.24 Polioksidonyum-Cu-Peptid Üçlü Komplekslerinin Hazırlanış Şeması 103
Şekil 4.25 BSA –Peptid Konjugatlarının Hazırlanış Şeması 105
Şekil 5.1 VP – AA = 2:1 Kopolimeri Sentezine Ait GPC-Refraktif İndeks Kromatogramı 106

Şekil 5.2 VP – AA = 2:1 Kopolimeri Sentezine Ait GPC-Işık Saçılması Kromatogramı .107
Şekil 5.3 VP – AA = 2:1 Kopolimeri Sentezine Ait FTIR Analiz Sonucu.....108
Şekil 5.4 Konvensiyonel metodla gerçekleştirilen EDC varlığında sentezlenen BSA-P(MVE-MA) konjugasyon reaksiyonunun mekanizması 111
Şekil 5.5 Konvensiyonel yöntemle EDC varlığında sentezlenen konjugatlar (CMC) : BSA , P(MVE-MA) ve n BSA /n P(MVE-MA) : 0.25(1), 0.5(2), 1(3), 3(4), 5(5) oranlarında hazırlanmış olan BSA- P(MVE-MA) konjugatlarına ait HPLC kromatogramları.....112
Şekil 5.6 Mikro dalga destekli yöntemle EDC varlığında sentezlenen BSA-P(MVE-MA) konjugatına ait konjugasyon reaksiyonunun mekanizması.....112
Şekil 5.7 Mikrodalga destekli konjugatlar (MWC) : BSA , P(MVE-MA) ve n BSA /n P(MVE-MA) : 0.25(1), 0.5(2), 1(3), 3(4), 5(5) oranlarında hazırlanmış olan BSA- P(MVE-MA) konjugatlarına ait HPLC kromatogramları. 113
Şekil 5.8 Konvensiyonel metodla EDC varlığında sentezlenen n BSA /n P(MVE-MA) : 0.25(1), 0.5(2), 1(3), 3(4), 5(5) oranlarındaki BSA-P(MVE-MA) konjugatlarına ait GPC [UV (a), LS (b)] kromatogramları ve de mikrodalga destekli yöntemle EDC varlığında sentezlenen n BSA /n P(MVE-MA) : 0.25(1), 0.5(2), 1(3), 3(4), 5(5) oranlarındaki BSA-P(MVE-MA) konjugatlarına ait GPC [UV (c), LS (d)] kromatogramları 114
Şekil 5.9 BSA /n P(MVE-MA) : 0.25, 0.5, 1, 3, 5 oranlarında hazırlanmış mikrodalga destekli EDC yöntemine ait (1) ve konvensiyonel EDC yöntemine ait (2) UV alanları.....115
Şekil 5.10 BSA /n P(MVE-MA) : 0.25, 0.5, 1, 3, 5 oranlarında hazırlanmış mikrodalga destekli EDC yöntemine ait (1) ve konvensiyonel EDC yöntemine ait (2) LS (ışığın saçılması) alanları 115
Şekil 5.11 Betulin molekülüne ait FTIR Analiz Sonucu 117
Şekil 5.12 PAA polimerine ait FTIR Analiz Sonucu.....117
Şekil 5.13 SOCl2 yöntemi kullanılarak hazırlanmış PAA-betulin konjugatına ait FTIR spektrumu 118
Şekil 5.14 CDI yöntemi kullanılarak hazırlanmış PAA-betulin konjugatına ait FTIR spektrumu 118
Şekil 5.15 A) betulin biyomolekülüne , B) poliakrilik asid polimerine, C) SOCl2 varlığında sentezlenmiş PAA-Betulin konjugatına , D) CDI varlığında sentezlenmiş PAA-Betulin konjugatına ait FTIR spektrumları 119
Şekil 5.16 Reaksiyonda yan ürün olan imidazole molekülüne ait FTIR sonucu.....123
Şekil 5.17 Kloranhidrin oluşumu 123
Şekil 5.18 PAA'nın botulin ile tiyanül klorür varlığında reaksiyon mekanizması.....124
Şekil 5.19 PAA'nın betulin ile CDI varlığında reaksiyon mekanizması.....126
Şekil 5.20 A) CDI varlığında PAA-Betulin konjugatına ait B) SOCl2 varlığında PAA-Betulin konjugatına ait ve C) PAA polimerine ait GPC - refractive index (kırılma indisi) kromatogramları.....128
Şekil 5.21 A) CDI varlığında sentezlenmiş PAA-Betulin konjugatına ait B) SOCl2 varlığında sentezlenmiş PAA-Betulin konjugatına ait ve C) PAA polimerine ait GPC - light scattering (ışık saçılması) kromatogramları 129
Şekil 5.22 A) CDI varlığında sentezlenmiş PAA-Betulin konjugatına ait B) $SOCl_2$ varlığında sentezlenmişp PAA-Betulin konjugatına ait ve C) PAA polimerine

ait GPC – UV kromatogramları.....129
Şekil 5.23 A) CDI varlığında sentezlenmiş P(MVE-MA)-Betulin konjugatına ait B) SOCl2 varlığında sentezlenmiş P(MVE-MA)-Betulin konjugatına ait ve C) PAA polimerine biyomolekülüne ait GPC - refractive index (kırılma indisi) kromatogramları.....130
Şekil 5.24 A) CDI varlığında sentezlenmiş P(MVE-MA)-Betulin konjugatına ait B) SOCl2 varlığında sentezlenmiş P(MVE-MA)-Betulin konjugatına ait ve C) PAA polimerine ait GPC – UV kromatogramları.....131
Şekil 5.25 A) CDI varlığında sentezlenen P(MVE-MA)-Betulin konjugatına ait B) SOCl2 varlığında sentezlenen P(MVE-MA)-Betulin konjugatına ait ve C) PAA polimerine ait GPC – UV kromatogramları 131
Şekil 5.26 P(MVE-MA) kopolimerine ait FTIR spektrumu 132
Şekil 5.27 CDI varlığında sentezlenmiş P(MVE-MA)-Betulin konjugatına ait FTIR spektrumu 133
Şekil 5.28 A) betulin biyomolekülüne , B) P(MVE-MA) kopolimerine, C) CDI varlığında sentezlenmiş P(MVE-MA)-Betulin konjugatına ait FTIR spektrumlarıdır 134
Şekil 5.29 SOCl2 varlığında sentezlenmiş P(NIPAA-AA)-Estradiol konjugatına ait kırılma indisi (refractive index) kromatogramı 136
Şekil 5.30 SOCl2 varlığında sentezlenmiş P(NIPAA-AA)-Estradiol konjugatına ait ışığın saçılması (light scattering) kromatogramı 137
Şekil 5.31 Betulinin, PAA polimerinin, SOCl2 varlığında sentezlenen PAA-Betulin konjugatının (PAA-Betulin 1.yöntem) , EDC varlığında sentezlenen PAA-Betulin konjugatının (PAA-Betulin 2.yöntem), L929 fibroblast hücrelerinde in vitro sitotoksik etkisi *p < 0.05 kontrol. 139
Şekil 5.32 Betulinin, P(MVE-MA) polimerinin, SOCl2 varlığında sentezlenen P(MVE-MA) -Betulin konjugatının (MMA–Betulin 1. yöntem) , EDC varlığında sentezlenen P(MVE-MA) -Betulin konjugatının (MMA–Betulin 2. yöntem), L929 fibroblast hücrelerinde in vitro sitotoksik etkisi. *p < 0.05 control. ..140
Şekil 5.33 Estradiolün, P(NIPAA-AA) kopolimerinin, SOCl2 varlığında sentezlenen P(NIPAA-AA) – estradiol konjugatının L929 fibroblast hücrelerinde in vitro sitotoksik etkisi. 141
Şekil 5.34 Progesteron – NHNH2'nin Hidrazon Reaksiyon Mekanizması 142
Şekil 5.35 Progesteron=N-NH_2 moleküllerine ait FTIR spektrumu.....142
Şekil 5.36 P(VP-AA)-Progesteron Konjugasyon Mekanizması.....143
Şekil 5.37 EDC varlığında sentezlenen P(VP-AA)-Progesteron konjugatına ait GPC – UV kromatogramı.....144
Şekil 5.38 EDC varlığında sentezlenen P(VP-AA)-Progesteron konjugatına ait GPC – LC kromatogramı.....145
Şekil 5.39 P(MVE-MA)-Progesteron Konjugasyon Mekanizması 146
Şekil 5.40 EDC varlığında sentezlenen P(MVE-MA)-Progesteron konjugatına ait GPC – UV kromatogramı.....146
Şekil 5.41 EDC varlığında sentezlenen P(MVE-MA)-Progesteron konjugatına ait GPC –RI (kırılma indisi) kromatogramı.....147
Şekil 5.42 EDC varlığında sentezlenen P(MVE-MA)-Progesteron konjugatına ait GPC –LS (kırılma indisi) kromatogramı 147
Şekil 5.43 Gen Script Firması tarafından sentezlenmiş MAGE (121-134) peptid

dizesine ait HPLC kromatogramı.....149
Şekil 5.44 Gen Script Firması tarafından sentezlenmiş MAGE (121-134) peptid dizesine ait Kütle Spektrumu.....150
Şekil 5.45 Polioksidonyum – peptid konjugasyon mekanizması.....150
Şekil 5.46 EDC varlığında sentezlenen Polioksidonyum - Progesteron konjugatı ve Polioksidonyum -Progesteron ikili kompleks yapısına ait GPC – UV kromatogramı.....151
Şekil 5.47 EDC varlığında sentezlenen Polioksidonyum - Progesteron konjugatı ve Polioksidonyum -Progesteron ikili kompleks yapısına ait GPC – LS kromatogramı.....151
Şekil 5.48 EDC varlığında sentezlenen Polioksidonyum - Progesteron konjugatı ve Polioksidonyum -Progesteron ikili kompleks yapısına ait GPC – RI kromatogramı.....152
Şekil 5.49 EDC varlığında sentezlenen Polioksidonyum - Progesteron konjugatına ait ve Polioksidonyum -Progesteron ikili kompleks yapısına ait 'yakından görünümlü' GPC – RI kromatogramı.....152
Şekil 5.50 BSA-Peptid konjugatına ait GPC-viscotec analizine ait ışığın kırılması (LS) kromatogramı.....155
Şekil 5.51 BSA-Peptid konjugatına ait GPC-viscotec analizine ait ışığın saçılması (LS) kromatogramı.....155
Şekil 5.52 BSA-Peptid konjugatına ait GPC-viscotec analizine ait ışığın kırılması (RI) kromatogramı.....156
Şekil 5.53 Balb/c fare.....157
Şekil 5.54 Peritondan örnek enjeksiyonu.....157
Şekil 5.55 Çizelge 5.12'daki 1,2,3,5,6,7 ve 17 numaralı gruplardaki balb/c farelerinden 49 gün boyunca 7 gün aralıklarla alınan serumlarında ELISA yöntemiyle tayin edilen antikor miktarlarının karşılaştırılması.....163
Şekil 5.56 Çizelge 5.12'daki 5,6,8,9,10,11 ve 17 numaralı gruplardaki balb/c farelerinden 49 gün boyunca 7 gün aralıklarla alınan serumlarında ELISA yöntemiyle tayin edilen antikor miktarlarının karşılaştırılması.....165
Şekil 5.57 Çizelge 5.12'daki 7,12,13,15,16 ve 17 numaralı gruplardaki balb/c farelerinden 49 gün boyunca 7 gün aralıklarla alınan serumlarında ELISA yöntemiyle tayin edilen antikor miktarlarının karşılaştırılması.....166

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 Serbest BGG, tüberkülozun protein türevi (PPD) ve bunların PVP (R2, R16) kompleksleriyle immünize edilmiş farelerin dalağındaki antikor oluşturan hücrelerin (AOH) miktarı. 19
Çizelge 2.2 Ovalbumine (OA) karşı olan Ig-E'nin miktarı (Fareler OA ve OA' nın PEK si ile immünize edilmişler) 20
Çizelge 2.3 Normal ve timusu olmayan farelere SA, GG ve bunların kuaternleşmiş poli (4-vinil-piridin) ile kompleksleri verildiğinde oluşan immünolojik aktiflik.. 20
Çizelge 2.4 Farelerde ikinci immünizasyondan sonra serum albumine karşı oluşan immün cevap 21
Çizelge 2.5 Farelerde proteine spesifik olan ikinci immün cevap 22
Çizelge 2.6 Konjugasyon reaksiyonlarında polielektrolitlerin, aminoasitlerin, peptidlerin, triterpenlerin sahip olduğu fonksiyonel gruplar ve bunların aralarında oluşan bağlara ait çizelge 23
Çizelge 2.7 Biyomonomerlerine göre biyomoleküller.....34
Çizelge 3.1 Elisa Protokolleri.....57
Çizelge 4.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler 66
Çizelge 5.1 VP – AA = 2:1 Kopolimeri Sentezine Ait GPC ile Molekül Ağırlığı Tayini Sonuçları 108
Çizelge 5.2 Polivinilpirolidon (PVP) FTIR Analiz Sonuçları. 109
Çizelge 5.3 Poliakrilik asit (PAA) FTIR Analiz Sonuçları. 109
Çizelge 5.4 Poli(N-vinilpirolidon-akrilik asit) (P(VP-AA)) FTIR Analiz Sonuçları. 109
Çizelge 5.5 Betuline ait FTIR sonuçları 119
Çizelge 5.6 PAA ait FTIR sonuçları 120
Çizelge 5.7 Yöntem 1 ($SOCl_2$ yöntemi)'ne ait FTIR sonuçları 121
Çizelge 5.8 Yöntem 2 (CDI yöntemi)'ne ait FTIR sonuçları 122
Çizelge 5.9 P(MVE-MA) kopolimerine ait FTIR spektrumu analiz sonuçları.....133
Çizelge 5.10 CDI varlığında sentezlenmiş P(MVE-MA)-Betulin konjugatına ait FTIR spektrum analiz sonuçları.....134
Çizelge 5.11 MAGE (121-134) dizesine ait HPLC sonuçları 149
Çizelge 5.12 Kompleks ve biyokonjugatların enjekte edildiği balb/c türü fare grupları ve enjekte edilen aşı örneklerinin içeriği.....158

ÖZET

BİYOMOLEKÜL İÇEREN POLİELEKTROLİT KONJUGATLARI

Sevecen TUĞLU

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Yard. Doç. Dr. Zeynep AKDESTE

Polielektrolit özellikteki farklı sentetik polimerlerin biyomoleküller ile etkileşimleri biyolojik açıdan önemli mekanizmaların varlığını ortaya koymakta ve biyomedikal uygulamalar için büyük önem taşımaktadır. Polielektrolit - biyomolekül konjugatları yeni tip sentetik polimerik aşı sistemlerinin geliştirilmesinde, biyomolekülün kararlılığının arttırılmasında, organ, doku, hücre ve reseptör hedeflemelerinin gerçekleştirilmesinde, biyopolimre ait çözünürlük gibi kimi sorunlarının giderilmesi ve canlıda uzun sürede salınımının sağlanmasında, biyouyumluluğunun arttırılmasında, tanı teşhis kitlerinin hazırlanmasında, biyosensör sistemlerinin geliştirilmesinde önemli ve öncü sistematik yapıları teşkil etmektedirler.

Bu yönde yapılan çalışmlarımızda sentetik polielektrolitlerin (poliakrilikasid, polioksidonyum gibi polimerler ve polimetilvinileter-ko-maleikanhidrid, poli(vinilpirolidon-ko-akrilikasid), poli(asetikasid-ko-*N-izopropilakrilamid) gibi kopolimerler)* özellikle antikanser özelliği bilinen betulin , steroid yapıdaki hormonlardan estradiol ve progestron, melanoma kanser peptidlerinden MAGE-3(121-134) peptid dizesi ve BSA gibi biyomoleküller ile farklı yöntemler ve çapraz bağlayıcılar (EDC, CDI, vb.) kullanılarak gerçekleştirilen konjugasyon reaksiyonları ile sentezlenen konjugatların ve hazırlanan komplekslerin kimilerinde yapı işlev analizleri, sitotoksisite testleri, antioksidan özelliklerinin incelenmesi kimilerinde ise immünolojik hayvan deneyleri gerçekleştirildi.

Bu sayede daha etkin, kararlı, hücre yönlendirmesi yapılabilen diagnostikler elde edilmesi amaçlanmakta, teşhis kitlerinde ve tedavi yöntemlerinde kullanılmasına yönelik ön çalışmaların yapılması hedeflenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Biyomolekül, polielektrolit, biyopolimer, konjugasyon reaksiyonları, biyomolekül-polielektrolit kompleksleri

ABSTRACT

BIOMOLECULE-POLYELECTROLYTE CONJUGATES

Sevecen TUĞLU

Department of Bioengineering

MSc. Thesis

Advisor: Assist. Prof. Dr. Zeynep AKDESTE

Interaction of biomolecules with different synthetic polymers, which has polyelectrolyte characteristic, reveals biologically the existence of important mechanisms and it has a great importance for biomedical practice. Polyelectrolyte - biomolecule conjugates comprise as an important and lead systematic structures in developing of the new types of synthetic polymeric vaccine systems, increasing the stability of biomolecule, realizing to organ, tissue, cell, and receptor targeting, overcoming some problems, such as resolution of biopolymer and the provision of long-period oscillation creature, increasing biocompatibility, preparing diagnosis and diagnostic kits and developing biosensor systems.

In our laboratory work, some of conjugates are synthesized with performed conjugation reactions using different methods and cross linkers (EDC, CDI, etc.) and some of complexes were prepared with synthetic polyelectrolytes (polymers like polyacrylic acid, polioksidonyum and copolymers like poly methylvinylether, co-maleic anhydride, poly(vinyl pyrrolidone, co acrylic acid), poly (N isopropyl acrylamide co asetikasid)) and biomolecules like betulin which is known its anticancer effect, estradiol and progesterone which are steroid hormones, MAGE-3 (121-134) peptide

line which is melanoma cancer spesific peptide and BSA. In some of conjugates and complexes antioxidation and cytotoxicity tests, analysis of the structure function and in some of them immunological animal experiments were realized.

In this way, obtaining more efficient, stable, cell orientation can be done diagnostics is intended and preliminary studies in order to use identification kits and methods of treatment are targeted.

Key words: Biomolecule, polyelectrolytes, biopolymers, conjugation reactions, biomolecule-polyelectrolyte complexes.

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Polilektrolitlerin protein, peptid ve diğer biyomoleküllere konjugasyonu tıp, eczacılık ve biyomühendislik alanlarında uygulamalar için çeşitli yenilikler gtirmektedir. Kontrollü ilaç salınımı, doku mühendisliği ve hücre üretimi gibi fonksiyonel uygulamalarda katı hal (suda çözünmeyen) polimerik sistemlerin yanısıra suda çözünebilen polimer-biyomolekül konjugatları son zamanlarda polimerik yapay aşı sistemlerinin, tanı kitlerinin, biyosensörlerin oluşturulmasında, enzim stabilitesinin düzenlenmsinde, DNA'nın hücre içi transferinde ve antijenin immünojnliğinin arttırılması için protein modifikasyonlarında kullanılmaktadır. Biyomolekül-polielektrolit konjugatlarının incelenmesi, gerek canlı organizmadaki davranışlarının anlaşılmasında gerekse de biyokonjugasyon teknolojisinin geliştirilmesi için büyük önem taşımaktadır. Ayrıca biyomoleküllerin biyolojik sistemde daha kararlı ve daha uzun süre kalabilmelerini sağlamak amacı ile ve polimerlerin bilinen adjuvan (aşının bağışıklık kazandırma potansiyelini artıran madde) etkisi için haptenlere, peptidlere, proteinlere, polisakkaritlere, nükleik asit ve hücre tipli (eritrosit gibi) tüm antijenlere bu moleküllerin immünojenliklerini arttırmak amacıyla konjugat sentezleri yapılmaktadır.

1.2 Tezin Amacı

Polielektrolit-biyomolekül konjugat sentezleri farklı reaktanlar varlığında ve farklı şartlar altında sentezlenerek çalışmalar türevlendirilmekte böylece hem daha etkin konjugat eldelerinin sentezi için çalışılırken hem de optimum reaksiyon koşulları aranmakta ve geliştirilmektedir. Bu amaçla tezde polimetilvinileter-ko-maleikanhidrid

kopolimeri ile BSA molekülünün konjugasyonu hem geleneksel (konvensiyonel metod) hem de mikrodalga şartları altında sentezlenmiştir. Benzer şekilde mikrodalga enerjisinin non termal dipolar polarizasyon etkisi sayesinde gelcekte diğer konjugasyon reaksiyonlarının da denenmesi böylece daha etkin daha çevre dostu ve daha kısa sürede yüksek verimli konjugatlar elde edilmesi amaçlanmaktadır.İmmunomodulator, antibakteriyel, antitümör, antimalaryal, antiinflamatuar etki gibi pek çok biyolojik aktiviteye sahip olduğu bilinen betulin molekülünün suda çözünürlüğü oldukça düşüktür. Hem çözünürlüğünün arttırılması, hem toksisitsinin azaltılması hem de ilaç taşıma sistemlerinde, arttırılmış immünomodülatör özelliklerinin geliştirilmesinde ve de antikanser özelliğinin geliştirilebilmesi için hedeflemenin yapılabilmesinde önemli çalışmalara ışık tutabilecek olan betulinin farklı yöntemler ile polielektrolitlere konjugatlarının sentezlenmesi üzerine çalışmalar bu tez kapsamında incelenmiştir.

Steroid yapısındaki hormonların en iyi bilinenlerinden estradiol ve progesteron molekülleri, gerek yapı işlev analizlerinin incelenmesi, gerek sitotoksisite değişimlerinin belirlenmesi gerekse immünolojik antikor yanıtlarının incelenmesi amacıyla farklı yöntemler kullanılarak polielektrolitlerle konjugatları sentezlenmiş ve kompleksleri hazırlanmıştır.

Polielektrolit-biyomolekül konjugatlarının yeni tip sentetik polimerik aşı sistemlerinin geliştirilmesinde önemi çok büyüktür. Biyoteknolojik yöntemle hazırlanan aşıların avantajları oldukça fazladır. Şöyle ki, aşı içinde mikroorganizmanın genomunun sadece küçük bir sekansı bulunur, tümü değil. Bu nedenle infeksiyon oluşturmaz. Bu sekans vücutta sadece bağışıklığı uyaran proteini (antijeni) kodlayan bir gen olduğundan, diğer yabancı ve zararlı proteinlerin sentezini spesifiye eden ve konakçıya zarar veren genleri de taşımamaktadır. Muhafazası kolaydır ve uzun süre saklanabilir. Ancak, biyoteknolojik aşıların bir kısmı hapten karakteri taşıdığından uygun ve özel adjuvantlarla birlikte vücuda verilmesi gerekmektedir. Bu tip sistemlerde immün cevabı artırabilmek, antijenin depo sürecinde ve enjeksiyon sonrasında korunabilmesi, antijenin uygun teslimi ve yan reaksiyonlarının minimuma indirilmesi için özel adjuvanları önemli bir bileşen olarak içerikte uygun yöntemle ihtiva etmesi şeklinde tanımlanabilir. Adjuvanlar antijene karşı immün cevabı arttırabilen ajanlar olarak tarif edilebilmektedirler. 70'li yılların başlarında immünolog ve kimyacıların ortak

çalışmaları ile bazı polielektrolitlerin bağışıklık yanıtına kuvvetli etkisi aydınlatılmış ve yapay polielektrolitlerin bu gibi amaçlar için daha uygun olduğu belirlenmiştir. Çünkü bu polielektrolitlerin sentezi ve modifikasyonu daha kolaydır, istenen molekül ağırlığında, elektrik yükünde, konformasyonda veya yüksek moleküler yapıda elde etmek olasıdır. Suda iyi çözünürler ve bilinen yapılarda çeşitli kompolimerlerini sentezlemek mümkündür. Klasik adjuvanlara alternatif olarak daha etkin immün ve koruma yanıtlarının alındığı polimerik adjuvanların kullanılması son yıllarda aşı sistemlerinin etkinliğinin geliştirilmesi açısından dikkat çekmekte ve kullanımı genişlemektedir.

Son yıllarda kanser aşılarının geliştirilmesine yönelik çalışmalar hızla artmaktadır. Kanserle savaşmada immun sistemi uyarmak ise çok eksiden beri üzerine çalışılan bir yaklaşımdır. MAGE A, B, C (yada 1, 2, 3) kodlanmış antijenler doğrudan tümör spesifiktirler ve kanser immünoterapisi için özellikle önemli olduğu belirlenmiştir. Bu tez tümör antijenlerinden olan MAGE-3 (121-134) polipeptid epitoplarını içeren, peptid ve sentetik polimerlerin kimyasal ve fiziksel kuvvetli etkileşimleri ile oluşturulan biyopolimer sistemler yardımıyla zayıf immunojen özellikteki peptidlerin immun özelliğini arttırmak için yeni bir yaklaşım çalışmasını da kapsamaktadır.

1.3 Hipotez

Sentetik tümör peptidlerinin farklı polielektrolitler ile biyokonjugatları sentezlenerek, ikili kompleksleri ve polimer-metal-peptid üçlü kompleksleri de hazırlanarak hayvan deneylerinde kullanılmasıyla peptidlerin immunojenik özellikleri çarpıcı bir şekilde arttırıldığı ve bu çalışma sayesinde de bir yandan gerçekleştirilen yüksek spesifiklikteki monoklonal antikorların oluşturulmasına olanak sağlanmış oldu. Böylece sentezlenen kompleks ve hazırlanan konjugatlar sayesinde melanoma kanser tipine karşı sentetik polimerik yapay aşı sistemi geliştirilmesi için önemli bulgular ortaya konabilirken bir yandan da daha sonraki çalışmalarda tanı ve teşhis kitlerinin ve biyosensörlerin tasarlanması için imkan sağlayacaktır.

Bu çalışma nitelik olarak ülkemizin hedeflediği ileri teknolojiye uyum sağlayacak polimer ve protein teknolojisi birlikteliğinde, ileri biyoteknolojik malzemelerin üretilmesine zemin hazırlayacaktır. Bu nedenle sunulan tez çalışması, temel bilimler

uygulamalı araştırma alanlarını kapsayan disiplinler arası nitelikte geniş spektrumlu bir çalışmadır[1], [2], [3], [4],[5], [6], [7].

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1 Biyopolimerler ve Polielektrolitler

Polimerler, çok sayıda molekülün (monomerin) kimyasal bağlarla düzenli bir şekilde bağlanarak oluşturdukları yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Bir polimere biyopolimer ya da biyomedikal polimer denebilmesi için biyouyumluluk, uygun biyobozunurluk ve uygun parçalanma hızı gibi bazı özellikleri taşımaları gerekmektedir.

Biyopolimer terimi, çeşitli maddeleri tanımlamada kullanılabilir.

Genelde biyopolimerler iki kategoriye ayrılabilir:

Mikroorganizmalar, hayvanlar ve bitkiler gibi biyolojik sistemlerde üretilenler,

Aminoasitler, sekerler, doğal yağlar gibi bir biyolojik başlatıcı madde kullanılarak kimyasal yolla sentezlenenler.

Kaynağına göre biyopolimerleri sentetik biyopolimerler ve doğal biyopolimerler olarak ikiye ayırabiliriz. Doğal biyopolimerlere örnek olarak vücuttaki proteinleri gösterebiliriz ve en iyi bilinen doğal biyopolimer DNA ve doğada kendiliğinden sentezlenen selülozdur. Doğal biyopolimerlerde monomerlerin bağlanması 1 mol H_2O çıkışıyla oluşan peptid bağı sayesinde meydana gelir. Sentetik polimerler ise katılma yada kandenzasyon reaksiyonlarından uygun olan bir tanesi ile gerçekleştirilir.. Örneğin, DNA'nın 2. zincirinin birleşip sarmalı oluşturması gibi biyolojik moleküllerde kendiliğinden toparlanma çok daha sık meydana gelir, lakin sentetik biyopolimerlerde kendiliğinden toparlanma çok zor gerçekleşir. Doğal biyopolimerler hatasız ve her

seferinde aynı monomerin olması gerektiği yerde sentezlenmesi ile devam eder, böylece molekül ağırlığı ve uzunluğu sabit kalmaktadır ve polidispersitesi 1 dir. Fakat sentetik biyopolimerlerin molekül ağırlıkları belirli bir aralıkta sentezlenir, molekül zincirlerinin uzunlukları da belirli bir aralıkta değişim göstermektedir. Dolayısıyla polidispersitesi 1'den farklıdır.

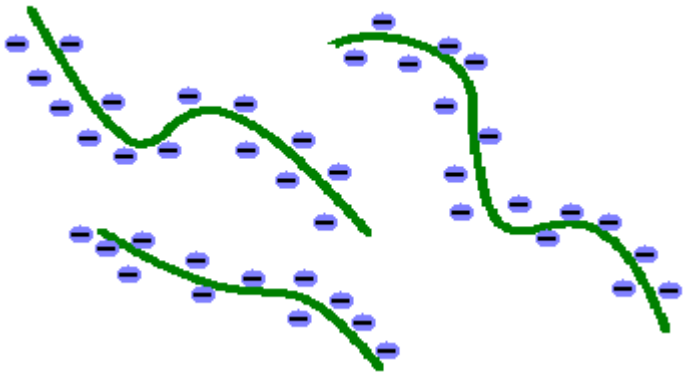
Polielektrolitler ise yapısında tekrarlanan üniteler olarak iyonize olabilen grupları taşıyan uzun biyopolimer zincirleridir. Zincirde bulunan merkezlerinin hepsinin anyonik, ya da katyonik veya ikisinin karısımı olmasına bağlı olarak, homopolielektrolitler **(**polianyonlar, polikatyonlar**)** ve poliamfalitler olarak adlandırılabilirler. Polielektrolitler suda çözündüklerinde, polimerin yüzeyindeki iyonize olabilen gruplar ile çözeltideki küçük iyonlar arasında elektriksel etkileşimler meydana gelir ve buna bağlı olarak makromolekülün yapısında değişimler gözlemlenir.

Prensipte, herhangi bir kimyasal yapının polimer zincirine yeterli sayıda iyonik grup kovalent olarak bağlanıp yapı uygun bir pH'da suda çözünür hale getirilerek bir polielektrolit elde edilebilir. Polielektrolitler genelde katılma veya kondenzasyon polimerleşme reaksiyonlarıyla elde edilebilir. Ayrıca polielektrolit yapıdaki pektin gibi anyonik polisakkaritler doğadan edinilebilir. Polipeptidler, proteinler, DNA gibi çoğu biyolojik molekül polielektrolit formundadır. Nişasta ve selüloz gibi noniyonik doğal polimerler kimyasal modifikasyonla polielektrolite dönüştürülebilir. Polifosfatlar ve polisilikatlar da inorganik polielektrolitler olarak sayılabilir[1].

Homopolielektrolitler**;** tüm monomerlerinde aynı işaretli yüklere sahip polielektrolitlere homopolielektrolitler adı verilmektedir. Polielektrolitlerin özellikleri bir yandan elektrolitlere (tuzlar) benzerken bir yandan da polimerlere benzemektedir ve polituzlar olarak da adlandırılmaktadırlar[2].

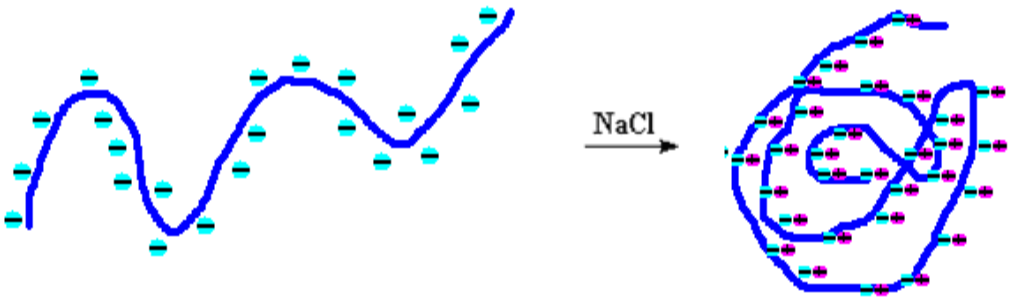
Zincirdeki gruplar kısmi olarak iyonlaşabiliyorsa, titre edilebilirler ve buna bağlı olarak polimerin yükü artış yada azalma gösterebilir. Bir homopolielektrolit seyreltildiğinde, özellikle ortama eklenmiş düşük molekül ağırlıklı tuzların yokluğunda, yüklü gruplardaki yüklü iyonların, kendi aralarında daha kuvvetli bir etkileşime girmek üzere, zincirdeki polimerin yüklü bölgelerinden uzaklaştığı gözlenir Bu durum, makromolekülün

konformasyonunun değişerek daha açık bir hal almasına yol açar ve sistemin viskozitesinin değişmesine sebep olur [3].



Şekil 2.1 Bir polianyonun tuz içermeyen çözeltideki durumları

Bu yapıdaki polielektrolit molekülleri, çözeltide toparlanmış hallerine göre daha çok yer kaplarlar. Dolayısıyla da, çözeltide akmaya karsı gösterdikleri direnç daha fazladır ve çözelti yoğun ve viskoz bir hal alır. Ortamda tuz olduğunda, polielektrolitler sulu ortamdaki formlarından farklı bir hal alırlar. Sulu ortamda Na^+ and Cl^- iyonlarına ayrılan NaCl tuzu, poliakrilik asid gibi negatif yüklü polielektrolitlerle etkileşime girer. Na^+ iyonları, polimer zinciri üzerindeki negatif yüklerle etkileşir ve bu durum onun konformasyonunda ve viskozitesinde bazı değişimlere neden olur[8].



Şekil 2.2 Tuz içeren ortamda polielektrolitlerin konformasyonundaki degisim

Homopolielektrolit zinciri boyunca uzanan bitişik anyonik ve katyonik yükler arasındaki ortalama mesafe, polielektrolitin yük yoğunluğunu veren bir parametredir. Bu ortalama yük yoğunluğunun yanında zincir boyunca uzanan iyonik grupların dağılımı da polielektrolit özelliklerini önemli ölçüde etkileyebilmektedir, örneğin çözünebilirlik. Bir

kural olarak, eğer bir kopolimerde her on monomerik birimin birden fazla iyonik kısmı varsa tipik polielektrolit davranışı beklenir. Asit-baz kuvveti ve yük yoğunluğuna ek olarak, polielektrolit özelliklerinin saptanmasında, makro iyonun molekül geometrisinde yüklü kısımların yerleşimi bir diğer önemli noktadır. Yüklü grupların geometrik yeri özellikle polianyon-polikatyon komplekslerinin oluşumu ile ilgilidir[2].

Poliamfolitler; katyonik ve anyonik grupların her ikisini bulunduran polielektrolitlerdir. Homopolielektrolitlerin aksine, poliamfolitlerin yapı-özellik ilişkisi anyonik ve katyonik monomer birimleri arasındaki elektrostatik çekme kuvvetleri tarafından yönlendirilmektedir. Anyonik veya katyonik gruplar yeteri kadar fazla olduğunda (≥% 10-15 mol), yüklü grupların itme gücü, polielektrolitlerin tipik davranışlarında olduğu gibi zincir konformasyonunda gerilmelere neden olur. Anyonik ve katyonik grupların molar oranı birbirine yaklaşmaya başladıkça elektrostatik etkileşimler globular konformasyona neden olurlar ve birçok durumda deiyonize suda çözünmezler. Elektrolit eklenmesiyle ya da pH'nın değiştirilmesiyle düzensiz bir yumak konformasyonu gözlemlenebilir ve çözünmesi kolaylaştırılabilir. Bu davranış çoğunlukla "antipolielektrolit etkisi" olarak adlandırılmaktadır ve elektrolitlerin varlığında viskozitede bir artışa neden olmaktadır [2], [9].

2.2 Lineer Polimer Özellikteki Taşıyıcı Moleküller

Zayıf immünojenik özellikteki sentetik peptidler,haptenler ve diğer biyolojik aktiviteye sahip biyomoleküller antikor oluşturmak için yeterli büyüklükteki moleküler boyutlara sahip olmadıklarından, bu moleküllere karşı antikor üretiminde immünojenligi arttırmak için biyomoleküller, proteinlerin yanı sıra lineer özellikteki polimerlere de bağlanabilmektedir. Poliakrilikasid (PAA), Poli N-isopropilakrilamid (NIPAA), PoliNvinilprolidon (VP), Polivinilpiridin-Polisetilpiridin kopolimeri ve Polivinilpirilidon-Poliakrilikasid (VP-AA) kopolimerleri vb. genel olarak kullanılan lineer taşıyıcılardır ve peptidler bu tür taşıyıcılara kararlı kovalent bağlarla bağlanırlar[10].

Konjugasyon bölgesi proteinlerde olduğu gibi peptid dizilimine bağlı olarak; dizinin N-ucu, C- ucu ya da içerisindeki bir nokta olabilir. Konjugasyon noktası karboksil (-COOH), amino (-NH2) ya da sülfidril (-SH) uçları olabilir. Aşı olarak kullanıldığında önemli bir etki oluşturan sentetik peptidler, haptenler vb. moleküller spesifik antikor oluşturmak

için günümüzde oldukça yaygın kullanılmaktadırlar. Ancak tedavi edici ajanların ve sentetik peptidlerin ya da haptenlerin; düşük çözünürlüğü, kararsızlığı, küçük molekül boyutlarından dolayı antijenik özelliklerinin düşük olması, biyouyumlu ve spesifik olmayışı ya da sitematik toksisitesi gibi istenmeyen özellikleri onların etki yeteneklerini oldukça azaltmıştır. Ancak proteinlerin, antijenlerin ya da ilaç etken maddelerinin suda çözünebilir polimerler ile konjugatlarının oluşturulması, tedavi edici ajanların özelliklerini ve immünojenligini önemli ölçüde değiştirmektedir. Antijenik peptidlerin suda çözünebilir polimere bağlanması çok yönlü etkilere sahiptir.

Bunlardan bazıları;

• Peptidlerin modifikasyonu saglamak,

• Hidrofobik özellikte olanların suda çözünebilirligini arttırmak,

• Bölgesel etkilerini yükseltmek,

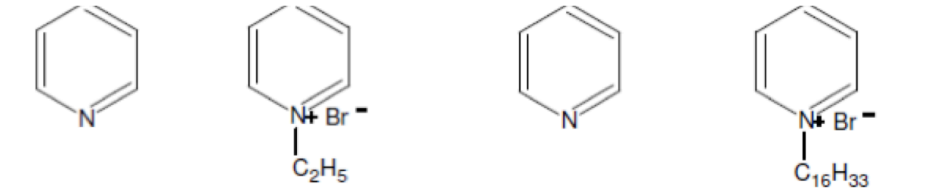
• İmmünojenik etkilerini ve immünoreaktiflliklerini arttırmak ve

• Canlı organizmada daha uzun süre etkili olmasını saglamaktır [11], [12]

Polimerik konjugatların bu eşsiz özellikleri tedavi edici etkilerini de arttırmaktadır. Böylece klasik adjuvantlara en iyi alternatiflerden bir tanesi olarak da pozitif ya da negatif olarak yüklü, immünolojik olmayan sentetik polielektrolit polimerlerin kullanımıdır[4].

Polimerik taşıyıcı olarak kullanılan bazı polielektrolitlerin genel gösterimi aşağıda verilmiştir[13].

Katyonik Polielektrolitler

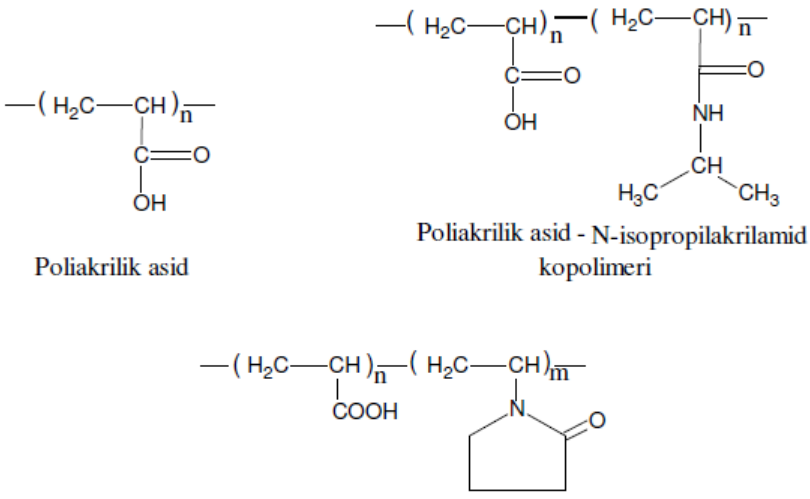


4-vinilpiridin ve 4-vinil-N-etilpiridin kopolimeri

4-vinilpiridin ve 4-vinil-N-setilpiridin kopolimerleri

Şekil 2.3 Taşıyıcı polimer olarak yaygın kullanılan katyonik polielektrolitler

Anyonik Polielektrolitler



Poliakrilik asid

Poliakrilik asid - N-isopropilakrilamid kopolimeri

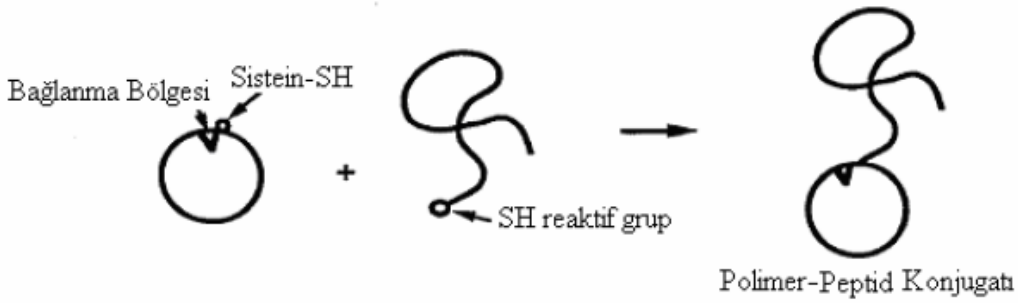
Poliakrilikasid - N-vinilpirolidon kopolimeri

Şekil 2.4 Taşıyıcı polimer olarak yaygın kullanılan anyonik polielektrolitler

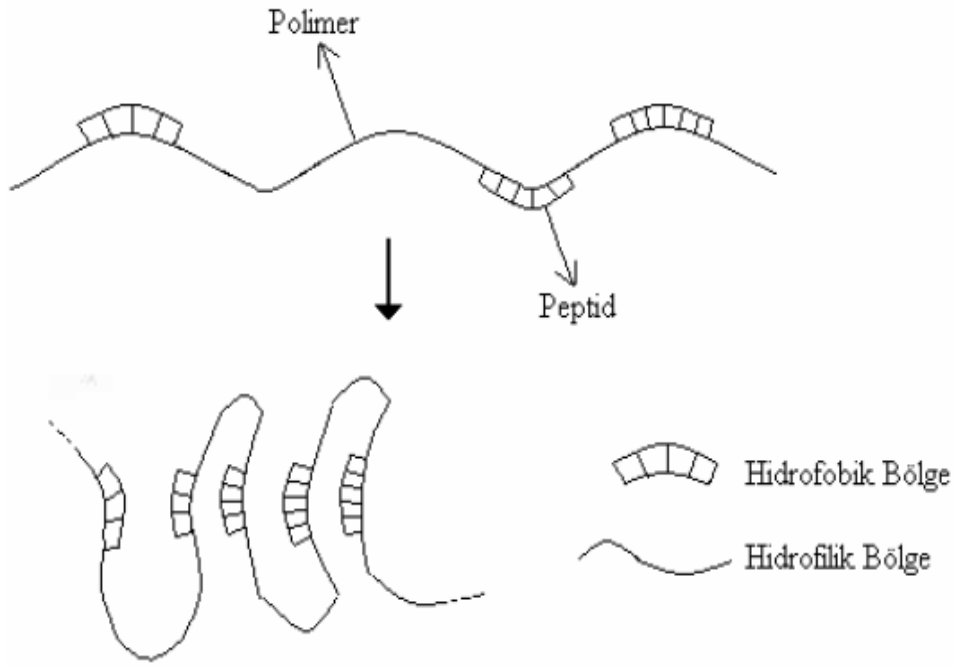
Polielektrolitler, sentetik peptidler ile konjugatlarının güçlü koruma özelliklerinden dolayı yeni nesil aşı bileşenleri olarak düşünülmektedir [11], [12].

Mustafaev ve arkadaşları tarafından geleneksel metodlar kullanılarak, sudaki makromoleküllerin aktive edilmiş fonksiyonel grupları arasında gerçekleşen reaksiyonlar ile protein-lineer polielektrolit, peptid-lineer polielektrolit kovalent konjugatları sentezlenmistir. Karbodiimid aktivasyonu ile gerçeklestirilen iki basamaklı kovalent konjugasyon reaksiyonu; polimerin karboksil gruplarının karbodiimid ile aktive

edilmesi ve sonrasında karboksil grupları ile proteinin ya da peptidin amino grupları arasında kondenzasyon reaksiyonun oluşumu ile gerçekleşir. Birinci basamak süresince karboksil grubunun karbodiimide saldırması ile O-açilisoüre ara ürünü oluşmaktadır. Daha sonrasında kararsız olan bu ara ürüne peptid ya da proteindeki amino gruplarının saldırmasıyla polimer ile peptid veya protein arasında çapraz bağlanma gerçekleşmektedir.



Şekil 2.5 Sistein içeren peptidin polimerle olusturdugu konjugatın sematik gösterimi[10]



Şekil 2.6 Kısa zincirli peptid moleküllerinin lineer ve uzun zincirli polimerler ile olusturdukları konjugatların sematik gösterimi [4], [15]

Yukarıda anlatıldığı gibi karbodiimid kullanılarak peptidlerin tasıyıcı polimerlerle kovalent konjugasyonu sonucu sentezlenen konjugatların yüksek immünolojik özelliğe sahip oldugu Mustafaev ve arkadasları tarafından yapılan çalışmalarla gösterilmiştir ve

konjugatın yüksek immünolojik özelliğinin polimerin adjuvant etkisine bağlı olduğu düşünülmektedir[15],[16].

Poliakrilik asitler (PAAs) birçok ticari isim halinde (karbopol, karbomer, vb.) karşımıza çıkmasının yanı sıra kozmetik, ev ürünleri ve farmasotik preparatlarda da kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak PAA'lar veteriner uygulamalarda kullanılan aşılarda yardımcı olarak görev yapmaktadır. PAA'nın tavuklarda aktif olmayan New Castle virüsüne karşı immün yanıtı arttırdığı görülmüştür. PAA'nın yardımcı rolü uzun yıllar önce tarif edilmiş olmasına karşın araştırmacılar tarafından yakın bir zamanda kabul görmüştür. Bunun yanı sıra proteinlerin PAA'ya kovalent olarak bağlanması antijenlerin immünojenliğini arttırır. PAA'nın karboksil grubu oktanol ve bütanol ile esterleşme reaksiyonu vererek PAA-alkil esterlerini meydana getirirler. Buna benzer çalışmaları da yürüten Hilgers ve arkadaşları PAA-alkil esterlerini tavuklar üzerinde uygulayarak bu yardımcılar (adjuvant) sayesinde oluşan ikinci immün cevabı ölçmüşlerdir. Günümüzde PAA alkil esterlerinin kümes hayvanları aşılarında kullanılan W/O yardımcılarına alternatif olarak gösterilebileceği ileri sürülmektedir[17]. Polielektrolitler medikal ve veteriner uygulamalarda pratikte aşı olarak tanıtılmadan önce çözülmesi gereken bazı problemler vardır. Bu gibi çalışmalarda en önemlisi seçilen PE‟nin toksik olmaması, biyo-bozunur olması ve düşük molekül ağırlığına sahip olması gerekir. Toksisite incelendiğinde PAA toksik olmasına rağmen, gerçekte polimer taşıyıcıları toksik değildirler. Hatta PAA zincirine, NIPAAm ünitelerinin katılması bu gibi PE‟ lerin toksisitelerini azaltmaktadır [18].

Homopolimerler yanı sıra sentetik polimerik aşı sistemlerinde kopolimerlerin etkisi de ayrıca incelenmiştir. Adjuvanların kullanımı özellikle yaşlı nüfusta grip aşısının immünojenitesi ve etkinliğinin artırılması için bir de farklı bir yaklaşım olmuştur. Bir noniyonik blok kopolimer olan Polyoxipropylen-polyoxiethilen blok kopolimeri (CRL1005 - $(C_3H_6O•C_2H_4O)_x$) adjuvanı varlığında veya yokluğunda, subkutan olarak , formalin ile inaktive edilmiş sağlam tam grip virüsü aşısı için BALB / c farelerinin immün tepkisi değerlendirilmiştir. Genç farelerde, kopolimer adjuvan önemli ölçüde virüse özel IgG ve hemaglüsinasyon-inhibisyon (HI) antikor tepkisini arttırmıştır. 2.5 mg kopolimer ile formüle edilmiş grip aşısı, üst ve alt solunum yollarında önemli ölçüde gelişmiş koruyucu etkinlik gösterdiği belirtilmiştir. Daha önce grip virüsü ile enfekte

olmuş veya yaşlı farelerde, büyük ölçüde tek başına kopolimer adjuvan ile birlikte uygulanan inaktive aşı enjeksiyonlarından sonra canlı virüs ile enfekte edildiklerinde inaktive influenza aşısı sayesinde önemli oranda serum HI antikor yanıtı için düşük akciğer virüs titresi geliştiği gözlenmiştir. Bu sonuçlar, grip aşısında kopolimer adjuvanın insanlarda kullanımı için potansiyel bir adjuvan olarak yer alabileceğini ancak daha fazla araştırmaların yapılması gerektiğini ileri sürmektedir. (A nonionic block co-polymer adjuvant (CRL1005) enhances the immunogenicity and protective efficacy of inactivated influenza vaccine in young and aged mice[19].

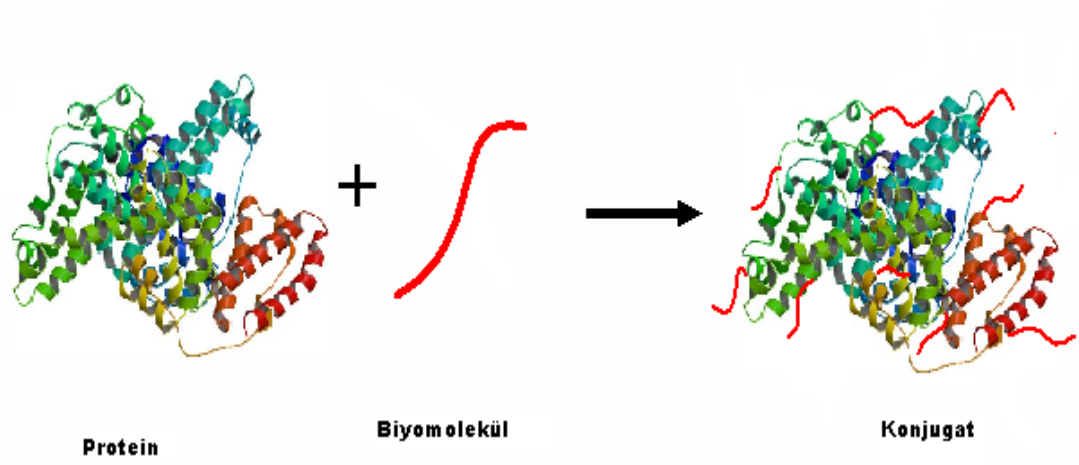
2.3 Protein Özellikteki Taşıyıcı Moleküller

Hem kısa (10-12) hem de uzun aminoasid zincirlerine sahip sentetik peptidler antikor oluşturmak için yeterli büyüklükteki moleküler boyutlara sahip olmadıklarından, peptidlere karşı antikor üretiminde immunojenliği arttırmak için peptidlerin daha büyük molekül boyutuna sahip taşıyıcı proteinlere bağlanması gerekmektedir[20]. Büyük moleküler boyutlardaki BSA, HSA, KLH, OVA gibi globular proteinler ve liposomlar peptidler için taşıyıcı olarak kullanılmakta ve küçük boyutlu peptidlerin in-vivo sistemde antikor oluşumu prosesinde tanınmasını sağlamaktadırlar . BSA ve KLH genel olarak en sık kullanılan tasıyıcı proteinlerdir ve peptidler bu tür taşıyıcılara kararlı kovalent bağlarla bağlanırlar. Bağlanma (konjugasyon) bölgesi, peptid dizilimine bağlı olarak; dizinin N- ucu, C- ucu ya da içerisindeki herhangi bir nokta olabilir. Peptidler içerdikleri aminoasid kompozisyonuna göre N- ucundan, C- ucundan ya da dizinin içerisindeki herhangi bir fonksiyonel grubundan konjugasyona girebilirler. Konjugasyon noktası karboksil (-COOH), amino (-NH2) ya da sülfidril (-SH) uçları olabilir. Antijenik peptid dizilimi tasıyıcı proteine (BSA-Bovin Serum Albumin, KLH-Keyhole Limpet Hemocyanin, OVA-Ovalbumin vb.) bağlanacagı göz önünde bulundurularak sentezlenmelidir. Antikor oluşumunda iyi sonuçlar elde etmek için uygun antijenik peptid dizilimini seçmek ve buna baglı olarak konjugasyonun dizaynını yapmak oldukça kritik noktalardır. Peptidin taşıyıcı protein yüzeyinde konumlanması ve yerleşimi seçilen bağlanma yönteminden etkilenmektedir. Sisteine dayalı amino asid spresifik bağlanma yöntemleri genel olarak maleimidler ile yapılmakta ya da serbest –SH grubunun kovalent olarak etkileşmesine dayanmaktadır. Diğer bağlanma yöntemleri

ise genel olarak serbest amino grupları için glutaraldehid ya da N-hidroksisükdinimid reaktif grupları kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Peptidler antikor oluşturmak amacı ile immunizasyon için proteinlerle bağlanacağı zaman konjugasyon için spesifik bağlanma yöntemlerinin kullanılması, peptid dizilimine sistein eklenmesi gibi klasik yöntemlerden kaçınılması gerekmektedir[20],[21].

2.3.1 BSA (Bovin Serum Albumin) Proteini

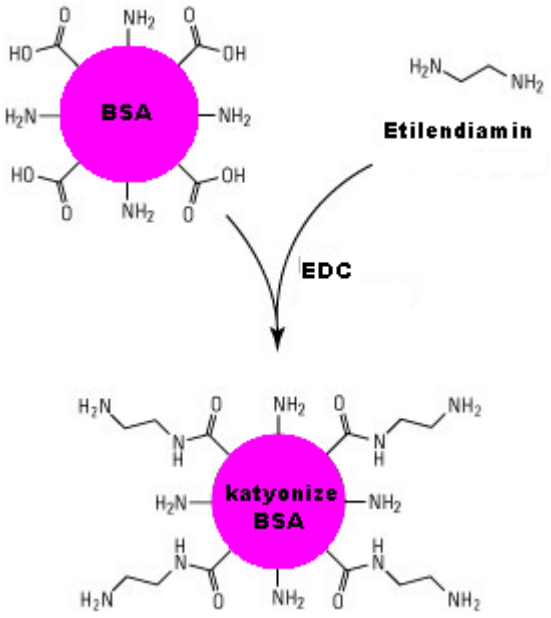
Bovin serum albumin antikor oluşumda konjugasyon için genel olarak en yaygın kullanılan taşıyıcı proteindir. Molekül ağırlığı 66,463 Da (= 66.5 kDa), 585 aminoasit içerir ve izoelektrik noktası suda 4.7'dir. Serum proteinlerinden albumin alt sınıfına aittir ve plazmadaki toplam proteinin yaklaşık yarısını albuminler oluşturmaktadır. Bu da albuminlerin plazmadaki en kararlı ve en yüksek çözünürlükteki protein olduğunu göstermektedir. BSA kolay erişilebilirliği, çözünürlügü vb. avantajlarından dolayı; deneysel çalısmalarda oldukça sık kullanılmaktadır. Yapısıda taşıdığı çesitli fonksiyonel gruplarından dolayı da konjugasyon reaksiyonlarında çesitli moleküller, proteinler ya da haptenler için taşıyıcı olarak tercih edilmektedir[22].



Şekil 2.7 Taşıyıcı protein olarak BSA'nın biyomoleküller ile oluşturduğu konjugat

Katyonize sığır serum albümin (cBSA) pozitif yüklü birincil aminler ile tüm negatif yüklü karboksil gruplarını kapatma esasına dayanan, aşırı etilendiamin ile doğal BSA'nın değiştirilmesiyle hazırlanmaktadır. Sonuçta doğal BSA'ya kıyasla pozitif yüklü olan katyonize BSA (pI> 11) immünojeniteyi arttırmıştır. Buna ek olarak, artan primer amin

sayısı sayesinde çapraz bağlama yöntemleri ile konjuge edilebilecek antijen moleküllerin sayısı da arttırılmaktadır.



Şekil 2.8 Katyonize BSA oluşumu

Muckerheide, Domen ve Apple (1987, 1988) araştırma makalelerinde, katyonize taşıyıcı proteinlerin bağışıklık yanıtının düzenlenmesi ve üretimi üzerine etkilerini bildirmişlerdir. Bu çalışmalarda, bir taşıyıcı protein olarak cBSA kullanıldığında doğal BSA'dan çok daha yüksek bir antikor tepkisini teşvik eden immünojenisite olduğu belirtilmiştir. In vivo olarak, antikor yanıtı artmış ve uzun bir süre yüksek kalmıştır. In vitro olarak, aynı derecede T hücresi proliferasyonunun üretmek için doğal BSA'dan çok daha az cBSA gerekliliği gözlemlenmiştir. Ayrıca, bağışıklık tepkisi geliştirme cBSA'ya konjuge olmuş hapten ya da diğer tür proteinler için de uzatılmıştır. Örneğin farelerde yapılan denemede antikor seviyeleri için sadece OVA-BSA konjugatına nispeten OVA-cBSA konjugatında daha yüksek immun yanıtın daha uzun süre elde edildiği belirtilmiştir[23],[24],[25],[26].

2.3.2 HSA

Kısaca albümin diye de bilinen insan serum albümini, insan ve diğer memeli hayvanların kan plazmasında bulunan en yaygın proteindir. Molekül ağırlığı 67 kDa ve

yarılanma ömrü 20 gün civarındadır. Kanda bulunan proteinlerin %60'ını oluşturur. Ayrıca, doku sıvılarında, özellikle kas ve deride, az miktarda göz yaşı, ter, mide suları ve safrada da bulunur. Vücuttaki toplam albüminin %30-40'ı kandadır. Yağ asitleri ve çeşitli başka maddeleri kanda taşımasının yanı sıra en önemli işlevi, kan ile doku sıvıları arasında suyun dengelenmesini sağlamaktır[27].

2.3.3 KLH

KLH bir deniz yumusakçası olan megathura crenulata'dan izole edilen ve yaklaşık olarak 4.5x105-1.3x107 Da arasında değisen molekül ağırlığına sahip bir proteindir. 0.45 'den 13 milyon dalton arasında değişen molekül ağırlığına sahip agregatlar oluşturması için 350 kDa ile 390 kDa molekül ağırlıklı alt birimden oluşmaktadır. KLH genel olarak antijenik özellikteki peptidler, haptenler ya da diğer immunolojik moleküllerin antijenik özelliklerini arttırmak için kullanılan taşıyıcı proteinlerden biridir. Yapısında yaklaşık olarak 2000 lizin (amino grubu), 700 sistein (sülfidril grubu) ve 1900 adet tirozin (fenolat grubu) olmasından dolayı konjugasyon reaksiyonları için oldukça fazla fonksiyonel grup içermektedir. Bu özellikler KLH'a yüksek immünojenite ve immünojenik preperat hazırlanması için etkin taşıyıcı protein olma özelliği kazandırmaktadır. Ancak KLH yüksek tuz konsantrasyonundaki çözeltilerinde stabil ve daha çözünür olduğundan konjugasyon reaksiyonlarının yüksek tuz konsantrasyonlarında yapılması gerekmektedir. Sulandırıldıktan sonra, süspansiyon-çözeltideki saf ve denatüre olmamış KLH, karakteristik bir yanardöner mavi rengi vermektedir[21] , [28], [29] .

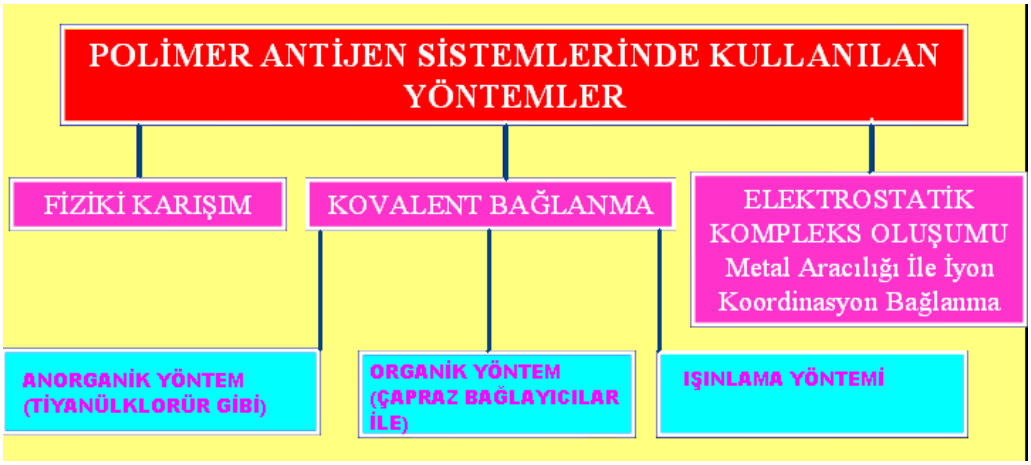
2.3.4 OVA

Ovalbumin proteini yumurta akının %60-65'ini oluşturan 45 kDa molekül ağırlığına sahip, 385 amino asitten oluşan 4 tarafından glikozilasyon olan bir glikoproteindir ve izoelektrik noktası 4.6'dır. Ovalbumin dizilimi ve üç-boyutlu homoloji gereği serpin süperailesinde yer almasına rağmen diğer bilinen serpinler gibi serin proteaz inhibitörü değildir. Ovalbuminin fonksiyonu bilinmemektedir ancak bir çeşit depo proteini olduğu tahmin edilmektedir. Ağır metal (örneğin, demir gibi) zehirlenmesinden şüphelenilen durumlarda, ovalbumin tatbik edilmektedir. ovalbumin ağır metaller ile şelat oluşturur

ve proteinin yapısındaki sülfidril bağları ile metal iyonlarını tuzaklar. Böylece şelatlama gastrointestinal olarak emilim ile metal zehirlenmesi önler. OVA proteini de BSA ve KLH gibi sentetik peptidlerin immunojenik özelliklerini arttırmak için tasıyıcı protein olarak kullanılmaktadır[30], [31].

2.4 Polimer Antijen Sistemlerinde Kullanılan Yöntemler

Polimer antijen sistemlerinde kullanılan yöntemler aşağıdaki gibi bir tablo halinde gösterilmektedir.



Şekil 2.9 Polijen antijen sistemlerinin hazırlanmadında en sık kullanılan yöntemler

2.4.1 Polimer Antijen Sistemlerinde Elektrostatik Kompleks Oluşumu

Temel olarak kovalent olmayan etkileşimlerin bir çoğu polimer ve proteinler arasında kompleks oluşumuna katkıda bulunabilmektedir. Proteinler ve poli(vinilpirolidon) veya diğer hidrofilik noniyonik polimerler arasındaki etkileşim hidrojen bağı ile oluşur ve donor gibi görev yapan karboksilik asit gruplarının varlığını gerektirmektedir[5]. Bütün çözünenler suya göre daha hidrofobiktir. Bu sebeple polikomplekslerdeki hidrofobik etkileşimlerin varlığı yok sayılamaz. Hidrofobik etkileşimler için en güçlü kanıt sistematik yapısal değişimlerle ortaya çıkar veya hidrofobik etkileşimlerin karakteristiği olan assosiyasyon entropisine ve entalpisine bağlı sıcaklık değişimi ile bulunabilir, ancak uygun bir ölçüm yöntemi bulunmamaktadır. Elektrostatik etkileşimlerin baskın olduğu genel olarak kabul edilmiştir. Tuzsuz çözeltilerde ve kuvvetli polielektrolitlerle kompleks oluşumu sırasında stokiyometrik çökelme gözlenir. Çökelek oluşumu sabit protein/polielektrolit oranında pH'a bağlıdır. Bu davranış polielektrolit kolloid

titrasyonuna benzemektedir[32]. Kabanov ve araştırmacıları (2004) zıt yüklü polielektrolitler temeline dayanan interpolielektrolit kompleksleşme modeli üzerine çalışırken, protein ve polielektrolit arasında oluşan stokiyometrik tuz bağlarının, proteinin iyonik birimlerinden sadece birkaç fraksiyonunu gerektirdiğini bildirdiler. Bütün yüklü birimlerin ya serbest olduğu ya da tuz bağlarına tutunduğu tüm yüklü birimleri içeren iki halli model bir denge durumunun olduğunu gösterir ve proteinin ya da polielektrolitin diğer bir makro iyonu yerine geçtiği yer değiştirme reaksiyonlarını kantitatif olarak açıklamakta kullanıldı[33].

Elektrostatik kuvvetler zıt yüklü grupları içeren tüm etkileşimleri esnek bir şekilde tanımlasa da, proteinin etrafındaki dielektrik alanında bulunan tuz köprülerini de bu kuvvetlere dahil etmeliyiz. Bu özel etkileşimler diğer kısa mesafeli kuvvetleri tamamlamaktadır. Klasik biyokimya modelinde, protein-ligand arasındaki spesifik etkileşim yapısal olarak kusursuz ligand-konakçı komplekslerinin oluşumunu sağlayan spesifik kısa mesafeli kuvvetlerden ortaya çıkar. Ama esas olarak, bağlanma enerjisi protein ve polielektrolitlerin sabit yükleri arasındaki itme ve çekme coulomb kuvvetlerinin bir toplamıdır[34].

Son on yılda yapılan çalışmalarda temel olarak şu üç faktörün üzerinde durulmuştur: uygulamalar, enstrümantel çalışmalar ve simulasyonlar. Polielektrolit multi tabakaları ile protein-polielektrolit kompleksleri üzerine yapılan çalışmaların bir arada sürdürülmesi; glukoz, kolesterol ve antikorların saptanmasında kullanılan biyosensörlerin dayanımını ve stabilitesini artırmaya yönelik protein-elektrolit tabakalarının elde edilmesi için önemli olanaklar sağlamıştır. Yüzey karakterizasyonu için optik “waveguide” lazer spektroskopisi, yüzey plazmon rezonans (SPR) ve dar açı reflaktometrisi kullanılarak uygulanan yeni teknikler bu multitabakaların incelenmesine yardımcı olmaktadır. Protein-polielektrolit komplekslerinin karakterizasyonunda uygulanabilen yeni teknikler kapiler elektroforez ve affinite esaslı ayırma metodlarıdır. Son on yılda komplekslerin faz davranışları ve yapısının iç yüzünün anlaşılmasını sağlamada bu simulasyonlar büyük yankı uyandırmıştır. Polielektrolitprotein kompleks koaservat fazlarının çökelek ve süspansiyonlardan ayrı ve farklı olarak kabul edilmesi nm-µm ölçekli yeni mikroskobik tekniklerin geliştirilmesinde fayda sağlamıştır. Son

olarak polielektrolitler, proteinler için koaservat ve mikrokapsüller içinde ılıman immobilizasyon koşulları sağladığı için, farmasötik uygulamalarda proteinlerin

taşınması ve tutulması (entrapment) için polielektrolitlerin jel veya "brush" olarak kullanılması şaşırtıcı değildir. Bu alanlardaki çalışmalar 1995'den önceki literatüre dayanmaktadır. Biyokimya, malzeme bilimi, polimer ve kolloid kimyası ile diğer disiplinlerin bir araya gelmesi önümüzdeki yıllarda bu alanda daha yaratıcı ve geniş kapsamlı bilimsel çalışmaların temelini atmış olacaktır[34], [35].

2.4.1.1 Polielektrolit Komplekslerin ve Yapay Aşılarda Kullanımı

Son yıllarda yapılmış araştırmalar model antijenlerin yanı sıra (GG, SA-OA v.s.) mikrop ve bakteri antijenlerinin polielektrolit komplekslerinin fazla immünolojik aktifliğe sahip olduğunu göstermektedir (Çizelge 2.1; 2.2). Örnek olarak tüberkülozun protein antijeni (PPD), H-antijeni, Salmonel, grip antijeni, menenjit mikrobunun B-polisakkariti, α-fetoprotein ile (kanser antijeni) polikatyonların kompleksleri serbest antijenlerden karşılaşılırsa daha yüksek immünolojik aktiviteye sahiptirler[36]. PEK'ler timusa bağlı antijenleri timusa bağlı olmayan immünojenlere çevirme imkanı sağlamaktadırlar. (Çizelge 2.3). Bir kat enjekte edildikten sonra ilave yardımcılardan yararlanmadan güvenli immünolojik hafıza meydana getirirler (Çizelge 2.4). Böyle PEK'ler aynı zamanda yüksek koruyucu aktifliğe sahiptirler ve bunlar temel alan yapay aşıların sentezlenmesinde büyük olanak sağlarlar.

Çizelge 2.1 Serbest BGG, tüberkülozun protein türevi (PPD) ve bunların PVP (R2, R16) kompleksleriyle immünize edilmiş farelerin dalağındaki antikor oluşturan hücrelerin (AOH) miktarı.

PREPARAT	AOH	FARE SAYISI
BGG	5000±5.35	18
PVP(R2, R16)-BGG	100000±15000	18
PPD	25±5.0	18
PVP(R2,R16)-PPD	25000±2000	18

Çizelge 2.2 Ovalbumine (OA) karşı olan Ig-E'nin miktarı (Fareler OA ve OA' nın PEK si ile immünize edilmişler) [37]

SAYISAL	IgE'nin titri (log-/T)	
Oran N_{OA}/N_{PE}	PVP (R_2,R_{16})-OA* β≈5 mol %	PVP (R_2,R_{16})-OA* β≈7 mol %
2.0	6.6	7.8
3.8	5.6	5.5
4.0	4.0	5.1
5.0	3.4	4.0
6.0	4.0	3.5
8.0	3.0	4.8

(*) serbest ovalbumin için Ig-E'nin titri 4.0'a eşittir.

Çizelge 2.3 Normal ve timusu olmayan farelere SA, GG ve bunların kuaternleşmiş poli (4-vinil-piridin) ile kompleksleri verildiğinde oluşan immünolojik aktiflik[37].

Farelerin gen tipi	İmmünojen	Dalakta protein spesifik antikorların miktarı	Farelerin sayısı
C57BL/6(+/+) C57BL/6(+/+)	BSA BSA-PVP(R_2,R_{16}) PVP(R_2,R_{16})PPPVPPVP(R_2,R_{16})	25±10 2500±400	6 6
Nude (nu/nu) Nude (nu/nu)	BSA BSA-PVP(R_2,R_{16})	- 600±100	3 5
C57BL/6(+/+) C57BL/6(+/+)	BGG BSA-PVP(R_2,R_{16})	2500±400 3500±200	6 6
Nude (nu/nu) Nude (nu/nu)	BGG BSA-PVP(R_2,R_{16})	200±20 20000±2500	5 5

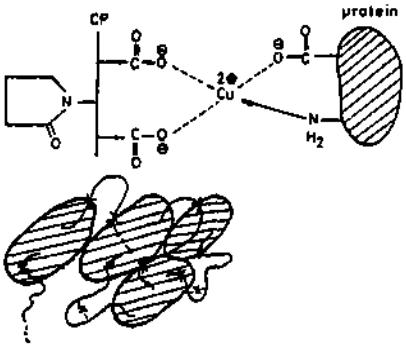
Çizelge 2.4 Farelerde ikinci immünizasyondan sonra serum albumine karşı oluşan immün cevap[37].

İmmünlaştırma		Farelerin sayısı	Birinci veya ikinci immünlaştırmadan 7 gün sonra AOH miktarı	
Birinci	İkinci		25IgM	IgG
BSA	-	18	23,5±2	5,5±2
BSA	BSA	11	20 ±4	6±2
PVP(R_2,R_{16})-BSA	-	15	3840±470	3990±300
PVP(R_2,R_{16})	-	14	5920±720	7450±680

2.4.1.2 Üçlü Polielektrolit Kompleksler

Yukarıdaki bilgilerden elde edilen sonuçlara göre, stabil yapılı kompleksler (veya konjugatlar) en fazla immünolojik aktifliğe sahiptirler. Böyle sistemlere örnek olarak PE ve antijen moleküllerinin (fragmentlerinin) kooperatif elektrostatik ve hidrofob karşılıklı etkisiyle stabilleşmiş kompleksleri veya fonksiyonel grupları kovalent bağla bağlanmış komponentlerden oluşan konjugatları göstermek mümkündür. Ancak PE'ler veya antijen molekülleri birbiriyle bağlanmak için uygun fonksiyonel gruplar veya hidrofob radikallere sahip değillerse bunların kimyasal modifikasyon problemi ortaya çıkar. Bu ise polimerlerin biyolojik etkisinin geniş boyutta değişmesine neden olur[38].

Doğal PE'ler ve metal iyonları esasında ilaç preparatlarının alınma metodu bir seri araştırmalarda gösterilmiştir[37]. Mikroplar yoluyla oluşmuş hastalıkların tedavisinde polisakkarit-protein karışımı bazı metallerin katkısıyla kullanılabilmektedir. Günümüzde BN meninjit için spesifik olan proteinle polisakkaritin farmakolojik metalle üçlü kompleksi pratik olarak kullanılmaktadır. Son zamanlarda çeşitli protein antijenlerinin sentetik PE'lere metal katılmasıyla oluşan üçlü kompleksler esasında yüksek etkili immünojenler elde edilmiştir. Bu sistemlerin önemi, PE-protein karışımına çok az miktarda metal iyonu ilave edilmesiyle stabil üçlü kompleks oluşmasıyla anlaşılmaktadır. Proses teknolojik açıdan çok basittir ve komponentlerin kimyasal yapısının değişmemesi açısından oldukça önemlidir. Küçük moleküllü "ilaveler" veya mediyatörler (ara bağlayıcılar) gibi yüzey aktif maddeler ve geçiş metal iyonları (Cu^{2+}, Al^{3+}, Pt^{4+}, Fe^{3+} ve diğerleri) kullanılmıştır[15], [18], [37],[38].



Şekil 2.10 CP makromolekülünün ve SA fonksiyonel gruplarının Cu2+ iyonları vasıtasıyla kompleks oluşumunun şematik gösterilmesi ve oluşan üçlü PMC'nin yapısı[15]

Çizelge 2.5 Farelerde proteine spesifik olan ikinci immün cevap

Preparat	Farelerin sayısı	İkinci cevap IgM	Anti SA miktarı IgG
BSA	18	23.5 ± 2.1	5.5 ±2.3
BSA	11	20 ± 4.2	6 ± 2.1
BA-CP1	10	10 ± 4.0	5 ± 2.0
BSA-Cu^{+2}-CP1	15	22400 ± 1570	14720 ± 1200
BSA-CP2	10	20 ± 4.0	6 ± 2.0
BSA-Cu^{+2}-CP2	15	2400 ± 1670	10500 ± 750
BSA-Cu^{+2}	10	20 ± 4.0	5.5 ± 2.3
PVP(R_2,R_{16})-BSA	14	5960 ± 724	7446 ± 678

Çizelge 2.5'de görüldüğü gibi üçlü komplekslerin immün cevabı ikili elektrostatik komplekslere göre daha fazladır.[37]

2.4.2 Polimer Antijen Sistemlerinde Kovalent Bağlanma

Çizelge 2.6 Konjugasyon reaksiyonlarında polielektrolitlerin, aminoasitlerin, peptidlerin, triterpenlerin sahip olduğu fonksiyonel gruplar ve bunların aralarında oluşan bağlara ait çizelge

Amino asit, peptid ve triterpenlere ait fonksiyonel gruplar	Polielektrolitlere ait fonksiyonel gruplar	Oluşan bağlar
-COOH	-OH	Karboksilik ester
-COOH	-NHR	Amid
-COOH	-SH	Tioester
-OH	-COOH	Karboksilik ester
-SH	-COOH	Tioester
-NHR	-COOH	Amid
-OH	$-OP(=O)(OH)_2$	Fosforik asid ester
-OH	$-OP(=O)(OR)_2$	Fosforik asid ester
-OH	$-SO_2OH$	Fosforik asid ester

2.5 Kovalent Bağlanmada Kullanılan Çapraz Bağlama Reaktifleri

Çapraz bağlama reaktifleri (çapraz bağlayıcılar) biyokonjugat prosedürlerinde moleküllerin kovalent olarak bağlanmasını sağlayan ve uygulama amacına göre çok farklı çeşitleri bulunan kimyasallardır. Çapraz bağlayıcılar biyolojik moleküllerin işaretlenmesinde, çapraz bağlanmasında ya da küçük moleküllerin daha büyük moleküllere bağlanarak hedeflenmesi ve dağıtımında kullanılmaktadır. İki farklı molekül intermoleküler (moleküller arası) ya da tek bir molekül intramoleküler (molekül içi) olarak çapraz bağlayıcılar kullanılarak bağlanabilmektedir. Çapraz bağlayıcılar aktif bağın sağındaki ve solundaki R gruplarının eş olup olmamasına göre Homobifonksiyonel (iki eş fonksiyonel R grubu taşıyanlar) veya Heterobifonksiyonel (farklı fonksiyonel R grubu taşıyanlar) olarak sınıflandırılırlar[39].

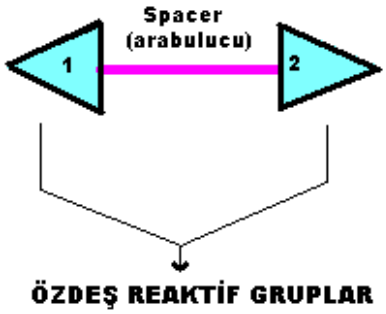
Kullanılan bağlayıcının cinsine göre bağlanan iki molekül arasında yaklaşık 0-20 A° (1 A°=1x10-10 m) uzunluğunda bir arabulucu (spacer) bulunmaktadır (arabulucu uzunluğu 0 A° olan bağlayıcılar özel bir alt bölüm olan Direkt Çapraz Bağlayıcılardır). Arabulucu içeren bağlayıcıların bazı avantajları;

- Değişen uzunluktaki arabulucu mesafesi peptide, taşıyıcı protein yüzeyinden çıkabilme özelliği sağlamakta ve böylece peptid daha ulaşılabilir olduğundan daha fazla antijenik özellik göstermektedir.

- Arabulucu en fazla 6 metilen zincirinden oluşmaktadır ve başka bir fonksiyonel grup içermemektedir. Bu da istenmeyen immunolojik cevapların oluşumunu önleyecektir. Çapraz bağlanma reaktifleri kullanılarak kovalent bağlanma ile elde edilen konjugatlar her iki molekülün biyolojik aktivitesini birlikte taşımaktadır.

2.5.1 Homobifonksiyonel Çapraz Baglayıcılar

Homobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar; karbon zincirinden oluşan bir arabulucunun simetrik olarak iki özdeş reaktif gruba bağlanması ile oluşturulmuştur[39].



Şekil 2.11 Homobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların şematik gösterimi

Arabulucu moleküler bir ip gibi bir protein molekülünü diğer bir moleküle ortak reaktif gruplarına saldırarak kovalent olarak bağlamaktadır. Örneğin bir proteindeki lizine ait e amino ya da N- ucundaki amino grubu diğer bir moleküldeki amino grubuna homobifonksiyonel bağlayıcı aracılığı ile çapraz bağlanmaktadır. Bu şekilde iki proteini ya da diğer molekülleri birbirine bağlayabilme yetenekleri homobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların farklı assay (deneme) ya da target (hedefleme) çalışmalarında kullanılmasına olanak sağlamıstır. Bunun yanında homobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların bazı dezavantajları da mevcuttur[39]. Bunların basında;

- Genel olarak basit homobifonksiyonel bağlayıcıların kullanılması ile oluşturulan konjugatların yeteri kadar tanımlanamaması,
- Konjugasyon esnasında çapraz bağlayıcı tarafından aktive edilen ilk protein tarafından oluşturulan aktif ara ürünün yine aynı cins protein ile çapraz bağlanabilmesi,

- Aktif ara ürünün kendi içerisinde aynı polipeptid zincirinde diğer bir fonksiyonel gruba çapraz bağlanarak intramoleküler konjugat olusturabilmesi,
- Diğer bir çapraz bağlayıcının yine bu aktif ara ürüne bağlanması bunun sonucunda aynı molekülün ikili (dimer), üçlü (trimer) vb, oligomerlerinin oluşabilmesi ve bu şekilde polimerize olabilmesi gelmektedir.

Bu şekilde homobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar kullanılarak gerçekleştirilen tek basamaklı konjugasyon reaksiyonlarında tam olarak tanımlanamayan konjugatların oluşumu önemli bir problemdir. Çünkü bu tip reaksiyonlarda tüm reaktiflerin aynı anda reaksiyon karışımına koyulması gerekmektedir. Tüm bu olumsuz nedenlerden dolayı homobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar için iki basamaklı reaksiyon prosedürü geliştirilmiştir[30]. Öncelikle ilk protein molekülü homobifonksiyonel çapraz bağlayıcı ile aktive edilir ve sonrasında çapraz bağlayıcının fazlası ile yan ürünler (protein monomeri, dimeri, trimeri, vb.) uzaklaştırılarak aktive edilmiş protein saflaştırılır. Sonrasında bağlanacak olan ikinci molekül ya da protein ile konjugat oluşumu için karıştırılır. Ancak burada da aktive edilmiş proteinin saflaştırılması sırasında hidroliz olması ya da ilk molekülün kendi arasında polimerize olması ve reaksiyon veriminin oldukça düşük kalması gibi sorunlar ile karşılaşılmaktadır.

2.5.2 Seçici Gruplara Göre Homobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri

Homobifonksiyonel çapraz bağlama reaktiflerinin konjugasyon çalışmalarında en yaygın olarak kullanılanları yöneldikleri reaktif gruplara göre sınıflandırılarak aşağıda verilmiştir[40].

2.5.2.1 Amino Grubuna Yönelen Homobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri

- NHS Esterleri
- Bis-imidoesterler
- Bis-aldehidler
- Bis-izosiyonatlar ve _zotiyosiyonatlar
- Diflorobenzen Türevleri

- Amino Gruplarının Yönlendirdiği Diğer Çapraz Bağlayıcılar

2.5.2.2 Sülfidril (Tiyol) Grubuna Yönelen Homobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri

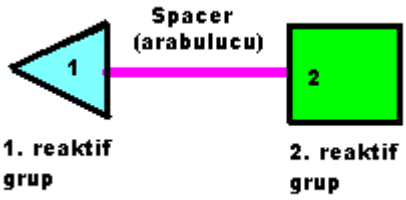
- Bis-maleimidler
- Disülfid Oluşturan Reaktifler
- Bis-alkil halojenürler

2.5.2.3 Karboksil Grubuna Yönelen Homobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri

Karboksil anyonu nüklofilik yapıdadır ancak nötral ve oldukça bazik pH değerleri arasında elektrofiller için reaktifliği amino ya da tiyol grubunun yanında oldukça zayıf kalmaktadır. Ilımlı asidik koşullarda (karobksil grubunun pKa değerleri arasında; yaklaşık pH=3-5) amino ve tiyol grupların protonlanmış formları (NH_3^+, SH) baskın olduğundan reaktiflikleri azalmakta ve karboksil grupları reaksiyon için tercih edilmektedir. Karbonildiazo bileşikleri bu koşullar altında konjugasyon reaktifi olarak kullanılmaktadır. Bu bileşikler fotoaktive edilebilir formda olup sonrasında karanlık koşullarda nükleofilleri hedefleyerek reaksiyona girmektedir. Genel olarak kullanılan karboksil grubuna yönlenen homobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar diazo bileşikleridir[40].

2.5.3 Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlayıcılar

Heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar; karbon zincirinden oluşan bir arabulucunun iki ucuna farklı reaktif grupların bağlanması ile oluşturulmuştur[39].



Şekil 2.12 Heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların şematik gösterimi

İki farklı reaktif grup, kovalent olarak bağlanacak farklı moleküllerdeki iki farklı fonksiyonel gruba saldırarak bu moleküllerin çapraz bağlanmalarını sağlarlar. Örneğin çapraz bağlayıcının bir ucu amino grubuna yönelen reaktif grup içerirken, diğer ucu sülfidril ya da karboksil grubuna yönelen reaktif grup içermektedir. Bunun sonucunda hedeflenen molekülün istenilen bölgesinde çapraz bağlanma reaksiyonu gerçekleştirilebilmekte ve böylece konjugasyon prosesinde daha iyi bir kontrol sağlanmaktadır[39].

Heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar kullanılarak gerçekleştirilen konjugasyon reaksiyonu birkaç basamaktan oluşmaktadır. Tipik bir konjugasyon reaksiyonunda ilk protein (ya da peptid, makromelekül vb.) heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcının daha reaktif ve reaksiyona meyilli olan ucu tarafından modifiye edilir. Sonrasında modifiye protein, reaktiflerin fazlasının jel filtrasyon ya da diyaliz yoluyle uzaklaştırılması sonucu saflaştırılır. Konjugasyon için ikinci molekül ilave edilmeden aktive edilmiş ara ürünün saflaştırılması sırasında ara ürünün kararlılığını koruyabilmesi için birçok heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar, en az bir tane sulu ortamda uzun süre kararlı kalabilecek reaktif grup içerirler. Örneğin NHS-ester maleimid heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcıları, aminlere karşı oldukça reaktif olan NHS ucu ile proteine bağlanıp molekülün modifikasyonunu gerçekleştirirken, maleimid fonksiyonel grubunun kararlılığından dolayı ara ürünün aktivitesi korunmaktadır. Çünkü maleimid grubu sulu çözeltilerde NHS esterlere göre daha kararlıdır. Hızlı bir saflaştırma işleminden sonra ikinci molekül (sülfidril grubu içeren) ortama eklenerek maleimid ucu ile ilk moleküle çapraz bağlanması sağlanır. Bu şekilde çoklu basamaklı konjugasyon reaksiyonlarında konjugat ürününün molekül boyutu ve çapraz bağlı üründeki bileşen oranları üzerinde daha iyi bir kontrol sağlanmaktadır. Konjugatın konfigürasyonu ya da yapısı ilk proteinin başlangıç modifikasyon derecesine bağlı olarak ikinci proteinin konjugasyon reaksiyonuna eklenecek miktarı ayarlanarak düzenlenebilmektedir[39]. Bu şekilde kullanım amacına göre; düşük ya da yüksek molekül ağırlıklı konjugatlar elde edilebilir.

Heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar konjugasyon reaksiyonlarında hedef molekülün özel bir bölgesine kar ı spesifik yönlendirici olarak kullanılabilirler. Bunun yanı sıra heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar seçici olmayan bağlanma gerçekleştiren ve UV ışınlama ile aktive edilen bir adet fotoreaktif gruba sahip olabilirler.

Heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar iki farklı fonksiyonel grubun yanı sıra bunları birbirine bağlayan bir adet de arabulucu (spacer) içerirler. Çapraz bağlayıcılar her zaman yalnızca reaktivitelerine göre değil bazen de sahip oldukları arabulucunun boyutuna ve özelliğine göre seçilip kullanılabilirler.

2.5.3.1 Seçici Gruplara Göre Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri

Heterobifonksiyonel çapraz bağlama reaktiflerinin konjugasyon çalışmalarında en yaygın olarak kullanılanları yöneldikleri reaktif gruplara göre sınıflandırılarak aşağıda verilmiştir[40].

- Amino ve Süldifril Grubuna Yönelen Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri
- Karbonil ve Sülfidril Grubuna Yönelen Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri
- Amino Grubuna Yönelen ve Fotoreaktif Grup İçeren Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri
- Sülfidril Grubuna Yönelen ve Fotoreaktif Grup İçeren Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri
- Karbonil Grubuna Yönelen ve Fotoreaktif Grup İçeren Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri
- Karboksil Grubuna Yönelen ve Fotoreaktif Grup İçeren Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri
- Arjinin Grubuna Yönelen ve Fotoreaktif Grup İçeren Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri
- Amino ve Karboksil Grubuna Yönelen Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri

2.5.4 Direkt (Zero-Length) Çapraz Bağlayıcılar

Çapraz bağlayıcıların diğer bir grubu ise zero-length olarak da bilinen direkt çapraz bağlama reaktifleridir. Bu alt gruptaki bağlayıcılar iki molekülü arada herhangi bir grup

ya da atom olmaksızın birbirine bağlamakta yani ilk moleküldeki bir atom diğer moleküle kovalent olarak bağlanırken arada hiçbir arabulucu ya da bağlayıcı bulunmamaktadır. Ancak birçok konjugasyon reaksiyonu elde edilen konjugattaki moleküller birbirlerine bağlanırken yapıya yabancı bir madde girmiştir ve bu madde konjugatın kullanılmak istendiği yere göre zararlı olabilmektedir. Örneğin peptid-protein konjugatları, taşıyıcı proteine bağlanmış olan peptide karşı immun cevap oluşumu amacı ile sentezlenmiştir. Bazı durumlarda oluşturulan antikorların bir kısmı, konjugasyon reaksiyonunda kullanılan çapraz bağlayıcı ajanlara spesifiktir. Direkt çapraz bağlama reaktifleri iki molekülü birbirlerine arada bir arabulucu ya da bağlayıcı bulunmadan direkt bağladığı için bu tür istenmeyen antikor oluşumlarını engellemektedirler[39].

Bu tür çapraz bağlayıcılar;

· Primer amino grubu ile karboksilik asid grubunu, kondenzasyon reaksiyonu sonucu amid bağı oluşturarak,

· Organik fosfat grubu ile primer aminleri fosfoamid bağı üzerinden ya da,

· Aldehidler ile primer veya sekonder amino gruplarını Shiff bazı oluşturarak ve bu bileşiğin indirgenmesi sonucu sekonder ya da tersiyer amin bağları ile bağlamaktadır.

2.5.4.1 EDC

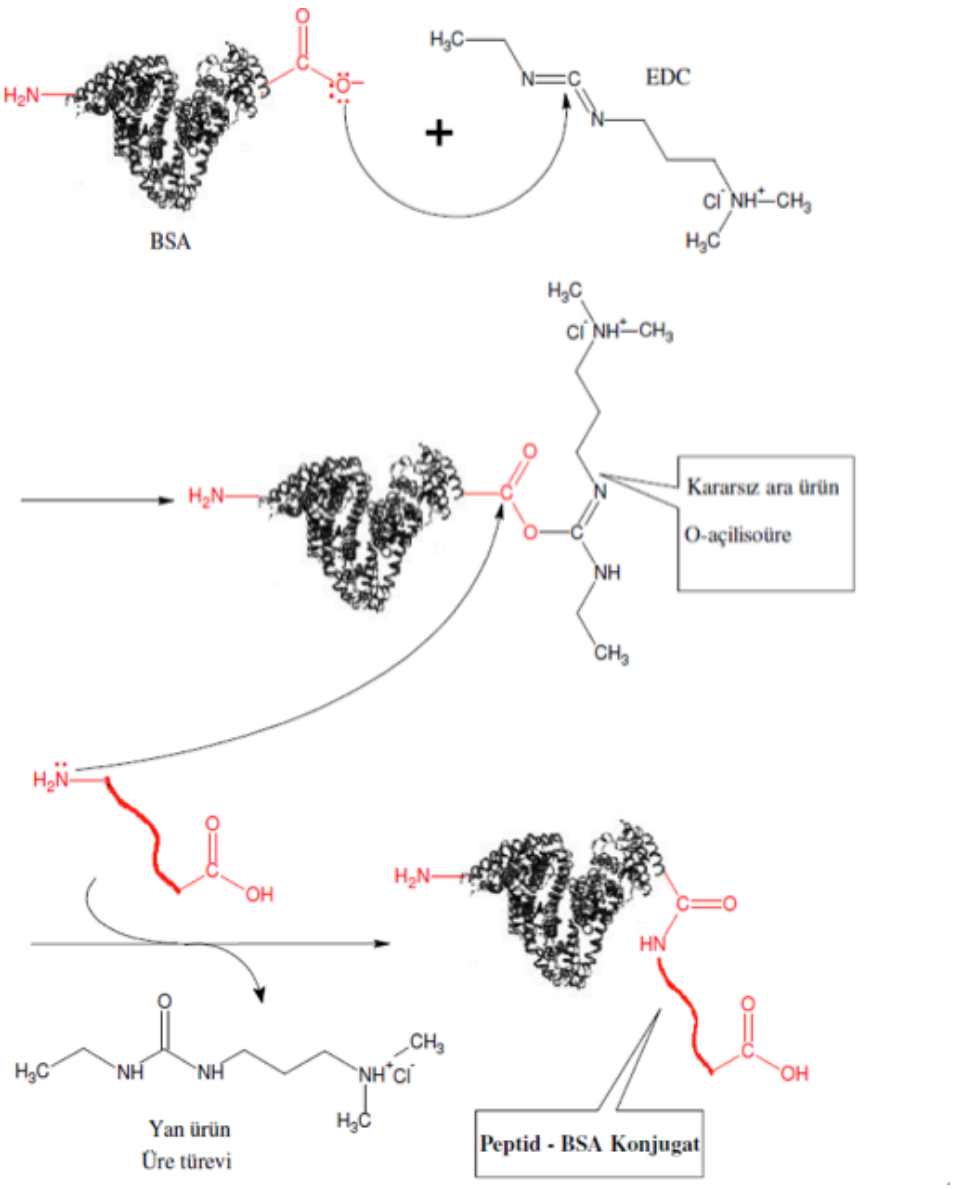
EDC ya da EDAC adı ile bilinen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür biyolojik moleküllerin konjugasyonunda en sık kullanılan karbodiimid türevidir. Suda çözünebilir özelliği çapraz bağlayıcıyı reaksiyon ortamında daha önce bir organik çözücüde çözme zorunluluğu olmadan direkt olarak ekleme imkanı sunmaktadır. Karbodiimidin fazlası ve çapraz bağlama reaksiyonunun yan ürünü olan üre türevleri suda çözünebilir olduğundan diyaliz ya da jel filtrasyon ile kolayca ortamdan uzaklaştırılabilir ve elde edilen konjugatlar saflaştırılabilir. Ancak EDC suyun varlığında kararlı olmadığından kimyasal -20 °C'de saklanmalıdır. Daha sonrasında kimyasal kullanılacagı zaman oda sıcaklıgına getirilmeli ve öyle açılmalıdır bu EDC'nin erkenden bozunmasını önlemektedir. EDC'nin küçük miktarlarını reaksiyon ortamına eklemek için suda stok çözeltisi hazırlanabilmektedir ancak bu çözeltinin kimyasalın aktivitesini

kaybetmemesi için oldukça çabuk hazırlanması ve kısa sürede kullanılması gerekmektedir.

Primer amin ve karboksil grupları içeren birçok molekülün EDC kullanılarak konjugasyonu gerçekleştirilebilmektedir[21],[41].Konjugat oluşum prosesinde öncelikle N-substitue karbodiimidler (karbon atomuna komsu iki azot atomu karbona göre daha elektronegatif olduğundan karbon atomu d+ yüklenir ve karboksilat anyonunun saldırması için oldukça uygun bir yapı oluşur) karboksilik asidler ile reaksiyona girerek oldukça reaktif olan O-açilisoüre ara ürününü oluştururlar. Sonrasında bu aktif ara ürün primer amin gibi nükleofil özellikteki gruplar ile reaksiyona girerek amid bağı üzerinden konjugat oluşumunu gerçekleştirir. Reaksiyon esnasında herhangi başka bir nükleofil de reaktif olabilmektedir. Örnegin sülfidril grupları ara ürüne saldırabilmektedir ancak oluşan tiyoester bağı amid bağı kadar kararlı değildir[21],[41].

Ancak EDC peptidlerin proteinlerle konjugasyonu sırasında moleküllerin kendi içerisinde polimerizasyonu da söz konusudur. Örnegin peptid molekülü hem karboksil grubu hem de amino grubu içerdiğinden karbodiimid tarafından aktive edilen karboksil grubunun oluşturduğu kararsız ara ürüne yine peptid molekülünün amino grubu saldırabilmekte ve bunun sonucunda peptid-protein konjugatının yanı sıra peptidin oligomerlerininin oluşumu da söz konusu olabilmektedir. Birçok çalışmada karbodiimidler için refere edilen optimum pH aralığı 4,7 ile 6'dır. Bunun yanı sıra karbodiimid reaksiyonları pH 7,5'a kadar daha düşük verimle de olsa gerçekleşebilmektedir.

Proteinlerinlerin karboksil gruplarının EDC ile aktivasyonu sırasında bazı yan reaksiyonlar da oluşabilmektedir. Bunlardan bir tanesi yukarıda da değinildiği gibi peptid polimerizasyonu, diğerleri ise protein polimerizasyonu, EDC moleküllerinin peptid ya da protein yapısında açıkta bulunan sülfidril uçları ile reaksiyon girmesi ya da tirozin ucunun EDC ile reaksiyonu ve bunun sonucunda fenolat iyonu oluşumudur[21],[41].



Şekil 2.13 EDC kullanılarak sentezlenen Peptid-BSA konjugasyon mekanizması[21]

2.5.4.2 CMC

Suda çözünebilir özellikteki 1-Siklohegzil-3-(2-morfolinetil) karbodiimid, karboksil ve amino grubu içeren moleküllerin konjugasyonunda kullanılmaktadır. Moleküle suda çözünebilme özelliğini sağlayan yapısındaki pozitif yüklü morfolin grubudur[39].

2.5.4.3 DCC

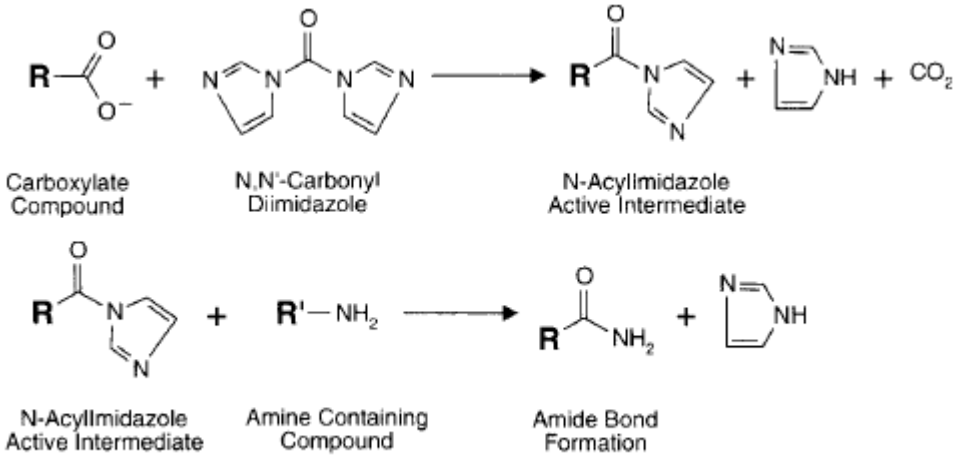
Disiklohegzilkarbodiimid özellikle organik sentez uygulamalarında oldukça sık kullanılan bir çapraz baglayıcıdır. 1955 yılından beri peptid sentezinde kullanılmakta ve halen de kullanımında devam edilmektedir. DCC organik çözücülerde çözünebilir özelliktedir ve 80 °C'a kadar olan sıcaklıklarda kullanılabilmektedir[39].

2.5.4.4 DIC

Diizopropilkarbodiimid suda çözünmeyen özellikteki ve oda sıcaklıgında sıvı olarak bulunan diğer bir karbodiimid çeşididir[39].

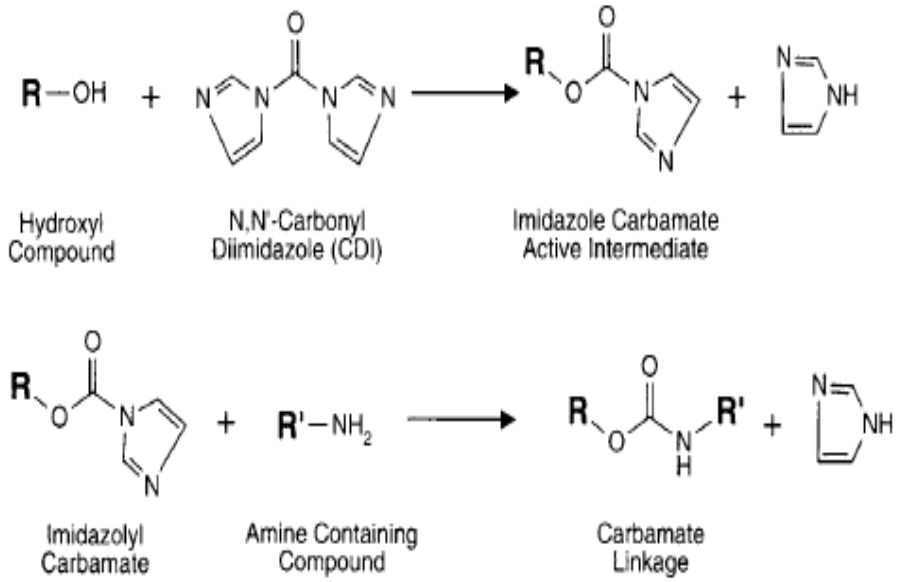
2.5.4.5 N,N-Karbonildiimidazol (CDI)

N,N-karbonildiimidazol yapısında konjugasyon sırasında ayrılan iki adet açilimidazol grubu taşıyan diger bir direkt çapraz baglama reaktifidir[39]. CDI reaktifi, amin içeren moleküller ile hem karboksilat iyonu içeren molekülleri hem de hidroksil gubu içeren molekülleri konjuge etmek için kullanılmaktadır. Karboksil grupları ile reaksiyonunda N-açilimidazol ara ürünü oluştururken, imidazol ve karbondioksit yan ürünlerini de oluşturmaktadır. Karbondioksit ve imidazolün uzaklaştırılması ile sağlanan itici güç sayesinde ara ürünlerin yüksek verimi sağlanabilmektedir. Daha sonra aktif karboksilat gubu amid bağını oluşturmak üzere amin gupları ile yada ester bağları oluşturmak üzere hidroksil grupları ile reaksiyon vermektedir. Bu reaksiyonlar peptid sentezinde de başarılı şekilde kullanılmaktadır.



Şekil 2.14 CDI ile amid bağı oluşum mekanizması[39]

Ancak reaksiyon hidroksil grub içeren molekül ile amin grubu arasında gerçekleştiğinde reaksiyonun ilerleyişi karboksil grubu içerenlerden farklı şekilde devam etmektedir. Hidroksil grubunu aktive eden CDI reaktanı imidazol karbamat aktif ara ürünü oluşturmaktadır. Amin saldırısı sonucu ara ürün imidazol grubunu salar ancak karbonil grubunu bırakmaz. Böylece hidroksil içeren molekülü amin içeren diğer gruba arada tek karbon içeren spacer ile bağlanmış olarak devam eder ve karbamat bağını oluşturur.



Şekil 2.15 CDI ile karbomat bağı oluşum mekanızması[39]

2.6 Biyomoleküller

Biyomoleküller, proteinler, polisakkaritler, yağlar ve nükleik asitler gibi büyük polimer moleküllerinin yanı sıra primer metabolitler, sekonder metabolitler ve doğal ürünler gibi küçük molekülleri de içeren ve de canlı bir organizma tarafından üretilen moleküllerdir. Biyomoleküller, genel olarak karbon, hidrojen, azot ve oksijen içeren organik bileşiklerden örülü yapılardır. Başka elementlerin de bu bileşiklere katıldığı gözlense de, bunlar nadiren görülür.

Genel olarak bu tür maddelere biyojenik madde de denilmektedir. Biyomoleküllerin genel olarak çeşitleri şunlardır;

1. Küçük moleküller:

- Lipidler, fosfolipitler, glikolipitler, steroller, gliserolipidler

- Vitaminler
- Hormonlar, nörotransmitterler
- Metabolitler

2. Monomerler, oligomerler ve polimerler :

Bu molekül sınıfına daha genel olarak biyojenik madde de denilmektedir.

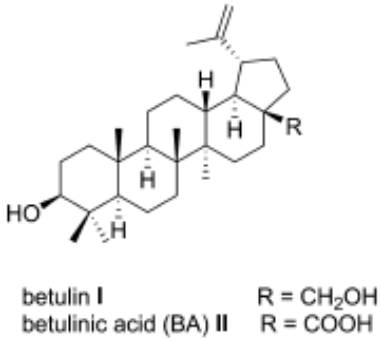
Çizelge 2.7 Biyomonomerlerine göre biyomoleküller

Biyomonomer	Biyo-oligomerler	Biyopolimerler	Polimerizasyon prosesi	Monomerler arası kovalent bağ ismi
Amino asidler	Oligopeptidler	Polipeptidler, proteinler (hemoglobin, albumin…)	Polikondenzasyon	Peptid bağı
Monosakkarid	Oligosakkaridler	Polisakkaridler (selüloz…)	Polikondenzasyon	Glikozidik bağ
İzoprenler	Terpenler	Politerpenler	Polimerik katılma	
Nükleotidler	Oligonükleotid	Polinükleotid Nükleik asit		Fosfodiester bağı

2.6.1 Betulin

Betulin (LUP-20 (29)-ene-3β ,28-diol) doğada bol miktarda yaygın olarak bulunan huş ağacı kabuğundan ekstrakte edilen ve ancak kuru ağırlığının % 30'nu oluşturan önemli bir biyomoleküldür.Molekül kütlesi 442.7 olan betulin lupan grubuna ait pentasiklik triterpen alkol türevi doğal bir moleküldür. Betulinik asit (karboksilik asit grubu yerine alkol grubu) ise çınar ağacı kabuğundan ekstrakte edilebilir veya betulinden hazırlanabilir. Çok yönlü özelliklere sahip betulinin moleküler yapısı modifikasyonlara olan uygunluğu sayesinde mesinal kimya için önemli bir moleküldür. İlk olarak

yapısında bulunan hidroksi grupları daha çözünür olması için başka fonksiyonel gruplara türevlendirme çalışmaları yapılmıştır. Bir diğer çalışma ise triterpenlerde halka açılması modifikasyonudur. Hem betulin hem de betulinik asit immunomodulator, antibakteriyel, antimalaryal, antiinflamatuar, anthelmintik, antimutajenic, antipiretik antioksidan ve insan immün yetmezlik virüsü (HIV) inhibisyonu de dahil olmak üzere çeşitli biyolojik aktiviteye sahip olduğu bilinen pentacyclic triterpenlerdendir. Betulinik asit bir on yıldan fazla süredir cilt kanseri için potansiyel bir tedavi edici molekül olarak araştırılmıştır[42], [43], [44].



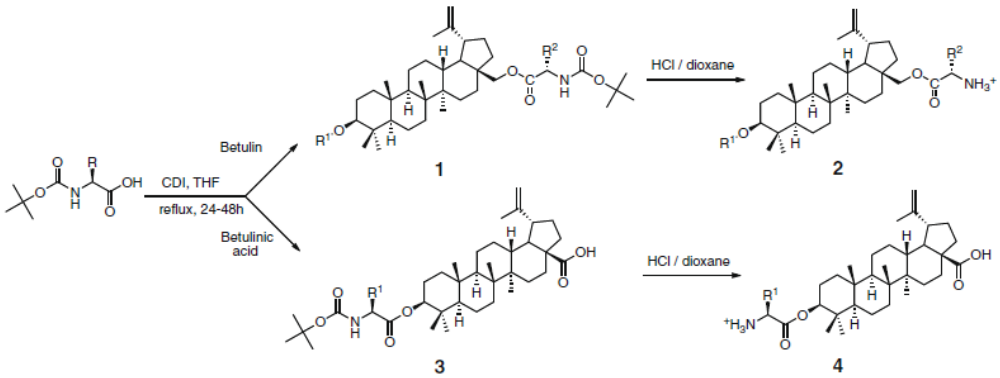
betulin **I** R = CH_2OH
betulinic acid (BA) **II** R = COOH

Şekil 2.16 Betulin ve/veya betulinik asidin moleküler yapısı

Son on yılda melanoma veya cilt kanseri hastalığının sıklığı, ultraviyole ışığa maruz atfedilen diğer kanser türlerine göre daha yüksek bir oranda artıyor, ve endişe verici bir tahmin olarak melanoma hastalığı olan nüfus gelecekte daha da artacaktır. Bu nedenle olası antimelanoma ajanları üzerine yapılan çalışmalar son derece önemlidir. Bu, birçok bitki kaynaklı doğal ürünlerin etkin antikanser pro-ilaçları olarak hizmet verebilecekleri keşfedildi, Örneğin aralarında bitkisel triterpenler olan betulin ve betulinic asit gibi. Betulin ve betulinik asit önemli biyolojik aktivitelere sahip olması son derece ilgi çekerken suda çözünür olmayışları büyük bir dezavantajdır. Medisinal kimya açısından farklı konjugatlarının elde edilmesi, anti kanser apoptis özelliklerinin ve çözünürlüğünün arttırılması amacıyla türevlendirilmeleri ve değişik yan grupların bağlanması çalışmaları devam etmektedir.

Betulin molekülünün çözünürlüğünün, kanser apoptis özelliklerinin arttırılması ve konjugatlarının hazırlanmasına dair yapılan bir çalışmada L-boc koruma gruplu DCC (N,N-disikloheksilkarbodiimid) / DMAP (4 dimetilaminopiridin) aktivatörü ile organik solent THF'de yapılan konjugasyonlar kısmen başarılı olmuştur. %10-15 oranında

verimli bağlanma ancak 5-10 günlük reaksiyon süreleri ile elde edildiği belirtilmiştir. Bunun yerine CDI çapraz bağlayısı kullanılarak THF de 24-48 saat karıştırma ile yapılan konjugasyon sonucunda Boc-Glisin (Gly) korumalı amino asidini mono ve disübstitüe olarak betulin ve betulinik asit molekülüne bağlamanın daha yüksek verim sağladığı rapor edilmiştir. Glisin (Gly) dışında alanin (ala), fenilalanin (Phe), methionin (Met), aminobutirik asit (Abu) ve lizin (Lys) mino asitleri de mono ve disübstitüe şekilde betulin molekülüne bağlanmıştır. Betulinin disübstitüe lizin türevinin en iyi çönürlüğe sahip olduğu belirtilmiştir. Genel olarak Fizyolojik pH (7.4) da 0.02 M fosfat tamponunda ters faz HPLC, 2g ye uygulanmıştır ve oda sıcaklığında 6 günlük inkubisyonda kararlı konjugatlar elde edildiği saptanmıştır[43].



Şekil 2.17 Amino asidin betulin ve betulinik asit ile sübstitüsyon reaksiyonunun gösteriminde 1-koruma gruplu aminoasid – betulin molekülünün oluşumunu, 2-aminoasid – betulin molekülündeki amino asidin Boc koruma grubunun deprotectionını, 3- koruma gruplu aminoasid – betulinik asit molekülünün oluşumunu, 4- aminoasid – betulinik asit molekülündeki amino asidin Boc koruma grubunun deprotectionını göstermektedir[45], [46]

.

Betulin ve betulinik asidin kanser hücrelerini apoptasis yolu ile öldürdüğü bilinmektedir. Kaspaz aracılı apoptozisin aktivasyonunda üç ayrı yolun varlığı bilinmektedir;

1. Mitokondri/Sitokrom-C aracılı apoptozis
2. Hücre yüzey reseptörleri aracılığı ile tetiklenen apoptozis
3. Endoplazmik retikulum aracılı apoptozis

Öne sürülen aktivasyon şekli öncelikle mitekondri membranına tutunması ve kaspaz (öldüren enzim) aktivasyonunu başlatan ve hücreyi öldüren sitokrom c'nin salınmasını sağlamasıdır. Sonuçlar belirgin şekilde serviks karsinomu HeLa hücrelerinin, hepatoma

HepG2 hücrelerinin, akciğer karsinomu hücreleri A549 ve meme kanseri MCF-7 hücrelerinin hücre canlılığını betulinin inhibe ettiğini göstermiştir. Yapılan kinetik analizler sonucu betulin tedavisinin 30 dk kadar kısa süre içerisinde kanser hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelinin depolarizasyonuna ve mitokondriyal sitokrom c salınımına sebep olduğu belirtilmiştir[47].

Betulinin anti-kanser özelliğinin aminoasit modifikasyonundan sonra değişimi de incelenmiştir. Mide kanseri parental (EPG85-257P) ile daunorubisin dayanıklı(EPG85-257RDB) hücre dizilerinde ve pankreas kanseri parental (EPP85-181P) ile daunorubisin dayanıklı (EPP85-181RDB) hücre dizilerinde tüm bileşiklerin SRB testleri 24 saat süreyle uygulanarak en iyi apoptosis gözlenmiş ve de rezistanslı olanlardan 4 kat daha iyi sonuç elde edildiği kaydedilmiştir. Kontrol amaçlı modifiye edilmemiş betulinden ise 10 kat daha fazla kanser hücresi üstünde apoptosise sebep olduğu belirlenmiştir. Suda çözünürlüğün artması ile daha kolay oral yoldan ulaşım ve hedefleme gerçekleştirilebilmesinin sağlanabildiği öngörülmüştür[43].

M. Mustafaeva ve arkadaşlarının yaptıkları diğer bir çalışmada, anyonik polielektrolitlerin betulin molekülü ile (PE-B) konjugatlarının sentezi tiyonilklorid bağlama ajanı kullanarak betulinin hidroksi grupları ile ısıya duyarlı poly(N-isopropilacrilamid-akrilikasid) (CP1) ve poly(N-viniylpirolidon-akrilikasid) (CP2) kopolimerlerinn karboksil gruplarının çapraz bağlanması ile tek adımda gerçekleştirilmiştir[42].

Suda çözünen BSA-betulin kovalent konjugatı (BSA-B) karbodiimid bağlanması yöntemi ile sentezlenmiştir. Betulin içeren polielektrolit konjugatları (PEC-B), sentetik polikatyon - poli(N-alkil-4-vinil-pridinyum bromid) in BSA-B konjugatları ile komplekleştirilmesi vasıtasıyla hazırlamışlardır. CP1-B ve CP2-B ile protein içeren kovalent konjugat sistemleri PEC-B ve BSA-B geleneksel adjuvanlar olmadan fare immünizasyonunda betuline karşı spesifik immün cevabını yükselttiğini gözlemişlerdir. CP2-B, CP1-B konjugatlarında betulinin tersine konjugatlara özgü daha yüksek bağışıklık aktivitesi olduğunu belirtmişleridir. Betulinin önce BSA proteinine daha sonra bir polikatyona olan kompleksleştirme sisteminde ise PE-BSA-B komplekslerinde 160 gün betuline özel antikor yanıtı alınırken BSA-B konjugatlarının immünojenitesinde belirli bir süre içinde hızla azalma olduğunu belirtmişlerdir[42].

CP2'de 35. güne kadar post immünizasyon olması daha etkin bir sonuç olarak kayda alınırken CP1-B de NIPAA nın hidrofobik momoner ünitelerine karşın vinilpirilidon monomer birimleri hidrofilik olmasından kaynakladığının düşünüldüğü belirtilmiştir. Sadece betuline karşı alınan immün yanıt ise beklendiği üzere en düşük değerlerdedir ve yok olarak kabul edilmiştir. BSA-B konjugatlarının polimer-betulin konjugatına kıyasla daha uzun süre immünojenisitesi devam etmiştir. Polikatyonlarla BSA-B komplekslerinin hazırlanması 2 şekilde gerçekleştirilmiştir. Polikatyon olarak poli(N-alkil-4-vinil-pridinyum bromid) sentezlenirken4-vinilpiridin ile 4-vinil-N-etilpiridin kopolimerize edilmesi (PEVP) ve 4-vinil-N-setilpiridin (PEVCP) sentezlenmiştir. Daha sora BSA-Betulin konjugatları ile komplekleri hazırlamıştır ve immünojenitelerine bakılmış, BSA-B konjugatlarının immün yanıtları ile kıyaslandığında benzer sonuç gösterdiği belirtilmiştir (ilk 10 gün artış 40. güne kadar benzer seviye). Ancak farkı immünojenisitenin toplam uzama süresinden gözlemleyebiliriz. PE-BSA-B komplekslerinde 160 güne kadar uzayan immün yanıtlar gözlendiği kaydedilmiştir[42].

2.6.2 Estradiol

Canlı organizmasında endokrin sistemde doku hücreleri arasındaki haberleşmeyi ve cevap oluşturmasını sağlayan, organ ve dokularda fonksiyon düzenleyici bir etki meydana getiren, çok düşük miktarlarıyla görev yapan hareketli maddelere "hormon" adı verilmektedir. Bu bileşikler amino asid, polipeptid, protein veya steroid yapıda olabilirler.

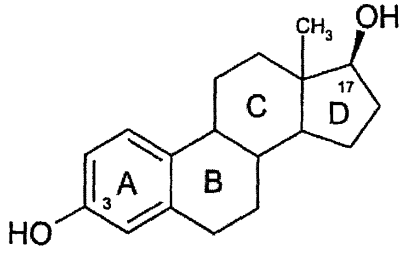
Steroid yapısındaki hormonların en iyi bilinenlerinden bir tanesi estrojenik hormonlardır. Dişi üreme hormonu olarak overlarda sentezlendikten sonra salgılanan bu hormonların başlıcaları estradiol, estron ve estradiol'dür. Estradiol asıl hormon, estron ve estriol ise metabolik ürünler olarak gözükmektedir. Estrojenler karaciğerde glukoronatlar ve sülfatlarla konjugasyona uğrayarak ve diğer organlarda çeşitli etkisiz steroidlere çevrilerek idrarla dışarı idrarla dışarı atılırlar.

Estrojen bileşikleri genelde lipofilitesi yüksek olan yağlarda çözünen bileşiklerdir. Estrojen reseptörleri (ER) hücre çekirdeğinde bulunan büyük protein moleküleridir[46]. ER_{α} ve ER_{β} olmak üzere iki şekilleri mevcuttur. Her iki estrojen

reseptörü de meme, uterus ve over gibi üreme sistemi organlarında, kemik, kardiyovasküler sistem ve çeşitli kanser hücrelerinde farklı oranlarda bulunurlar[48].

Estrojenler, hücrede estrojen reseptörlerinde spesifik bölgeye bağlanarak hedef dokuda etki yapmaktadır[49]. Bu etkileşimde hormon kilide uygun bir anahtar gibi, bir hücre reseptörüne bağlanarak "ligand-hormon reseptör kompleksler" şeklini alır. Bu bağlanma sonucu harekete geçen hormon reseptörü spesifik genlere yönelerek hücresel değişimlere sebep olur[50]. Estrojen reseptörleri hücrenin çekirdeğinde DNA molekülleri ile birlikte bulunmaktadırlar. Estrojen moleküllerinin yokluğunda estrojen reseptörleri inaktirtif ve DNA üzerinde etkisi yoktur. Fakat bir estrojen molekülü bir hücrenin çekirdeğini girdiği zaman onun reseptörüne bağlanır ve reseptörün şekli değişir. Oluşan estrojen-reseptör kompleksi daha sonra spesifik DNA bölümüne bağlanarak "estrogen response" (estrojen cevaplı) eleman adını alır. Genlere yakın yerleştikleri için estojence kontrol edilirler. Estrojen reseptör kompleksinin koaktivatör proteinlere bağlandığı zaman ise daha yakın genler aktif hale geçerek mRNA moleküller üretilir. Rna molekülleri de spesifik proteinlerin sentezine rehberlik ederler[6].

Estrodiol hormonunun kadınlarda ve erkeklerde beyin, deri, mesane gibi birçok doku üzerinde etkili olmasının yanı sıra uterus, meme ve endometrium üzerine oldukça olumsuz etkileri vardır. Estodiolün agonistik etkisi kadınlarda kemik dokusunun korunumu için gerekli olduğu uzun süredir bilinmektedir[51] . Ayrıca bazı deneysel hayvan çalışmaları 17β-estradiol'ün kadınlarda hafıza fonksiyonlarını geliştirdiğini göstermiştir[52].



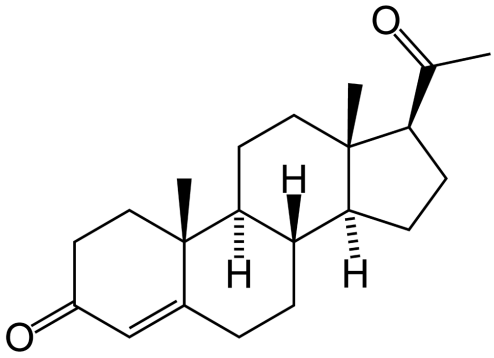
Şekil 2.18 Estradiolün moleküler yapısı[53]

Diğer estrojen türevlerinin yanı sıra, Estradiol en çok bulunan ve fizyolojik bakımdan en etkin hormondur. 17β-estradiol, kolestrolden türemiş olup over tarafından salgılanan en önemli estrojenik steroiddir[54].

İki tür steroizomerik estradiol (α, β) vardır. Bunlardan biri β-estradiol (17β-estradiol; E.N. : 178 ºC) bir diğeri ise α-estradiol (17α-estradiol; E.N. 222 ºC)' dir. α –izomeri diğerine göre daha kuvvetlidir. Estradiol-17 β ilk olarak estronun indirgenmesiyle elde edilmiş olur daha sonra domuz overlerinden elde edilmiştir ve estrona göre daha aktif bir moleküldür[55].

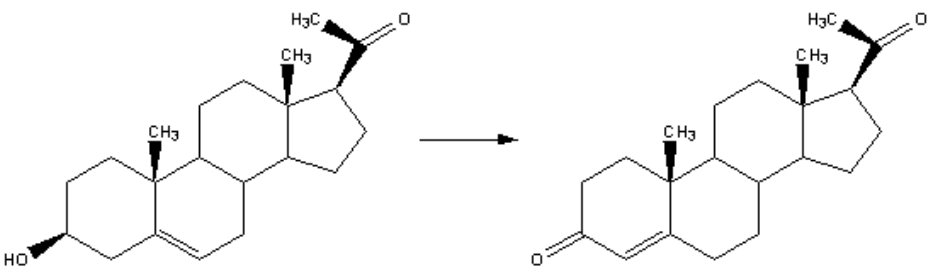
2.6.3 Progestron

Progesteron, insan ve diğer hayvanlarda adet döngüsü, gebelik ve embriyogenezde rol oynayan 21 karbonlu bir steroit hormondur. Progesteron, progestagen adlı bir hormonlar grubuna aittir ve insanlar da bu grubun başta gelen üyesidir.



Şekil 2.19 Progesteronun moleküler yapısı[56]

Diğer steroidler gibi, progesteron da birbirine bağlı dört siklik hidrokarbondan oluşur. Progesteronda keton, metil ve oksijenlenmiş fonksiyonel gruplar bulunur. Diğer steroid hormonlar gibi, polar fonksiyonel grupların yokluğundan dolayı hidrofobiktir. Progesteron, diğer steroid hormonlar gibi, bir kolesterol türevi olan pregnenolondan sentezlenir. Bu dönüşüm iki aşamada gerçekleşir. 3-hidroksil grubu bir keto grubuna dönüşür, ve çift bağ C-4'ten C-5'e geçer.



Şekil 2.20 Pregnenolonun to Progesterona dönüşümü[56]

Progesteron aldosteron (mineralokortikoid) sentezi için önemlidir. 17-hidroksiprogesteron da kortizol (glukokortikoid) ve androstendion (üreme hormonları) için önemlidir.

Progesteron, bir mineralokortikoid olan aldosteronun öncülüdür. Ayrıca, başka bir doğal progesteron olan 17-hidroksiprogesterona dönüştükten sonra, kortizol ve androstendion de ondan kaynaklanır. Andostendion'den testosteron, estron ve estradiol oluşur.

Progesteronun üretildiği yerler, adrenal bezler, eşeysel bezler (özellikle ovülasyondan sonra corpus luteumda), beyin ve, gebelik sırasında, plasentadır. İnsanlarda gebelik sırasında artan miktarda progesteron üretilir. Bu progesteronun kaynağı başta koriyonik gonadotropinler (hCG) tarafından "kurtarılmış" olan corpus luteumdur, ama 8. haftadan sonra progesteron üretimi plasentaya geçer. Plasenta, hammadde olarak anne kaynaklı kolesterol kullanır, üretilen progesteronun büyük bir kısmı annenin kan dolaşımına girer ama bir kısmı fetal dolaşıma girip orada fetal kortikosteroid üretimi için kullanılır. Gebeliğin sonuna doğru plasenta günde 250 mg progesteron üretir[56].

Progesteron molekülünün modifikasyonları, biyouyumlu polimerler ile konjugasyonu ve deney fareleri üzeirnde yapılan immün yanıtların arttırılması çalışmalarının önemi şu şekilde açıklanabilir; Hayvancılık alanındaki, Mandıracılık çalışmalarında yavru veriminde arzu edilen düzeyin elde edilememesi yurdumuzda rastlanılan en önemli sorunlardan birisidir. İnfeksiyoz ve paraziter hastalıklar, hayvanda infertilite sorunları, yetersiz beslenme ve yetiştirme yöntemlerindeki aksaklıklara bağlı olarak bir verim kaybı gözlenmektedir. İneklerde gebelik sürecinin uzun olması (9 ay) ile birlikte doğum sonrası siklik aktivitenin yeniden düzenlenmesindeki aksaklıklar, gizli kızgınlık, gebe olmayanların erken teşhis edilememesi sonucunda tohumlamanın gecikmesi, hayvanların genital bölgelerindeki hastalıklara bağlı olarak buzağılama aralığı 2-3 yıla kadar uzayabilir. Buzağılama aralığının uzun olması ayrıca süt verimini de etkilemektedir. Mandıracılıkta, ineklerin doğum sonrasında en kısa zamanda gebe kalması ekonomik açıdan çok önemlidir. İneklerde optimum doğumu izleyen 85 güne kadar hayvanın gebe kalması istenmektedir. Üretim kontrolü ve hayvanların uygun zamanda gebe kalmalarının sağlanması için veteriner hekimler, en fazla güvenilirliği kanıtlanmış olan, progesteron hormonunun mevcudiyetini teşhis ve tedavide rutin

olarak kullanmaktadırlar. Progesteron corpus luteumdan başka adrenal korteksten ve gebelik sırasında insan, koyun ve kısrakta plesentadan da salınan pregnenalondan sentezlenen 21 karbonlu, 314 dalton ağırlığında steroid yapıda bir cinsiyet hormonudur. Bu hormonun bazı fizyolojik aktiviteleri çok yakın bir şekilde estrojen hormonu ile ilişki halindedir. Bu fizyolojik aktiviteler; endometriumu geliştirerek uterusu implantasyon için hazır hale getirmekte, gebelik süresince folikül gelişimini ve ovulasyonu önleyerek, kızgınlığın ortaya çıkmasını önlemekte ve meme bezlerinin büyümesini ve süt salınımını sitümüle etmektedir. Ayrıca menstrual siklusun 21. ve 22. günlerinde, progesteron düzeyinin yükselmesi ovulasyonun başladığını göstermektedir.

Gebe kalan ineklerde progesteron 21. günde yüksek düzeyde bulunur ve bu özellik erken gebelik teşhisinin temelini oluşturur. Süt ve plazmada progesteron tayini ile gebelik tanısı pozitif ve negatif olarak yapılmaktadır. Tohumlamadan sonraki 19-22. günlerde alınan örneklerde progesteron yüksek düzeyde bulunursa gebelik pozitif olarak değerlendirilir. Bu yüksek miktarlar; yağsız sütte 1.0 ng/ml, plazmada 1,5 ng/ml, süt yağında 90 ng/ml olarak bildirilmiştir. Negatif teşhis ise 19. - 22. günlerde progesteron miktarları plazmada 0,5 ng/ml'den düşük olduğunda belirlenmektedir. Bu yolla gebeliğin negatif teşhisi % 100 oranında gerçekleşmektedir. Vücut sıvılarında hormon miktarının tayin edilmesi bazı fizyolojik olayların açığa kavuşmasını, hastalıkların teşhis ve tedavisi açısından da önemlidir. Yani gebelikte pozitif teşhislerde % 80 oranında doğruluk gözlenirken, % 20 oranındaki hata, hayvanın genital bölgelerindeki enfeksiyon durumuna bağımlı olarak bir artış göstermektedir.Gebelik, bu testler ile 21. güne kadar tesbit edilmediğinde ancak tohumlanmadan 4 ay sonra gözlemlenir Dolayısıyla erken teşhis il 4 ay beklemeden hayvanlar tekrar tohumlanabilmektedir. Zaman kazanımı ile birlikte verimde artacaktır.Ayrıca progesteron insanlarda tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Kadınlarda, adet görmeme durumlarında, adet dışı rahim kanamalarında, ağrılı adetlerde, gebelikte düşük tehlikesini önlemede, rahim kanserlerinde dışardan progesteron uygulanarak tedavi mümkündür. Tedaviye başlamadan önce serumdaki progesteron düzeyinin doğru teşhis edilebilmesi progesterona karşı geliştirilecek monoklonal antikorlarla belirlenebilmektedir. Bu hormonun süt veya plazmada tayininde RIA ve ELISA metodları kullanılmaktadır.

Progesteron tayini için gerekli kitlerin ithal edilmesi hayvancılık ve tıp alanında ekonomik bulunmamaktadır. Bu çalışmada hedeflenen progesterona karşı geliştirilmiş monoklonal antikorlar ile hazırlanacak kitlerin; hayvancılık ve tıp alanında kullanımı ülke ekonomisine büyük yararlar sağlayacaktır[57].

2.7 Aşılar Hakkında Genel Bilgiler

Aşılar, insan ve hayvanlarda humoral ve sellüler karakterde oluşan aktif bağışıklığı uyararak infeksiyonlara karşı koruma sağlayan biyolojik maddelerdir. Ancak, vücudun mikroorganizmalara karşı korunmasında, pasif bağışıklığın da rolü fazladır ve her ikisi (aktif ve pasif bağışıklık) birden etkin olurlar. Sadece biri yeterli değildir.

Aktif bağışıklık için kullanılan aşılar başlıca iki gruba ayrılırlar.

- Klasik (konvansiyonel) aşılar (aktif ve inaktif)
- Biyoteknolojik aşılar

2.7.1 Klasik (Konvansiyonel) Aşılar

Canlıları viral infeksiyonlardan korumak amacıyla hazırlanan klasik aşılar bugün de etkinliğini sürdürmektedir. Bazıları çok iyi bağışıklık (aylar, hayat boyu) vermesine karşın, diğer bir bölümü ise kısa süreli bir immunite sağlamaktadır.

Pratikte kullanılan viral aşılar başlıca 2 tarzda hazırlanmaktadır.

2.7.2 Aktif (Canlı) Aşılar

Bu tür aşılar, virusların doğal veya suni tarzda attenüasyonları sonu elde edilen canlı viruslardan hazırlanırlar. Aşı materyalinde viruslar, bütün olarak (yapısal) ve istenilen konsantrasyonda bulunurlar. Doğal attenüe aşı suşları, suni olarak attenüe edilen suşlardan daha güvenli ve standarttırlar. Tekrar virulens kazanma olasılığı, doğal attenüe suşlarda, çok zayıftır.

Bu aşılar vücuda verildiklerinde, ürer, yayılır ve immun sistemi (lenfoid ve miyeloid hücreleri) uyarırlar. Bu uyarımın, derecesi, vücuda giren virusun, antijenik yapısına, virulensine, miktarına, giriş yoluna ve konakçının bağışıklık durumuna, yaşına, cinsine ve duyarlılığına göre değişebilir. (Örneğin; çiçek aşısı, kızamık aşısı, newcastle aşısı gibi)

2.7.3 İnaktif (Ölü) Aşılar

İnaktif aşılar virulensi yüksek suşların çeşitli yöntemlerle (fiziksel ve kimyasal) inaktive edilmesi sonu hazırlanırlar. İnaktivasyonda kullanılan inaktivanlar virusların antijenik yapılarına zarar vererek veya değiştirerek, vücutta oluşturduğu yanıtta farklılık meydana getirebilir ve virulent suşlara karşı koruma gücünde azalma yaratabilir. Buna dikkat etmek gerekir.

İnaktivasyon iyi yapılamadığı hallerde infeksiyonlara yol açabilir. Vücutta oluşturduğu uyarım genellikle zayıftır. Bunu gidermek için, aşıya çeşitli adjuvantlar karıştırılır ve birlikte vücuda (deri altı veya kas içi) verilirler. Virusun konsantrasyonu da gereklidir. İki veya üç kez kullanırlar. (İnfluenza, kuduz, hepatit B gibi)

2.7.4 Biyoteknolojik Aşılar

Biyoteknolojik yöntemle hazırlanan aşıların avantajlarıoldukça fazladır. Aşı içinde mikroorganizmanın genomunun sadece küçük bir sekansı bulunur, tümü değil. Bu nedenle infeksiyon oluşturmaz. Bu sekans vücutta sadece bağışıklığı uyaran proteini (antijeni) kodlayan bir gen olduğundan, diğer yabancı ve zararlı proteinlerin sentezini spesifiye eden ve konakçıya zarar veren genleri taşımamaktadır. Muhafazası kolaydır ve uzun süre saklanabilir. Ancak, biyoteknolojik aşıların bir kısmı hapten karakteri taşıdığından uygun ve özel adjuvantlarla birlikte vücuda verilmesi gerekmektedir.

Bugün, insan hekimliğinde biyoteknolojik yöntemle hazırlanan ve kullanılan Hepatitis B aşısı oldukça başarılı sonuçlar vermektedir. Diğer önemli hastalıklar için de güvenilir ve etkili aşılar zamanla ortaya çıkacaktır.

Bazı moleküler teknikler kullanılarak hazırlanan aşıları başlıca iki kategoride incelemek mümkündür.

2.7.4.1 İleri Teknoloji ile Hazırlanan Aşılar

1) Sentetik peptid aşılar: İnfeksiyon etkenlerinin (bakteri, virus, parazit) immunojenik olan komponentlerinin protein yapıları (aminoasit sayısı, türü ve sıraları) belirlendikten sonra, in vitro koşullarda yeterli miktarda kimyasal sentezleri yapılır ve elde edilen peptidler aşı olarak kullanılabilir. Bu peptidler (antijenler) vücuda şırınga edilerek

koruyucu antikorların meydana gelmesi sağlanır. Virus, bakteri ve parazitlere karşı koruyucu amaçla sentetik peptidler hazırlanmış ve kullanılmıştır.

Bu aşılar vücutta infeksiyon oluşturmaz ve üremezler. Bu tekniğin kullanıldığı ajanlar arasında bakteriler (E. coli, V. cholerae, S. pyogenes, vs), toksinler (difteri toksini), viruslar (Hepatitis B, influenza, HIVS-1, Poliovirus, şap virusu, vs) ve parazitler (P. falciparum, vs) bulunmaktadır.

2) Antiidiotip antikor aşılar: Spesifik bir etkene (antijene) karşı bir deneme hayvanında hazırlanmış olan idiotip antikorların (Ab1) tekrar farklı bir deney hayvanına verilmesi halinde oluşan antiidiotip antikorlar (Ab2) aşılamada kullanılabilir ve protektif bağışıklık elde edilebilir. Bu ikinci antikorlar (Ab2), ilk verilen antijenin epitopu ile aynı internal imaja sahiptirler ve koruyucu antikorların sentezini uyarırlar.

Bu teknikle bakterilere (H. influenzae, N. meningitidis, S. pneumoniae, E. coli, L. monocytogenes, vs), viruslara (WEE, poliotip-II, kuduz virusu, HSV, Reotip 3, vs) parazitlere (S. mansoni, T. rhodesiense, T. crusei, Eimeriae sp., vs) karşı antiidiotip antikor aşıları hazırlanmış ve kullanılmıştır.

Bu aşılar da infeksiyon oluşturmazlar ve vücutta üremezler.

3) Subünüt aşılar: Bu tür aşılar bir kaç değişik strateji kullanılarak hazırlanabilirler.

a) Mikroorganizmaların antijenik komponentlerinin (pilus, flagella, kapsül, protein, glikoprotein, toksin, peplomer, vs) çeşitli yöntemlerle izole edilip saflaştırıldıktan sonra bunların direkt olarak vücuda verilmesi sonunda bağışıklık sağlanabilir.

b) Mikroorganizmaların antijenik komponentleri (protein) saptandıktan sonra, bu proteinlerin aminoasit sayısı, türü ve sırası belirlenerek laboratuvarlarda özel tekniklerle sentezleri sonunda elde edilen peptidler aşı olarak kullanılabilirler. Bu teknikle bakteri, virus ve parazitlere karşı subunit aşılar hazırlanmıştır.

Bu aşılar da infeksiyon oluşturmaz ve vücutta çoğalmazlar.

2.7.4.2 Genetik Mühendisliği İle Hazırlanan Aşılar

Bu başlık altında, mikroorganizmaların genomlarında, yapılan çeşitli manipulasyonlar sonucunda elde edilen mutant ve rekombinant mutant mikroorganizmalar ile bunların ürünlerinin ve antijenik fraksiyonlarının aşı olarak kullanılması amaçlanmaktadır.

a) Mutant aşılar: Mikroorganizmaların genetik materyallerinde (genomlar) yapay olarak oluşturulan değişiklikler (mutasyonlar) sonucunda meydana gelen ve parental mikroorganizmalardan bir veya birkaç yönden farklı organizmalar (mutant) aşı olarak kullanılabilirler. Bu mutant suşların hastalık yapıcı veya virulens genleri çıkarıldığı için infeksiyon oluşturamazlar, ancak vücutta çoğalabilirler.

Bu tür aşılar arasında bakteriler (S. typhi Ty2la, V. cholareae, S. typhimurium aro ASL 3261 suşu, BCG, MaxSterne, v.s) ve viruslar (kuduz virusu, at vebası virusu, Newcastle virusu, I. bronchitis, v.s.) bulunmaktadır.

Ancak, böyle mutant suşların spontan geri mutasyonlarla tekrar patojenik formları kazanmaları olasıdır. Bu nedenle dikkatli bulunmakta yarar vardır.

b) Subünit aşılar: Subünit aşılar, bir veya birkaç saf veya yarı saf antijenik komponent içeren aşılar olarak kabul edilmektedirler. Bu aşılarda, mikroorganizmaların spesifik antijenik proteinlerini kodlayan genleri çıkarılarak, bunların plasmidle birleştirildikten sonra alıcı hücrede genin ekspresyonunun sağlanması ve elde edilen gen ürününün aşı olarak kullanılması esas amacı oluşturmaktadır.

Örneğin, pilus, kapsül, flagella, toksin genleri, peplomerler, yüzey antijenleri (HBsAg, v.s.), glikoproteinleri v.s kodlayan genler bu tarzda bir bakteri veya bir maya hücresine (S. cerevisiae) kolayca transfer edilebilir ve bu hücreler içinde genin ekspresyonu sağlanabilir.

c) Marker aşılar: Bunlar subunit veya gen delesyon sonu elde edilen aşılar arasında yer alırlar ve diagnostik testlerde, aşılı bireylerle, infekteleri veya portörleri saptamada ve birbirinden ayırmada kullanılırlar. Böyle aşılar Veteriner hekimlikte, ulusal sorun yaratan bulaşıcı hastalıkları kontrol altına almada veya eradikasyonunda yararlanılabilir.

d) Rekombinant mutant aşılar: Bu aşılar, mikroorganizmaların antijenik determinantlarını, komponentlerini ve bazı önemli faktörleri kodlayan genleri, kendi genomlarından çıkardıktan sonra bunları mutant mikroorganizmaların genomlarına integre etmek suretiyle elde edilirler. Örn, BCG, S. typhi Ty21a, S. typhimurium aso SL 3261 vs veya vaccinia virusu genomuna veya diğer mutant viruslara, böyle genler aktarılabilir ve aşı olarak kullanılabilirler. Vaccinia virus genomuna, HBsAg geni, HSV'nin gD geni, influenza virusunun HA geni, kuduz virusun glikoprotein geni, vs. integre edilmiş ve başarılı sonuçlar alınmıştır. Bazen de bir gen yanı sıra birden fazla gen aktarılarak kombine aşılar hazırlanmıştır. E. coli K12 suşu genomuna V. cholerae antijeni veya S. typhimurium 'a (aro SL3261), K88 fimbria, termolabil B toksini geni ve ayrıca M. tuberculosis'in 65kD'luk antijenik determinantı inkorpore edilerek kullanılmıştır.

e) Rekombinant ürünü aşılar: Bu tür aşılarda, mikroorganizmaların antijenik komponentleri çıkarıldıktan sonra alıcı bir hücreye (bakteri, maya) transferi, burada gen ürünü antijenik proteinin ekspresyonunun sağlanması, hücrelerde biriken proteinlerin elde edilmesi ve bunların deneme hayvanlarına verilerek bağışıklık kazandırılması amaçlanır. Bu teknikle bazı bakteri, virus ve parazitlere karşı aşılar hazırlanmıştır.

f) Nukleik asit aşıları (DNA aşıları): DNA aşıları da rekombinant DNA teknolojisi temeline dayalı ve gen mühendisliği yardımıyla elde edilen aşılar arasında yer almakta ve deneme hayvanları üzerinde de ümit verici sonuçlar alındığı açıklanmaktadır[58].

2.7.5 Kanser Aşıları

Son yıllarda kanser aşılarının geliştirilmesine yönelik çalışmalar hızla artmaktadır. Kanserle savaşmada immun sistemi uyarmak ise çok eksiden beri üzerine çalışılan bir yaklaşımdır.

William B. Coley ilk kez 1900 – 1936 yılları arasında streptokok kültürünü ileri sarkoma (bağ doku malignant kanseri) hastatalarını tedavi etmede kullanmıştır. Sonuç tümöre karşı immün cevabın oluşumudur ve bu ilk kez kullanılan kanser aşısı olarak bilim tarihine geçmiştir. Günümüzde bakteri ekstraktlarına ait bileşenlerin genel anlamda immun cevabı uyardığını biliyoruz. Coley aynı düşünçeyle “bacille Calmette-Guerin”

(BCG)'yi mesane kanserinin tedavisinde başarıyla kullanmıştır. 1980'lerde Rosenberg ileri düzeydeki kanser tedavilerinde interlökin -2 (IL-2)' yi kullanmıştır. Hastalarda %15-20 gerileme görülmüştür. IL-2 solid tümör büyümesi üzerine doğrudan etki etmez anti-tümör etkini T hücrelerini etkilemesiyle göstermektedir. Bütün bu aşılar immün sistemi uyararak tümöre karşı daha etkili bir cevap oluşmasına neden olur.

2.7.5.1 Tümörün İmmün Özellikleri

Tümörler iki nedenden dolayı kuvvetli bir immun tepki oluşturmazlar. Birincisi erken embriyonik evrede normal hücrelerin antijenlerini –kendi antijenlerini – tanıyan tüm lenfositler kendi dokusuna karşı immun cevabı engellemek için yok edilir. Bu "self tolerance" olarak adlandırılır. Tümör hücreleri normal hücrelerden çok farklı olmadıkları için tümör hücreleri de immünolojik açıdan toleranslıdır. (örneğin immun sistem tarafından ihmal edilirler) İkincisi tümörlerin aktif şekilde immun sistemden kaçmalarıdır.

Genelde tümörler zayıf immünogenik özellikte olup immün cevabı tetiklemezler

İki tip tümör antijeni bilinmektedir.

1) Bazı tümörler normal hücrelerde bulunmayan özel tip antijenlere sahiptir. Bunlar tümöre özgü antijenler (TSA) olarak adlandırılır. TSA'ler infeksiyöz ajanlar tarafından indüklenen tümörlerde bulunur. (örneğin Epstein BArr virusu tarafından indüklenen Burkitt's lenfoma da görülen EBNA-1 antijeni gibi). Baş ve boyun kanserlerindeki tümör hücrelerinde normal hücrelerden farklı olarak mutant kaspaz 8 olduğu bulunmuştur.

2) Pek çok tümör "tumor-associated antigens" (TAA) tümör ilişkili antijenler olarak adlandırılan normal hücrelere benzer fakat modifiye olmuş veya fazla miktarda üretilen antijenlere sahitir. Bazı TAA'lar tümöre özgü (MAGE antijenleri melanoma özgü) olmakla beraber bazıları pek çok farklı tümörde (testis kanseri antijenleri normal testislerde, prostat karsinoma, meme karsinoma ve akciğer karsinomada da) bulunmaktadır.

Tümörlerin İmmun sistemden kurtulması

Tümörler birkaç yolla immun sistemden kaçabilirler

1) İmmun sistemdeki işlev bozukluğu kanser hücreleri tarafından indüklenir. Kanser hastalarında ve hayvan modellerde immün sistemde bazı immun bozukluklar bulunmuştur.

a) Antijen sunumundaki bozukluklar: Tümör hücreleri genellikle stabil değildirler ve genlerini bazı durumlarda kromozomların bir kısmını kaybedebilirler. MHC sınıf 1 genlerinin kaybı tümör antijenlerinin tümör hücre yüzeyinde olamayacağı anlamına gelmektedir. Bu durum tümörün CTL cevabından kaçmasına neden olur.

b) T hücresi işlev bozukluklarına yola açan anomaliler: Tümör hücreleri arjinin amino asitini tüketen arjinaz enzimini kodlar. Arjinin T hücre reseptörünün önemli bir aadir. Bu nedenle arjinin azalması antjenin T hücresini tanıma özelliğinin kaybolmasına ve T hücresinin işlevini yapamamasına neden olur. Helicobacter pylori (mide ülseri) ve Mycobacteria (leprosy and tuberculosis), infeksiyonlarında da arjinaz üretimi iş görmektedir.

c) Dendritik hücre bozuklukları: Pek çok tümör immünogenik olmadığından dendritik hücreler T hücre aktivasyonundan sorumludur. Tümörler growth faktörler salgılayarak kemik iliğinde dendritik hücrelerin oluşumunu inhibe ederler. Bazı tümörler IL-10 düzeyini artırarak kostimulatör molekül olan CD80 veCD86'nın üretimini azaltırlar CD80 ve 86 T hücrelerin aktivasyonu için gereklidir. Bu iki molekülün yokluğunda T hücreleri tümör hücrelerine toleranslı olur ve immun cevap oluşumunu başlatamazlar. Dendritik hücre işlevini etkileyen üçüncü yol tümör hücresinden salgılanan nitrik oksittir ve Hidrojen peroksit dendritik hücrenin ölüme gitmesine neden olur.

2) İmmün Baskılama: Siklooksijenaz -2 (COX-2) akciğer kanser hücreleri tarafından üretilen bir enzimdir ve immün sistem üzerinde çeşitli etkilere sahiptir ve kanserin metastazına neden olur. Fare modelinde Cox-2 eksikliğinin tümör büyümesini durduğu gözlenmiştir. Cox-2 inhibitörleri metastazı önlemede kullanılmaktadır.

3) Hücre delesyonu: Bazı tümörler anti tümör cevabın başlamasına neden olacak tümör antijeni için gelişen T hücrelerini aktif bir şekilde öldürürler. Örneğin plazmositoid tümör antijeni için spesifik T hücreleri delesyona uğratılıp fareye verildiğinde immun cevaptan kaçış gözlenmiştir.

4) İmmün ihmal : İmmün ihmal T hücrelerinin tümör antijenini tanımak için kör olmaları demektir. Bu durum immün baskılamadan farklıdır. Nedenleri henüz tam aydınlatılamamıştır.

Günümüzde hayvan modeller pek çok kanser türü için oluşturulmuştur ve sıçan modeller kanser aşılarının çalışılması için kullanılmaktadır. Klinik uygulamalar bazı kanser aşıları için yapılmakta bazıları için de süreçler devam etmektedir.

a. Önleyici Terapötik (tedavi edici) Kanser aşıları

İnfeksiyon hastalıkları önlemek için kullanılan aşılar önleyici aşılardır. Kanser aşılarının ise tedavi edici (gelişen tümörün yok edilmesi) olması beklenir. Bu beklentiye uymayanlar seviks (rahim) kanserine neden olan "Human papilloma virus (HPV)" ve gastrit kanserine neden olduğu düşünülen Helicobacter pylori bakterileri gibi infeksiyöz ajanlar tarafından indüklenen kanserleri önlemek için kullanılan aşılardır. HPV16 ve HPV18 birlikte serviks kanserinin %70'inden sorumludur ve bu iki ırka karşı geliştirilen bir aşı büyük bir umut gibi gözümektedir. Teorik olarak kanserin önlenmesi örneğin meme kanserinde mutant hormon reseptörü gibi farklı antijenler üreten mutant gene sahip kanserler için de etkili olabilir. Terapötik aşılar; Kanserlerin çoğu infeksiyöz ajanlar tarafından oluşturulmaz. Bu nedenle kanser aşısı geliştirmede tümör antijenlerini hedef almak çok önemlidir. Otoimmün sistemi uyarmadan tümör antijenlerine karşı uzun süreli immünolojik hafızayı uyarmak oldukça güçtür.

b. Kanser Aşılarının Tasarlanması

İdeal bir kanser aşısı konakta kuvvetli anti tümör cevabı indükler. Bu nedenle kanser aşılarının iki önemli elementi immün cevabın "özgünlüğü" ve "gücü"dür. Özgünlük T-hücre reseptörü veya antikor tarafından tümör antijeninin tanınmasını ifade eder. Tümörler zayıf immünogenik özellikte olduğundan immün cevabın gücünün immünüstimulatörler tarafından artırılması gerekir.

Kanser aşılarında genel immün uyarımınında en çok tercih edilen klasik adjuvanlar; hemosiyanin, bakterilere ait liposakkaritler ve BCG olarak sıralanabilir. Buna alternatif olarak sentetik polielektrolit adjuvanlarda kullanılmaktadır.

c. Kanser aşılarının tipleri

Protein kimyası ve genomik çalışmalardaki ilerlemeler tümör antijenlerinin tanımlanmasına ve potansiyel kanser terapisinde kullanılmasına izin vermektedir.

* Tümör antijen DNA aşıları: İlk yaklaşım tümör antijenini kodlayan DNA'nın hayvan veya bireye aktarmaktı. DNA antijen sunan hücreler tarafından alınır ve tümör antijeni hücrede üretilir. Daha sonra hücre yüzeyinde MHC-antijen kompleks olarak sunulur ve sitotoksik T hücreyi aktive eder. Araştırmalar tümör kodlayan gen için uygun vektör bulmak üzere devam etmektedir. Aşının gen anlatımının uzatılması ile ilişkili çeşitli viral vektörler denenmiştir. Viral vektör temelli aşılar tümörün gerilediği hayvan modellerde başarılı olmakla beraber klinik denemeler başarılı olmamıştır. İnsanlarda başarısızlığın nedeni infeksiyon hastalıklar için bebeklikten itibaren olunan aşılardır. İmmün sistem vektör olarak kullanılan bu virüslara karşı reaksiyon vermektedir.

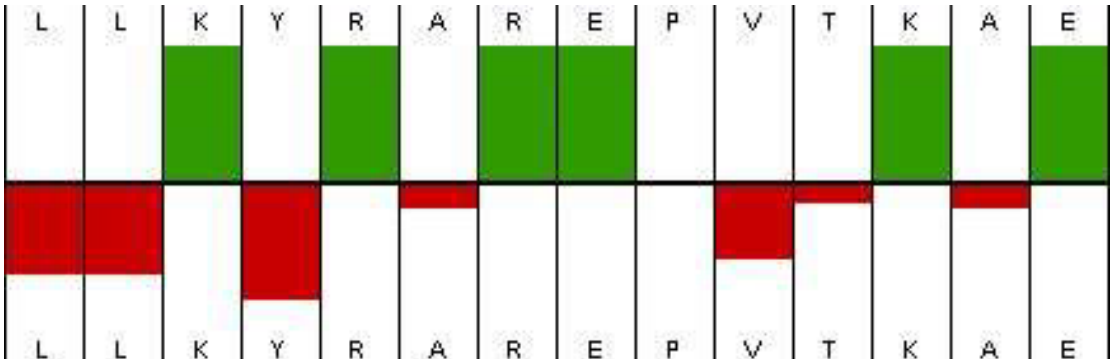
* Tümör antijeni temelli sentetik peptit aşılar: Bir parça tümör antijenine karşılık gelen sentetik sentezlenmiş kısa bir protein parçası (peptit) doğrudan hastaya aktarılır. Kullanılan peptit normal dokularda fazla miktarlarda olmamalıdır. 9 amino asitlik peptit aşının myeloid lösemi hastalarının klinik uygulamalarında umut verici sonuçları olmuştur. Diğer peptit aşılar ise karışık sonuçlar vermektedir.

* Karbohidrat antijenlere karşı antikor indükleyen aşılar: Hücre yüzeyi karbohidratlara karşı antikor cevabının indüklenmesiyle her bir tümör hücresi ve erken metastas önlenebilir. "Thompsen-Freidenreich antijeni normal hücrelerde olmayan fakat karsinomada bulunan küçük bir moleküldür ve kanserin erken aşamasında anlatılır. Bu tümör antijeni pek çok kanser tipiyle ortak özellik taşıdığı için kullanımı etkin bir şeçim olabilir[59], [60], [61].

Kanser hastalarının kanından alınan sitolitik T lenfositleri tarafından tanınan tümör antijenlerini kodlayan MAGE-3 geninin önemi son yıllarda hakkında pek çok çalışma yapılmasına sebep olmuştur. Mage genel olarak MAGE A, B, C adlı üç gen kümesinde ilişkili 18 geni ihtiva eden bir gen ailesidir. Bu genler insan tümor hücrelerinin farklı histolojik tiplerinde belirtilmiştir fakat erkek gamet hücreleri için normal hücrelerde beklendiği üzere sessizdir. MAGE A, B, C kodlanmış antijenler doğrudan tümör

spesifiktirler ve kanser immünoterapisi için özellikle önemli olduğu belirtilmiştir. MAGE A grubu yerine MAGE 3A yada MAGE 3 ismi de reesmi olarak kullanılmaktadır.

MAGE 3 (121-134) dizesinin tek harf gösterimi ; LLKYRAREPVTKAE ve üç harf gösterimi; H - Leu - Leu - Lys - Tyr - Arg - Ala - Arg - Glu - Pro - Val - Thr - Lys - Ala - Glu – OH' dirç Molekül ağırlığı 1674.0 g/mol[62], [63].



Şekil 2.21 MAGE-3 121-134 (LLKYRAREPVTKAE) hidrofilik peptid dizisine ait amino asitlerin hidrofobik ve hidrofilik olarak gösterimi

Melanomun kısmi veya tam regrese(gerileme) olabilmesi, vitiligo (pigment kaybına bağlı deride beyaz, yama tarzında lekelerle giden bir deri hastalığıdır.) benzeri depigmentasyon ve halo nevus (Nadiren bir benin etrafında beyaz bir halka oluşur ki bu tip benlere "halo nevüs" denir. Bunlar genellikle çocukluk ve ergenlik çağında ortaya çıkarlar ve zamanla hem ben hem de çevresinde ki beyaz halka kendiliğinden kaybolur.) gelişiminin immünsuprese (immün sistemi baskılanmış) hastalarda daha yüksek oranlarda gözlenmesi, melanomun immünojenik bir tümör olduğunu düşündürmüştür. Tanımlanan majör melanom antijenleri, mutasyona uğramış antijenler (örn. mutasyone p16), kanser/ testis ailesinin paylaşılan tümör- spesifik antijenleri (örn. Mage-1, -3, NY-ESO-1) ve diferansiyasyon antijenlerini (örn. tirozinaz, gp100, MelanA/ MART-1) kapsar. Bu proteinler hücre içinde işlenerek melanom hücresi yüzeyinde MHC/ peptid kompleksleri olarak sunulurlar. CD8+ sitotoksik T hücreleri bu antijenik oluşumları tanıyarak eğer uygun şekilde aktive olmuşlarsa tümör hücrelerini öldürebilirler. Melanom hastalarında genellikle bu sistem başarılı olamaz ancak spesifik immünoterapilerle aktive edilebilir [64].

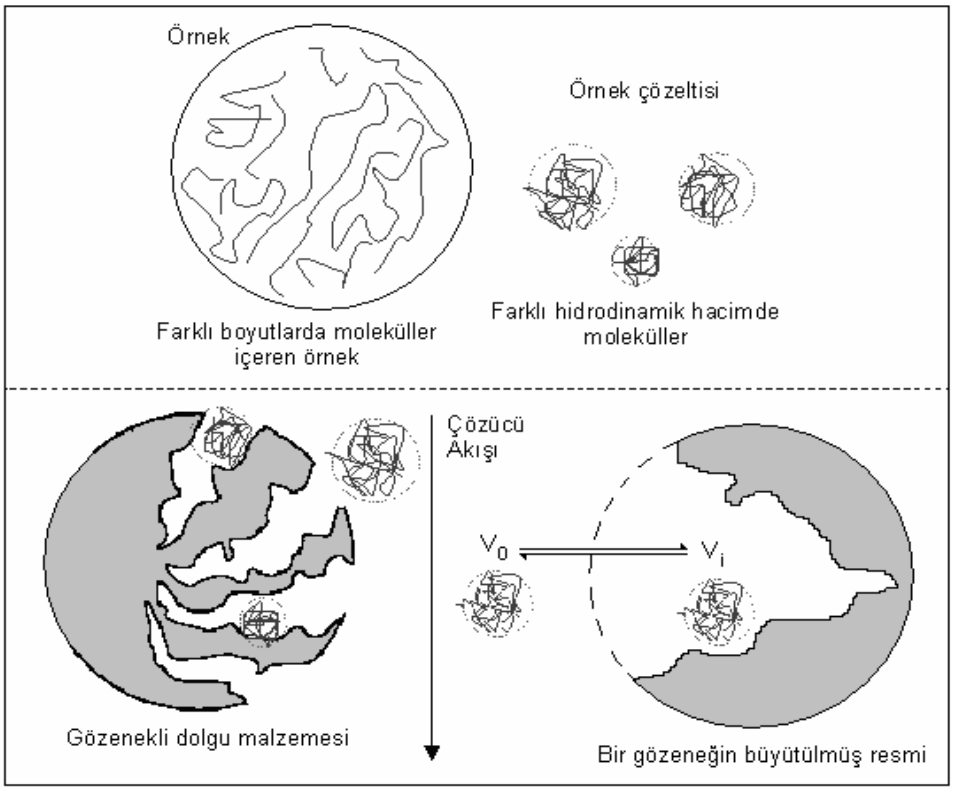
BÖLÜM 3

KULLANILAN ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ

3.1 Moleküler Eleme Kromatografisi

Kromatografi çeşitli maddeleri (biyolojik moleküller, sentetik polimerler, sentetik peptidler vb.) incelemek için kullanılan fizikokimyasal bir yöntemdir. Metod bileşenlerin, 10 cm (HPLC) ile 30 cm (GC) arasında değişen boylarda kalibre edilmiş tüplerden oluşan kromatografik kolon içerisinden geçerken ayrılması temeline dayanmaktadır ve kolon silikajel, çapraz bağlı polimer gibi özel dolgu maddeleri ile doldurulur[7].

Ayırma sırasında belirli bir anda her bir molekül türünün belli bir kısmı gözeneklerin içinde bulunur. Molekül ne kadar ufaksa gözenek içinde o kadar çok molekül bulunur (büyük moleküllerin tamamı gözeneklerin dışındadır). Büyük moleküller sterik engellemeden dolayı gözeneklere giremezken ufak moleküllerin önemli bir kısmı gözeneklere girer. Ufak moleküller gözeneklerin içinde daha uzun süre bulunurlar. Sabit faz partiküllerinin dışında kalan büyük moleküller hareketli fazla birlikte hareket eder. Bu sebeple büyük moleküller ufaklardan daha önce kolondan çıkar [65].



Şekil 3.1 SEC'in ayırma mekanizması [66]

Moleküler Eleme Kromatografisi polimer, protein, peptid vb. bileşenlerin fiziksel etkileşimler doğrultusunda; molekül ağırlığı, boyutu ve şekli temel alınarak likit kromatografi ile ayrılmasında kullanılmaktadır. Monomerik, oligomerik ya da polimerik çok bileşenli sistemler, mikro gözeneklere sahip jelde, moleküler eleme prensibine göre ayrılmaktadır. Çalışmamızda kullanılan protein, peptid gibi biyolojk moleküllerin molekül boyutları birbirlerinden farklıdır. BSA çözeltilerinde; monomer, dimer ve trimer olarak bulunmaktadır. Çalıştığımız triterpen yapıdaki biyomoleküllr ve peptid dizeleri ise BSA ya ve polimerlere göre çok daha küçük molekül boyutuna sahiptirler. Bu şekilde farklı boyutlardaki moleküllerin karışımından oluşan çözeltide her bir molekülün hidrodinamik çapı ve hidrodinamik hacmi birbirlerinden farklı olacaktır. Konjugat karışımımızda bulunan serbest peptid, N-metilimidazol ya da üre türevi gibi küçük moleküller gözeneklerde daha uzun kalacakları için kolondan daha geç çıkacaklardır. Oysa molekül çapı çok daha büyük olan BSA, polimer ve konjugatları gibi moleküllerin gözenekler ile etkileşimi çok daha az olacağından kolonda daha kısa süre kalacak ve sistemden daha çabuk çıkacaktır. Bu şekilde molekül çapı büyüdükçe kolonda kalma süresi buna ters orantılı olarak azalacaktır. Jel geçirgenlik

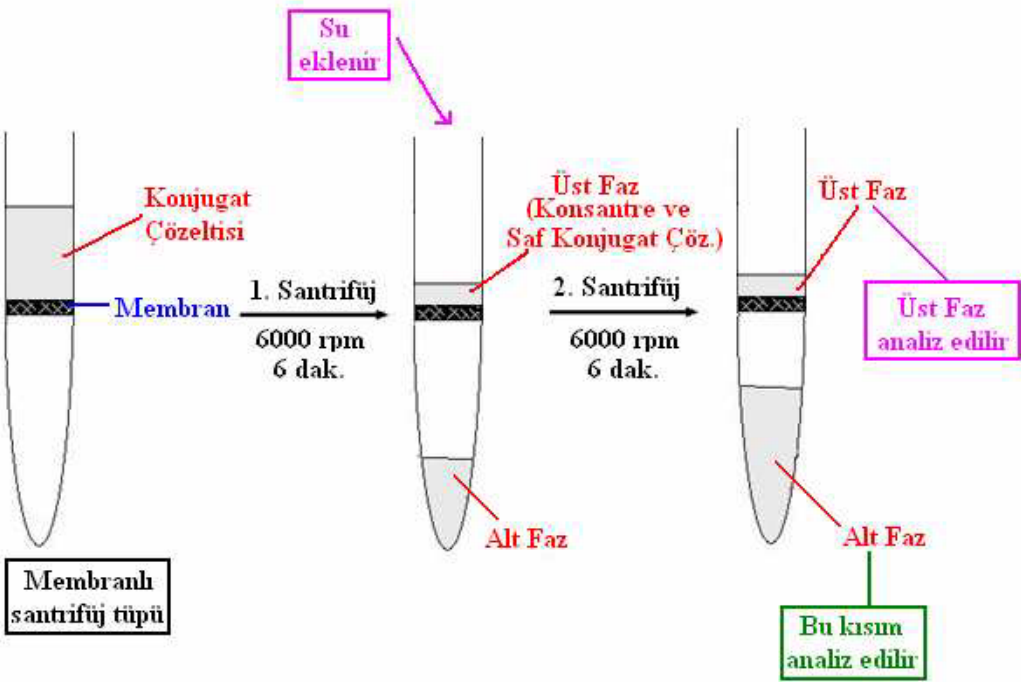
kromatografisinde (gel permeation chromatography, GPC) sistemi terk eden moleküller ise UV, Vizkozite, Işık saçılması ya da RI detektörlerinde saptanacak ve sinyale dönüştürülerek kromatogram elde edilmektdir. GPC, apolar türlerin ayrılmasında kullanılır. Apolar sabit faz, apolar hareketli faz kullanılır. Bu teknik genelde polimer karakterizasyonu için polimer kimyası alanında kullanılmaktadır[2], [41].

3.2 Konjugatların Saflaştırılması

Konjugasyon işleminden sonra elde edilen Polimer-Peptid ve Peptid-Protein konjugatları üre türevi ya da reaksiyona girmemiş çapraz bağlayıcıların fazlasından çeşitli yöntemler kullanılarak ayrılır ve saflaştırılabilir. Bu yöntemlerin içerisinde en yaygın olarak kullanılanları; Molekuler Eleme Kromatografisi (Kolon) uygulanması, Gaz basınclı filtrasyon ya da Santrifujlu filtrasyon (membranlı santrifuj tüpleri ile) uygulamalarıdır.

3.2.1 Santrifujlu Filtrasyon (Membranlı Santrifuj Tupleri)

Çeşitli boyutlardaki molekülleri ayıracak özelliğe sahip mebranları içeren santrifuj tüpleri konjugatların istenmeyen küçük molekullerden ayrılmasında kullanılmaktadır. Bunun icin ayrılacak çözelti membranlı tüpe konulur ve tüpün değişen devir ve sürede santrifujlenmesi sonucu membranın gözeneklerinden daha küçük molekulerin gecerek alt fazda toplanması ile büyük moleküller (konjugat) üst fazda kalırlar. Böylelikle konjugat hem saflaştırmış hem de konsantre edilmiş olur[67].



Şekil 3.2 Membranlı santrifüj tüpü kullanılarak konjugatların konsantre edilmesi ve saflaştırılmasının şematik göserimi[67]

3.3 Elisa Yöntemi:

ELISA, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay testinin İngilizce kısaltmasıdır. Antijen-antikor ilişkisini, antikora bağlanmış bir enzimin aktivitesini araştırmak temeline dayanan kantitatif ölçüm yöntemidir. Antijene karşı antikor ya da antikora karşı antijen aramak mümkündür. Virüs ve parazit enfeksiyonlarında kullanılan bir tanı yöntemidir; immobilize edilmiş antijen kullanılarak kompetetif olmayan indirek boyama yöntemi kullanılm [68] aktadır.

Elisa yönteminde, antijen ya da antikor bir enzimle işaretlenmekte ve immunolojik reaksiyon, enzimatik bir aktivite sonucu ölçülmektedir. Duyarlı spesifik ve çabuk sonuç veren bir testtir. Serodiagnostik"de kolay ve hızlı olmasından dolayı geniş bir uygulama alanı bulmuştur.

Elisa yönteminde antijen, katı bir faza bağlanmaktadır. Katı faz olarak rigid plystyrene, polyvinyl ve polypropylene'den yapılmış tüpler ve mikropleytlerin daha uygun olduğunu belirtmişlerdir. Antijen ve antikoru uygun bir şekilde adsorbe eden ve diğer safhalarda yer alan komponentleri adsorbe etmeyen özellikte mikropleytler tercih edilmelidir. Elisa'da enzim olarak beta galaktozidaz, glukozoksidaz, peroksidaz ve

alkalin fosfotaz kullanılmaktadır. Yüksek aktivite gösterdiği ve ona karşı seçilen susbstratın ucuz ve nontoksik olduğu için genellikle alkalin fosfatazı tercih edilmektedir[41].

Çizelge 3.1 Elisa Protokolleri[69]

ELISA protokolü	Kullanımları	Gerekli kimyasallar	Yorumlar
Indirekt	Antikor aramada	Antijen saf veya yarı saf antikor içeren tez solüsyonu immunize örneklerde Ig'i bağlayan enzim konjugatı	Önceden varolan spesifik antikorların kullanımına gerek duyulmaz. Relatif olarak fazla miktarda antijen gerektirir.
Direkt kompetatif(yarışmacı)	Antijen aramada, çözünür antijeni saptamada	Antijen saf veya yarı saf; antijen içeren test solüsyonu; spesifik antijen için enzim-antikor konjugatı	Sadece iki basamaktan oluşan hızlı test; antijeni çapraz reaksiyonu ölçmede çok kullanışlı
Antikor-sandviç yöntemi	Antijen aramada, çözünür antijeni saptamada	Antikor yakalama(capture) (saf veya yarı saf spesifik antikor); antijen içeren test solüsyonu, antijen için spesifik enzim-antikor konjugatı	En hassas antijen testi; relative olarak fazla miktarda saf veya yarı saf antikor gerektirir (antikor yakalama)

Çizelge 3.1 Elisa Protokolleri (devam)

Çift antikor-sandviç yöntemi	Antikor arama	Antikor yakalama(capture) (immunize örneklerde Ig için spesifik); antijen içeren test solüsyonu, antijen için spesifik enzim-antikor konjugatı	Saflaştırılmış antijen gerektirmez; beş basamaklı relative olarak uzun bir testir
Direkt hücresel yöntem	Antijen ekspresse eden hücrelerin aranmasında; hücresel antijen ekspresyonunun ölçülmesi	İlgili antijen ekspresse eden hücreler; hücresel antijen için spesifik enzim-antikor konjugatı	Fazla miktarda taramada hassas bir testir; heterojen karışık hücre gruplarında hassas değildir
Indirekt hücresel yöntem	Hücresel antijenlere karşı oluşan antikorların aranmasında	Immunizasyonda kullanılan hücreler antikor test solusyonları; immunize örneklerde Ig bağlayan enzim konjugatı	Düşük miktarda ekpresse edilen hücresel antijenler için spesifik antikorları saptamayabilir.

Elisa testinin her evresi için aşağıda belirtilen optimum şartlar gereklidir.

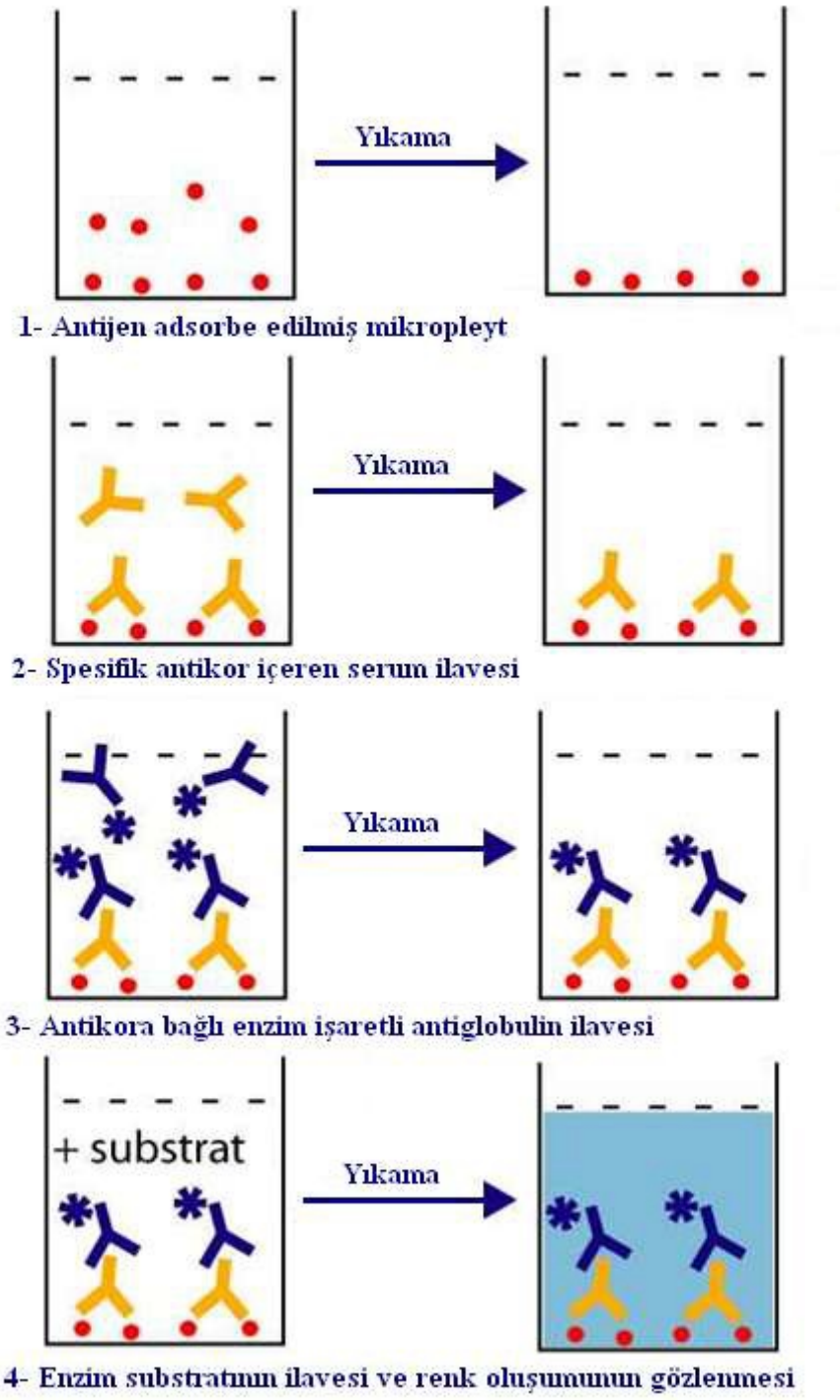
1. Solid fazın kaplamasında antijen veya antikor optimum konsantrasyonda olmalıdır.

2. İnkübasyon süresi ve sıcaklığı optimum olmalıdır.

3. En uygun substrat seçilmelidir.

Antijen ve antikorun optimum konsantrasyonunun saptanmasında chequer board yöntemi ile referans numuneler kullanılır. Direkt Elisa yöntemi ise yüksek molekül ağırlıklı antijenin miktar tayini için uygundur.

Indirekt metotda antijen, solid faza pasif adsorbsiyonla immobilize edilir. Daha sonra test serumu ilave edilerek belli süre inkübe edilir. Eğer test serumlarında ki antikorlar ile solid fazdaki antijenler uygun ise bağlama meydana gelir. Daha sonra yıkama solusyonu ile yıkama işlemi yapılır. Yıkama ile reaksiyona girmemiş komponentler ortamdan uzaklaştırılır ve sonar ağır zincir spesifik antihuman IgG konjugatı ilave edilir.



Şekil 3.3 İndirekt Elisa Yöntemi[41]

Antikor aramak için;

Bilinen antijen plastik bir yüzeye yapıştırılır. Mikro-Elisa sisteminde bu antijen her hasta için kullanılmak üzere yapılan çukurların yüzeyine kaplanır. Antikor aranacak hasta serumu bu çukurlara konur. Bir süre beklenir ve yıkanır. Eğer serumda uygun antikor varsa antijenle birleşir.

Bir enzim ile işaretlenmiş insan globülini antiserumu eklenir. Bir süre beklenir ve yıkanır. İncelenmekte olan serumda antijene uygun antikor var ise antijene bağlanmış olacağından bu son eklenen enzim ile işaretlenmiş insan antiglobülini de bağlayacak ve yıkama ile uzaklaştırılamayacaktır.

Enzime uygun bir kromojen substrat eklenir. Sisteme bağlanmış enzim bu substratı parçaladığında ortaya çıkan renk, yapılacak kolorimetrik yöntemlerle ölçülerek bağlanmış olan enzim dolayısıyla bağlanmış olan antikor hakkında fikir verecektir[68].



Şekil 3.4 Enzim substratının ilavesinden sonra renk değişiminin görünümü

3.4 Sitotoksisite

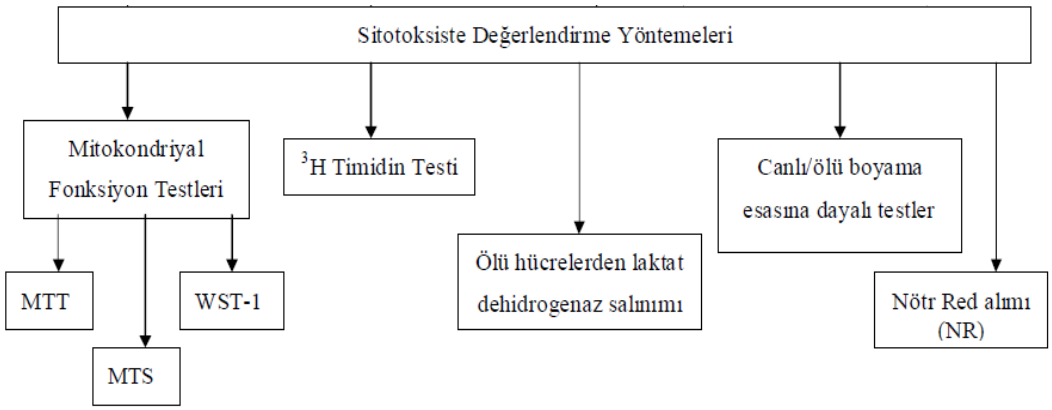
Sitotoksisite, medikal etken bir maddenin hücreler üzerindeki zararlı etkilerini saptamaya yönelik olarak standardize edilmiş, hızlı, duyarlı ve pahalı olmayan bir yöntemdir ve tüm medikal testler için gereklidir. Geçmişten bugüne hücre kültürü çalışmalarında hücre canlılığını ve çoğalmasını belirlemek için birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden en kullanışlı olanlar, 96 kuyucuklu plakaların kullanıldığı modern deneylerdir. Böylece birçok örnek aynı anda ve hızlı analiz edilebilmektedir. Sitotoksisite deneyleri değişik parametreleri kullanarak hücre ölümünü ve çoğalımını belirler[70].

Sitotoksik etki, hücre yapısı ya da fonksiyonunda hasar oluşturan kimyasal bileşiğin sıklıkla bölünmekte olan hücreleri selektif olarak ortadan kaldırmak için kullanılan antineoplastik ilaçları tanımlamak için de kullanılmaktadır. Ne tüm antineoplastikler sitotoksiktir, ne de tüm sitotoksik bileşikler kanser tedavisinde kullanılmaktadır[71].

Sitotoksisite kimyasalların hücreler ve dokular üzerindeki aktivasyon mekanizmasının anlaşılmasında önemli bir faktördür. Sitotoksisitenin karsinogenesis ve inflasyonunda içinde bulunduğu patolojik proseslerde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Sitotoksisite serbest radikaller, irritantlar ve genotoksinlerinde içinde bulunduğu diğer ajanların aktivitelerinde etkilidir[72].

Sitotoksisitenin in vitro testler ile ölçülmesinin birçok faydası bulunmaktadır. Bunlardan biri, toksisite testleri için kullanılan hayvan sayısını en aza indirmesidir. In vitro testlerin bir diğer avantajı hücre ya da organın toksik etkiye karşı mekanizmasının belirlenebilmesidir. Yeni ürünlerin toksisitesinin in vitro yöntemlerle üretimin erken evrelerinde belirlenebilmesi, harcanan para, zaman ve deney hayvanlarından kazanç sağlayabilir[72].

In vitro sitotoksisite testleri hücre canlılığı, hücre proliferasyonu, membrane bütünlüğü, DNA sentezi ya da hücresel metabolizma gibi çeşitli parametrelerin ölçülmesiyle temel hücre toksisitesinide belirler. Bu parametreleri ölçen çeşitli sitotoksisite deneyleri vardır.



Şekil 3.5 Sitotoksiste test yöntemleri[73]

En çok kullanılan yöntemler neutral red uptake deneyi (hücre canlılığı için), Lowry Coomassie Blue ve Kenacid blue deneyleri (toplam hücre proteini ve hücre proliferasyonunu belirlemek için), MTT (mitokondriyal aktivite ve hücresel metabolizmayı belirlemek için) ve intraselüler laktat dehidrogenaz (LDH) aktivite testi

(hücre lizizini belirlemek için) Trypan blue (TB) yöntemi, Sulforhodamine B (SRB) yöntemi, WST yöntemi dir[74].

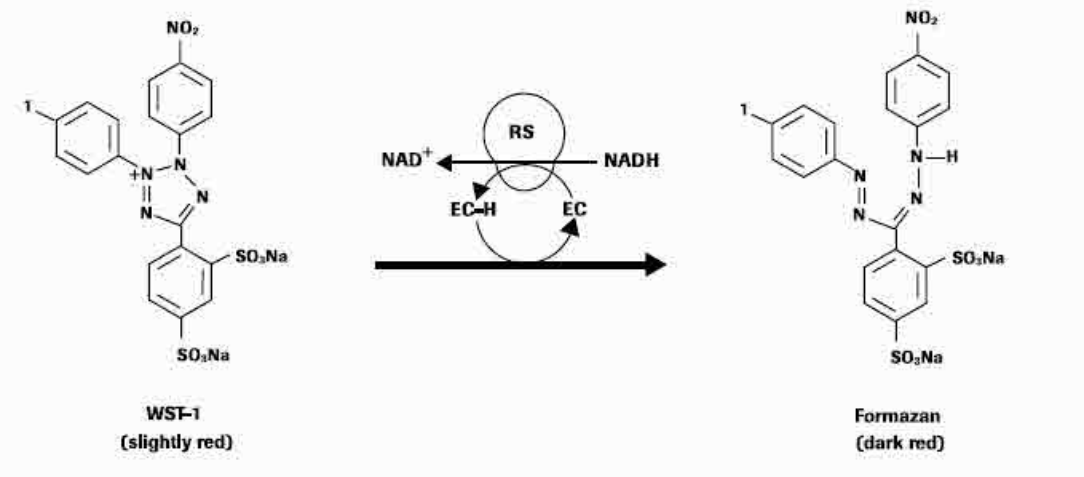
Kimyasalların sitotoksisitesi hücre ölümünün, canlılığının, hücre yapısının, morfolojisinin, enerji metabolizmasının ve hücre çoğalmasının ölçülmesi gibi çeşitli farklı noktalarla belirlenebilir. Bir bileşiğin sitotoksik etkisi test edilirken hücrelerin genel mekanizması ve hücre tiplerine özgü mekanizmalar göz önünde tutulmalıdır[62]. Hücre canlılığının belirlenmesi mutagenesiz, malignant transformasyon, apoptosis, hücresel patoloji ve farmosötik toksisiteyi değerlendirmede oldukça önemlidir. Çünkü sadece canlı hücrelerin değişimiyle oluşur. Ölen hücrelerdeki sinyaller ve diğer değişimler karsinogenez araştırmalarında önemli değildir[75].

Sitotoksisite deneyleri in vitro çalışmalarda sıkça kullanılmaktadır. Neutral Red (NR), WST-1 ve MTT (tetrazolyum tuz redüksiyon) deneyleri monolayer kültürlerde sitotoksisite ölçümleri ya da toksik madde varlığında hücre canlılığının belirlenmesinde sık kullanılan yöntemlerdir[76].

Neutral Red deneyi boyanın yaşayan hücrelerin lizozomlarında birikmesi temeline dayanır. MTT ve WST-1 deneyleri ise mitokondriyal aktivitenin ölçülmesi temeline dayanmaktadır [77].

3.4.1 WST-1 Testi

Tetrazolyum tuzu olan [4[3-(4-Iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen disülfonat), WST-1] birincil olarak yüzeyde gerçekleşen kompoleks bir hücresel mekanizmayla formazana dönüştürülür. Bu biyoindirgenme canlı hücreler tarafından nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADP) veya indirgenmiş nikotinamid adenine dinükleotit fosfat (NADPH) üretimine bağlıdır. Böylece oluşan formazan boya miktarı hücre kültüründeki metabolik olarak aktif canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır[78].



Şekil 3.6 WST-1'in formazana dönüşümü [RS: mitokondriyal süksinat-tetrazolyum redüktaz sistem, EC: elektron alıcı ajan (electron coupling reagent)] [79]

BÖLÜM 4

DENEYSEL KISIM

4.1 Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

4.1.1 Kullanılan Cihazlar

- Hanna Instruments pH 211
- WTW pH level 1 pH metre
- Precisa XB 220A Hassas Terazi
- Sartorius CP 225D
- Hettich Eba20 Santrifüj Cihazı
- Heraeus Biofuge Stratos
- Heildolph MR 3001 Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı
- IKAMAG Çoklu Karıştırıcı
- Finnpipette Micropipet (1-10 mL, 100-1000 mL, 5-50 mL)
- Viscotek 4 Detektörlü GPC (SEC) Sistemi (Viscotek TDA 302 üçlü detektör dizisi,
- Viscotek Model 2501 UV detektörü, Viscotek GPCmax VE2001 örnek modülü kısımlarından oluşur.)
- Shimadzu HPLC Sistemi
- Jasco V-530 UV-VIS Spektrofotometre

- Milipore-Q Gradient Ultra Saf Su Cihazı
- Milestone Microsynth Mikro Dalga Sentez Cihazı
- FTIR
- ThermoLab System Mikroplaka Yıkayıcı 4MK2
- ThermoLab System Multiskan Ascent Mikroplaka okuyucu

4.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çizelge 4.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kimyasalın Adı	**Alındığı Firma ve Kodu**
Bovin serum albumin, (BSA) Sigma A-4503	Sigma A-4503
1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorid (EDC)	Sigma E-7750
Dimetilsülfoksid (DMSO)	Amresco 0231
Sodyum dihidrojen fosfat, (NaH2PO4)	Riedel-de Haën 04361
Sodyum hidrojen fosfat,(Na2HPO4.7H2O)	Fluka 71647
Sodyum klorür, (NaCl)	Fluka 71376
Sodyum hidroksit, (NaOH)	Fluka 06203
Hidroklorik asit, (HCl)	Riedel-de Haën 07102
Sodyum azid, (NaN3)	Applichem A1430
Poliakrilikasid	Aldrich S23925
Polimetilvinile termaleikanhidrid	Sigma 416339
MAGE3 (121-134) peptid dizesi	GenScript 16169000LC03

Çizelge 4.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler(devam)

D-(+) Glukoz (C6H12O6)	Sigma 67528
Magnezyumklorür (MgCl2)	Applichem A1036
Sodyumsitrat 5,5hidrat	Merck A 339731408
Çinkoklorür (ZnCl2)	Riedel-de Haën 31650
Sitrikasitmonohidrat	Fluka 27490
Trisodyumfosfat	Fluka 71908
Tween 20	Applichem A10890500
1,1’-Karbonildiimidazol (CDI)	Sigma 115533
Tiyanülklorür	Fluka 88952
Tetrahidrofuran	Sigma 16212

4.2 Polivinilpirolidon-akrilik asit Kopolimeri Sentezi

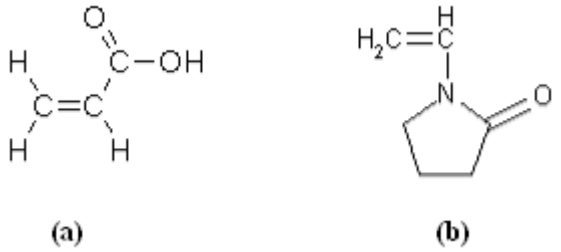
Grubumuzun daha önceki çalışmalarında da polivinilpirolidon-akrilik asit kopolimeri sentezlenmiş ve hem termal yöntemle hem de mikrodalga desteği ile sentzlenen bu kopolimerlerin yapıları aydınlatılmıştır. Melanoma NT-ESO-1 antijenlerinin 157-167, 155-163 peptid dizilerinin sentezi ve polielektrolitler ile biyokonjugatlarinin geliştirilmesi isimli tezdeki çalışmalarda bahsedildiği gibi 1:1, 2:1 ve 1:3 VP-AA kopolimeri her iki yöntemle de elde edilmiştir. GPC cihazından elde edilen bu sentezlere ait molekül ağırlıkları ise sırasıyla 35.678 g/mol, 68.908 g/mol ve 573.978 g/mol olarak elde edilmiştir. Bu çalışmamızda da VP-AA oranı için 2:1 seçilerek tekrarlanmış, elde edilen kopolimerin yapısı FTIR cihazı ile ve molekül ağırlığı da GPC ile aydınlatılmıştır.

Vinilprolidon-akrilik asit kopolimeri radikalik polimerizasyon yöntemi ile benzoilperoksit başlatıcısı kullanılarak vinil pirrolidon : akrilik asid = 2:1 bileşenlerin oranında kopolimer sentezlenmiştir. Sentezlenen polimerlerin karakterizasyonu FT-IR analizi ile gerçekleştirilmiş ve molekül ağırlığı hepsaplamaları yine bölümümüzdeki 4 detektörlü GPC cihazında elde edilen sonuçlar ile yapılmıştır.

Genel olarak, akrilik asit (AA) ve vinil pirrolidon (VP) monomerlerine THF solventinde, benzoil peroksit ile kobaltnaftanat redoks katalisti varlığında kopolimerleşme reaksiyonu verdirilir.

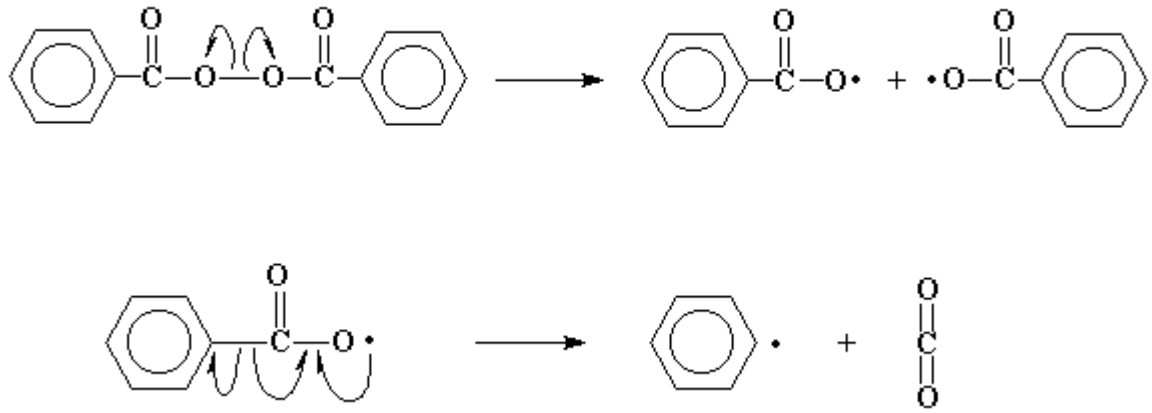
Karbon-karbon çifte bağının nispeten daha düşük kararlılığa sahip olmasından dolayı, özellikle serbest radikallerle kolayca tepkime verebilmektedir.

Katılma polimerizasyonun en önemli tiplerinden biri çiftleşmemiş elektron içeren elektriksel olarak nötral serbest radikallerle başlatılan polimerizasyondur. Bu tip polimerizasyonda doymamış monomerler tipik zincir reaksiyonu verirler ve bu da vinil polimerizasyonu olarak bilinmektedir. Polimerizasyon, basit gaz fazı zincir reaksiyonları için kullanılan ultraviolet radyasyon aktivasyon yöntemi, ısı vb. yöntemler ile başlatılabilir. Bu çalışmada ısı yolu ile reaksiyon yürütülmüştür. Tipik bir zincir polimerizasyonunda başlatıcı etkisi binlerce monomer molekülünün polimerizasyonuna neden olabilir[41].

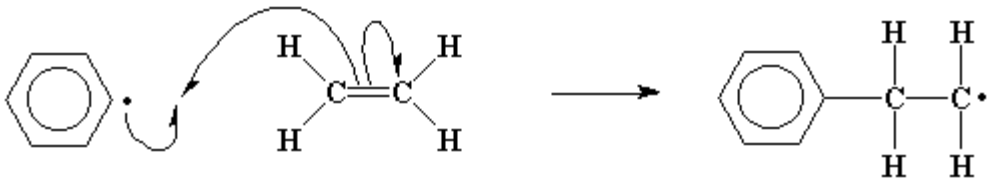


(a) (b)

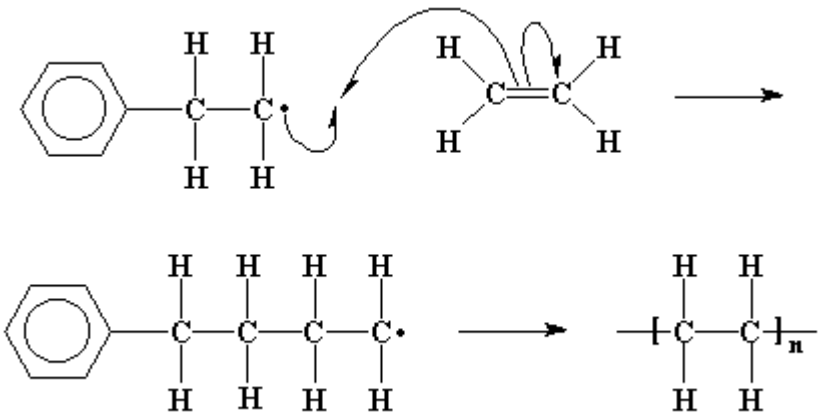
Şekil 4.1 Polimerizasyon iÇleminde kullanılan, vinil monomerleri olarak adlandırılan akrilik asit (AA) (a) ve vinil pirolidon (VP) (b) monomerlerinin moleküler yapıları.



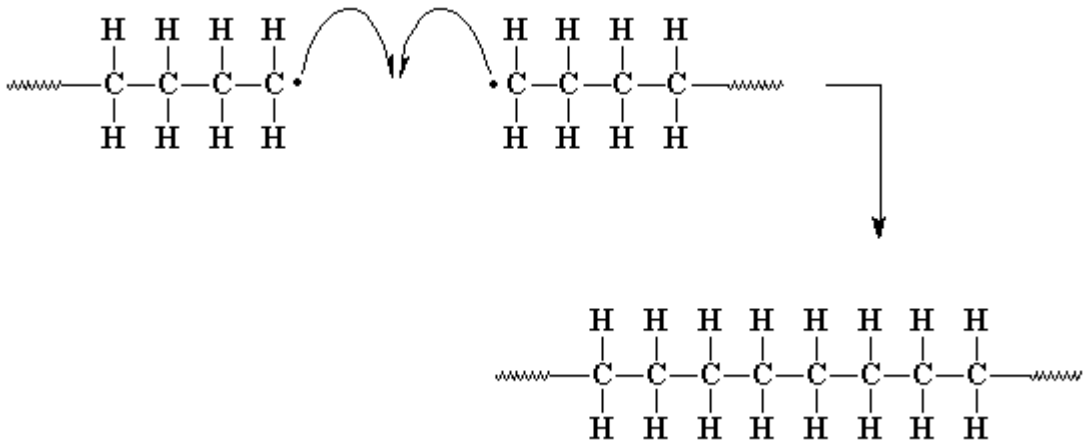
Şekil 4.2 Radikalik polimerizasyonun başlaması (initiation) için kullanılan benzol peroksitin radikal halini alması.



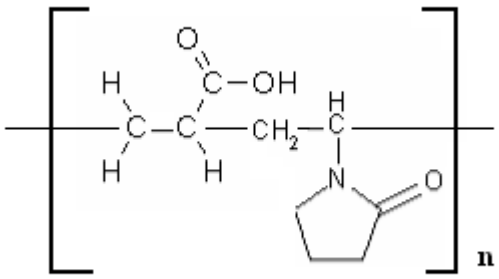
Şekil 4.3 Reaksiyonun ilerlemesi için ilk monomerin radikale katılımı.



Şekil 4.4 Reaksiyonun ilerlemesi; monomerin zincirle birleşmesi.



Şekil 4.5 Sonlanma aşamasında (radikallerin ortadan kalkma aşaması) iki zincir birbiri ile birleşerek reaksiyonun sonlanması[41]



Şekil 4.6 Akrilik asit-vinil pirolidon kopolimeri[41]

4.2.1 VP – AA = 2:1 Kopolimeri Sentezi:

Glacial akrilik asit (48 g) ve vinilpirrolidon-2 (111 g) 350 g THF içerisinde karıştırılır. Benzoil peroksit (318 mg) ve kobalt naftanat (32 mg) akrilik asit ve vinilpirolidon karıştırılırken ortama eklenir. Bu işlemler esnasında sıcaklık 65-70 ^{o}C' de tutulur. Polimerizasyon N_2 gazı varlığında 3 saat sürer. VP-AA kopolimeri kirli beyaz kristalin katı şeklinde oluşmuştur. Reaksiyon sonucunda kopolimer çökelti olarak elde edilir. Çökelti filtre edilir ve 40 ^{o}C' de vakum etüvde kurutulur. Reaksiyon sonucunda verim % 98,5 dir. . Suda çözünmesi yüksektir, derişik yada yarı derişik HCl içerisinde de çözünmektedir. Sentezlenen polimerlerin karakterizasyonu FT-IR analizi ile gerçekleştirilmiş ve molekül ağırlığı (Mw) hepsaplaması yine bölümümüzdeki 4 detektörlü GPC cihazında elde edilen sonuçlar ile yapılmıştır.

4.3 BSA proteininin poly(metil vinil eter-co-maleik anhidrid) kopolimeri ile EDC yönteminin konvensiyonel ve mikrodalga altında konjugasyonu

4.3.1 Konjugasyonlarda Kullanılan Çözeltiler

0,01 mol/lt'lik PBS Tamponu (pH=7) : 2.6807g Na_2HPO_4.7H2O (Mw=268.07 g/mol) tartılarak 500 ml ultra saf suda çözünür. Daha sonra 1.56g $NaH_2PO_4.2H_2O$ (Mw=156.01 g/mol) tartılarak 450 ml ultra saf suda çözünür. Hazırlanan 400 ml'lik NaH_2PO_4 çözeltisi 1 L'lik balon joje içerisindeki Na_2HPO_4 çözeltisinin üzerine eklenir ve karıştırılır. Bu karışıma son olarak 8.766 g NaCl eklenir ve tekrar karıitırılır. Karışımın pH'ı ölçülür ve 1 M NaOH yada 1 M HCl kullanılarak pH=7'ye ayarlanır. Ultra saf su kullanılarak çözelti hacmi 1 L olacak şekilde hacim tamamlanır.

4.3.2 Konvensiyonel ve MW Destekli Hazırlanan P(MVE-MA)-BSA Konjugatlarına Ait Hesaplamalar

Her iki yöntemin kıyaslanabilmesi için $n_{BSA}/n_{P(MVE-MA)}$ = 0,25; 0,50; 1; 3; 5 olmak üzere 5 farklı oranda konjugatlar hem EDC varlığında konvensiyonel konjugasyon yöntemiyle hem de mikrodalga destekli konjugasyon yöntemiyle sentezlenmiştir. P(MVE-MA) koplimerinin

pK: 3.64 kJ.mol^{-1} (Jens et al. 2007) ve PBS pH:7 de GPC kromatografi yöntemi ile in Mw: 70 kDa, Mn: 63.388 kDa, Mz: 78.934 kDa olarak bulunmuş, hesaplamalarda Mw:70 kDa olarak kullanılmıştır. Sentetik BSA molekülünün ise Mw: 66 kDa ve pI:4,9'dur[80].

1) $n_{BSA}/n_{P(MVE\text{-}MA)}$ = 0,25 olan 4 ml P(MVE-MA)-BSA konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{BSA}}{n_{P(MVE-MA)}} = \frac{c_{BSA}\,.\,M_{P(MVE-MA)}}{c_{P(MVE-MA)}.\,M_{BSA}} = 0{,}25 \Rightarrow \frac{\frac{Xmg}{4ml}\,.70{,}000}{66{,}000\;.\frac{4mg}{4ml}}$$

⇒0,94 mg BSA/4ml

2) $n_{BSA}/n_{P(MVE\text{-}MA)}$ = 0,50 olan 4 ml P(MVE-MA)-BSA konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{BSA}}{n_{P(MVE-MA)}} = \frac{c_{BSA}\,.\,M_{P(MVE-MA)}}{c_{P(MVE-MA)}.\,M_{BSA}} = 0{,}5 \Rightarrow \frac{\frac{Xmg}{4ml}\,.70{,}000}{66{,}000\;.\frac{4mg}{4ml}}$$

⇒ 1,88mg BSA /4ml

3) $n_{BSA}/n_{P(MVE\text{-}MA)}$ = 1 olan 4 ml P(MVE-MA)-BSA konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{BSA}}{n_{P(MVE-MA)}} = \frac{c_{BSA}\,.\,M_{P(MVE-MA)}}{c_{P(MVE-MA)}.\,M_{BSA}} = 1 \Rightarrow \frac{\frac{Xmg}{4ml}\,.70{,}000}{66{,}000\;.\frac{4mg}{4ml}}$$

⇒ 3,76mg BSA /4ml

4) $n_{BSA}/n_{P(MVE\text{-}MA)}$ = 3 olan 4 ml P(MVE-MA)-BSA konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{BSA}}{n_{P(MVE-MA)}} = \frac{c_{BSA}\,.\,M_{P(MVE-MA)}}{c_{P(MVE-MA)}.\,M_{BSA}} = 3 \Rightarrow \frac{\frac{Xmg}{4ml}\,.70{,}000}{66{,}000\;.\frac{4mg}{4ml}}$$

⇒ 11,28mg BSA /4ml

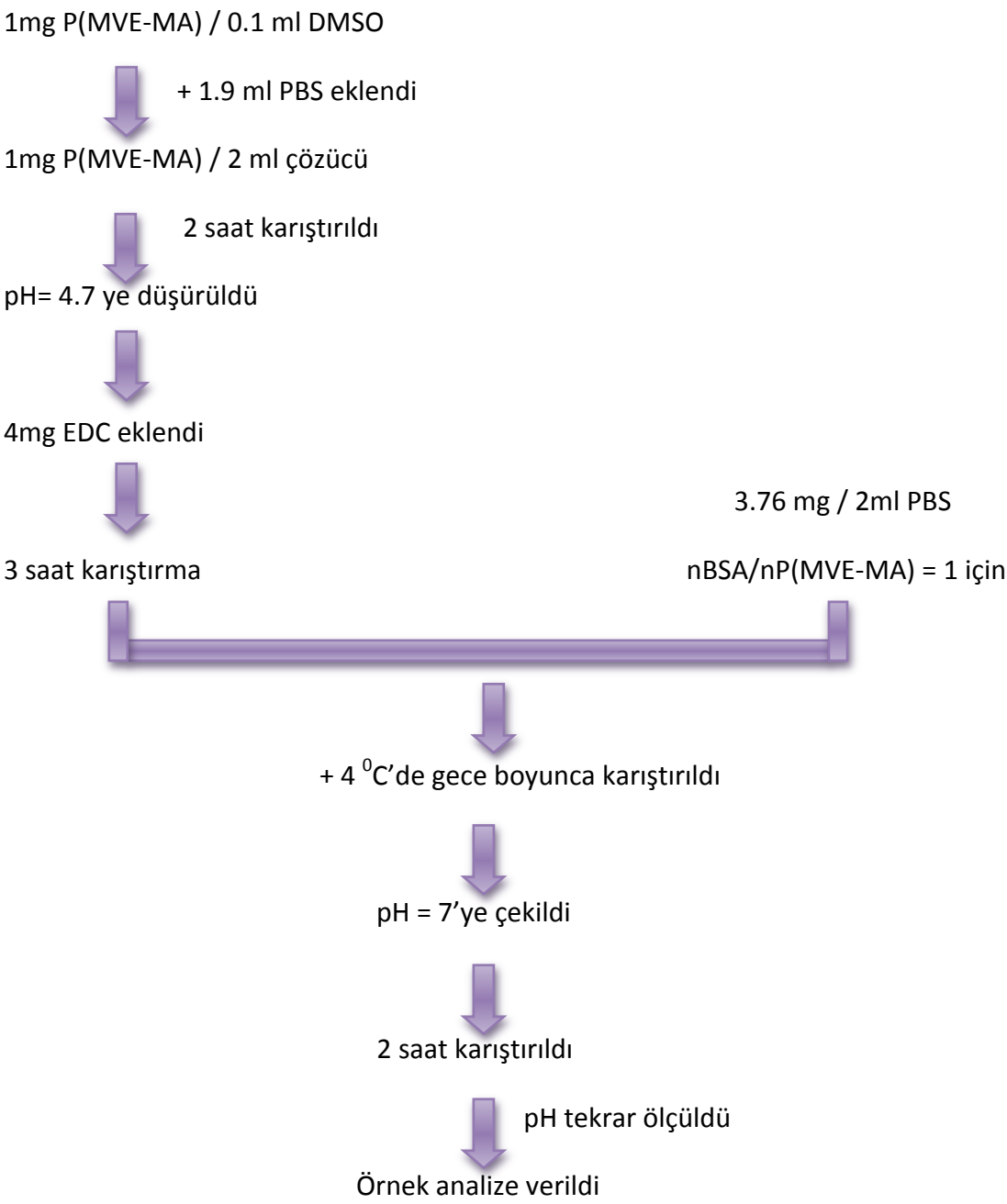
5) $n_{BSA}/n_{P(MVE\text{-}MA)}$ = 5 olan 4 ml P(MVE-MA)-BSA konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{BSA}}{n_{P(MVE-MA)}} = \frac{c_{BSA}\,.\,M_{P(MVE-MA)}}{c_{P(MVE-MA)}.\,M_{BSA}} = 5 \Rightarrow \frac{\frac{Xmg}{4ml}\,.70{,}000}{66{,}000\,.\frac{4mg}{4ml}}$$

$\Rightarrow$ 18,80mg BSA /4ml

4.3.3 Konvensiyonel Yöntem ile P(MVE-MA)-BSA Konjugatlarının Hazırlanışı

1mg P(MVE-MA) 0,1 ml DMSO ile oda sıcaklığında karıştırılarak çözüldükten sonra en fazla %5 organik solvent sınırlarını aşmamak için 1,9 ml PBS herhangi bir misel oluşmasını engellemek için hızlı karıştırma ile çözeltiye yavaş yavaş eklenmiştir. PBS sayesinde kopolimerdeki anhidrid yapı hidrolize olarak polielektrolit yapısına kavuşturulmuştur. En yüksek EDC akticasyonunu sağlamak için çözelti pH'ı 4.7'ye ayarlanmıştır. Kopolimerdeki karboksil gruplarının aktivasyonunu sağlamak için oda sıcaklığında 3 saat karıştırma yapıldıktan sonra n=0,25 ; 0,50 ; 1 ; 3 ; 5 oranlarına göre tartılan BSA 2 ml PBS de çözülerek aktive edilmiş kopolimere eklenmiştir. 1 gece boyu +4 ^{0}C'de karıştırılan çözeltide konjugasyon reaksiyonu tamamlandı ve pH 7 ye tekrar ayarlandıktan sonra analiz için hazır hale gelmiştir. Şekil 4.7'de konvensiyonel yöntem ile p(mve-ma)-bsa konjugatlarının hazırlanış şeması gösterilmektedir.

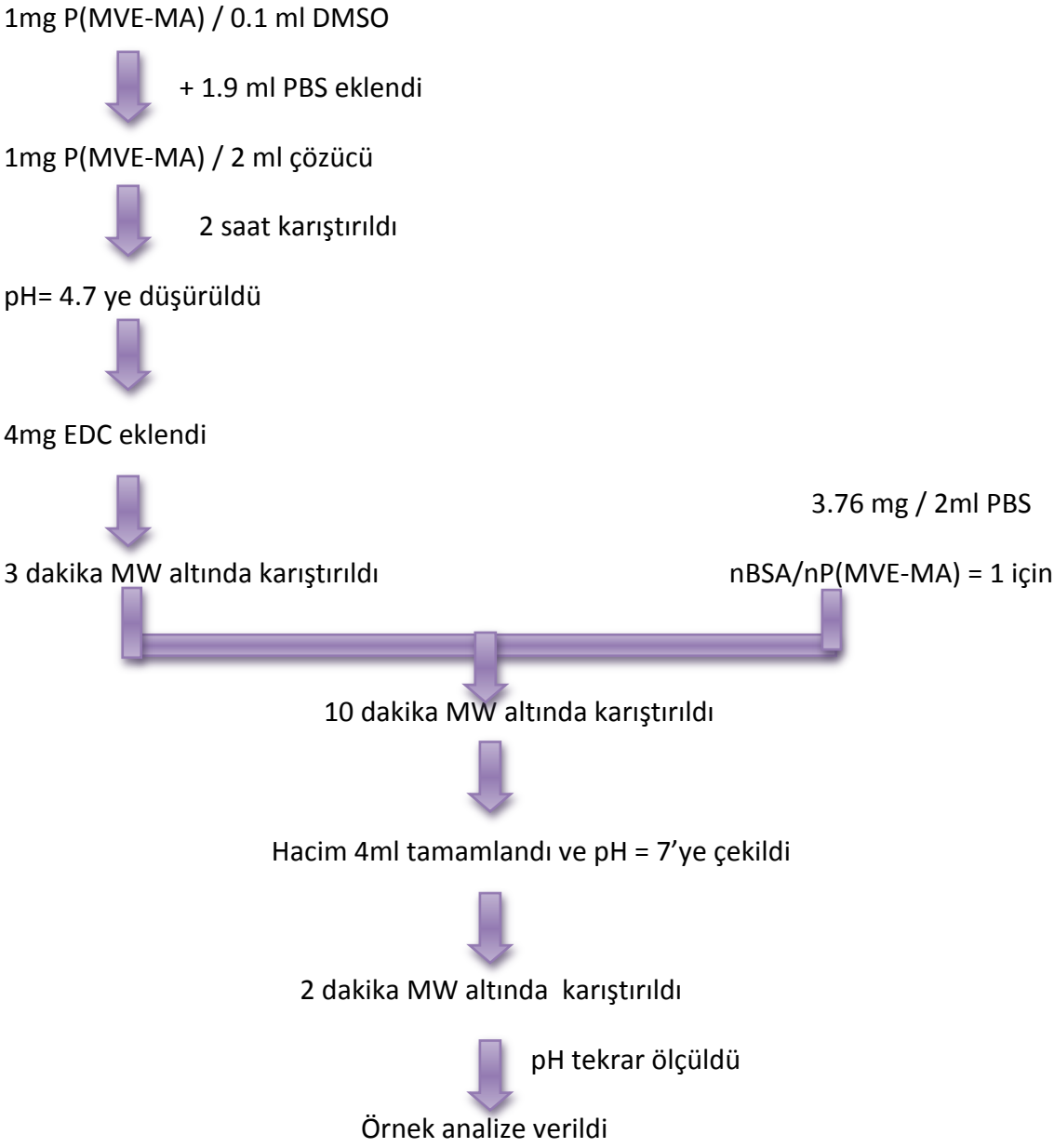


Şekil 4.7 Konvensiyonel Yöntem ile P(MVE-MA)-BSA Konjugatlarının Hazırlanış Şeması

4.3.4 Mikrodalga Destekli Yöntem ile P(MVE-MA)-BSA Konjugatlarının Hazırlanışı

1mg P(MVE-MA)-BSA 0,1 ml DMSO ile oda sıcaklığında karıştırılarak çözüldükten sonra en fazla %5 organik solvent sınırlarını aşmamak için 1,9 ml PBS herhangi bir misel oluşmasını engellemek için hızlı karıştırma ile çözeltiye yavaş yavaş eklenmiştir. PBS sayesinde kopolimerdeki anhidrid yapı hidrolize olarak polielektrolit yapısına

kavuşturulmuştur. En yüksek EDC aktikasyonunu sağlamak için çözelti pH'ı 4.7'ye ayarlanmıştır. Kopolimerdeki karboksil gruplarının aktivasyonunu sağlamak için 3 dakika MW şartları altında [75 Watt (W), Microsynth, Milestone (R) , BG, Italy] karıştırma yapıldıktan sonra n=0,25 ; 0,50 ; 1 ; 3 ; 5 oranlarına gore tartılan BSA 1 ml PBS de çözülerek aktive edilmiş kopolimere eklenmiştir. 10 dakika 75 Watt mikrodalga altında karıştırılan çözeltide konjugasyon reaksiyonu tamamlandı. Toplam son hacimleri 4 ml olacak şekilde PBS ile çözeltiler tamamlandı 2 dakika daha MW altında karıştırıldı ve pH 7 ye tekrar ayarlandıktan sonra analiz için hazır hale gelmiştir. Şekil 4.8'de mikrodalga destekli yöntem ile p(mve-ma)-bsa konjugatlarının hazırlanış şeması gösterilmektedir.



Şekil 4.8 Mikrodalga Destekli Yöntem ile P(MVE-MA)-BSA Konjugatlarının Hazırlanış Şeması

4.4 Betulin Biyomolekülünün Polielektrolitlerle Konjugatlarının Hazırlanması :

Betulin biyomolekülünün sahip olduğu hidroksi fonksiyonel grupları üzerinden ester bağları oluşturularak poliakrilikasit ve poli(metilvinileter-ko-maleikanhidrid) kopolimerlerine konjugasyonu gerçekleştirilmiştir.

4.4.1 Konjugasyonlarda Kullanılan Çözeltiler

Tiyanil Klorür Yöntemilerinde kullanılan 0,35M Sodyum Etanoat Çözeltisi : 5ml absolute etil alkolde 0,04g Metalik Na ile hazırlanmıştır. Tamamen nemsiz ortamda kesilerek alınan Na metali öncelikle susuz hekzanda yıkandı. Metalin dışındaki kısım dikkatlice kesilerek temizlendi. Absolute etil alkolde Na metalinin tamamı çözündükten sonra çözelti kaba süzgeç kağıdından 2 kez süzüldü.

4.4.2 Tiyanil Klorür Varlığında Sentezlenen PAA-Betulin Konjugatlarına Ait Hesaplamalar :

PAA M_w ≈100,000 g/mol ; C_{PAA}= % 35 wt. H_2O içinde ; d= 1.14 g/mL (25 °Cde)

BETULİN Mw = 442,72 g/mol ($C_{30}H_{50}O_2$) ; $SOCl_2$ Mw = 118,97

$$\frac{n_{Betulin}}{n_{PAA}} = \frac{c_{BETULIN} \cdot M_{PAA}}{M_{BETULIN} \cdot c_{PAA}} = 90 \Rightarrow \frac{\frac{Xmg}{10ml} \cdot 100{,}000}{442{,}72 \cdot \frac{50mg}{10ml}} \Rightarrow$$ 19,92 mg Betulin /10 ml

d= 1,14 g/ml ise $\frac{0{,}05g}{1{,}14\ g}$ = 0,04386 ml PAA çözeltisi kullanabilmek için

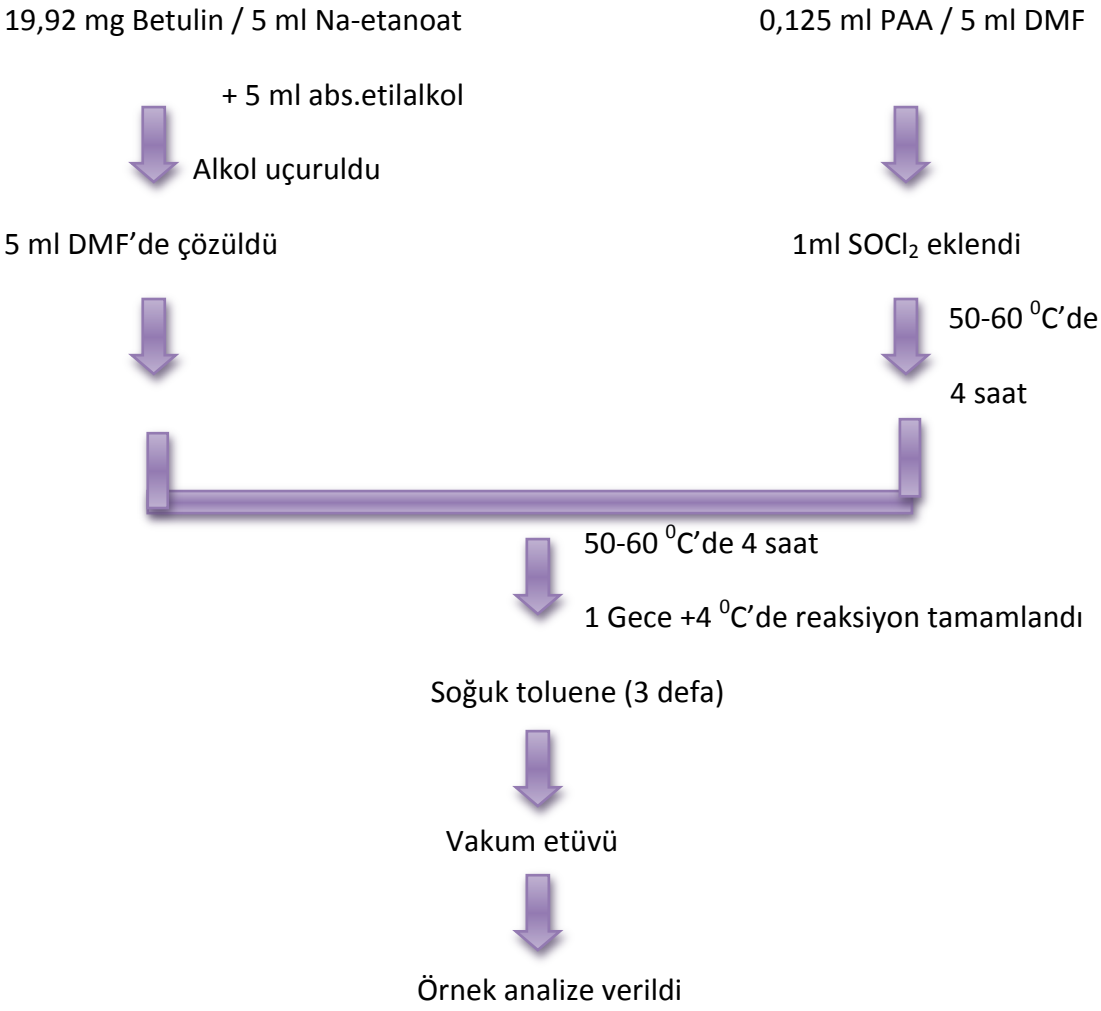
Hacimce %35'lik PAA çözeltisinden ;

$\frac{100\ .\ 0{,}04386}{35}$ = 0,125ml PAA çözeltisi otomatik pipet ile reaksiyona katılmalıdır.

4.4.3 Tiyanil Klorür Varlığında Sentezlenen PAA-Betulin Konjugatlarının Hazırlanışı

19,92 mg betulin hassas terazi ile tartılıp bir petri kabına alındı ve üzerine öncelikle 5 ml sodyum etanoat çözeltisi daha sonra da 5 ml abs.etil alkol çözeltisi eklendi bir süre karıştırılıp gece boyu alkolün oda sıcaklığında uzaklaşması için beklendi. 0,125 ml PAA çözeltisi otomatik pipetle çekilerek üç boyunlu dibi yuvarlak şilifli reaksiyon kabına koyuldu ve 5ml kuru DMF'te 2 saat karıştırılarak tam çözünme sağlandı. Reaksiyon kabının geniş boynuna geri soğutucu dar boyunlarından birine şilifli termometre takıldı ve diğer boynu da sıkıca mantar tıpa ile kapatıldı. 1 ml (0,015mol) $SOCl_2$ soğuk odada eklendi bir süre karıştıktan sonra 50-60 ^{0}C'de 4 saat akrilik asidin karbonil gruparının klorlanması sağlandı. Alkolü uçmuş olan betulin 5 ml DMF'de çözüldükten sonra reaksiyon ortamına eklendi. 4 saat kadar daha reaksiyon aynı sıcaklıkta devam ettirildi.

Oda sıcaklığında gece boyu karıştırılarak reaksiyon tamamlandı. Soğuk toluen ile çöktürme yapıldı ve 3 defa toluen değiştirilerek PAA-Betulin konjugatı elde edilmiş oldu. En son toluen süzüldü ve konjugat vakum etüvünde yüksek oranda çözücülerden uzaklaştırıldı. Şekil 4.9'de tiyanil klorür varlığında sentezlenen paa-betulin konjugatlarının hazırlanış şeması gösterilmektedir.



Şekil 4.9 Tiyanil Klorür Varlığında Sentezlenen PAA-Betulin Konjugatlarının Hazırlanış Şeması

4.4.4 CDI Çapraz Bağlayıcısı Varlığında Sentezlenen PAA-Betulin Konjugatlarına Ait Hesaplamalar :

PAA M_w ≈100,000 g/mol ; C_{PAA}= % 35 wt. H_2O içinde ; d= 1.14 g/mL (25 °Cde)

BETULİN Mw = 442,72 g/mol ($C_{30}H_{50}O_2$) ; $SOCl_2$ Mw = 118,97

$$\frac{n_{Betulin}}{n_{PAA}} = \frac{c_{BETULIN} \cdot M_{PAA}}{M_{BETULIN} \cdot c_{PAA}} = 90 \Rightarrow \frac{\frac{Xmg}{10ml} \cdot 100{,}000}{442{,}72 \cdot \frac{50mg}{10ml}} \Rightarrow$$ 19,92mg Betulin /10ml

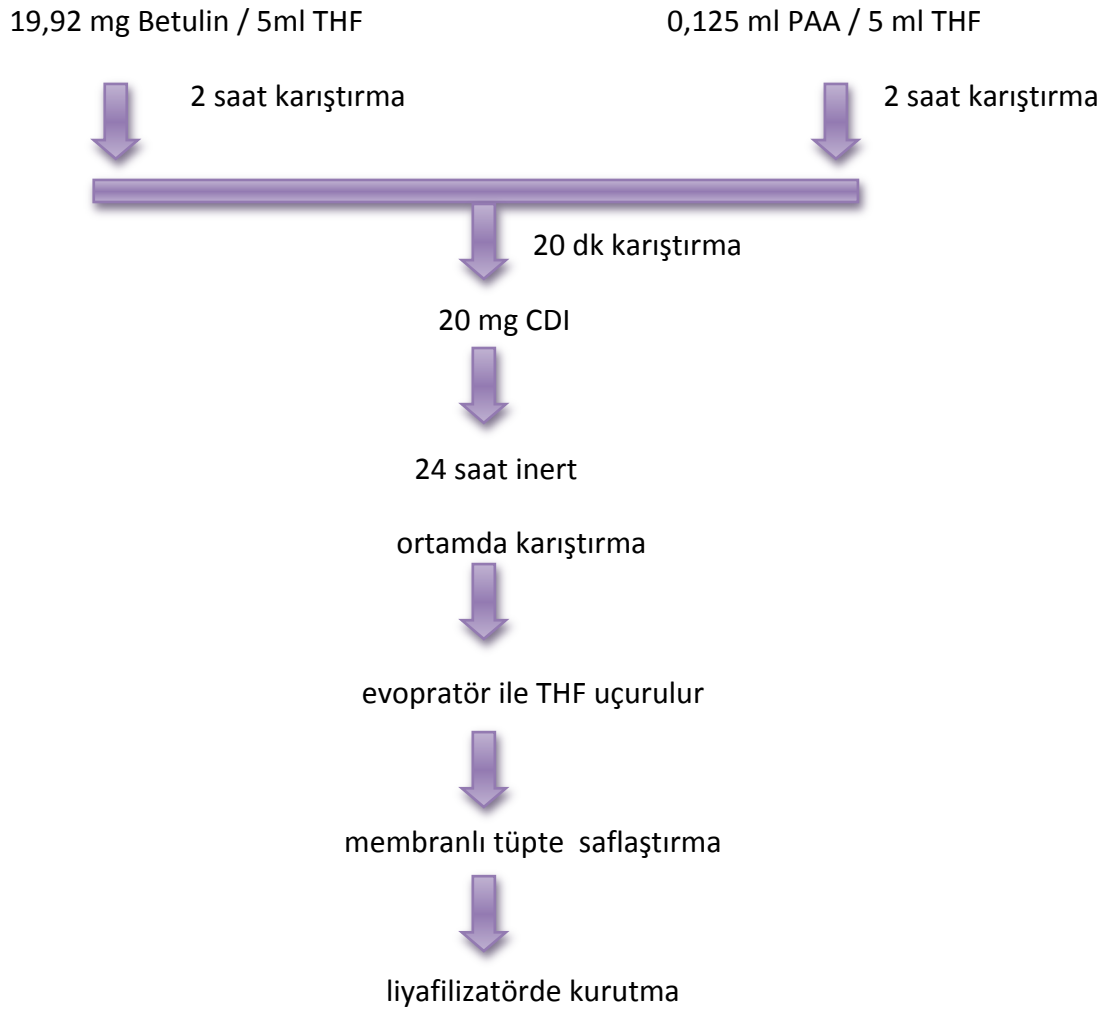
d= 1,14 g/ml ise $\frac{0{,}05g}{1{,}14\ g}$ = 0,04386 ml PAA çözeltisi kullanabilmek için

Hacimce %35'lik PAA çözeltisinden ;

$\frac{100\ .\ 0{,}04386}{35}$ = 0,125ml PAA çözeltisi otomatik pipet ile reaksiyona katılmalıdır.

4.4.5 CDI Çapraz Bağlayıcısı Varlığında Sentezlenen PAA-Betulin Konjugatlarının Hazırlanışı

19,92 mg betulin 5ml THF'de 2 saat karıştırılarak çözünmesi sağlandı. 0,125 ml PAA çözeltisi otomatik pipetle çekilerek üç boyunlu dibi yuvarlak şilifli reaksiyon kabına koyuldu ve 5ml kuru THF'de 2 saat karıştırılarak tam çözünme sağlandı. 5 ml THF'de çözünmüş betulin çok yavaş olarak (yaklaşık 1 dk'da 1 damla) reaksiyon ortamına eklendi ve 20 dakika karıştırıldı. 20 mg CDI eklendi bir süre karıştıktan sonra inert ortam sağlanması için boyunların bir tanesine enjektör iğnesi ile çıkış verilip diğer boyundan azot gazı geçişi sağlandı. 4 saat kadar daha reaksiyon aynı sıcaklıkta azot gazı geçirilerek devam ettirildi ve azot kaynağı, reaksiyon balonundan gaz kaçışı olmamasına dikkat edilirek kapatıldı. Oda sıcaklığında gece boyu karıştırılarak reaksiyon tamamlandı. THF evopratör yardımıyla uçuruldu (30 ^{o}C'de 20 torr vakumda). Elde edilen PAA-betulin konjugatı dH_2O'da çözülüp membranlı tüpte 5000 rpm devirde 5 dakika 3 kez santrifüj edilip saflaştırıldı. Liyafilizatörde kurutularak toz halde PAA-Betulin konjugatı elde edilmiş oldu. Şekil 4.10'de CDI çapraz bağlayıcısı varlığında sentezlenen paa-betulin konjugatlarının hazırlanış şemasını gösterilmektedir.



Şekil 4.10 CDI Çapraz Bağlayıcısı Varlığında Sentezlenen PAA-Betulin Konjugatlarının Hazırlanış Şeması

4.4.6 Tiyanil Klorür Varlığında Sentezlenen P(MVE-MA)-Betulin Konjugatlarına Ait Hesaplamalar

$$\frac{n_{Betulin}}{n_{PAA}} = \frac{c_{BETULIN} \cdot M_{PAA}}{M_{BETULIN} \cdot c_{PAA}} = 90 \Rightarrow \frac{\frac{19{,}92mg}{10ml} \cdot 216{,}000}{442{,}72 \cdot \frac{Xmg}{10ml}}$$

⇒108 mg P(MVE-MA) /10ml

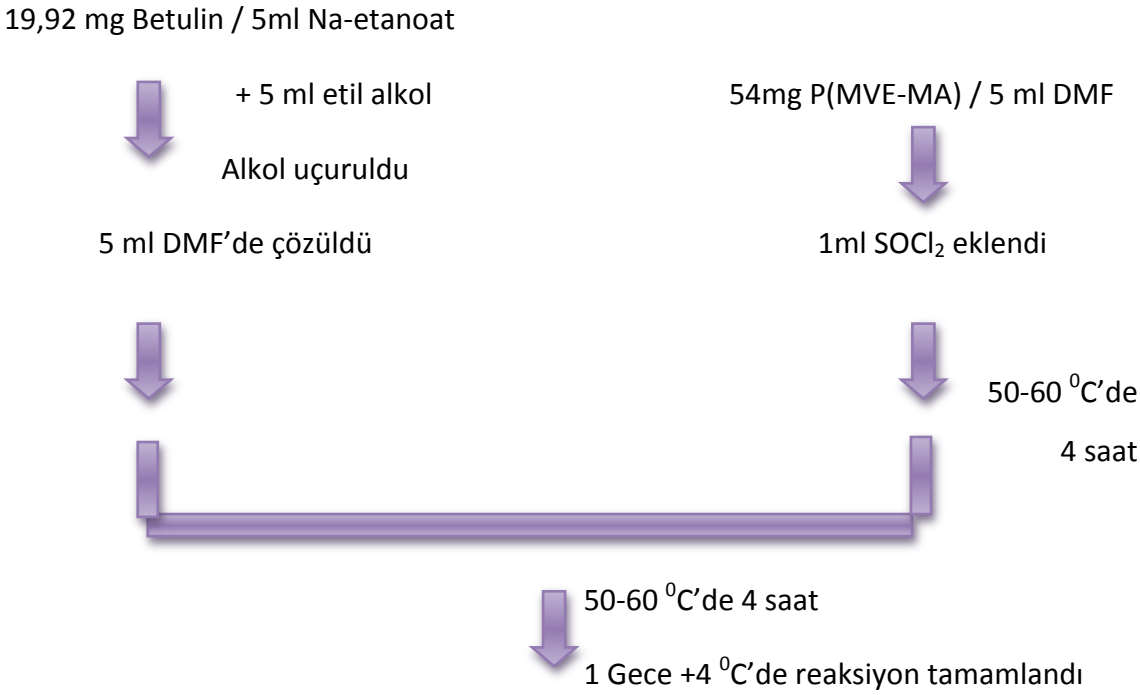
P(MVE-MA) M_w ≈216,000 g/mol ;

BETULİN Mw = 442,72 g/mol ($C_{30}H_{50}O_2$) ; $SOCl_2$ Mw = 118,97

P(MVE-MA) kopolimerinde tiyanül klorür ile reaksiyona girebilecek bir monomer içerisinde iki adet fonksiyonel grup oluşturduğundan 108/2 = 54 mg P(MVE-MA) /10ml olacak şekilde hesabımızda kullanılmıştır.

4.4.7 Tiyanil Klorür Varlığında Sentezlenen P(MVE-MA)-Betulin Konjugatlarının Hazırlanışı

19,92 mg betulin hassas terazi ile tartılıp bir petri kabına alındı ve üzerine öncelikle 5 ml sodyum etanoat çözeltisi daha sonra da 5 ml abs.etil alkol çözeltisi eklendi bir süre karıştırılıp gece boyu alkolün oda sıcaklığında uzaklaşması için beklendi. 54 mg P(MVE-MA) hassas terazi ile tartılarak üç boyunlu dibi yuvarlak şilifli reaksiyon kabına koyuldu ve 5ml kuru DMFte 2 saat karıştırılarak tam çözünme sağlandı. Reaksiyon kabının geniş boynuna geri soğutucu dar boyunlarından birine şilifli termometre takıldı ve diğer boynu da sıkıca mantar tıpa ile kapatıldı. 1 ml (0,015mol) $SOCl_2$ soğuk odada eklendi bir süre karıştıktan sonra 50-60 ^{0}C'de 4 saat anhidrid yapının açılarak oluşan karbonil gruparının klorlanması sağlandı. 5 ml DMF'de çözüldürülmüş betulin yavaş yavaş reaksiyon ortamına eklendi. 4 saat kadar daha reaksiyon aynı sıcaklıkta devam ettirildi. +4 ^{o}C'de gece boyu karıştırılarak reaksiyon tamamlandı. Soğuk toluen ile çöktürme yapıldı ve 3 defa toluen değiştirilerek P(MVE-MA) – betulin konjugatı elde edilmiş oldu. En son toluen süzüldü ve konjugat vakum etüvünde yüksek oranda çözücülerden uzaklaştırıldı. Şekil 4.11'de tiyanil klorür varlığında sentezlenen P(MVE-MA)-Betulin konjugatlarının hazırlanış şeması gösterilmektedir.



Şekil 4.11 Tiyanil Klorür Varlığında Sentezlenen P(MVE-MA)-Betulin Konjugatlarının Hazırlanış Şeması

4.4.8 CDI Çapraz Bağlayıcısı Varlığında Sentezlenen P(MVE-MA)-Betulin Konjugatlarına Ait Hesaplamalar

$$\frac{n_{Betulin}}{n_{PAA}} = \frac{c_{BETULIN} \cdot M_{PAA}}{M_{BETULIN} \cdot c_{PAA}} = 90 \Rightarrow \frac{\frac{19{,}92mg}{10ml} \cdot 216{,}000}{442{,}72 \cdot \frac{Xmg}{10ml}}$$

⇒108 mg P(MVE-MA) /10ml

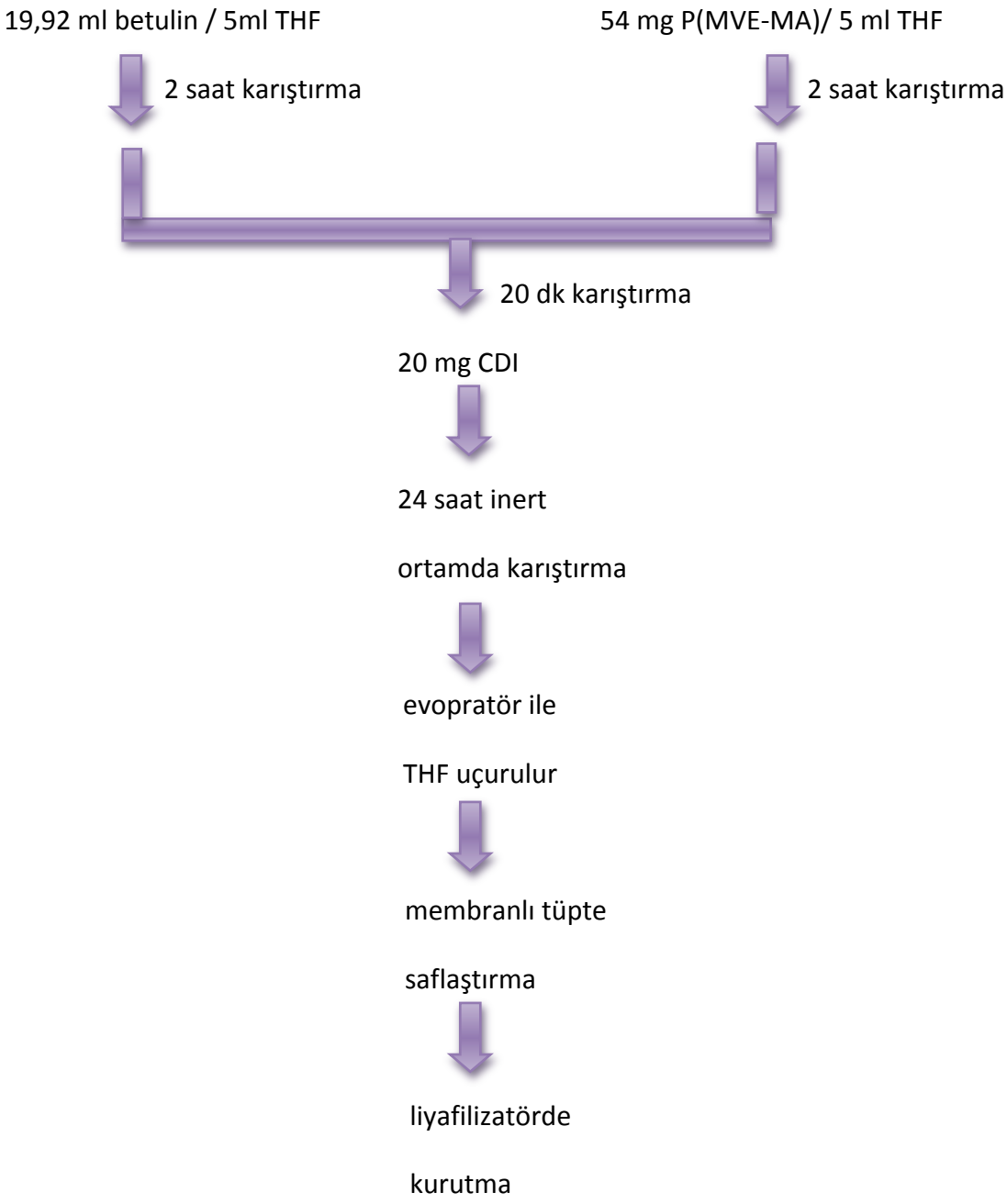
P(MVE-MA) M_w ≈216,000 g/mol ;

BETULİN Mw = 442,72 g/mol ($C_{30}H_{50}O_2$) ;

P(MVE-MA) kopolimerinde tiyanül klorür ile reaksiyona girebilecek bir monomer içerisinde iki adet fonksiyonel grup oluşturduğundan 108/2 = 54 mg P(MVE-MA) /10ml olacak şekilde hesabımızda kullanılmıştır. Çapraz bağlayıcı olan CDI 20 mg olarak tartıldı.

4.4.9 CDI Çapraz Bağlayıcısı Varlığında Sentezlenen P(MVE-MA)-Betulin Konjugatlarının Hazırlanışı

19,92 mg betulin 5ml THF'de 2 saat karıştırılarak çözünmesi sağlandı. 54 mg P(MVE-MA) kopolimeri hassas terazi ile tartılarak üç boyunlu dibi yuvarlak şilifli reaksiyon kabına koyuldu ve 5ml kuru THFte 2 saat karıştırılarak tam çözünme sağlandı. 5 ml THF'de çözünmüş betulin çok yavaş olarak (yaklaşık 1 dk'da 1 damla) reaksiyon ortamına eklendi ve 20 dakika katıştırıldı. 20 mg CDI eklendi bir süre karıştıktan sonra inert ortam sağlanması için boyunların bir tanesine enjektör iğnesi ile çıkış verilip diğer boyundan azot gazı geçişi sağlandı. 4 saat kadar daha reaksiyon aynı sıcaklıkta azot gazı geçirilerek devam ettirildi ve azot kaynağı, reaksiyon balonundan gaz kaçışı olmamasına dikkat edilirek kapatıldı. Oda sıcaklığında gece boyu karıştırılarak reaksiyon tamamlandı. THF evopratör yardımıyla uçuruldu (30 ^{o}C'de 20 torr vakumda). Elde edilen P(MVE-MA)-Betulin konjugatı dH_2O'da çözülüp membranlı tüpte 5000 rpm devirde 5 dakika 3 kez santrifüj edilip saflaştırıldı. Liyafilizatörde kurutularak toz halde P(MVE-MA)-Betulin konjugatı elde edilmiş oldu. Şekil 4.12'de CDI çapraz bağlayıcısı varlığında sentezlenen p(mve-ma)-betulin konjugatlarının hazırlanış şeması gösterilmektedir.



Şekil 4.12 CDI Çapraz Bağlayıcısı Varlığında Sentezlenen P(MVE-MA)-Betulin Konjugatlarının Hazırlanış Şeması

4.5 Estradiol Biyomolekülünün P(NIPAA-AA) Kopolimeri ile Konjugatının Hazırlanması

Laboratuvar grubumuzun daha önceki çalışmalarında Japon Hokkaido Üniversitesi ile ortak çalışılmasıyla P(NIPAA-AA) kopolimerinin sentezi başarıyla gerçekleştirilmiştir. NIPAA monomerinin AA monomeri ile kopolimerinin sentezi Yasumitsu Uraki ve Yoshihiro Sano tarafından radikalik polimerizasyon yöntemiyle 2-oxoglutalic acid varlığında 365 nm UV ışınlamasıyla inert azot ortamında gerçekleştirilmiştir[42].

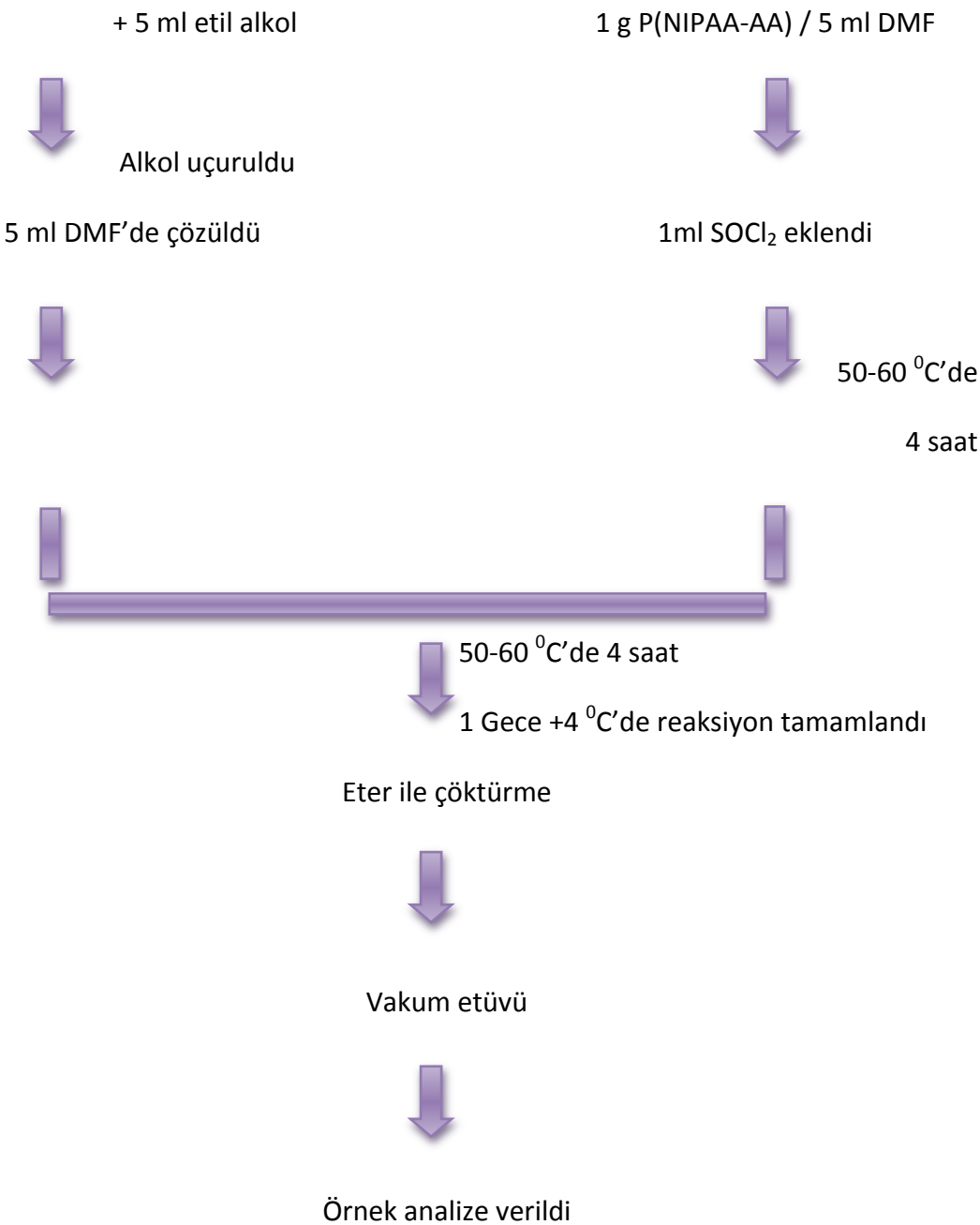
4.5.1 Tiyanül Klorür Varlığında Sentezlenen P(NIPAA-AA)-Estradiol Konjugatlarına Ait Hesaplamalar

Mamed Mustafaev et.al tarafından 2002 yılında gerçekleştirilen çalışmada kullanılan aynı polimer ile konjugasyon hesabında önceki bilgi ve denemeler çalışmamıza öncülük etmiştir. Tarafımızdan yapılan bu çalışmada yine 1 g P(NIPAA-AA) kopolimerine 0,3g estradiol konjuge edilmesi için hesaplamalar yapılmış, 1,5 ml $SOCl_2$ reaktan olarak kullanılması hesap edilmiştir[42].

4.5.2 Tiyanül Klorür Varlığında Sentezlenen P(NIPAA-AA)-Estradiol Konjugatlarının Hazırlanışı

300 mg estradiol hassas terazi ile tartılıp bir petri kabına alındı ve üzerine öncelikle 5 ml sodyum etanoat çözeltisi daha sonra da 5 ml abs.etil alkol çözeltisi eklendi bir süre karıştırılıp gece boyu alkolün oda sıcaklığında uzaklaşması için beklendi. 1 g P(NIPAA-AA) kopolimeri hassas terazi ile tartılarak üç boyunlu dibi yuvarlak şilifli reaksiyon kabına koyuldu ve 5ml kuru DMFte 2 saat karıştırılarak tam çözünme sağlandı. Reaksiyon kabının geniş boynuna geri soğutucu dar boyunlarından birine şilifli termometre takıldı ve diğer boynu da sıkıca mantar tıpa ile kapatıldı. 1 ml (0,015mol) $SOCl_2$ soğuk odada eklendi bir süre karıştıktan sonra karbonil gruparının klorlanması sağlandı. 5 ml DMF'de çözüldürülmüş betulin yavaş yavaş reaksiyon ortamına eklendi. 4 saat kadar daha reaksiyon oda sıcaklıkta devam ettirildi. +4 ^{o}C'de gece boyu karıştırılarak reaksiyon tamamlandı. Eter ile çöktürme yapıldı ve böylece P(NIPAA-AA) - estradiol konjugatı elde edilmiş oldu. En son eter süzüldü ve konjugat vakum etüvünde

yüksek oranda çözücülerden uzaklaştırıldı. Şekil 4.13'de tiyanül klorür varlığında sentezlenen P(NIPAA-AA)-Estradiol konjugatlarının hazırlanış şeması gösterilmektedir.



Şekil 4.13 Tiyanül Klorür Varlığında Sentezlenen P(NIPAA-AA)-Estradiol Konjugatlarının Hazırlanış Şeması

4.6 Progesteron Biyomolekülünün Polielektrolitlerle Konjugat ve Komplekslerinin Hazırlanması

Progesteron biyomolekülü P(VP-AA), P(MVE-MA) kopolimerleri, polioksidonyum ve BSA ile konjugatları ve yine polioksidonyum ile fiziksel etkileşime dayalı kompleksleri hazırlandı. Polioksidonyum ile hazırlanan konjugat ve kompleksler hayvan deneylerinde kullanırken BSA ile hazırlanan konjugatlar ise hayvan deneyleri için ELİSA metodunda kuyuların kaplanmasında kullanılmıştır.

Suda çözünür progesteron molekülünün sahip olduğu keton fonksiyonel gruplarının hidrazin diklorür ile reaksiyonu sonucu amin grubu içeren hidrazon molekülüne (progesteron=N-NH_2) dönüştürülmesi amacıyla ;

100 mg progesteron (0,32 mmol) 20 ml abs. etil alkolde çözüldü. geri soğutucu altında su banyosunda 80 ^{0}C'de kaynatmaya başlandı ve çözeltiye 33,59 mg (0,32 mmol) hidrazin diklorür eklendi ve 3 saat reaksiyonun aynı sıcaklıkta tamamlanması sağlandı. 3 saatin sonunda çözeldi süzgeç kağıdından sıcak süzme yapıldı ve oda sıcaklığında bekletilerek kristalize halde açık sarı renkte örnek elde edilmiş oldu. Tüm konjugatların sentezlenmsinde ve komplekslerin hazırlanmasında öncesinde sentezlenmiş bu progesteron=N-NH_2 molekülü kullanılmıştır.

4.6.1 EDC Varlığında Sentezlenen P(VP-AA) - Progesteron Konjugatlarına Ait Hesaplamalar

$$\frac{n_{PROG}}{n_{P(VP-AA)}} = \frac{c_{PROG} \cdot M_{P(VP-AA)}}{M_{PROG} \cdot c_{P(VP-AA)}} = 30 \Rightarrow \frac{\frac{2mg}{10ml} . 151,977}{347,46 . \frac{Xmg}{10ml}} \Rightarrow 29,16 \text{ mgP(VP-AA) /10ml}$$

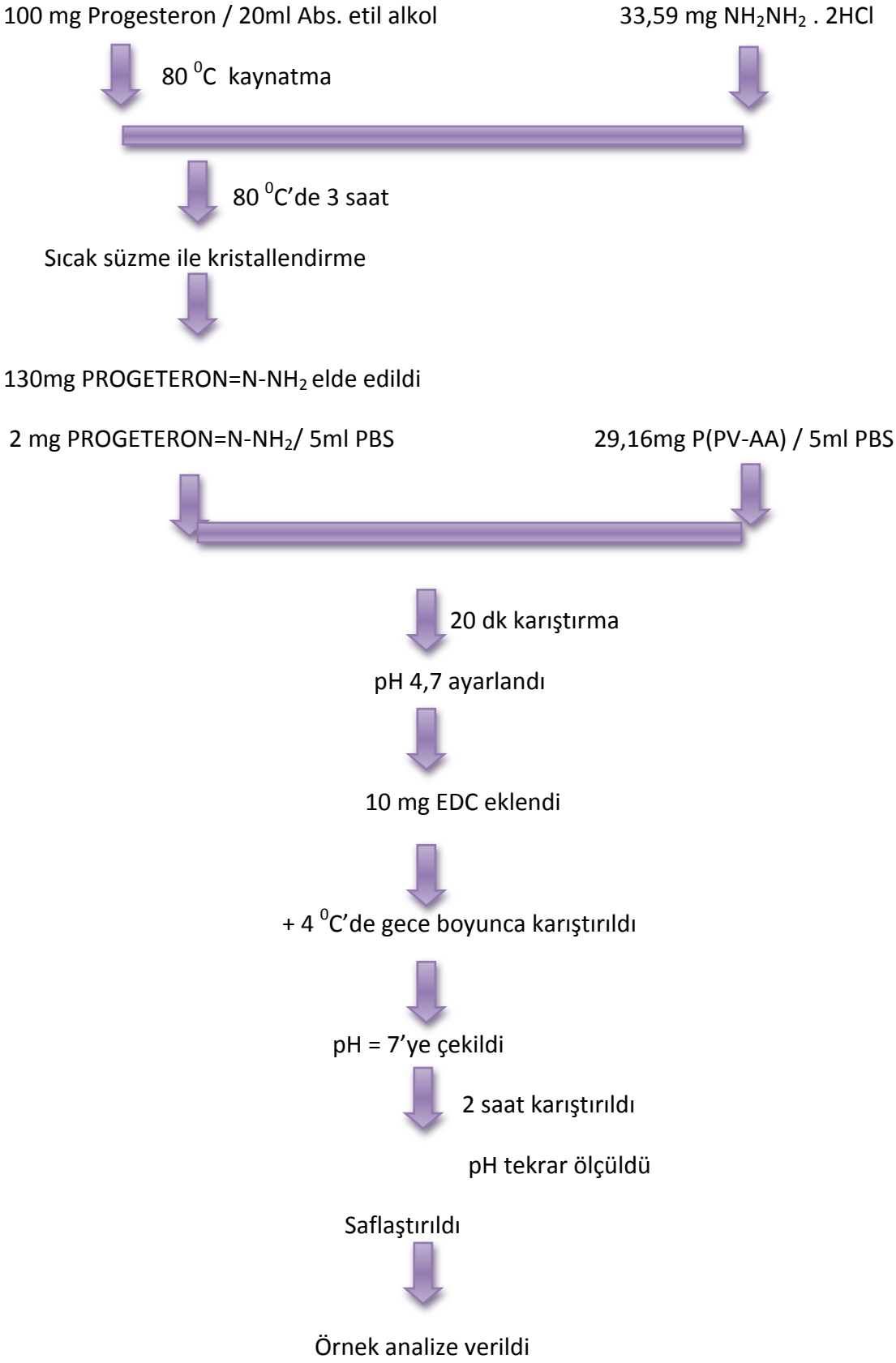
29,16 mg P(VP-AA) kopolimeri hassas terazi ile tartılarak 10 ml PBS de çözünmüştür.

2 mg progesteron=N-NH_2 molekülü tartılmış reaksiyon sırasında kullanılacak olan EDC çapraz bağlayıcısı ise biyomolekülün 10 katı kadar ; yani 10 mg olarak tartılmıştır.

4.6.2 EDC Varlığında Sentezlenen P(VP-AA)-Progesteron Konjugatlarının Hazırlanışı

EDC varlığında P(VP-AA)-progesteron konjugatlarını hazırlamak için 2 mg progesteron=NNH_2 5 ml PBS'de çözüldü ve yine 5 ml PBS'de çözünmüş 29,16 mg P(VP-AA) polimer çözeltisine eklendi. En yüksek EDC aktivasyonunu sağlamak için öncelikle

çözelti pH'ı 4.7'ye ayarlanmıştır.Yaklaşık 30 dk karıştktan sonra 10mg EDC eklendi ve gece boyunca +4 ^{0}C'de konjugasyon reaksiyonu tamamlandı. Çözelti analiz için pH 7 ye tekrar geri ayarlandıktan sonra membranlı tüp ile 5000 rpm de 5 dk santrifüj edilerek saflaştırıldı. Saflaştırılma işlemi 2 kez tekrarlandı ve üstte kalan kısım analize verildi. Şekil 4.14'de EDC varlığında sentezlenen P(VP-AA)-Progesteron konjugatlarının hazırlanış şeması gösterilmektedir.



Şekil 4.14 EDC Varlığında Sentezlenen P(VP-AA)-Progesteron Konjugatlarının Hazırlanış Şeması

4.6.3 EDC Varlığında Sentezlenen P(MVE-MA)-Progesteron Konjugatlarına Ait Hesaplamalar

P(MVE-MA) M_w ≈216,000 g/mol ;

Progesteron=N-NH_2 M_w = 347,46 ;

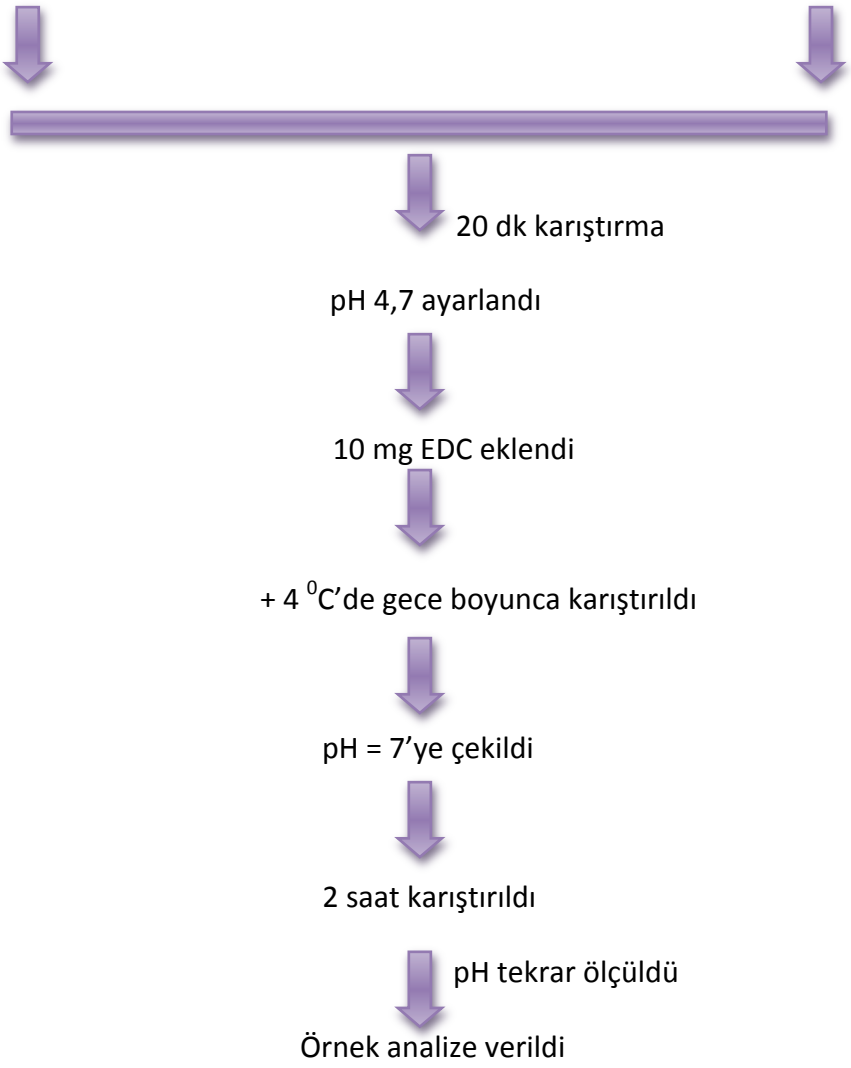
$$\frac{n_{PROG}}{n_{P(MVE-MA)}} = \frac{c_{PROG} \cdot M_{P(MVE-MA)}}{M_{PROG} \cdot c_{P(MVE-MA)}} = 30 \Rightarrow \frac{\frac{2mg}{10ml} \cdot 216{,}000}{347{,}46 \cdot \frac{Xmg}{10ml}}$$

⇒41,44mg P(MVE-MA) / 10 ml

4.6.4 EDC Varlığında Sentezlenen P(MVE-MA)-Progesteron Konjugatlarının Hazırlanışı

2 mg progesteron=N-NH_2 5 ml PBS'de çözüldü ve yine 5 ml PBS'de çözünmüş 41,44 mg P(MVE-MA) polimer çözeltisine eklendi. En yüksek EDC aktivasyonunu sağlamak için öncelikle çözelti pH'ı 4.7'ye ayarlanmıştır. Yaklaşık 30 dk karıştırıldıktan sonra çözeltiye 10 mg EDC eklendi ve gece boyunca +4 ^{0}C'de konjugasyon reaksiyonu tamamlandı. pH 7 ye çözelti analiz için tekrar geri ayarlandıktan sonra membranlı tüp ile 5000 rpm de 5 dk santrifüj edilerek saflaştırıldı ve üstte kalan kısım analize verildi. Şekil 4.15'de EDC varlığında sentezlenen P(MVE-MA)-Progesteron konjugatlarının hazırlanış şeması gösterilmektedir.

2mg Progesteron =N-NH_2/ 5ml PBS 41,44mg P(PV-AA) / 5ml PBS



Şekil 4.15 EDC Varlığında Sentezlenen P(MVE-MA)-Progesteron Konjugatlarının Hazırlanış Şeması

4.6.5 EDC Varlığında Sentezlenen Polioksidonyum-Progesteron Konjugatına Ait Hesaplamalar

Polioksidonyum $M_w \approx 100,000$ g/mol ;

progesteron=N-NH_2 M_w = 347,46 ;

$$\frac{n_{Progesteron}}{n_{Poxidonyum}} = \frac{c_{Progesteron} \cdot M_{Poxidonyum}}{M_{Progesteron} \cdot c_{Poxidonyum}} \Rightarrow \frac{\frac{0,5mg}{0,5ml} \cdot 100,000}{347,46 \cdot \frac{1mg}{0,5ml}} = 143,90$$

4.6.6 EDC Varlığında Sentezlenen Polioksidonyum-Progesteron Konjugatının Hazırlanışı

10 mg progesteron=N-NH_2 5 ml PBS'de çözüldü ve yine 5 ml PBS'de çözünmüş 20 mg polioksidonyum polimer çözeltisine eklendi. En yüksek EDC aktivasyonunu sağlamak için öncelikle çözelti pH'ı 4.7'ye ayarlanmıştır. Yaklaşık 30 dk karıştırıldıktan sonra çözeltiye 40 mg EDC eklendi ve gece boyunca +4 ^{0}C'de konjugasyon reaksiyonu tamamlandı. pH 7 ye çözelti analiz için tekrar geri ayarlandıktan sonra membranlı tüp ile 5000rpm de 5 dk santrifüj edilerek saflaştırıldı. Üstte kalan kısım için GPC analizlerine ait kromatogramlarda konjugatın oluştuğuna dair aydınlatılmanın yapılması üstüne fare deneylerinde 0,5 ml numune periton enjeksiyonlarında kullanılmıştır. Şekil 4.16'da EDC varlığında sentezlenen Polioksidonyum-Progesteron konjugatlarının hazırlanış şeması gösterilmektedir.

10 mg Progesteron=N-NH2 / 5 ml PBS 20 mg Polioksidonyum / 5ml PBS



20 dk karıştırma

pH 4,7 ayarlandı

30 dk karıştırma

40 mg EDC eklendi

+ 4 ^{0}C'de gece boyunca karıştırıldı

pH = 7'ye çekildi

2 saat karıştırıldı

pH tekrar ölçüldü

5000 rpm 5 dk

Membranlı tüple saflaştırma

Örnek analize verildi

Şekil 4.16 EDC Varlığında Sentezlenen Polioksidonyum-Progesteron Konjugatlarının Hazırlanış Şeması

4.6.7 Polioksidonyum-Progesteron Kompleksinin Hazırlanmasına Ait Hesaplamalar

Polioksidonyum Mw ≈ 100,000 g/mol ;

Progesteron=N-NH_2 = 347,46 g/mol;

$$\frac{n_{progesteron}}{n_{Poxidonyum}} = \frac{c_{progesteron} \cdot M_{Poxidonyum}}{M_{Progesteron} \cdot c_{Poxidonyum}} \Rightarrow \frac{\frac{0{,}5mg}{0{,}5ml} \cdot 100{,}000}{347{,}46 \cdot \frac{1mg}{0{,}5ml}} = 143{,}90$$

4.6.8 Polioksidonyum-Progesteron Kompleksinin Hazırlanışı

10 mg progesteron=N-NH_2 5 ml PBS'de çözüldü ve yine 5 ml PBS'de çözünmüş 20 mg polioksidonyum çözeltiye eklendi. Oda sıcaklığında yaklaşık 30 dk karıştırıldıktan sonra gece boyunca +4 ^{0}C'de kompleksleşme reaksiyonu dvam ettirilerek tamamlandı. Numune membranlı tüp ile 5000rpm de 5 dk santrifüj edilerek saflaştırıldı üstte kalan kısım analize verildi. GPC analizlerine ait kromatogramlarda fiziksel etkileşimlerin oluştuğuna dair aydınlatılmanın yapılması üstüne fare deneylerinde 0,5 ml numune periton enjeksiyonlarında kullanılmıştır. Şekil 4.17'de Polioksidonyum-Progesteron kompleksinin hazırlanış şeması gösterilmektedir.



Şekil 4.17 Polioksidonyum-Progesteron Kompleksinin Hazırlanış Şeması

4.6.9 BSA – Progesteron Konjugatlarının Hazırlanmasına Ait Hesaplamalar

$$\frac{n_{progesteron}}{n_{BSA}} = \frac{c_{progesteron} \cdot M_{BSA}}{M_{Progesteron} \cdot c_{BSA}} \Rightarrow \frac{\frac{2{,}5mg}{4ml} \cdot 66{,}000}{347{,}46 \cdot \frac{8mg}{4ml}} = 0{,}06$$

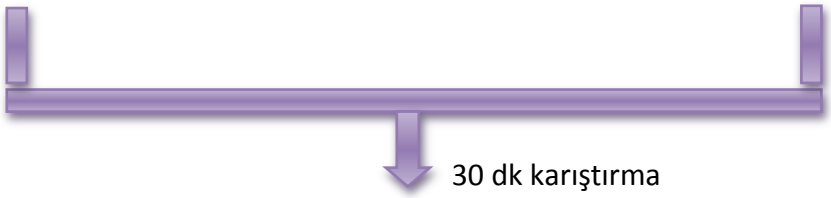
n=0,06'ya göre 8 mg BSA ve 2,5 mg progesteron hesaplanmıştır.

EDC ise progesteronun 4 katı olarak yani 10mg olarak hesaba katılmıştır.

4.6.10 BSA – Progesteron Konjugatlarının Hazırlanışı

8 mg BSA 2 ml PBS'de çözüldükten sonra bu çözeltiye 2 ml PBS'de çözünmüş olan 2,5 mg progesteron=NNH_2 çözeltisi yavaşça eklendi. Yarım saatlik bir karıştırmanın ardından çözeltinin önce pH'ı 4,7'ye ayarlandı ve 20 dakika karıştırdıktan sonra 10 mg EDC bu çözeltiye ilave edildi. 2 saat oda sıcaklığında karıştıktan sonra +4^{o}C'de bir gece reaksiyon tamamlandı. Ertesi gün pH tekrar 7 ye ayarlandıktan sonra elde edilmiş olan konjugat liyofilizatörde tamamen çözücülerden uzaklaştırılarak kurutuldu. Daha sonra 4mg konjugat 2ml PBS'te tekrar çözülerek kuyuların kaplanması dilüsyona hazır hale getirildi. Şekil 4.18'de BSA – Progesteron konjugatlarının hazırlanış şeması gösterilmektedir.

2,5 mg Progesteron=N-NH2 / 2 ml PBS 8 mg BSA / 2 ml PBS



30 dk karıştırma

pH 4,7 ayarlandI 30 dk karıştırma

10 mg EDC eklendi

+ 4 ^{0}C'de gece boyunca karıştırıldı

pH = 7'ye çekildi

-40 ^{0}C'de dondurulduu

liyofilizatörde kurutuldu

4 mg numune / 2 ml PBS'de stok hazırlandı

0,3 ml'şer numune ayrılarak ependorflarda -20C'de dondurulduu

Şekil 4.18 BSA – Progesteron Konjugatlarının Hazırlanış Şeması

4.7 MAGE 3 (121-134) Peptidinin Polielektrolitlerle Konjugat ve Komplekslerinin Hazırlanması

4.7.1 Polioksidonyum-Peptid Konjugatlarına Ait Hesaplamalar

Polioksidonyum Mw ≈ 100,000 g/mol ;

MAGE 3 (121-134) (LLKYRAREPVTKAE) Peptid Dizesi Mw = 1674.0 g/mol

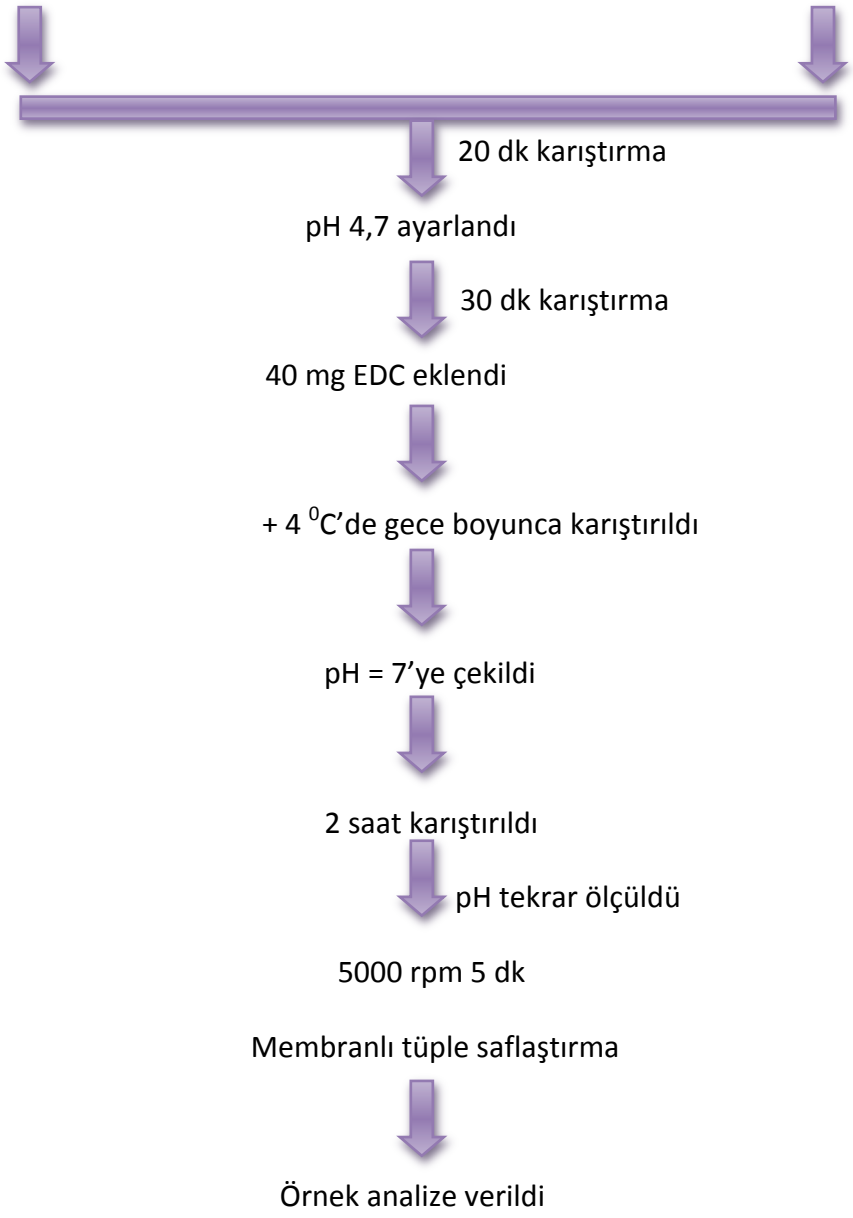
$$\frac{n_{Peptid}}{n_{Poxidonyum}} = \frac{c_{Peptid} \cdot M_{Poxidonyum}}{M_{Peptid} \cdot c_{Poxidonyum}} \Rightarrow \frac{\frac{0{,}5mg}{0{,}5ml} \cdot 100{,}000}{1670 \cdot \frac{1mg}{0{,}5ml}} = 29{,}94$$

Fare deneylerinde kullanılmak üzere 1 fare başına 0,5ml peritonal enjeksiyon için 0,5 mg peptid, 1 mg polioksidonyum polimeri ile $n_{peptid}/n_{polioksidonyum}$ = 29,94 oranında EDC yüntemi kullanılarak konjuge edilmiştir. EDC miktarı peptide kıyasla 4 kat olacak şekilde 40mg olarak hesaplanmıştır.

4.7.2 Polioksidonyum-Peptid Konjugatlarının Hazırlanışı

10 mg peptid 5 ml PBS'de çözüldü ve yine 5 ml PBS'de çözünmüş 20 mg polioksidonyum polimer çözeltisine eklendi. En yüksek EDC aktivasyonunu sağlamak için öncelikle çözelti pH'ı 4.7'ye ayarlanmıştır. Yaklaşık 30 dk karıştırıldıktan sonra 40mg EDC eklendi ve gece boyunca +4 ^{0}C'de konjugasyon reaksiyonu tamamlandı. pH 7'ye çözelti analiz için tekrar geri ayarlandıktan sonra membranlı tüp ile 5000rpm de 5 dk santrifüj edilerek saflaştırıldı üstte kalan kısım analize verildi. GPC analizlerine ait kromatogramlarda konjugasyonun oluştuğuna dair aydınlatılmanın yapılması üstüne fare deneylerinde 0,5 ml peritonal enjeksiyonlarında kullanılmıştır. Şekil 4.19'da Polioksidonyum-Peptid konjugatlarının hazırlanış şeması gösterilmektedir.

10mg Peptid / 5 ml PBS 20 mg Polioksidonyum / 5ml PBS



Şekil 4.19 Polioksidonyum-Peptid Konjugatlarının Hazırlanış Şeması

4.7.3 Polioksidonyum-Peptid İkili Komplekslerine Ait Hesaplamalar

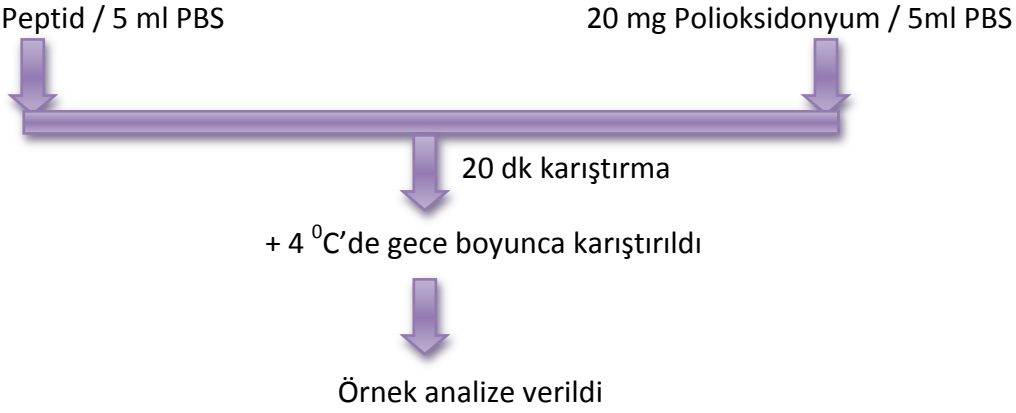
Polioksidonyum Mw ≈ 100,000 g/mol ;

MAGE 3 (121-134) (LLKYRAREPVTKAE) Peptid Dizesi Mw = 1674.0 g/mol

$$\frac{n_{Peptid}}{n_{Poxidonyum}} = \frac{c_{Peptid} \cdot M_{Poxidonyum}}{M_{Peptid} \cdot c_{Poxidonyum}} \Rightarrow \frac{\frac{0{,}5mg}{0{,}5ml} \cdot 100{,}000}{1670 \cdot \frac{1mg}{0{,}5ml}} = 29{,}94$$

4.7.4 Polioksidonyum-Peptid İkili Komplekslerinin Hazırlanışı

10 mg peptid 5 ml PBS'de çözüldü ve yine 5 ml PBS'de çözünmüş 20 mg polioksidonyum çözeltisine eklendi. Oda sıcaklığında yaklaşık 30 dk karıştırıldıktan sonra gece boyunca +4 ^{0}C'de kompleksleşme reaksiyonu tamamlandı. Numune membranlı tüp ile 5000rpm de 5 dk santrifüj edilerek saflaştırıldı üstte kalan kısım analize verildi. GPC analizlerine ait kromatogramlarda ikili kompleksin kuvvetli fiziksel etkileşimlerle oluştuğuna dair aydınlatılmanın yapılması üstüne fare deneylerinde 0,5 ml numune periton enjeksiyonlarında kullanılmıştır. Şekil 4.20'de Polioksidonyum-Peptid ikili komplekslerinin hazırlanış şeması gösterilmektedir.



Şekil 4.20 Polioksidonyum-Peptid İkili Komplekslerinin Hazırlanış Şeması

4.7.5 Polioksidonyum-Bakır-Peptid Üçlü Komplekslerinin Hesaplanması

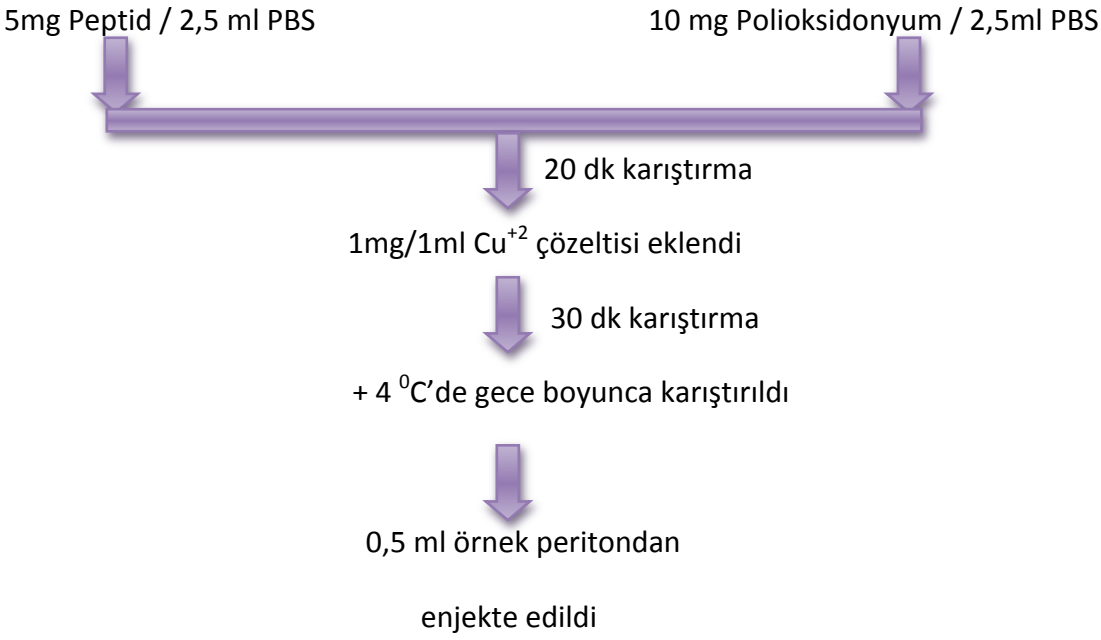
$$\frac{n_{Peptid}}{n_{Poxidonyum}} = \frac{c_{Peptid} \cdot M_{Poxidonyum}}{M_{Peptid} \cdot c_{Poxidonyum}} \Rightarrow \frac{\frac{0{,}5mg}{0{,}5ml} \cdot 100{,}000}{1670 \cdot \frac{1mg}{0{,}5ml}} = 29{,}94$$

15mg / ml konsantrasyonunda $CuSO_4 . 5H_2O$ çözeltisi hazırlanmıştır.

4.7.6 Polioksidonyum-Bakır-Peptid Üçlü Komplekslerin Hazırlanışı

5 mg peptid 2,5 ml PBS'de çözüldü ve yine 2,5 ml PBS'de çözünmüş 10 mg polioksidonyum çözeltisine eklendi. 20 dakika oda sıcaklığında karıştırıldı. 15 mg / ml konsantrasyonunda hazırlanmış bakır çözeltisi damla damla hafif bulanıklık görülünceye kadar karıştırılarak eklenmiştir. Oda sıcaklığında yaklaşık 30 dk karıştırıldıktan sonra gece boyunca +4 ^{0}C'de kompleksleşme reaksiyonu tamamlandı.

Numune membranlı tüp ile 5000rpm de 5 dk santrifüj edilerek saflaştırılarak üstte kalan kısım fare deneylerinde 0,5 ml polioksidonyum-Cu-peptid üçlü kompleksi periton enjeksiyonlarında kullanılmıştır. Şekil 4.21'de Polioksidonyum-Cu-Peptid üçlü komplekslerin hazırlanış şeması gösterilmektedir.



Şekil 4.21 Polioksidonyum-Cu-Peptid Üçlü Komplekslerin Hazırlanış Şeması

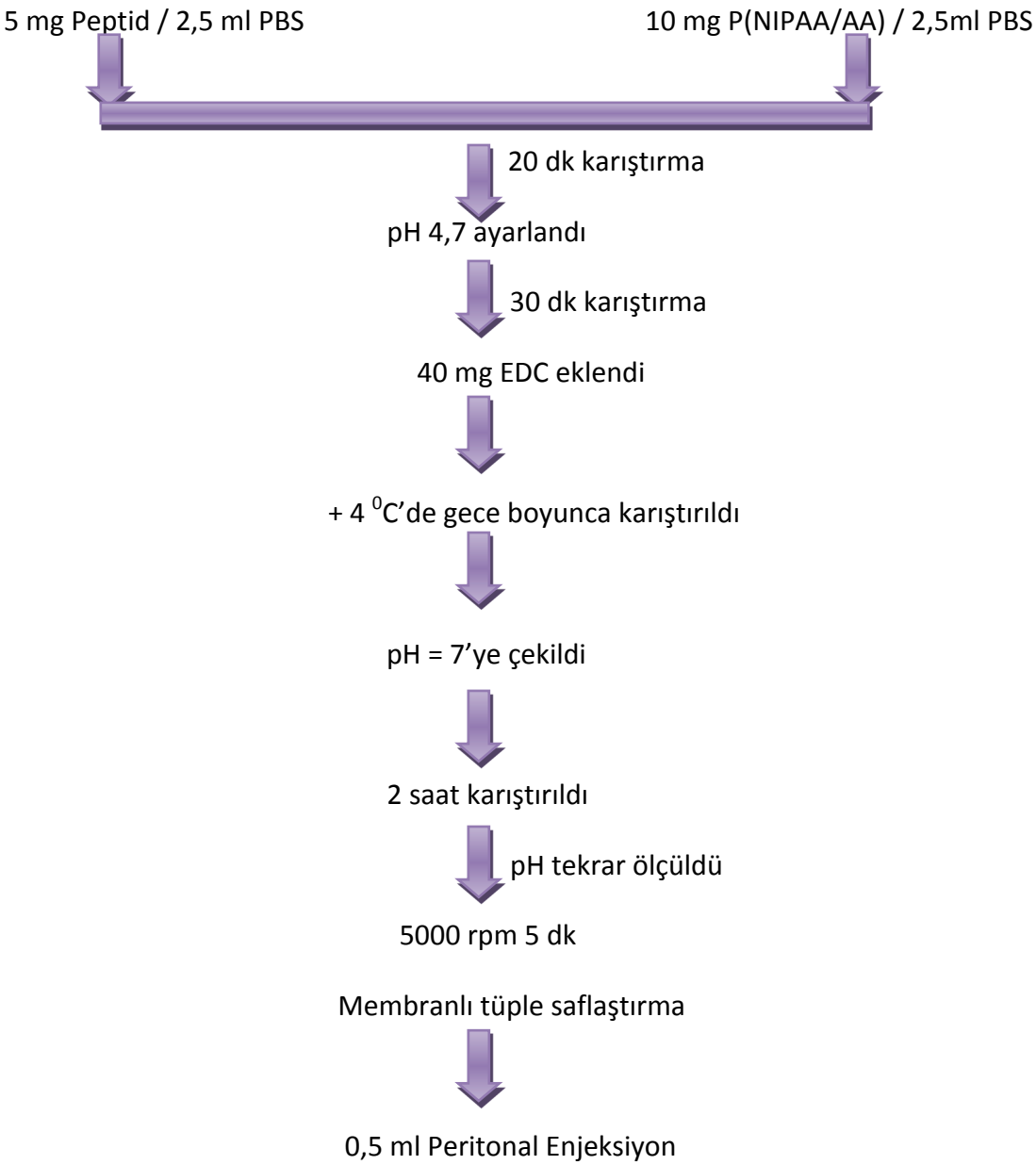
4.7.7 P(NIPAA-AA)-Peptid Konjugatlarına Ait Hesaplamalar

Fare deneylerinde kullanılmak üzere 1 fare başına 0,5ml periton enjeksiyon için 0,5 mg peptid, 1 mg P(NIPAA/AA) polimeri ile konjugasyon reaksiyonuyla EDC çapraz bağlama reaktifi kullanılarak konjuge edilmiştir. EDC miktarı peptide kıyasla 4 kat olacak şekilde 40mg olarak hesaplanmıştır.

4.7.8 P(NIPAA/AA)-Peptid Konjugatlarının Hazırlanışı

5 mg peptid 5 ml PBS'de çözüldü ve yine 5 ml PBS'de çözünmüş 10 mg P(NIPAA/AA) polimer çözeltisine eklendi. En yüksek EDC aktivasyonunu sağlamak için öncelikle çözelti pH'ı 4.7'ye ayarlanmıştır. Yaklaşık 30 dk karıştırıldıktan sonra 40mg EDC eklendi ve gece boyunca +4 ^{0}C'de konjugasyon reaksiyonu tamamlandı. pH 7 ye çözelti analiz için tekrar geri ayarlandıktan sonra membranlı tüp ile 5000rpm de 5 dk santrifüj edilerek saflaştırıldı üstte kalan kısım analize verildi. Fare deneylerinde 0,5 ml periton

enjeksiyonlarında kullanılmıştır. Şekil 4.22'de P(NIPAA-AA)-Peptid konjugatlarının hazırlanış şeması gösterilmektedir.



Şekil 4.22 P(NIPAA-AA)-Peptid Konjugatlarının Hazırlanış Şeması

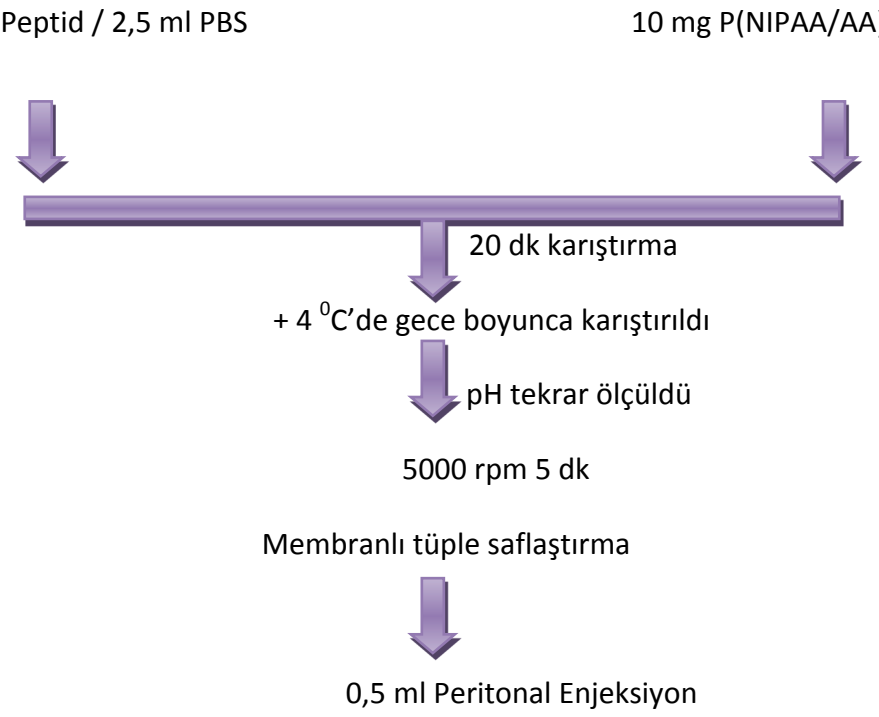
4.7.9 P(NIPAA/AA) - Peptid İkili Komplekslerine Ait Hesaplamalar

Fare deneylerinde kullanılmak üzere 1 fare başına 0,5ml periton enjeksiyon için 0,5 mg peptid, 1 mg P(NIPAA/AA) polimeri fiziksel etkileşim yoluyla bağlanmaları için kompleksleştirilmiştir.

4.7.10 P(NIPAA/AA) - Peptid İkili Komplekslerinin Hazırlanışı

Fare deneylerinde kullanılmak üzere 1 fare başına 0,5ml periton enjeksiyon için 0,5 mg peptid, 1 mg P(NIPAA/AA) polimeri fiziksel etkileşim yoluyla bağlanmaları için kompleksleştirilmiştir.

pH 7 de 5 mg peptid pH7 PBS tamponunda çözüldü ve yine PBS de çözülmüş olan 10 mg P(NIPAA-AA) kopolimeri ile oda sıcaklığında yavaş yavaş eklenerek karıştırılmaya başlandı. Gece boyu +4 ^{o}C'de karıştırma işlemi devam ettikten sonra 5000 rpm de bağlanmamış peptid membranlı tüplerde 5 dakika santrifüj edilerek uzaklaştırıldı ve daha sonra fare başına 0,5ml enjektörlere çekilerek balb/c farelere peritonal enjekte edildi. Şekil 4.23'de P(NIPAA/AA) - Peptid ikili komplekslerinin hazırlanış şeması gösterilmektedir.



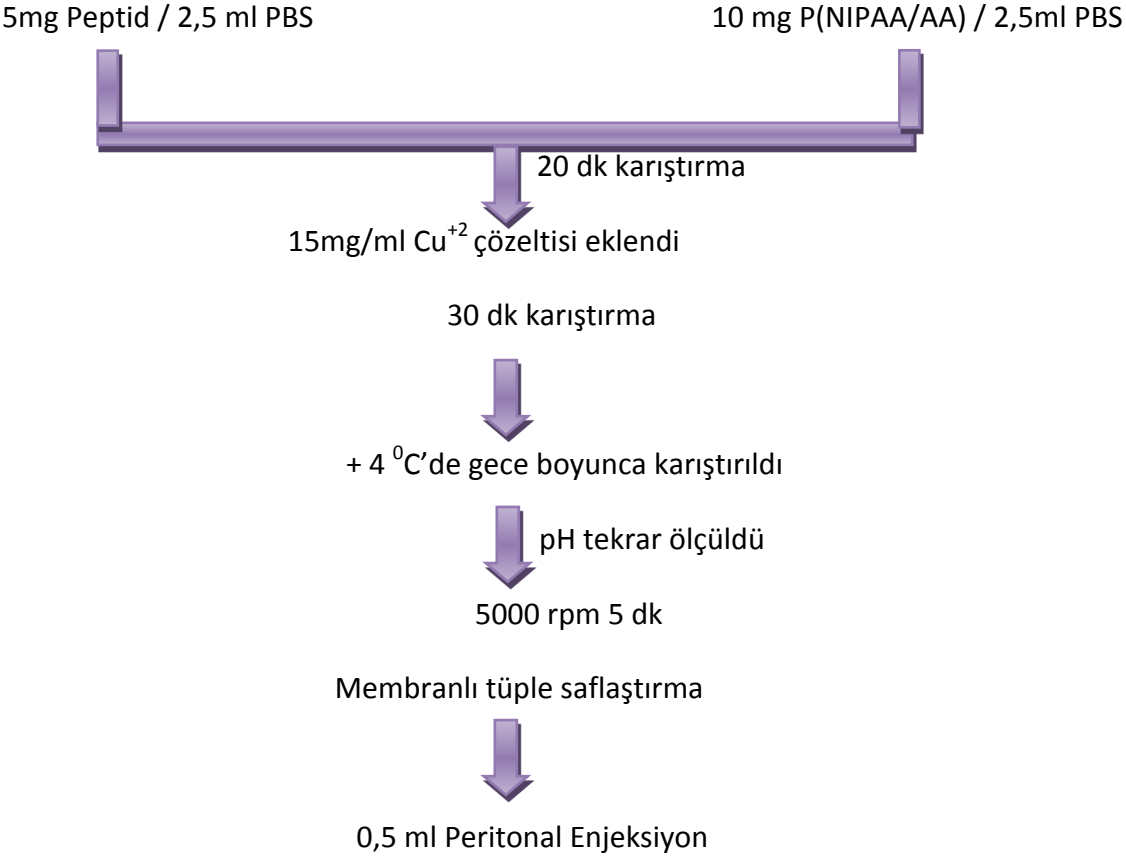
Şekil 4.23 P(NIPAA/AA) - Peptid İkili Komplekslerinin Hazırlanış Şeması

4.7.11 P(NIPAA/AA) -Cu - Peptid Üçlü Komplekslerin Hesaplanması

Fare deneylerinde kullanılmak üzere 1 fare başına 0,5ml periton enjeksiyon için 0,5 mg peptid, 1 mg P(NIPAA/AA) polimeri içerecek şekilde hesaplama yapılmıştır. Üçlü kompleks elde edilmesi amacıyla da 15mg/ml bakır çözeltisi hazırlandı.

4.7.12 P(NIPAA/AA) -Cu-Peptid Üçlü Komplekslerin Hazırlanışı

5 mg peptid 2,5 ml PBS'de çözüldü ve yine 2,5 ml PBS'de çözünmüş 10 mgP(NIPAA/AA) polimer çözeltisine eklendi. 20 dakika oda sıcaklığında karıştırıldı.1mg/1ml konsantrasyonunda hazırlanmış Cu^{+2} çözeltisi damla damla hafif bir bulanıklık görülünceye kadar karıştırılarak eklenmiştir. Oda sıcaklığında yaklaşık 30 dk karışımından sonra gece boyunca +4 ^{0}C'de kompleksleşme reaksiyonu tamamlandı. Numune membranlı tüp ile 5000rpm de 5 dk santrifüj edilerek saflaştırılarak üstte kalan kısım fare deneylerinde 0,5 ml polioksidonyum-Cu-peptid üçlü kompleksi periton enjeksiyonlarında kullanılmıştır. Şekil 4.24'de Polioksidonyum-Cu-Peptid üçlü komplekslerinin hazırlanış şeması gösterilmektedir.



Şekil 4.24 Polioksidonyum-Cu-Peptid Üçlü Komplekslerinin Hazırlanış Şeması

4.7.13 BSA –Peptid Konjugatlarının Hazırlanmasına Ait Hesaplamalar :

$$\frac{n_{peptid}}{n_{BSA}} = \frac{c_{peptid} \cdot M_{BSA}}{M_{Peptid} \cdot c_{BSA}} \Rightarrow \frac{\frac{2{,}5mg}{4ml} \cdot 66{,}000}{1674 \cdot \frac{8mg}{4ml}} = 12{,}32$$

n=12,32'ye göre 8 mg BSA ve 2,5 mg progesteron hesaplanmıştır.

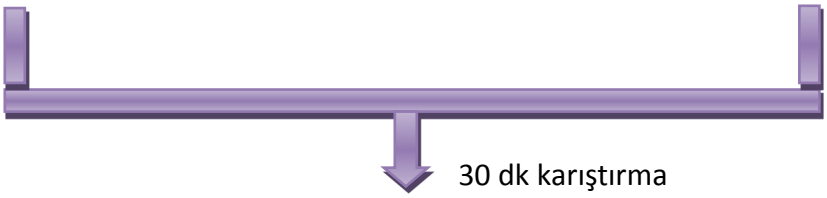
EDC ise progesteronun 4 katı olarak yani 10mg olarak hesaba katılmıştır.

4.7.14 BSA –Peptid Konjugatlarının Hazırlanışı :

8 mg BSA 2 ml PBS'de çözüldükten sonra bu çözeltiye 2 ml PBS'de çözünmüş olan 2,5 mg peptid çözeltisi yavaşça eklendi. Yarım saatlik bir karıştırmanın ardından çözeltinin önce pH'ı 4,7'ye ayarlandı ve 20 dakika karıştırdıktan sonra 10 mg EDC bu çözeltiye ilave edildi. 2 saat oda sıcaklığında karıştıktan sonra +4^{o}C'de bir gece reaksiyon tamamlandı. Ertesi gün pH tekrar 7 ye ayarlandıktan sonra elde edilmiş olan konjugat liyofilizatörde tamamen çözücüsünden uzaklaştırılarak kurutuldu. Daha sonra 4mg konjugat 2ml PBS'te tekrar çözülerek kuyuların kaplanmasında kullanılmak üzere dilüsyona hazır hale getirildi. Şekil 4.25'de BSA –Peptid konjugatlarının hazırlanış şeması gösterilmektedir.

2,5 mg Peptid / 2 ml PBS

8 mg BSA / 2 ml PBS



30 dk karıştırma

pH 4,7 ayarlandı

30 dk karıştırma

10 mg EDC eklendi

+ 4 ^{0}C'de gece boyunca karıştırıldı

pH = 7'ye çekildi

-40 ^{0}C'de dondurulduu

liyofilizatörde kurutuldu

4 mg numune / 2 ml PBS'de

stok hazırlandı

0,3 ml'şer numune ayrılarak

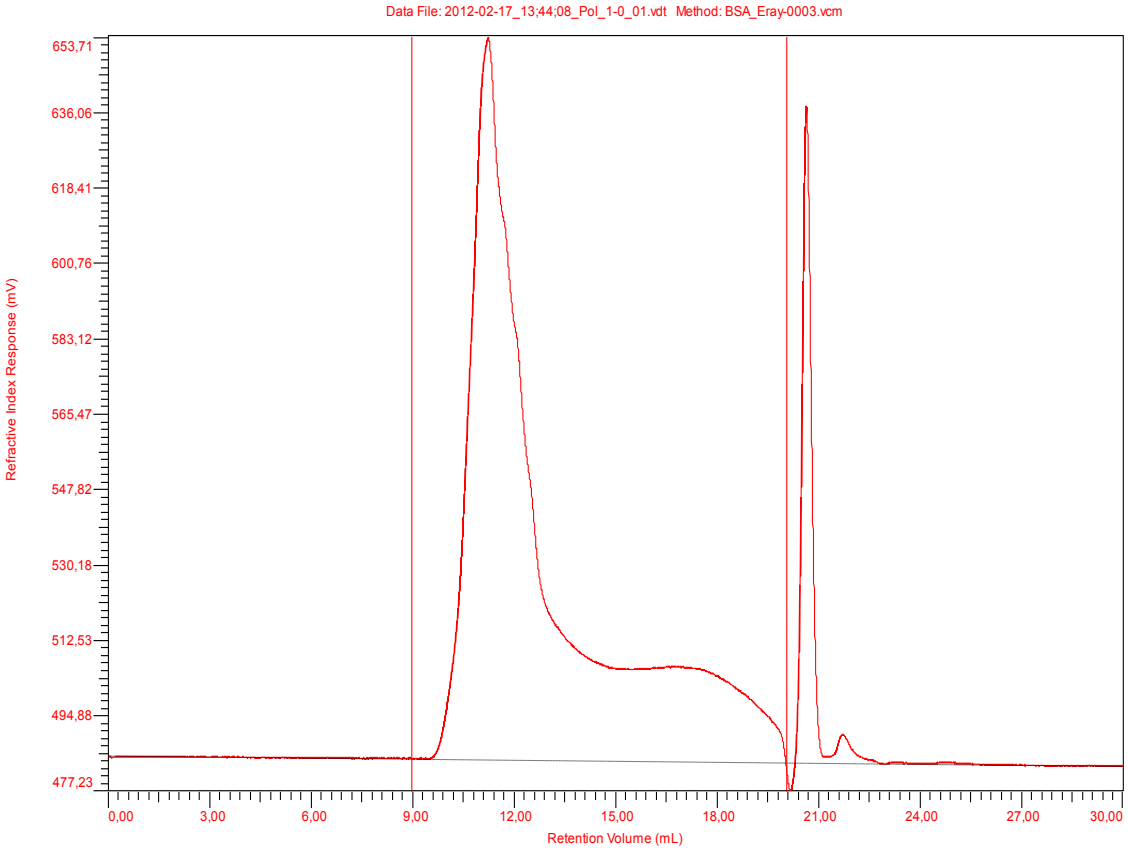
ependorflarda -20C'de dondurulduu

Şekil 4.25 BSA –Peptid Konjugatlarının Hazırlanış Şeması

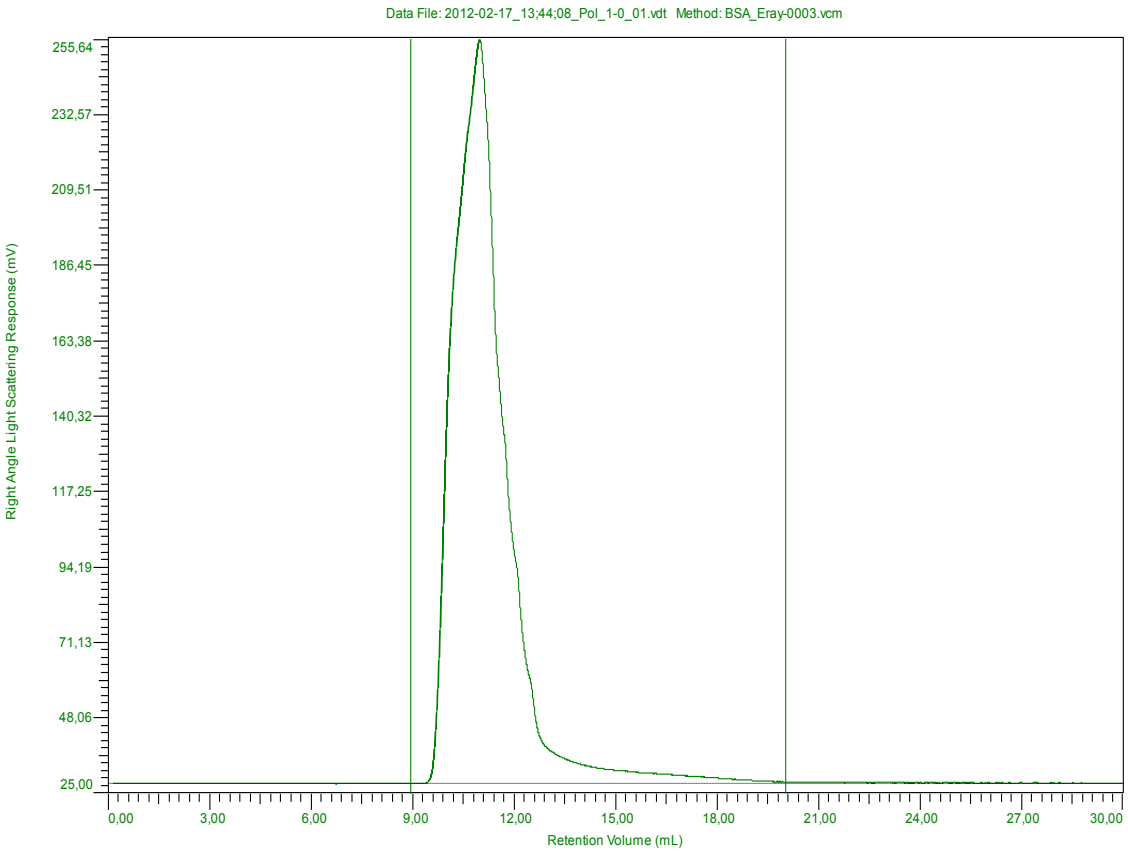
BÖLÜM 5

DENEY SONUÇLARI

5.1 VP – AA = 2:1 Kopolimeri Sentezine Ait Deney Sonuçları



Şekil 5.1 VP – AA = 2:1 Kopolimeri Sentezine Ait GPC-Refraktif İndeks Kromatogramı

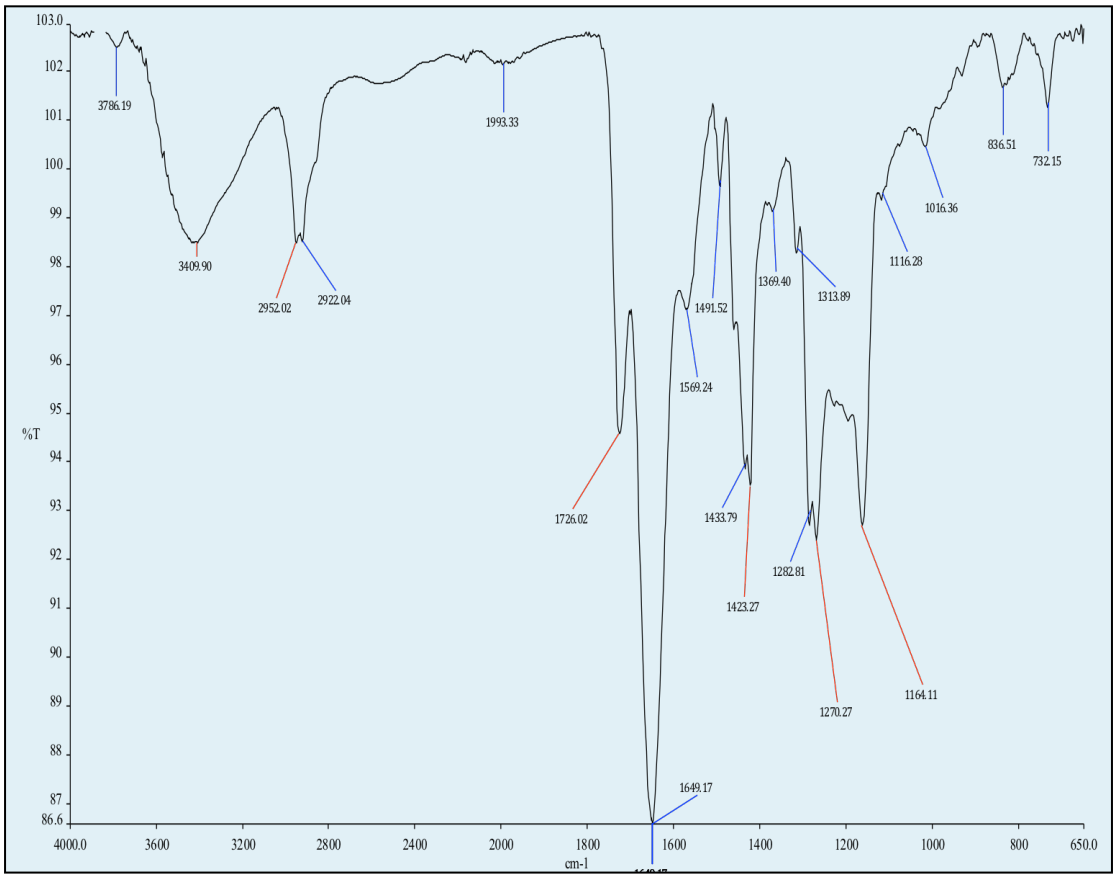


Şekil 5.2 VP – AA = 2:1 Kopolimeri Sentezine Ait GPC-Işık Saçılması Kromatogramı

Çizelge 5.1'de klasik yöntem kullanılarak literatürde anlatıldığı gibi sentezlenen, bileşenlerinin VP:AA = 2:1 olan kopolimerlerin molekül ağırlıkları Mn, Mw ve Mz cinsinden verilmektedir. Molekül ağırlığı tayini Viskotek cihazında yapılan analiz sonrası hesaplanmıştır. Şekil 5.1 ve Şekil 5.2'de GPC-refraktif indeks ve ışık saçılması dedektörlerine ait kromatogramlardan görüldüğü üzere sentezlenen P(VP-AA) (2:1) kopolimerinin 9 ile 20. dakikaları arasında yapılan hesaba göre Mw'ı 151.977 g/mol olarak bulunmuştur. P(VP-AA) (2:1) kopolimeri yapısında yer alan akrilik asit yüzdesine göre diğer sentezlenebilecek daha yüksek orandaki akrilik asit yüzdelerine kıyasla daha az toksik etkiye sahiptir ve canlı sistemde kalma süresi (prolongation) daha düşük molekül ağırlıklı P(VP-AA) (1:1) kopolimerine kıyaslayla daha uzun olacaktır. Deneylerimizde kullanmak için sentezlenen immünolojik çalışmalarda daha iyi sonuç vereceğini düşündüğümüz P(VP-AA) (2:1) kopolimeri seçilerek sentezlenmiştir.

Çizelge 5.1 VP – AA = 2:1 Kopolimeri Sentezine Ait GPC ile Molekül Ağırlığı Tayini Sonuçları

Peak RV - (ml)	11,200
Mn - (Daltons)	43.102
Mw - (Daltons)	151.977
Mz - (Daltons)	430.655
Mp - (Daltons)	185.248
Mw / Mn	3,526
Wt Fr (Peak)	1,000
RI Area - (mvml)	416,55
RALS Area - (mvml)	399,91
Sample Conc - (mg/ml)	5



Şekil 5.3 VP – AA = 2:1 Kopolimeri Sentezine Ait FTIR Analiz Sonucu

Çizelge 5.2 Polivinilpirolidon (PVP) FTIR Analiz Sonuçları [81], [82].

1100–1200 cm^{-1}	C–N absorpsiyon bandı
2900 cm^{-1}	C–H gerilme titreşimleri
1703 cm^{-1}	C□O gerilme bandı piki
1436 cm^{-1}	pirolidone halkasında bulunan C–C' a ait gerilme bandı

Çizelge 5.3 Poliakrilik asit (PAA) FTIR Analiz Sonuçları [81], [82].

3000–3500 cm^{-1}; 2500-2700 cm^{-1}	O–H bandı
2900 cm^{-1}	C–H gerilme titreşimleri
1485, 1396 ve 1700 cm^{-1}	COOH

Çizelge 5.4 Poli(N-vinilpirolidon-akrilik asit) (P(VP-AA)) FTIR Analiz Sonuçları [81], [82].

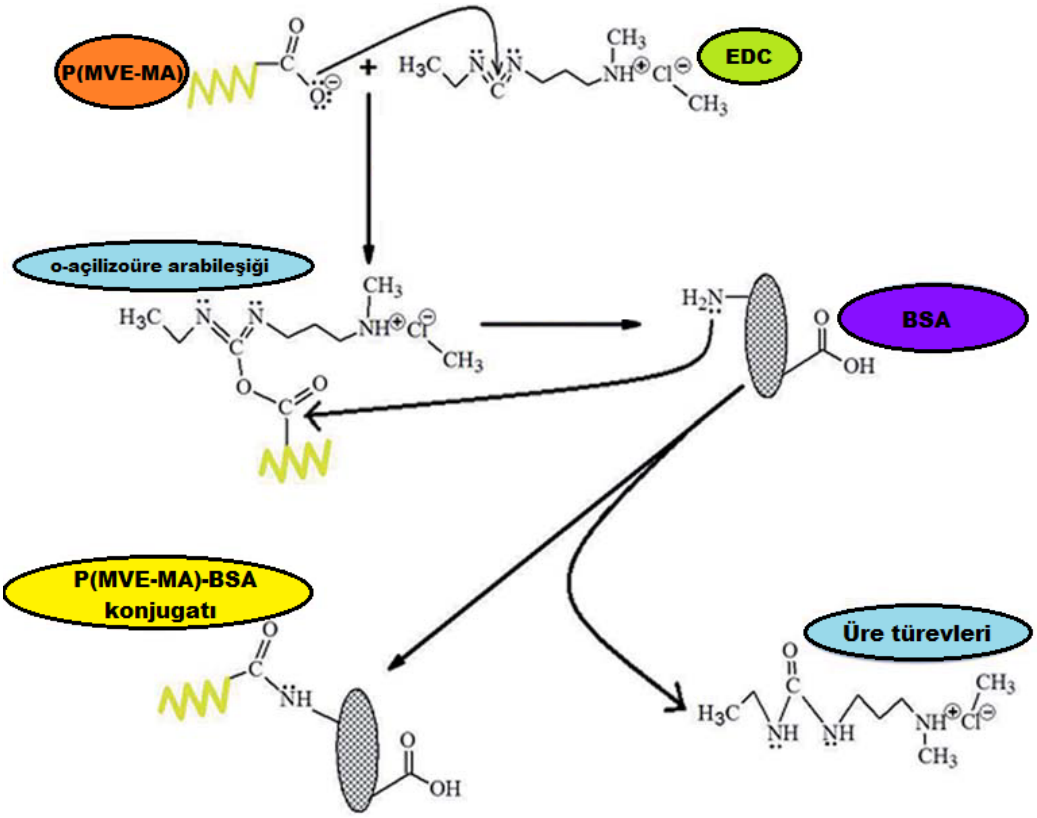
1340-1470 cm^{-1}	zincirdeki –CH2– grupları
690-900 cm^{-1}	aromatik halkadaki C-H ait kuvvetli bant
1700, 1485 cm^{-1}	siklik gruplarda bulunan C=O bağı
1690-1760 cm^{-1}	karboksilik grubuna ait C=O bağı
1050-1300 cm^{-1}	karboksilik asitteki C-O
1422, 1442 cm^{-1}	pirolidon halkasındaki (C–C) gerilme bandı
1180-1360 cm^{-1}	vinil pirolidonda yer alan C–N absorpsiyon bandı

Poly(n-vinilpirolidon-co-akrilik asit) oluşumunu tespit edebilmek için bir spektroskopik karakterizasyon olan FTIR analizi sentezlenen kopolimer için yapıldı. P(VP-AA) kopolimeri içerisinde yer alan her iki bileşene ait bantlar FTIR spekturumunda görülmektedir.Sentezlenen VP-AA kopolimerlerinde yer alan bağ ve grupların kopolimerde olması gereken bant karakteristiğiyle birebir örtüştüğü FTIR analizlerinde tespit edilerek yukarıda listelenmiştir. Bu sonuçlar AA monomerinin VP monomeri ile kopolimerleşmenin gerçekleştiğini göstermektedir. Şekil 5.3'de P(VP-AA) (2:1) mol oranlarında sentezlenen kopolimerlere ait FTIR spektrumu görülmektedir. 1690-1760 cm^{-1}, 1180-1360 cm^{-1}, 1422 ve 1442 cm^{-1}' de oluşan pikler kopolimerizasyonun gerçekleştiğini kanıtlayan en önemli piklerdir. Karboksilik gruplarında yer alan C=O bağına ait pikler 1569 cm^{-1} ve 1649 cm^{-1}'de görülürken ; siklik gruplarda bulunan C=O bağına pik 1726 cm^{-1} de görülmektedir. Pirolidon halkasında yer alan C-C bağına ait pikler 1423 cm^{-1} ve 1433 cm^{-1}' de görülmektedir.Ayrıca vinil pirolidonda yer alan C–N absorpsiyon bandına ait pikler 1180-1360 cm^{-1} alanı içerisinde 1270 cm^{-1} v 1282 cm^{-1} de görülmektedir. Analiz sonuçları literatur bilgileri ile kıyaslandığında başarılı bir sentezin gerçekleştirildiği sonucuna ulaşılırken GPC kromatogramlarından alınan molekül ağırlığı bilgisine göre konjugasyon reaksiyonlarında kullanılabileceğini ve immünolojik denemelerde konjugatların enjekte edilebileceği sonucuna ulaşılmıştır.

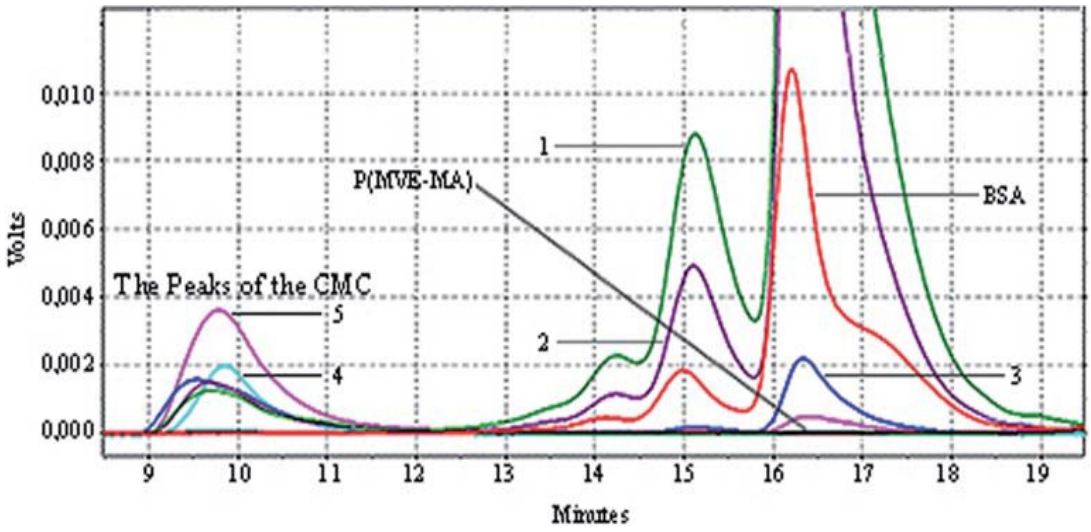
5.2 MW Destekli ve Konvensiyonel Yöntemle EDC Çapraz Bağlayıcısı ile Hazırlanan P(MVE-MA)-BSA Konjugatlarına Ait Analiz Sonuçları

Maleik anhidrid kopolimeri bünyesinde barındırdığı anhidrid yapının hidrolize olmasından dolayı sulu ortamda polyelektrolit halini alan, enzim immobilizasyonu, ilaç taşıma sistemleri ve benzeri biyomedikal uygulamalarda etkinliği iyi bilinen kopolimer çeşitlerindendir. Karboksilik grubunun iki adımda disosiasyonu, counterionlara bağlanmaları, pH'a bağlı konformasyonel değişimleri, yarı-nötralizasyon noktasında maksimum viskoziteye sahip olduğunu gösteren çalışmaların literatürde var olduğu bilinmektedir. P(MVE-MA) kopolimeri ile BSA ve benzeri biyomoleküllerin ikili kompleksleşme, metal varlığında üçlü kompleksleşme, spacer veya çapraz bağlayıcılar vasıtasıyla bağlanmaları daha önce de çalışılmış fakat geleneksel bu yöntemler ile uzun reaksiyon sürelerinin gerekliliği ortaya konmuştur[83].

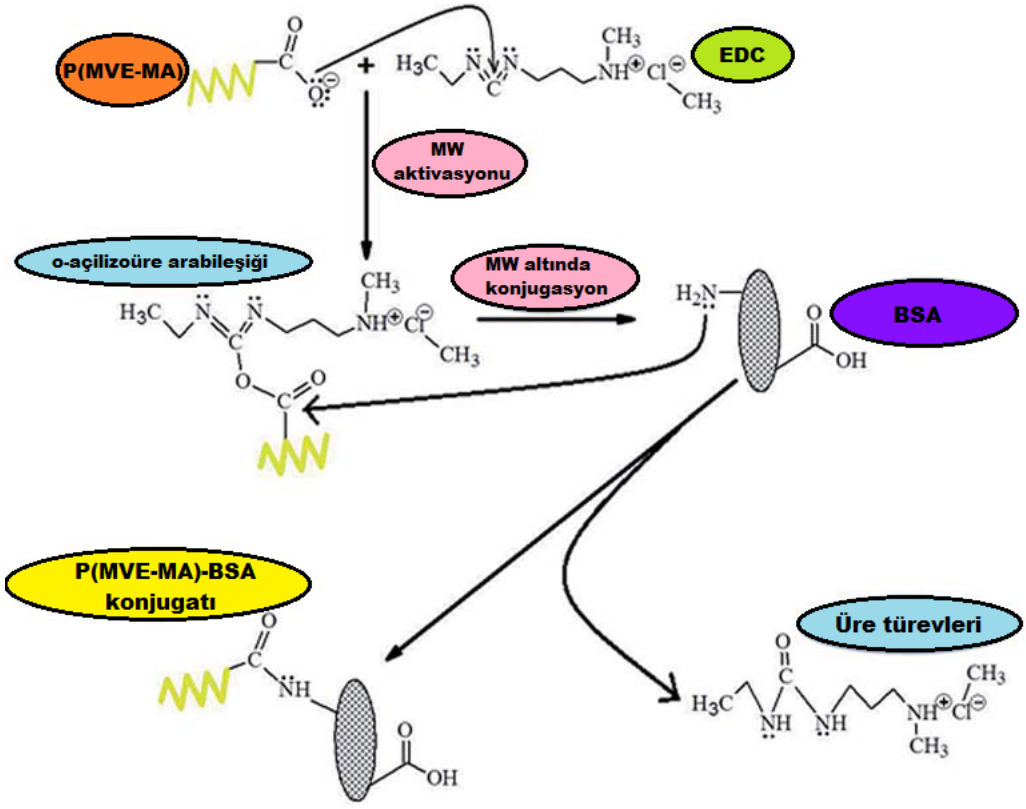
Bu amaçla çalışmamızda EDC varlığında sentezlenen P(MVE-MA)-BSA konjugatı hem geleneksel yöntemle hem de mikrodalga (MW) enerjisi altında sentezlendi. MW altında gerçekleşen reaksiyonlarda MW enerjisinin termal ve nontermal etkisinden faydalanarak MW enerjisinin dipol etkileşim desteği ile reaksiyon sürelerinin kısaltılması hedeflenmiştir.



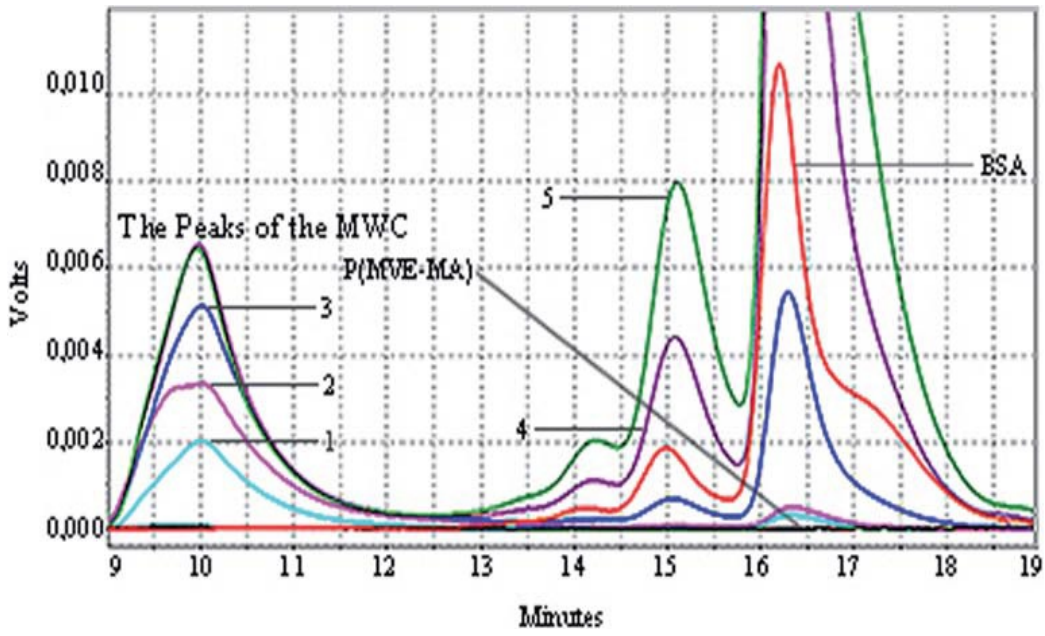
Şekil 5.4 Konvensiyonel metodla gerçekleştirilen EDC varlığında sentezlenen BSA-P(MVE-MA) konjugasyon reaksiyonunun mekanizması[83]



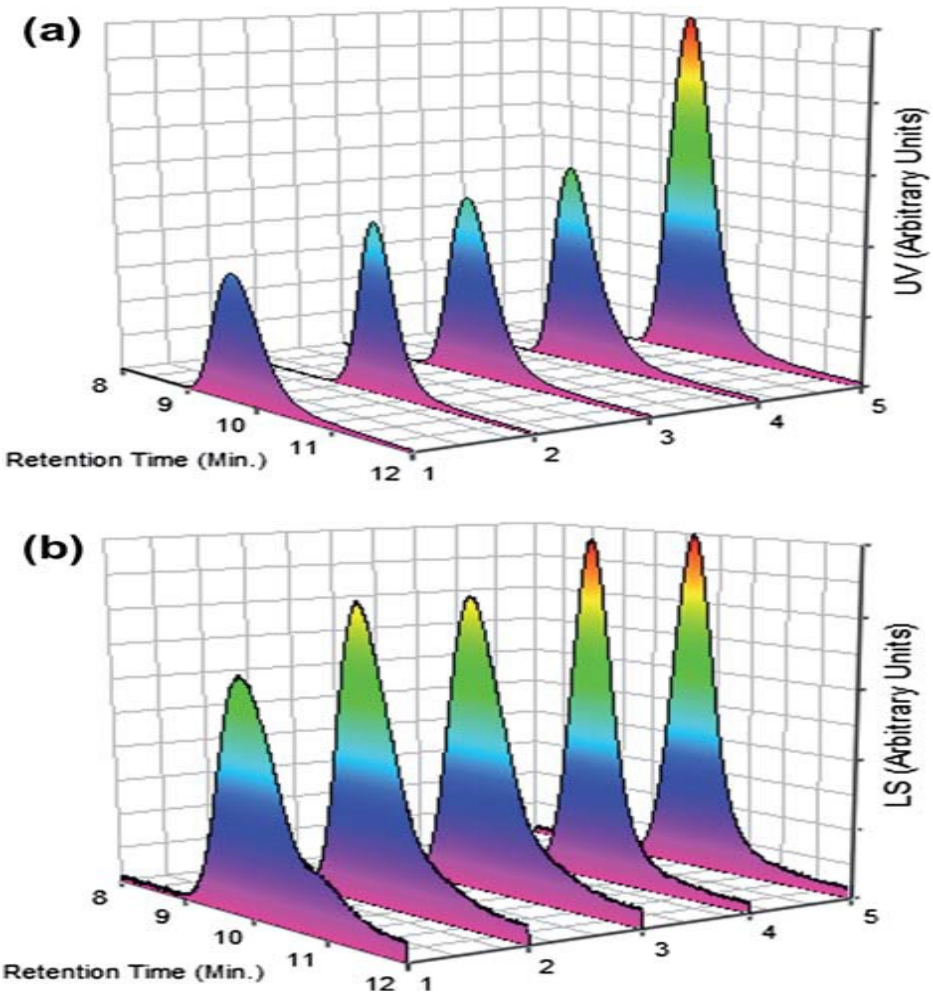
Şekil 5.5 Konvensiyonel yöntemle EDC varlığında sentezlenen konjugatlar (CMC) : BSA , P(MVE-MA) ve n BSA /n P(MVE-MA) : 0.25(1), 0.5(2), 1(3), 3(4), 5(5) oranlarında hazırlanmış olan BSA- P(MVE-MA) konjugatlarına ait HPLC kromatogramları[83].

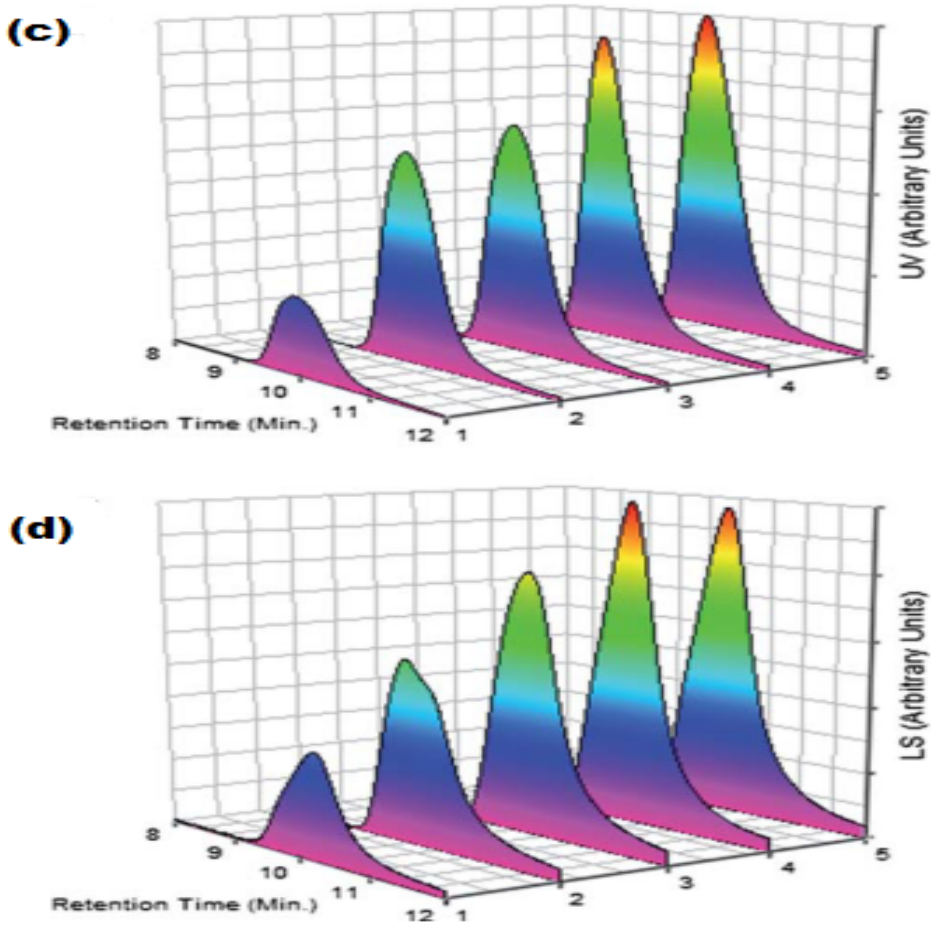


Şekil 5.6 Mikro dalga destekli yöntemle EDC varlığında sentezlenen BSA-P(MVE-MA) konjugatına ait konjugasyon reaksiyonunun mekanizması [83]

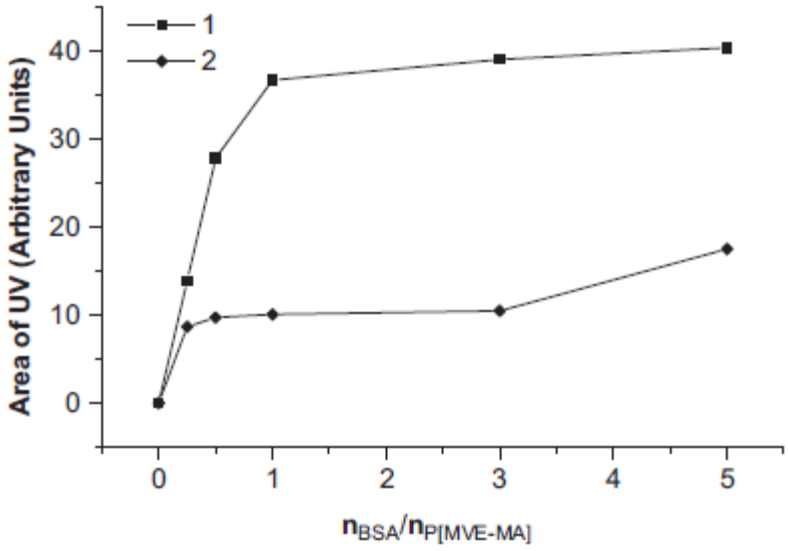


Şekil 5.7 Mikrodalga destekli konjugatlar (MWC) : BSA , P(MVE-MA) ve n BSA /n P(MVE-MA) : 0.25(1), 0.5(2), 1(3), 3(4), 5(5) oranlarında hazırlanmış olan BSA- P(MVE-MA) konjugatlarına ait HPLC kromatogramları[83].

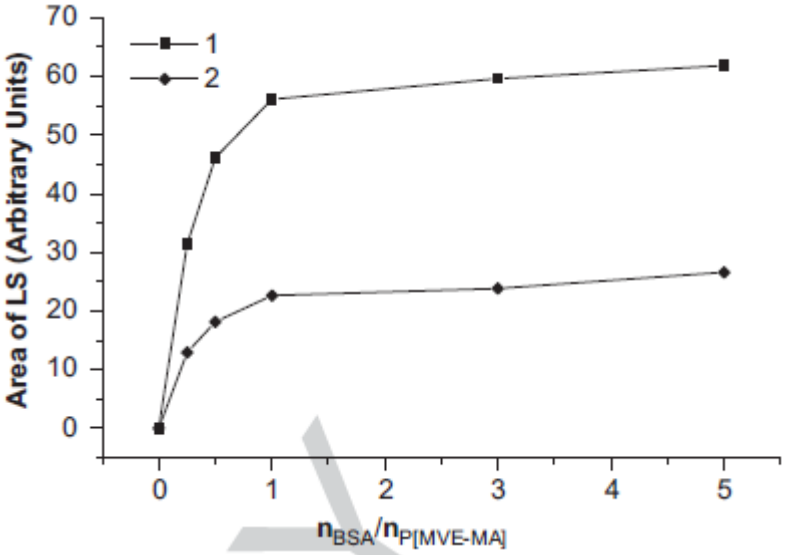




Şekil 5.8 Konvensiyonel metodla EDC varlığında sentezlenen n BSA /n P(MVE-MA) : 0.25(1), 0.5(2), 1(3), 3(4), 5(5) oranlarındaki BSA-P(MVE-MA) konjugatlarına ait GPC [UV (a), LS (b)] kromatogramları ve de mikrodalga destekli yöntemle EDC varlığında sentezlenen n BSA /n P(MVE-MA) : 0.25(1), 0.5(2), 1(3), 3(4), 5(5) oranlarındaki BSA-P(MVE-MA) konjugatlarına ait GPC [UV (c), LS (d)] kromatogramları [83]



Şekil 5.9 BSA /n P(MVE-MA) : 0.25, 0.5, 1, 3, 5 oranlarında hazırlanmış mikrodalga destekli EDC yöntemine ait (1) ve konvensiyonel EDC yöntemine ait (2) UV alanları [83]



Şekil 5.10 BSA /n P(MVE-MA) : 0.25, 0.5, 1, 3, 5 oranlarında hazırlanmış mikrodalga destekli EDC yöntemine ait (1) ve konvensiyonel EDC yöntemine ait (2) LS (ışığın saçılması) alanları [83]

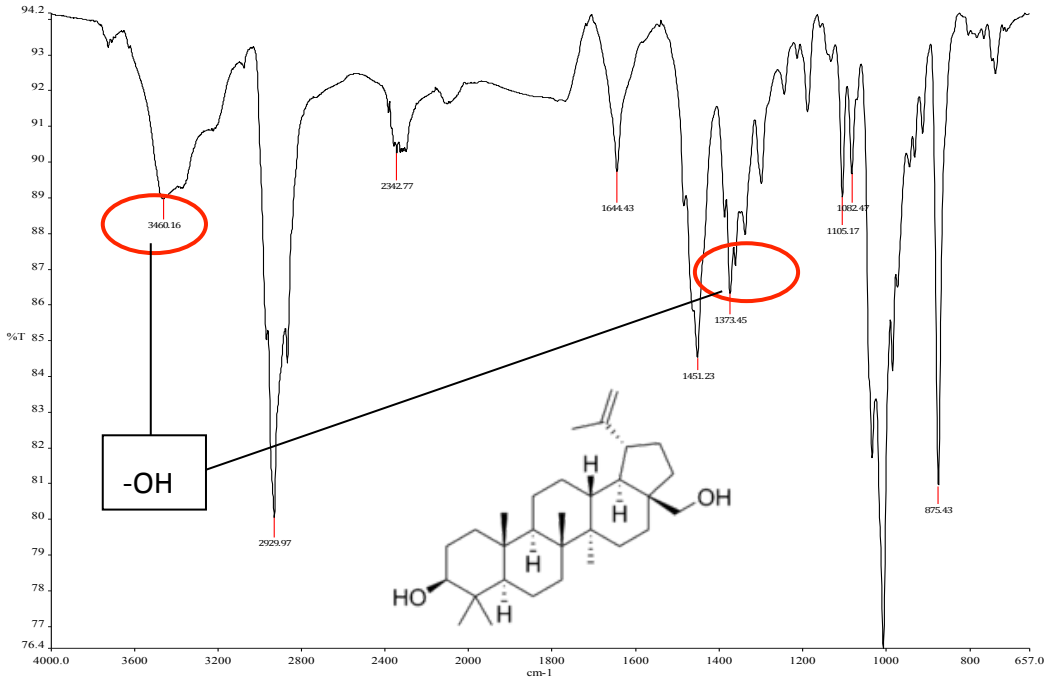
Konvensiyonel metod ile mikrodalga destekli metodun reaksiyon süreleri kıyaslandığından konvensiyonel metod ile 17 saat süren reaksiyon süresi mikrodalga şartlar altında toplam 15 dakikaya kısaltılmıştır. P (MVE-MA)-BSA konjugatlarının farklı oranlarda oluşumunun analizi HPLC ve GPC kromatografileri ile saptanmıştır. HPLC kromatogramlarına ait konvensiyonel metod ve mikrodalga destekli metoda ait

kromatogramlar tüm oranlarıyla Şekil 5.5 ve Şekil 5.7'de belirtilmiştir. BSA'ya ait proteinin primer, dimer ve trimer pikleri 13,5 ve 19 dakikaları arasında görülmüştür fakat polimer tek başına UV piki vermemektedir. Polimer ile BSA arasındaki intermoleküler etkileşimler sonucunda oluşan konjugatlara ait UV pikleri ise tek başına BSA'dan daha büyük moleküler yapıya sahip olduğu için kolonu daha erken terk etmekte ve genel olarak 9 ile 11,5 dakiakları arasında görülmektedir. Sabit polimer miktarlarına kıyasla her iki yöntemde de artan BSA miktarları ile konjugasyon reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Şekil 5.5'de görüldüğü üzere HPLC kromatogramına göre konvensiyonel EDC yönteminde n=5 oranında en yüksek şiddette konjugat piklerini elde etmekteyiz (n=5 için ; yaklaşık 0,004 volts – 9 ile 11 dakikaları arasında). Mikrodalga destekli EDC yönteminin HPLC kromatogramında ise Şekil 5.7 de görüldüğü gibi tüm oranlarda konvensiyonel metoda kıyasla daha yüksek şiddette konjugat pikleri elde etmekteyiz (n=5 için; 0,006 volts'dan daha yüksek – 9 ile 12 dakikaları arasında). Aynı P(MVE-MA)-BSA oranlarında GPC'ye ait UV ve LS sonuçlarını ise Şekil 5.8'de görmekteyiz ve bu kromatogramların da HPLC sonuçlarıyla benzer dakika ve şiddette konjugat pikleri vermesiyle birbirlerini desteklediği belirtilebilmektedir.

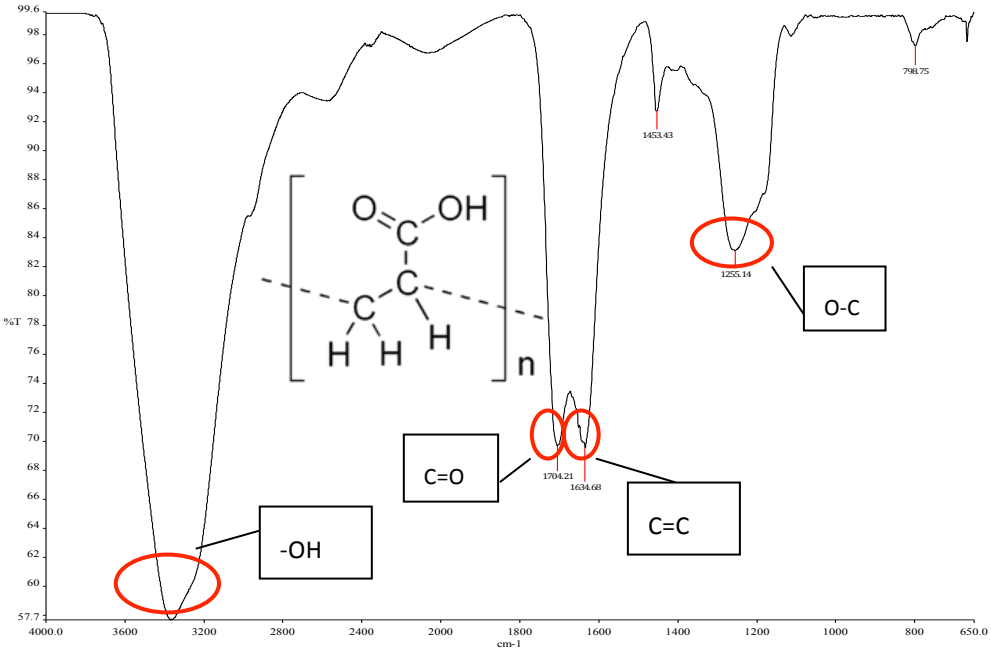
Şekil 5.9 ve Şekil 5.10'da ise konjugatların GPC kromatogramlarına ait UV ve LS alanları P (MVE-MA)-BSA oranlarına göre çizilmiştir. Mikrodalga destekli yöntemle EDC varlığında sentezlenen konjugasyonlardan elde edilen pik alanları ile konvensiyonel yöntemle EDC varlığında sentezlenmiş konjugatlara ait pik alanları kıyaslandığında mikrodalga desteğiyle sentezlenen konjugatlarda pik alanının 4 kat daha fazla olduğunu görmekteyiz.

Ölçümlerin sonucu olarak, artan miktarda BSA / P (MVE-MA) oranı arttıkça her iki yöntem ile elde edilen konjugat piklerinde artış görülmüştür ancak mikrodalga destekli konjugasyon reaksiyonları sonucu aynı miktarda reaktanlar kullanılmasına rağmen konjugatlara ait daha yüksek şiddette pik alanları elde edildiği HPLC kromatogramlarında görülmüştür. Bir diğer taraftan ise mikrodalga destekli şartlar sağlandığında, mikrodalga enerjisinin non termal etkisi olan moleküller üzerindeki dipolar polarizasyon mekanizması sayesinde konvensiyonel yöntemde 17 saatte tamamlanan konjugasyon reaksiyonunun 15 dakikada tamamlanması sağlanmış oldu.

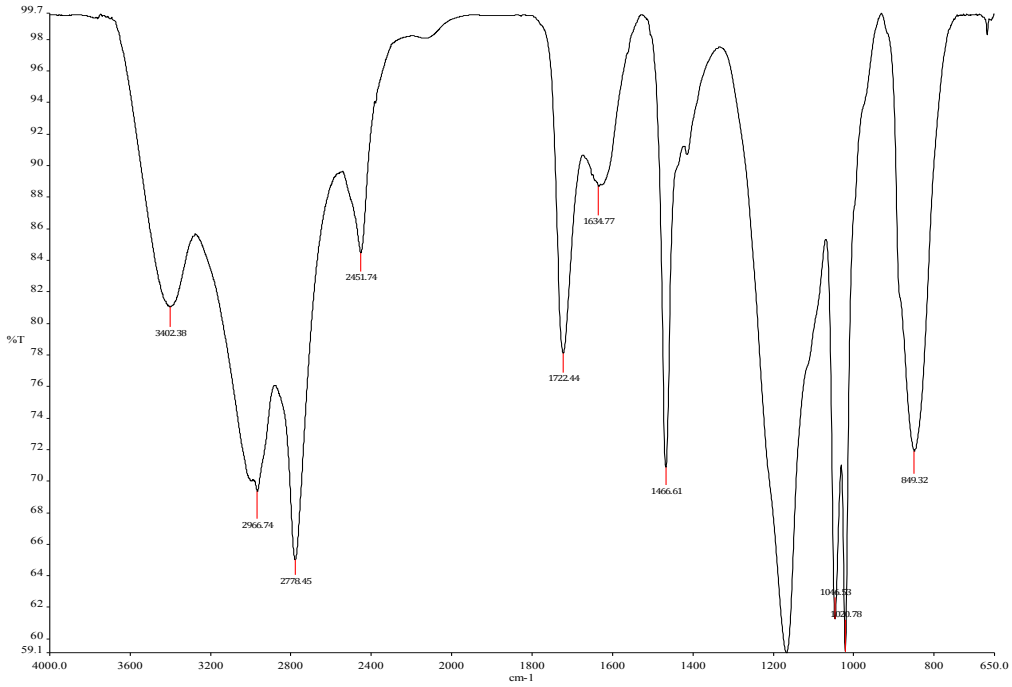
5.3 Tiyanil Klorür ve CDI Çapraz Bağlayıcısı ile Sentezlenmiş PAA-BETULİN Konjugatlarına Ait Analiz Sonuçları



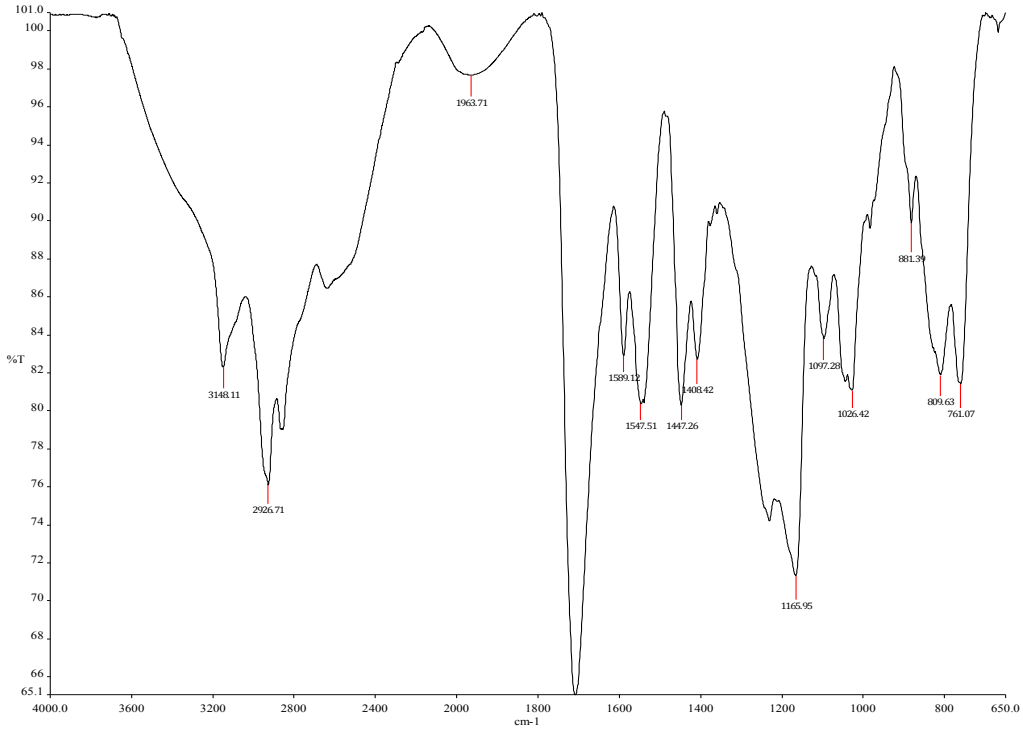
Şekil 5.11 Betulin molekülüne ait FTIR Analiz Sonucu



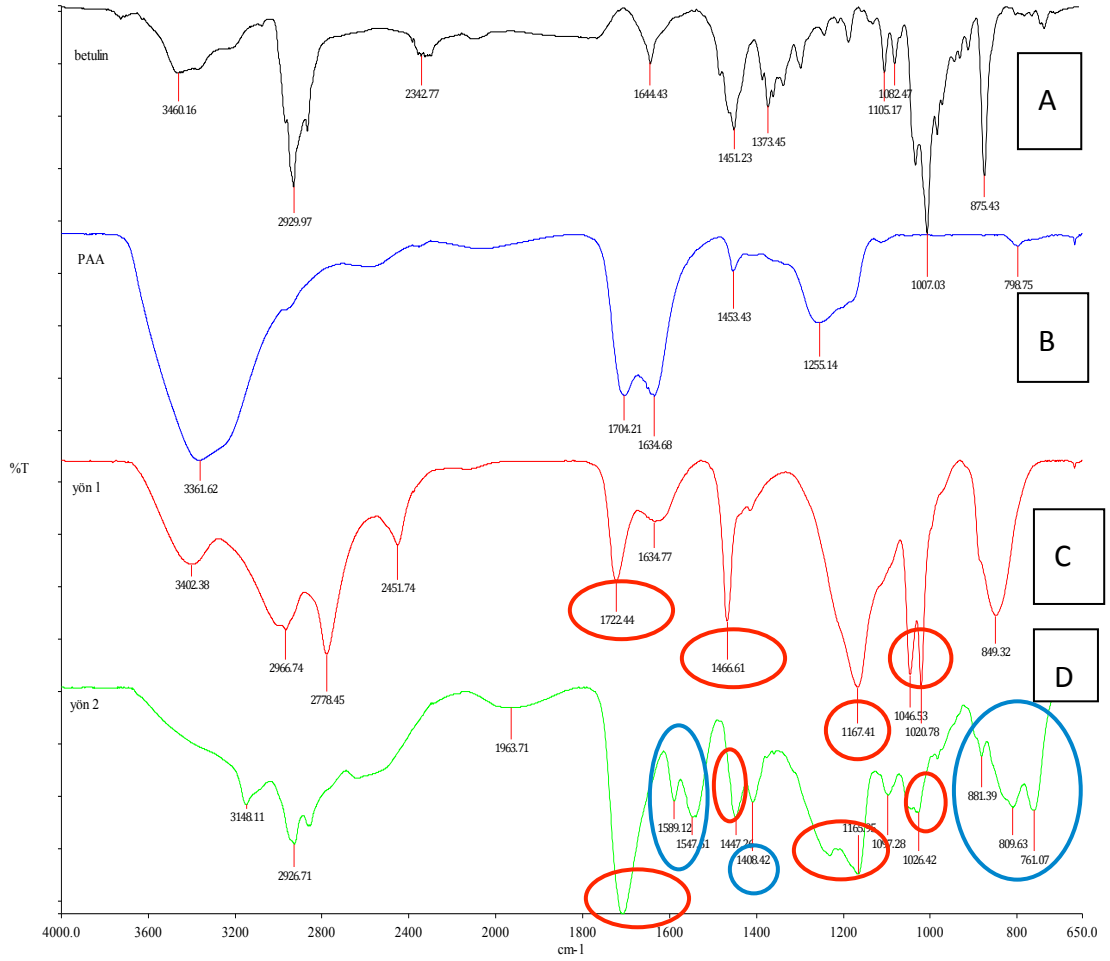
Şekil 5.12 PAA polimerine ait FTIR Analiz Sonucu



Şekil 5.13 SOCl2 yöntemi kullanılarak hazırlanmış PAA-betulin konjugatına ait FTIR spektrumu

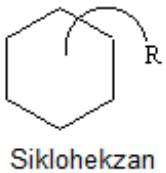


Şekil 5.14 CDI yöntemi kullanılarak hazırlanmış PAA-betulin konjugatına ait FTIR spektrumu



Şekil 5.15 A) betulin biyomolekülüne , B) poliakrilik asid polimerine, C) SOCl2 varlığında sentezlenmiş PAA-Betulin konjugatına , D) CDI varlığında sentezlenmiş PAA-Betulin konjugatına ait FTIR spektrumları

Çizelge 5.5 Betuline ait FTIR sonuçları [81], [82]

Alan [cm^{-1}]	**İlgili kısım**	**Açıklama**
1000 - 1055 arası 1007	 Siklohekzan	C-C İskelet titreşimleri
3580-3650 arası 3660	O-H (serbest),	Gerilme Titreşimleri

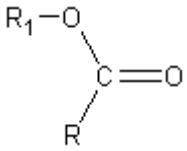
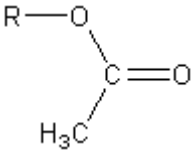
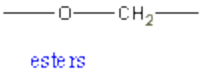
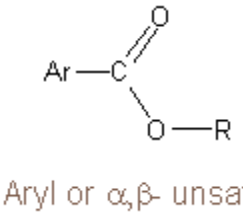
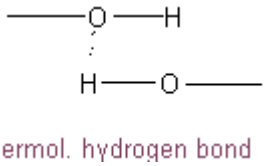
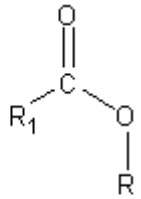
Çizelge 5.5 Betuline ait FTIR sonuçları (devam)

3200-3550 arası 3460	O-H (H-bağı),	Gerilme Titreşimleri
1330-1430 arası 1373	O-H bağı (düzlemde)	Eğilme Titreşimleri
2850-3000 arası 2929	CH3, CH2 & CH 2 veya 3 bağ	Gerilme Titreşimleri

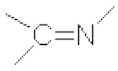
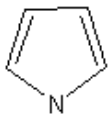
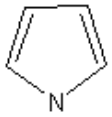
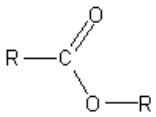
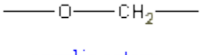
Çizelge 5.6 PAA ait FTIR sonuçları [81], [82]

Alan [cm^{-1}]	**İlgili kısım**	**Açıklama**
1580 - 1660 arası 1634	C=C C=C ile konjuge C=O	Zayıf; C=C Gerilme Titreşimleri
1700 - 1725 arası 1704	R—COOH doymuş alifatik hidrojen bağı	Çok kuvvetli; C=O Gerilme Titreşimleri
2500 – 3600 arası 3361	O-H çok geniştir C-H bandı ile çakışabilir	Çok Geniş-Kuvvetli; O-H Gerilme Titreşimleri
1210-1320 arası (asitler için) 1255	O-C (bazen 2 pik)	Orta – kuvvetli; O-H Gerilme Titreşimleri
1395-1440 arası 1400 civarı örtüşen	C-O-H bükülmeme	Orta; C-O-H Bükülme Titreşimi

Çizelge 5.7 Yöntem 1 ($SOCl_2$ yöntemi)'ne ait FTIR sonuçları [81], [82]

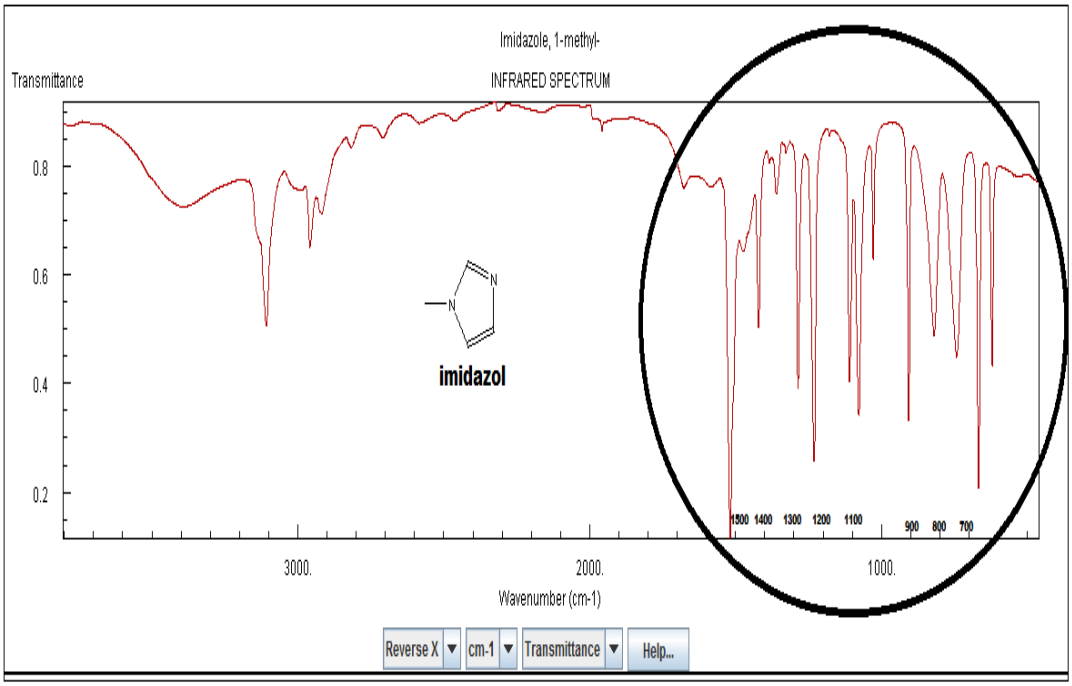
Alan [cm^{-1}]	**İlgili kısım**	**Açıklama**
1050 - 1275 arası 1167		Kuvvetli; C-O-C asimetrik gerilme titreşimleri
1020 - 1060 arası 1020 1046		Orta ; gerilme titreşimleri
1460 - 1475 arası 1466		Zayıf - Orta; CH_2 simetrik deformasyon titreşimleri
1705 - 1740 arası 1722		Çok kuvvetli; C=O gerilme titreşimleri
2500 – 3200 arası 2966	Orto-fenol bağlanmalar	Orta
3230 - 3550 arası 3402		Zayıf-orta; Geniş ve konsantrasyona bağlı pik oluşur
765 - 845 arası 849		Orta; C-O-C deformasyon titreşimi

Çizelge 5.8 Yöntem 2 (CDI yöntemi)'ne ait FTIR sonuçları [81], [82]

2850 – 3000 arası 2926	CH_3, CH_2 & CH 2 or 3 bands	Kuvvetli; Gerilme Titreşimleri
1480 - 1660 arası 1549 1589	conjugated, cyclic  	Kuvvetli; Gerilme Titreşimleri
1545 - 1580 arası 1549 1589	 Pyrroles	Zayıf - Orta; C=C and C=N düzlem tit.; 1-sübstitüe pirol halkası için 2 band oluşur
1390 - 1430 arası 1408	 Pyrroles	Çok kuvvetli; C=C and C=N düzlem titreşimi
660 – 900 arası 881 ; 809 ; 761	NH_2 & N-H	Sallanma (dalgalanma) (H bağlanmasında shift yapar)
1720 – 1750 arası 1725	 sat. aliphatic	Çok kuvvetli; C=O Gerilme Titreşimleri
1000-1300 arası 1165 1280	O-C (2 band) Esterler	Orta- Kuvvetli ; Gerilme Titreşimleri
1435 - 1470 arası 1447	 acyclic esters	Kuvvetli - orta; CH_2 simetrik deformasyon titreşimi

Çizelge 5.8 Yöntem 2 (CDI yöntemi)'ne ait FTIR sonuçları (devam)

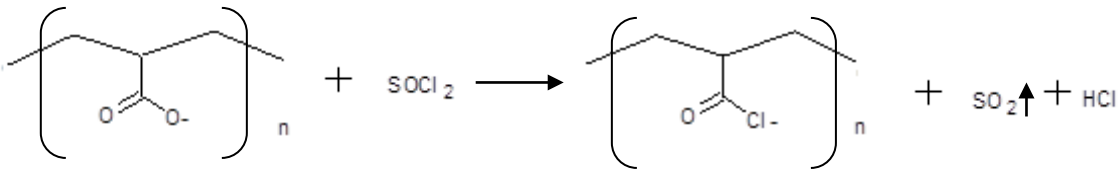
1030 -1030 arası 1026	—O—CH_2— esters	Zayıf – Orta ; C-H deformasyon titreşimi



Şekil 5.16 Reaksiyonda yan ürün olan imidazole molekülüne ait FTIR sonucu [84]

PAA-Betulin konjugatının $SOCl_2$ ile sentezlenme reaksiyon mekanizması;

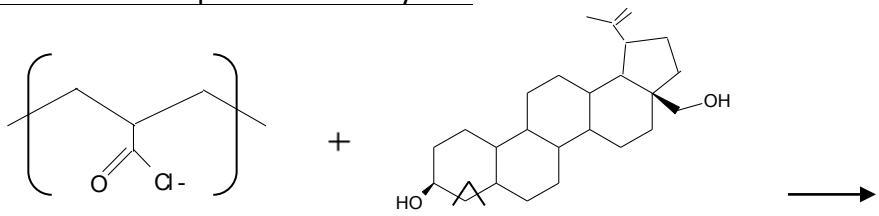
Kloranhidridin Oluşumu;



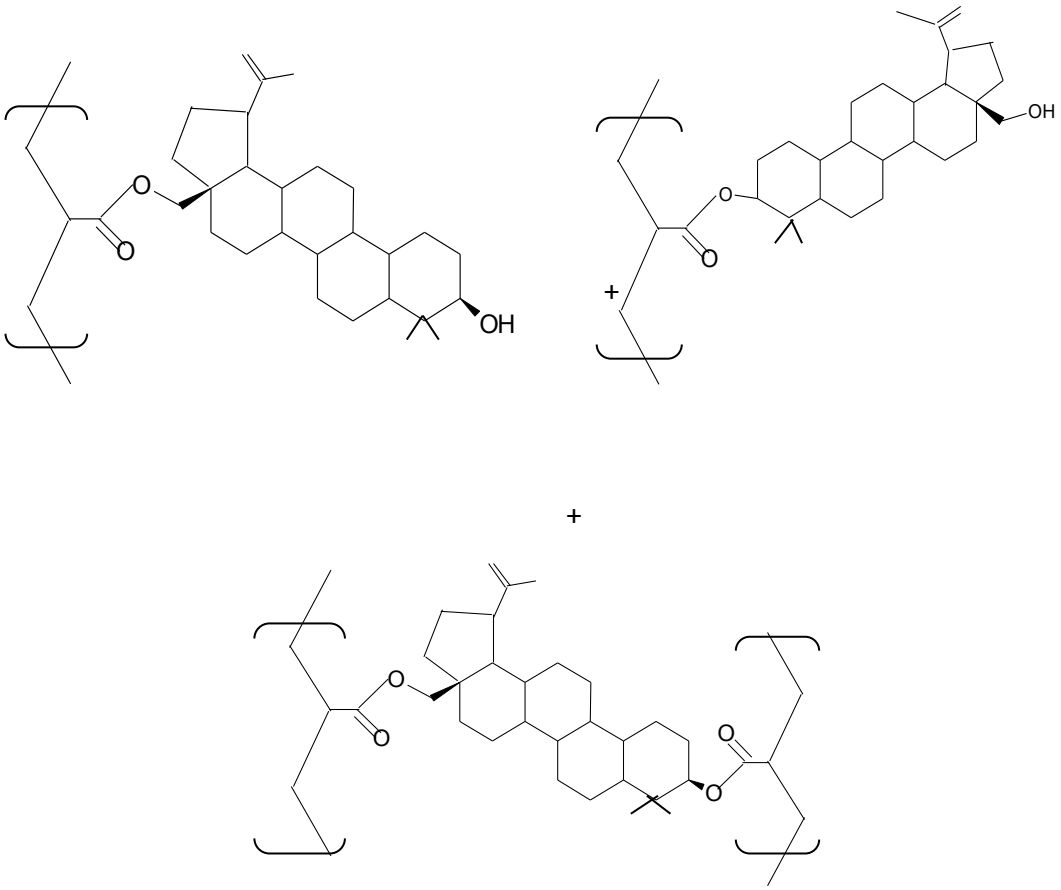
Şekil 5.17 Kloranhidrin oluşumu

Reaksiyonun SO_2 ayrılması ile gitmesi konjugat sentezinin tek bir aşama ile elde edilmesini sağlar[82], [85].

Kloranhidridin haptenlerle reaksiyonu:



Betulin

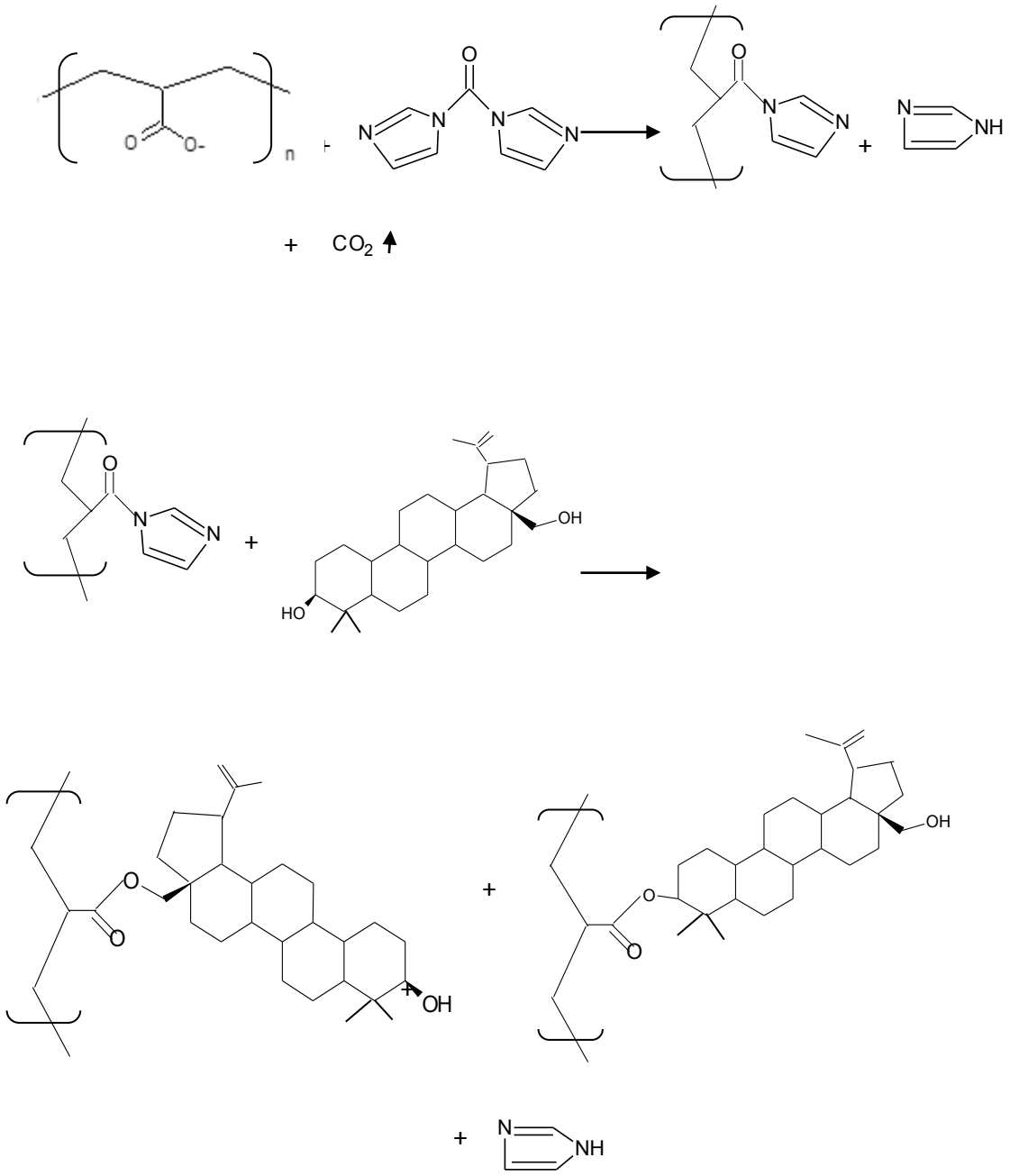


Şekil 5.18 PAA'nın botulin ile tiyanül klorür varlığında reaksiyon mekanizması

Poliakrilik asit – Betulin konjugatının oluşumunu tespit edebilmek için bir spektroskopik karakterizasyon olan FTIR analizi sentezlenen tüm konjugatlar için yapıldı. PAA-Betulin konjugatı içerisinde yer alan her iki bileşene ait bantlar FTIR spekturumunda şiddetleri azalarak görülmektedir. Sentezlenen PAA-Betulin konjugatında yer alan bağ ve grupların konjugatta olması gereken bant karakteristiğiyle birebir örtüştüğü FTIR analizlerinde tespit edilerek yukarıda listelenmiştir. Bu sonuçlar betulin biyomolekülünün poliakrilikasid polimeri ile konjugasyonunun gerçekleştiğini göstermektedir. Şekil 5.13 PAA-Betulin konjugatına ait FTIR spektrumu görülmektedir ve Şekil 5.15 PAA-betulin , sadece betulin ve sadece PAA'a ait spektrumların bir arada bulunduğu genel bir spektrum bulunmaktadır. Şekil 5.17 gösterildiği üzere reaksiyon 3 farklı şekilde gerçekleşebilmekte ve ester bağları oluşturarak konjugat elde edilmektedir. Betulin molekülünde fonksiyonel grup olarak 2 tane hidroksi grubu mevcuttur ve reaksiyonun daha yüksek oranda pirimer alkol kısmından ilerleyeceği, çapraz bağlayıcının yüksek oranlarında diol kısmından da reaksiyonun yürüyeceği öngörülmektedir. Nitekim konjugatın jel kıvamında elde edilişi reaksiyonda çarpraz bağlanmanın gerçekleştiğini göstermektedir. PAA-Betulin konjugatının FTIR sonuçları da betulinin her iki hidroksi grubundan da ester oluşturarak konjugasyonun gerçekleştiği görülmektedir.

1050-1275 cm-1 bandında kuvvetli C-O-C asimetrik gerilme titreşimleri ile 1460 - 1475 cm-1 bandında zayıf – orta dereceli CH2 simetrik deformasyon titreşimleri ve 1705 - 1740 cm-1 bandındaki çok kuvvetli olan C=O gerilme titreşimleri ester oluşumunu kanıtlayan en önemli pik aralıklarıdır. C-O-C asimetrik gerilme titreşimlerine ait 1167 cm-1 , CH2 simetrik deformasyon titreşimlerine ait 1466 cm-1 ve C=O gerilme titreşimlerine ait 1722 cm-1 pikleri ester oluşumuna dolayısıyla PAA-Betulin konjugatlarının oluştuğuna dair kanıt teşkil etmektedir. Analiz sonuçları literatur bilgileri ile kıyaslandığında başarılı bir sentezin gerçekleştirildiği sonucuna ulaşılırken GPC'den alınan kromatogramlar ile de PAA-betulin konjugatının elde edildiği sonucu desteklenmektedir.

5.4 CDI çapraz bağlayıcısı ile PAA-Betulin onjugatının sentezlenme reaksiyon mekanizması



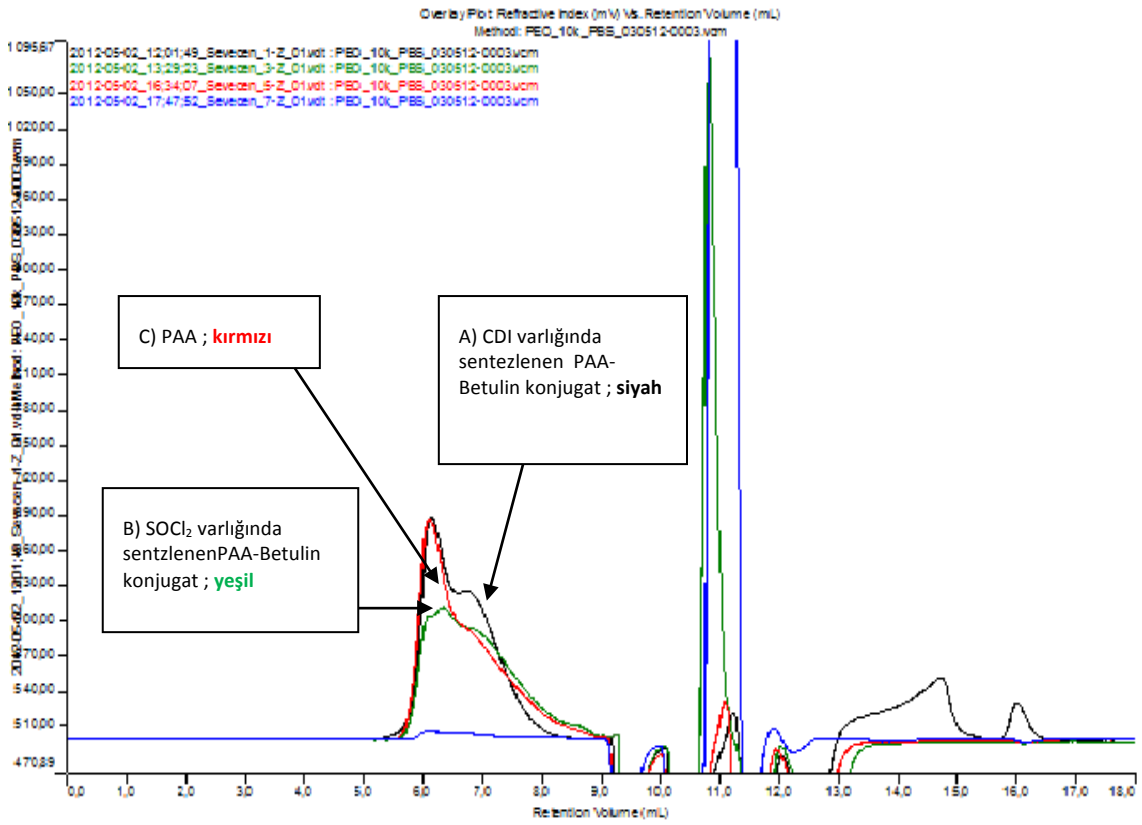
Şekil 5.19 PAA'nın betulin ile CDI varlığında reaksiyon mekanizması

CDI çapraz bağlayıcı reaktifinin kullanıldığı yöntemde poliakrilik asit – betulin konjugatının oluşumunu tespit edebilmek için bir spektroskopik karakterizasyon olan FTIR analizi sentezlenen tüm konjugatlar için yapıldı. PAA-Betulin konjugatı içerisinde

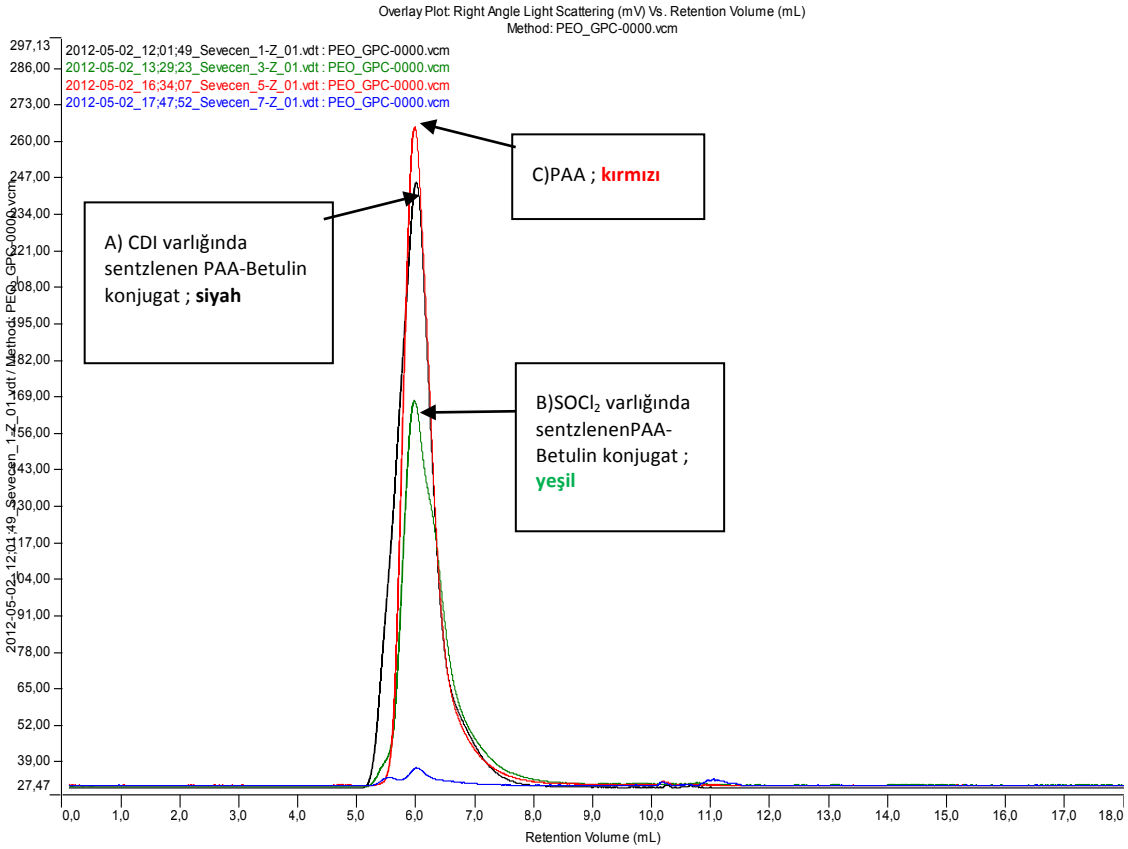
yer alan her iki bileşene ait bantlar FTIR spekturumunda şiddetleri azalarak görülmektedir. Sentezlenen PAA-Betulin konjugatında yer alan bağ ve grupların konjugatta olması gereken bant karakteristiğiyle birebir örtüştüğü FTIR analizlerinde tespit edilerek yukarıda listelenmiştir. Ayrıca reaksiyon yan ürünü olan imidazole ait piklerin görülmesi de ana ürün olan konjugatın sentezlenmiş olduğunu işaret etmektedir. Tüm bu sonuçlar betulin biyomolekülünün poliakrilikasid polimeri ile konjugasyonunun gerçekleştiğini göstermektedir. Şekil 5.14 PAA-Betulin konjugatına ait FTIR spektrumu görülmektedir ve Şekil 5.15 PAA-betulin , sadece betulin ve sadece PAA'a ait spektrumların bir arada bulunduğu genel bir spektrum bulunmaktadır. Şekil 5.18 gösterildiği üzere reaksiyon 2 farklı şekilde gerçekleşebilmekte ve ester bağları oluşturarak konjugat elde edilmektedir. Betulin molekülünde fonksiyonel grup olarak 2 tane hidroksi grubu mevcuttur ve reaksiyonun daha yüksek oranda primer alkol kısmından ilerleyeceği, çapraz bağlayıcının yüksek oranlarında diol kısmından da reaksiyonun yürüyeceği öngörülmektedir. PAA-Betulin konjugatının FTIR sonuçları da betulinin her iki hidroksi grubundan da ester oluşturarak konjugasyonun gerçekleştiği görülmektedir.

Ester gruplarına ait 1000 - 1300 cm-1 bandında orta kuvvette C-O gerilme titreşimleri ile 1435 - 1470 cm-1 bandında kuvvetli – orta dereceli CH2 simetrik deformasyon titreşimleri ve yine esterlere ait orta- zayıf dereceli 1020-1030 cm-1 bandında C-H deformasyon titreşimleri ile 1720 - 1750 cm-1 bandındaki çok kuvvetli olan C=O gerilme titreşimlerinin spektrum sonuçlarında gözlemlenmesi ester oluşumunu kanıtlayan en önemli pik aralıklarıdır. C-O gerilme titreşimleri ait 1165 cm-1 ve 1280 cm-1 , CH2 simetrik deformasyon titreşimlerine ait 1447 cm-1 ve C=O gerilme titreşimlerine ait 1725 cm-1 pikleri ester oluşumuna dolayısıyla PAA-Betulin konjugatlarının oluştuğuna dair kanıt teşkil etmektedir. Ayrıca zero-length çapraz bağlayıcı olarak kullanılmış olan CDI reaktifi konjugasyon reaksiyonu sonucu imidazol yan ürünlerine dönüşmektedir. FTIR analiz sonuçlarında yer alan 1549 cm-1 1589 cm-1 ve 1408 cm-1 C=N titreşimleri literatur bilgileri ile kıyaslandığında yan ürün olan imidazole ait olduğu söylenebilmektedir. Tüm analiz sonuçları incelendiğinde başarılı bir sentezin gerçekleştirildiği sonucuna ulaşılırken GPC'den alınan kromatogramlar ile

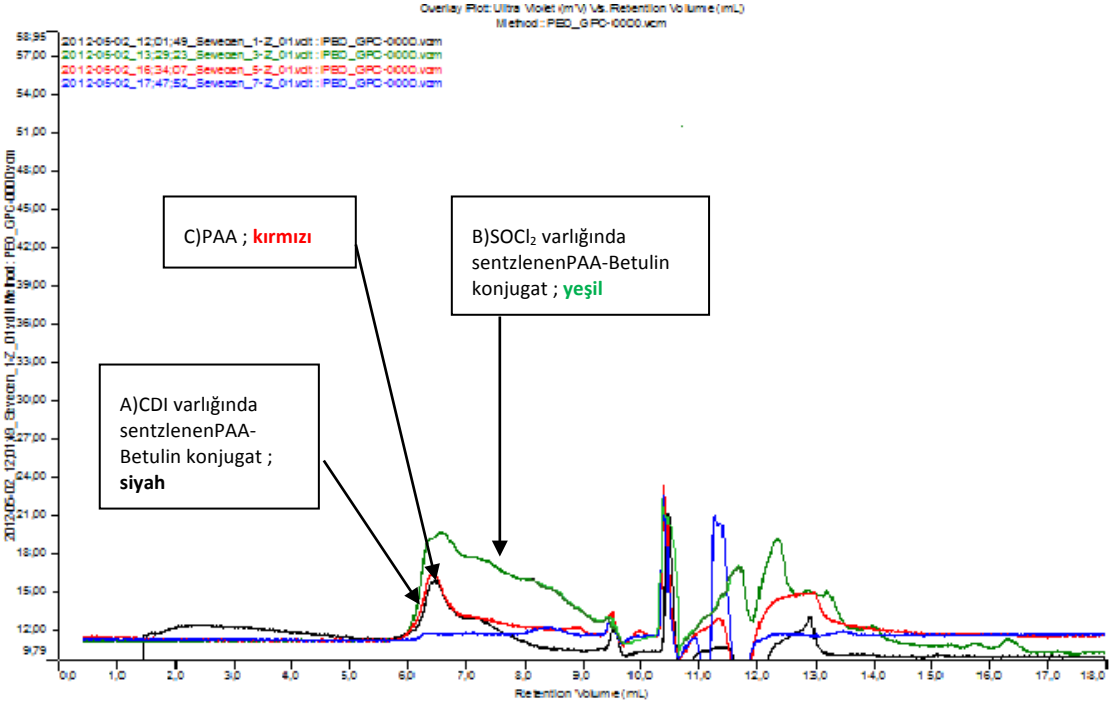
de PAA-betulin konjugatının CDI yöntemiyle de başarılı bir şekilde elde edildiği sonucu desteklenmektedir.



Şekil 5.20 A) CDI varlığında PAA-Betulin konjugatına ait B) SOCl2 varlığında PAA-Betulin konjugatına ait ve C) PAA polimerine ait GPC - refractive index (kırılma indisi) kromatogramları



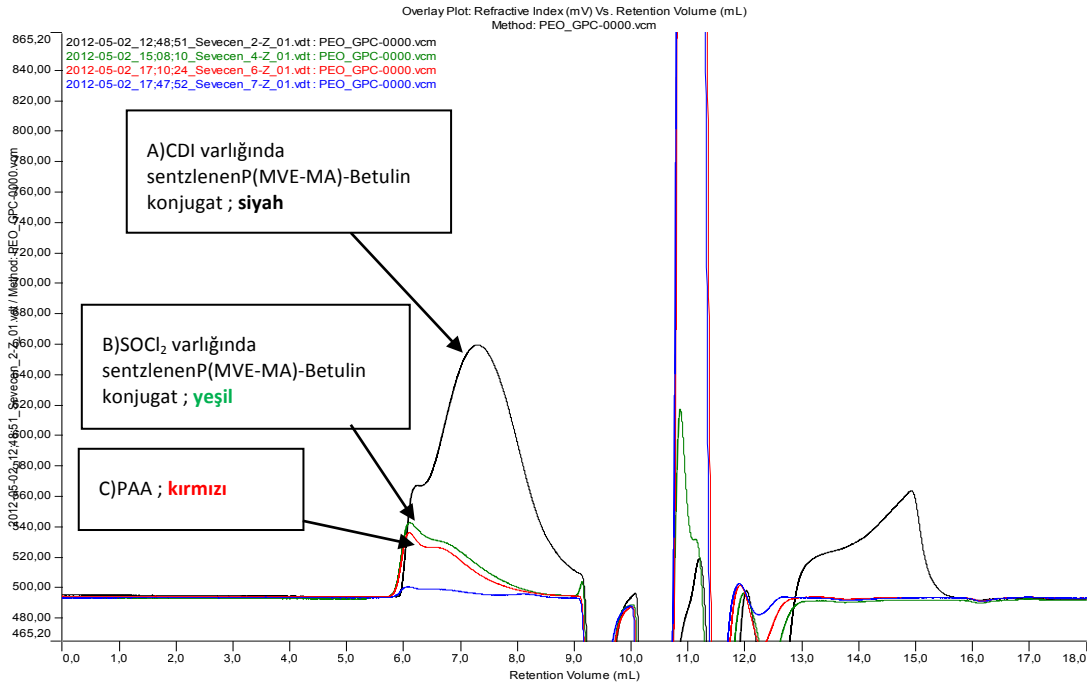
Şekil 5.21 A) CDI varlığında sentezlenmiş PAA-Betulin konjugatına ait B) SOCl2 varlığında sentezlenmiş PAA-Betulin konjugatına ait ve C) PAA polimerine ait GPC - light scattering (ışık saçılması) kromatogramları



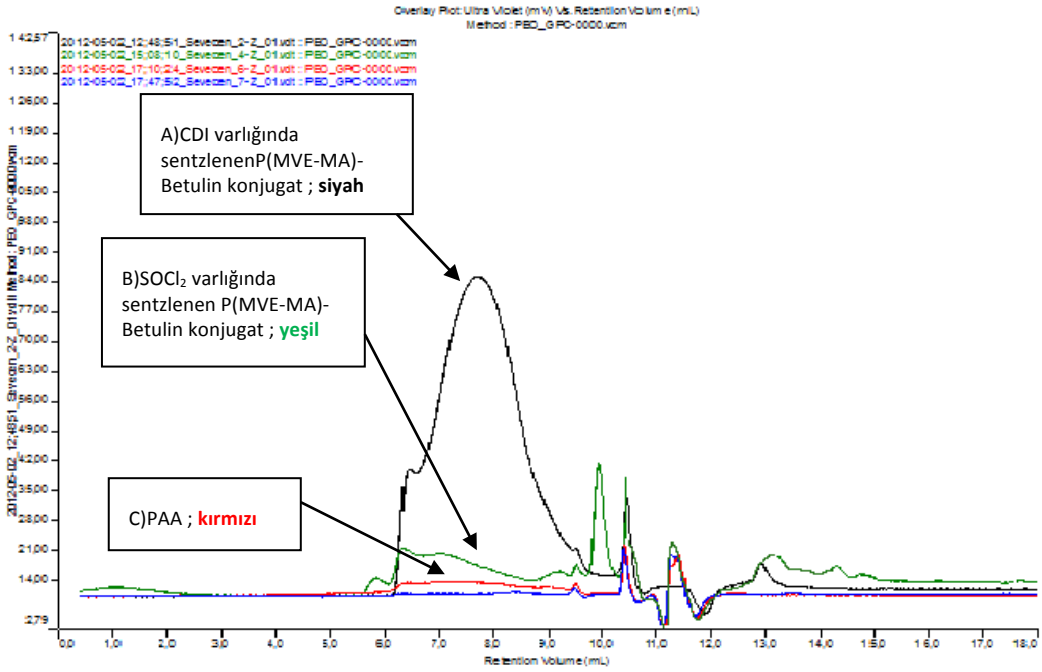
Şekil 5.22 A) CDI varlığında sentezlenmiş PAA-Betulin konjugatına ait B) $SOCl_2$ varlığında sentezlenmişp PAA-Betulin konjugatına ait ve C) PAA polimerine ait GPC – UV kromatogramları

Şekil 5.19, Şekil 5.20, Şekil 5.21'de CDI yöntemi ve $SOCl_2$ yöntemi kullanılarak sentezlenmiş PAA-Betulin konjugatlarına ait GPC sonuçları belirtilmiştir. Sonuçlar göz önüne alındığında 5 ve 8. dakikalar arasında konjugatlara ait piklerin oluştuğunu gözlmlemekteyiz. $SOCl_2$ varlığında sentezlenen konjugatlar jel kıvamındanır ve suda çözünürlüğünün CDI yöntemine kıyasla daha düşük olmasından dolayı partikül boyutlarının daha geniş bir alı konma zamanına yayılmış olduğu görülmekte ve bu partiküllerin boyutlarına göre farklı UV sonuçlarını yansıttığı farklı alıkonma zamanlarına yayılmış bir pik gözlenmektedir.

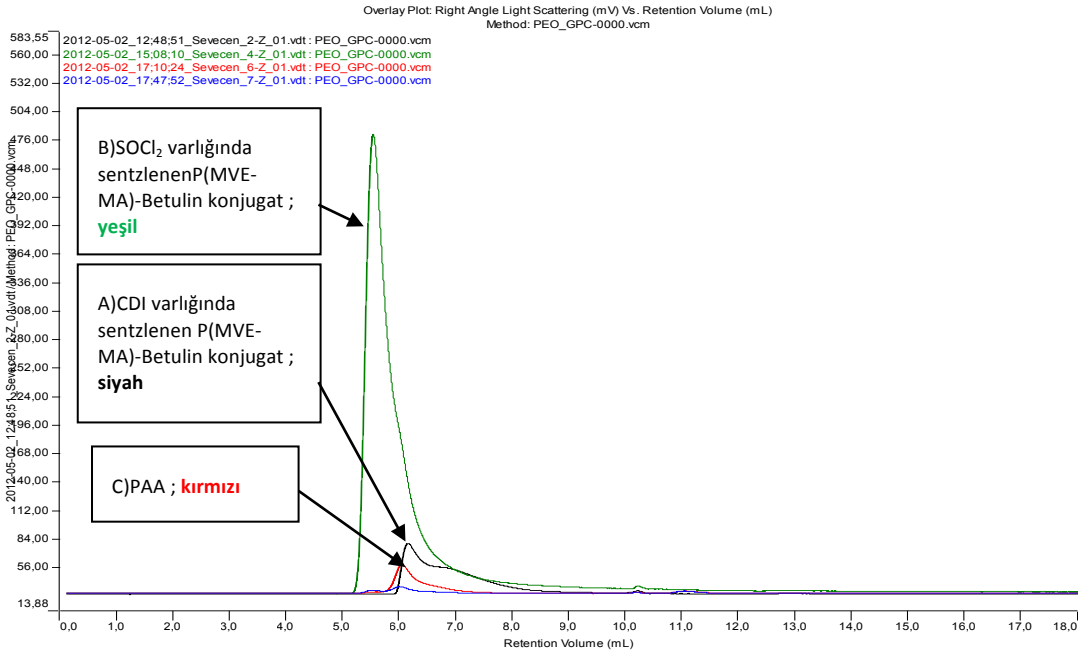
5.5 Tiyanil Klorür Varlığında ve CDI Varlığında Sentezlenen P(MVE-MA)-Betulin Konjugatlarına Ait Analiz Sonuçları



Şekil 5.23 A) CDI varlığında sentezlenmiş P(MVE-MA)-Betulin konjugatına ait B) SOCl2 varlığında sentezlenmiş P(MVE-MA)-Betulin konjugatına ait ve C) PAA polimerine biyomolekülüne ait GPC - refractive index (kırılma indisi) kromatogramları

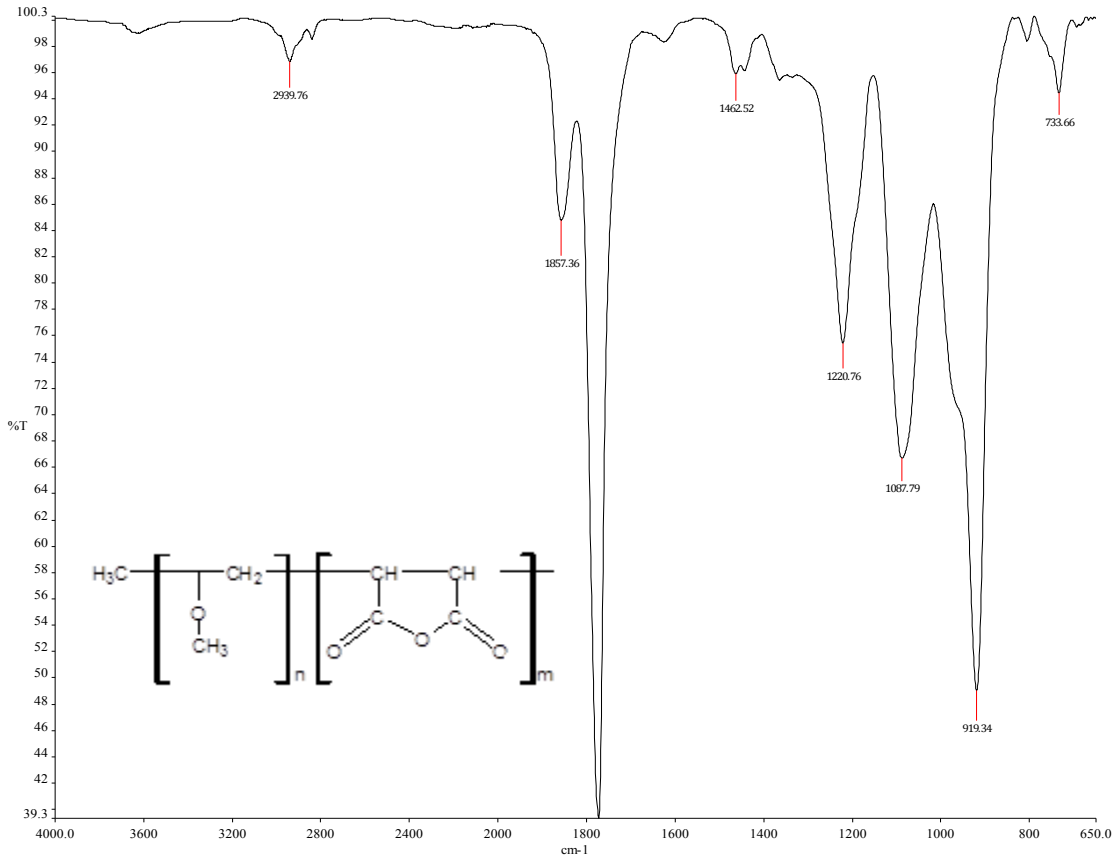


Şekil 5.24 A) CDI varlığında sentezlenmiş P(MVE-MA)-Betulin konjugatına ait B) SOCl2 varlığında sentezlenmiş P(MVE-MA)-Betulin konjugatına ait ve C) PAA polimerine ait GPC – UV kromatogramları



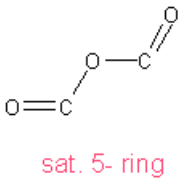
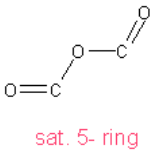
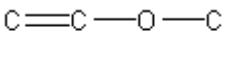
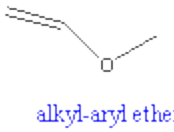
Şekil 5.25 A) CDI varlığında sentezlenen P(MVE-MA)-Betulin konjugatına ait B) SOCl2 varlığında sentezlenen P(MVE-MA)-Betulin konjugatına ait ve C) PAA polimerine ait GPC – UV kromatogramları

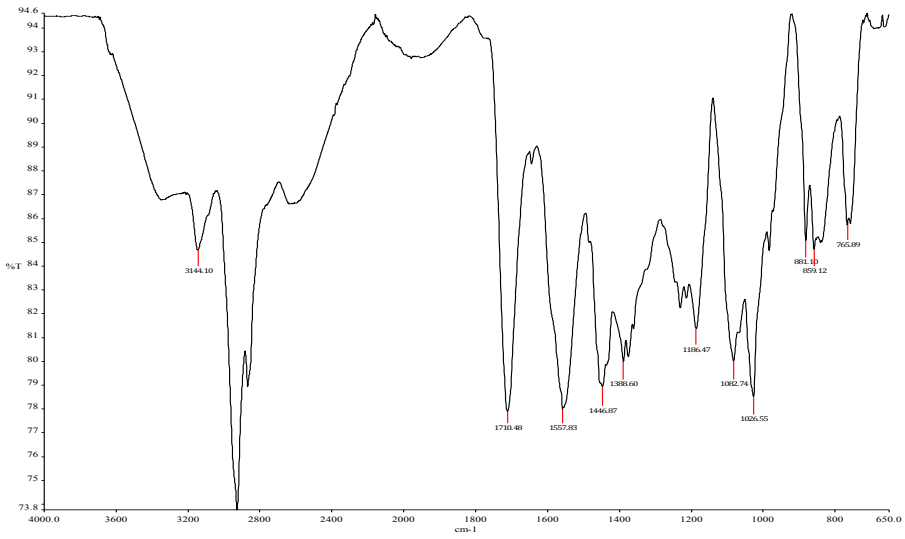
Şekil 5.22, Şekil 5.23, Şekil 5.24'de CDI yöntemi ve $SOCl_2$ yöntemi kullanılarak sentezlenmiş P(MVE-MA)-Betulin konjugatlarına ait GPC sonuçları belirtilmiştir. Sonuçlar göz önüne alındığında 6 ve 9. dakikalar arasında konjugatlara ait piklerin, polimer ve betulin piklerinden ziyade daha yüksek şiddette veya toplam alanda bulunması moleküler boyutlarının arttığının göstergesi olarak değerlendirilebilmektedir. $SOCl_2$ varlığında sentezlenen konjugatlar koyu jel kıvamındanır ve suda çözünürlüğünün CDI yüntemine kıyasla daha düşük olmasından dolayı partikül boyutlarının daha geniş bir alı konma zamanına yayılmış olduğu görülmekte ve bu partiküllerin boyutlarına göre farklı UV alıkonma hacimleri yansıttığı gözlenmektedir. Genel olarak RI ve UV kromatogramları incelendiğinde CDI yöntemi kullanıldığında P(MVE-MA)-Betulin konjugatlarına ait daha geniş birer pik gözlenmektedir. Bu sebeple CDI yönteminin daha ayrıntılı analiz edilebilmesi için FTIR spektroskopik incelemesi aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir.



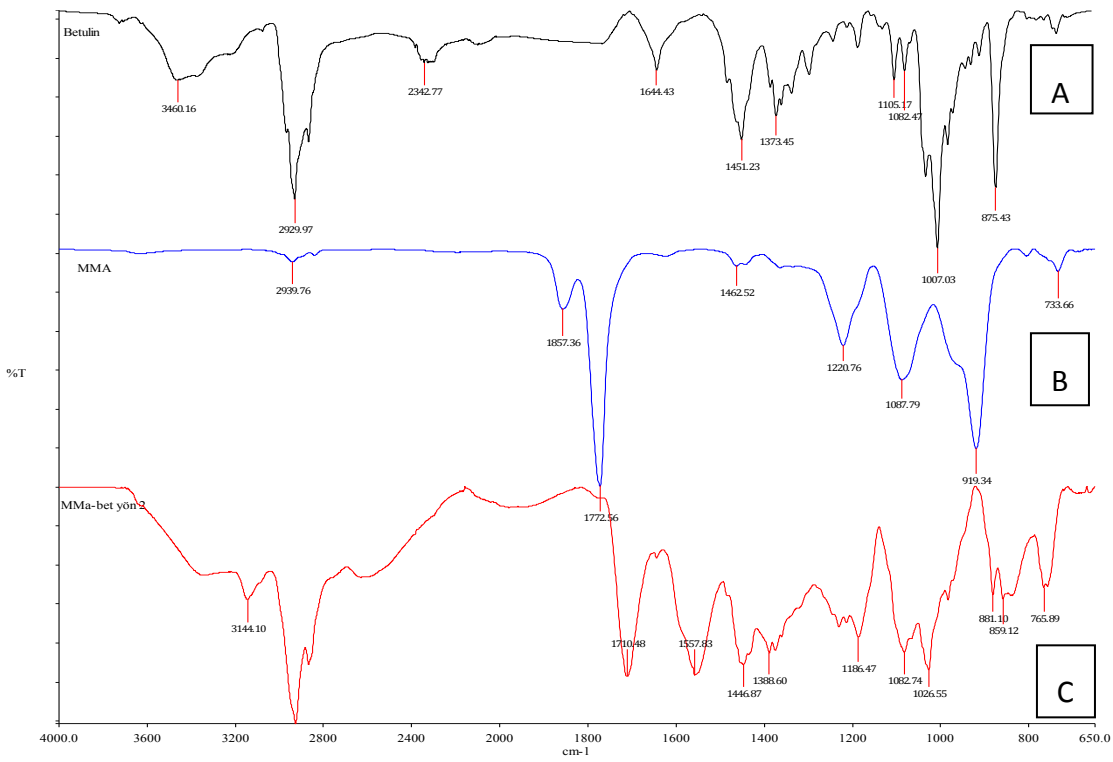
Şekil 5.26 P(MVE-MA) kopolimerine ait FTIR spektrumu

Çizelge 5.9 P(MVE-MA) kopolimerine ait FTIR spektrumu analiz sonuçları

Alan [cm^{-1}]	**İlgili kısım**	**Açıklama**
1820 – 1870 arası		Kuvvetli; C=O gerilme titreşimi
1775 – 1800 arası		Çok Kuvvetli; C=O gerilme titreşimi
1200 - 1225 arası		Kuvvetli; Asimetrik C-O gerilme titreşimi
1020 - 1120 arası		Kuvvetli; simetrik C-O gerilme titreşimi

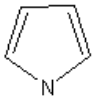


Şekil 5.27 CDI varlığında sentezlenmiş P(MVE-MA)-Betulin konjugatına ait FTIR spektrumu

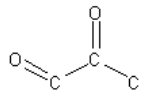
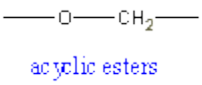
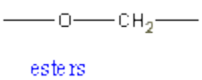
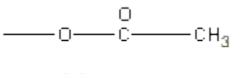


Şekil 5.28 A) betulin biyomolekülüne , B) P(MVE-MA) kopolimerine, C) CDI varlığında sentezlenmiş P(MVE-MA)-Betulin konjugatına ait FTIR spektrumlarıdır

Çizelge 5.10 CDI varlığında sentezlenmiş P(MVE-MA)-Betulin konjugatına ait FTIR spektrum analiz sonuçları

2850 – 3000 arası 2850	CH_3, CH_2 & CH 2 or 3 bands	Kuvvetli; Gerilme Titreşimleri
1480 - 1660 arası 1557	conjugated, cyclic  	Kuvvetli; Gerilme Titreşimleri
1545 - 1580 arası 1557	 Pyrroles	Zayıf - Orta; C=C and C=N düzlem tit.; 1-sübstitüe pirol halkası için 2 band oluşur
660 – 900 arası 881 ; 859 ; 765	NH_2 & N-H	Sallanma (dalgalanma) (H bağlanmasında shift yapar)

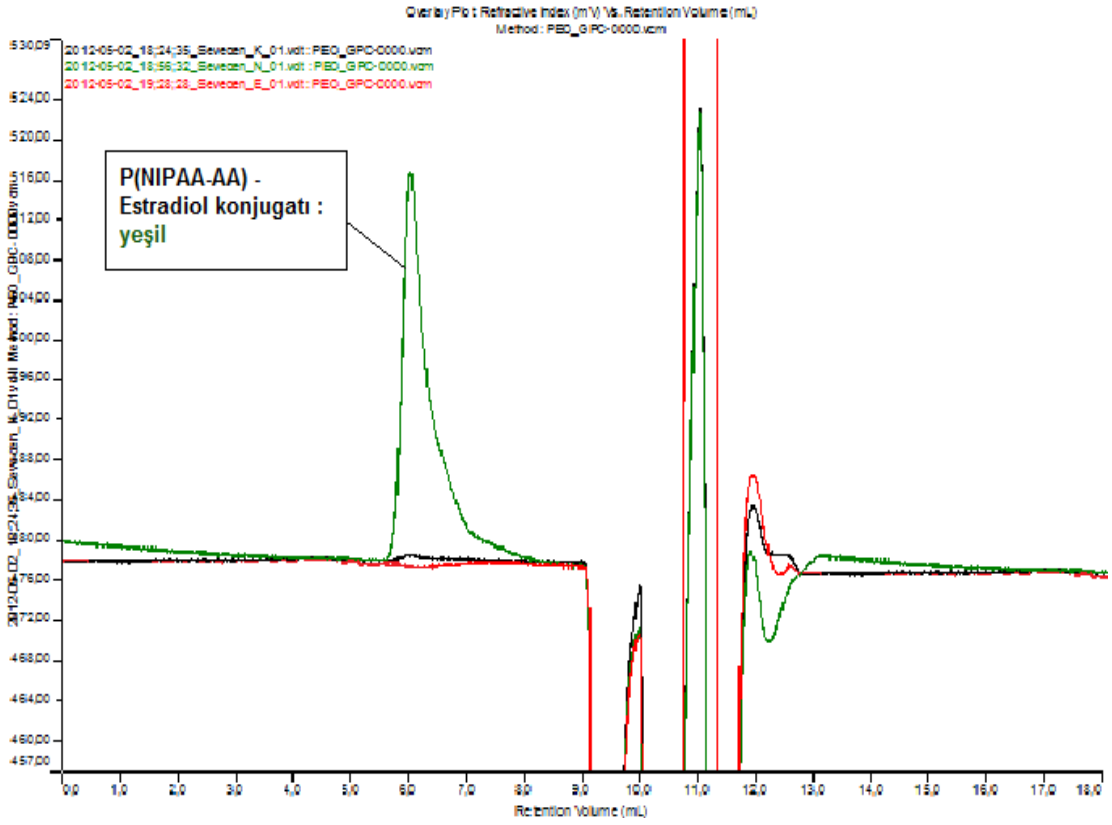
Çizelge 5.10 CDI varlığında sentezlenmiş P(MVE-MA)-Betulin konjugatına ait FTIR spektrum analiz sonuçları(devam)

1705 up to 1730 1710	 α-diketones	Çok kuvvetli; C=O Gerilme Titreşimleri
1000-1300 arası 1082 1186	O-C (2 band) esterler	Orta- Kuvvetli ; Gerilme Titreşimleri
1435 - 1470 arası 1446	 acyclic esters	Kuvvetli - orta; CH_2 simetrik deformasyon titreşimi
1020 -1030 arası 1026	 esters	Zayıf – Orta ; C-H deformasyon titreşimi
1340 - 1385 arası 1388	 acetates	Kuvvetli; C-H simetrik deformasyon titreşimi

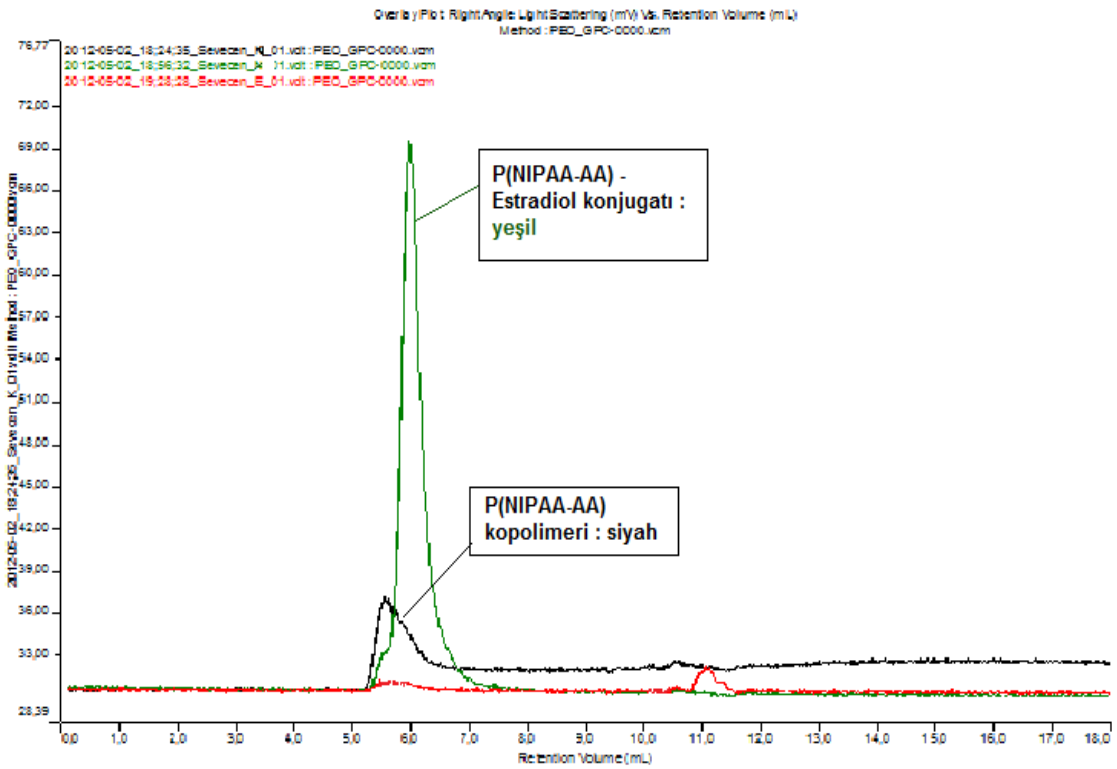
Ester gruplarına ait 1000 - 1300 cm-1 bandında orta kuvvette C-O gerilme titreşimleri ile 1435 - 1470 cm-1 bandında kuvvetli – orta dereceli CH2 simetrik deformasyon titreşimleri ve yine esterlere ait orta- zayıf dereceli 1020-1030 cm-1 bandında C-H deformasyon titreşimleri ile 1705 - 1730 cm-1 bandındaki çok kuvvetli olan C=O gerilme titreşimlerinin spektrum sonuçlarında gözlemlenmesi ester oluşumunu kanıtlayan en önemli pik aralıklarıdır. C-O gerilme titreşimleri ait 1082 cm-1 ve 1186 cm-1 , CH2 simetrik deformasyon titreşimlerine ait 1446 cm-1 bandları ester oluşumuna ve ayrıca C=O gerilme titreşimlerine ait 1710 cm-1 pikleri ise diketon grubuna ait olmasından dolayı PAA-Betulin konjugatlarının oluştuğuna dair kanıt teşkil etmektedir. Ayrıca zero-length çapraz bağlayıcı olarak kullanılmış olan CDI reaktifi

konjugasyon reaksiyonu sonucu imidazole yan ürünlerine dönüşmektedir. FTIR analiz sonuçlarında yer alan 1557 cm-1 C=N titreşimleri ile 881 cm-1 859 cm-1 ve 765 cm-1 N-H dalgalanma titreşimleri literatur bilgileri ile kıyaslandığında yan ürün olan imidazole ait olduğu söylenebilmektedir. Tüm analiz sonuçları incelendiğinde başarılı bir sentezin gerçekleştirildiği sonucuna ulaşılırken daha önce de belirtildiği üzere GPC kromatogramları ile de P(MVE-MA) -betulin konjugatının CDI yöntemiyle de başarılı bir şekilde elde edildiği sonucu desteklenmektedir.

5.6 P(NIPAA-AA)-Estradiol Konjugatına Ait Deney Sonuçları :



Şekil 5.29 SOCl2 varlığında sentezlenmiş P(NIPAA-AA)-Estradiol konjugatına ait kırılma indisi (refractive index) kromatogramı



Şekil 5.30 SOCl2 varlığında sentezlenmiş P(NIPAA-AA)-Estradiol konjugatına ait ışığın saçılması (light scattering) kromatogramı

SOCl2 varlığında sentezlenmiş olan P(NIPAA-AA)-Estradiol konjugatının yapı işlev analizinin gerçekleştirilebilmesi amacıyla konjugatlar GPC-Viscotec dört detektörlü kromatografi cihazı ile analiz edildi. Şekil 5.29'da görüldüğü üzere P(NIPAA-AA) kopolimerine ait bir pik 5 ile 7 dakiakları arasında alıkonma hacmine sahipken, konjugata ait benzer pik aynı dakikalar arasında daha yüksek pik şiddetinde alıkonma hacmine sahiptir. Işığın saçılması kromatografisine göre daha büyük moleküler boyuta dolayısıyla da polimere kıyasla konjugasyon reaksiyonu sonucu daha büyük molekül ağırlığına sahip konjugat elde edilmiştir.

5.7 Sitotoksisite Deneyleri

Bütün numunelerin sitotoksisite testleri Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalında Doç.Dr. Zübeyde Akın Polat ve çalışma grubu tarafından yapılmıştır.

5.7.1 L929 fare Fibroblast Hücrelerinin Çoğaltılması

Bir fare bağ dokusu fibroblast hücre serisi L929 (ATCC hücre hattı, NCTC klon 929) % 10 fetal sığır serumu (FCS) (Sigma, St. Louis, MO,USA) ve 2 mM / ml L-glutamin eklenmiş Dulbecco's Minimum Eagle Medium (DMEM) (Sigma, St. Louis, MO,USA) içinde üretildi.

Hücre kültür ortamına antibiyotik ilave edilmedi. Kültürler yaklaşık 7 gün sonra hücreler tek tabaka haline ulaşıncaya kadar 37 ° C ve% 5 CO_2 ortamında inkübatörde çoğaltıldı.

Fibroblast hücreleri vücutta baskın doku tipi olmasından dolayı ve yetiştirilmesi kolay olduğu için ayrıca 24 saat içerisinde iki katlanmaları uygun olduğu için seçilmiştir. Üstelik bu hücreler birçok standard protokolde tavsiye edilmektedir.

5.7.2 Hücre Proliferasyon Deneyi

Proliferasyon deneyi WST-1 etiketleme reaktifi (Roche, Mannheim, Almanya) kullanılarak kültür ortamına ilave edilmiş tetrazolyum tuzlarının parçalanması ile canlı yaşayabilir hücrelerin sayısını analiz eden bir yöntemdir. Deney boyunca tetrazoilum tuzu hücresel enzimler tarafından formozana dönüştürülür. Yaşayabilir hücre sayısında çoğalma örnekteki mitekondrial dehidrojenazın genel aktivitesinin artmasına sebep olur.

Enzim aktivitesindeki bu artış, kültüründe metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile doğrudan ilişkili olarak oluşan formazan boya miktarının artışına yol açar.

Metabolik olarak aktif hücreler tarafından üretilen formazan boyası, boya çözeltisinin 450 nm'de absorbansının mikroplate reader spektrofotometresi ile ölçülmsiyle sayısal olarak belirlenmiştir.

Hücreler, 96-kuyucuklu plağa, kuyu başına 1x 10^5 hücre / ml konsantrasyonundaki stoktan 100 µl eklendi.

Betulin, PAA polimeri, $SOCl_2$ varlığında sentezlenen PAA-Betulin konjugatı , EDC varlığında sentezlenen PAA-Betulin konjugatı, P(MVE-MA) kopolimeri, $SOCl_2$ varlığında sentezlenen P(MVE-MA)-Betulin konjugatı, EDC varlığında sentezlenen P(MVE-MA)-

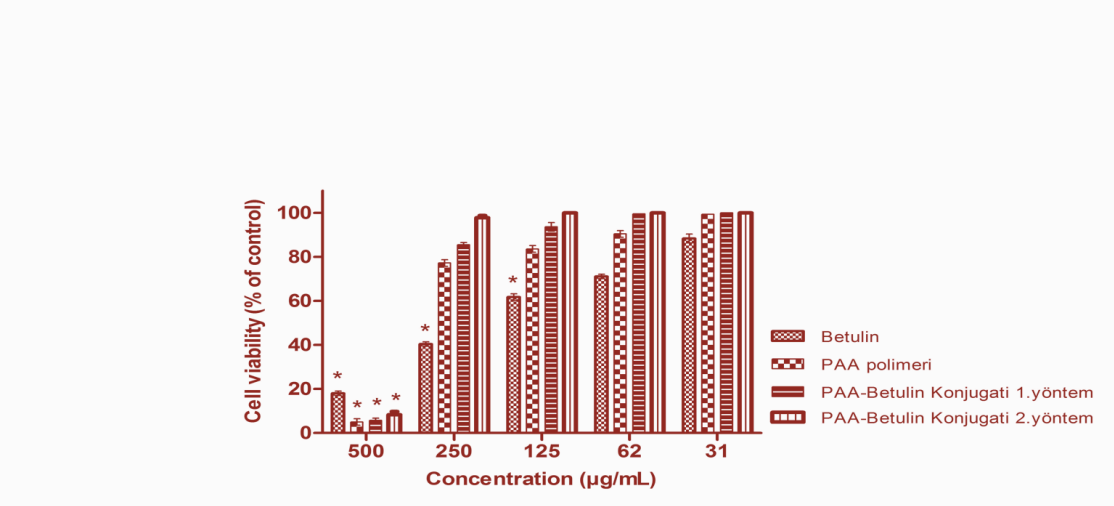
Betulin konjugatının sitotoksisitesi için tüm numunelerin 500, 250, 125, 62.5 ve 31.2 $\mu g.ml^{-1}$ konsantrasyonları kullanıldı.

Hücreler daha sonra 37 °C'de, % 5 CO_2, 24 saat boyunca inkübe edildi. Bundan sonra, herbir kuyucuğa 10 µl WST-1 reaktifi eklendi ve 2 saat sonrasında microtitre plate okuyucu kullanılarak 450 nm'de kontrole (aynı hücrenin hiçbir muamele görmemişleri) karşı absorbansları okundu.

Aynı hacimde kültür ortamı ve WST-1 işaretleme reaktifi (10 µl WST-1 işaretleme reaktifi / 100 µl kültür ortamı) elisa okuyucuda blank gibi referans kontrolü (hücre olmadan kültür ortamı ve WST reaktifi) olarak kullanmak için tek bir kuyuya eklendi. Deneyler dört kez gerçekleştirildi.

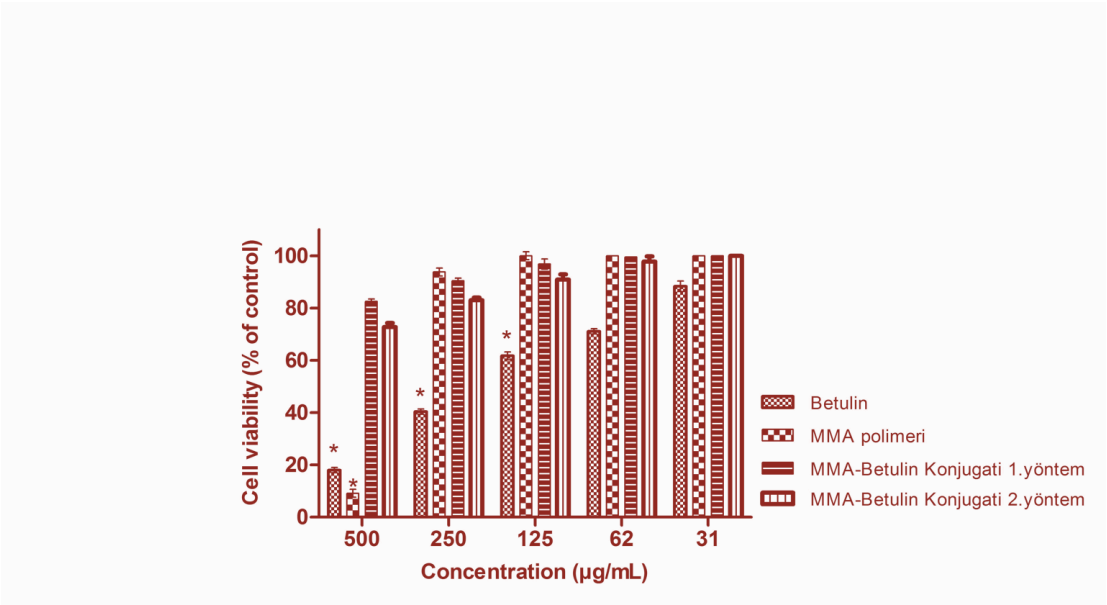
Örneklerin optik yoğunluğu (OD değeri), yüzde canlılığın belirtilebilmesi için negatif kontrol ile aşağıdaki gibi karşılaştırıldı :

Hücre canlılığı (%) = [(OD450 (örnek) / OD450 (negatif kontrol)) x 100] Dört kez tekrarlanmadan dolayı ortalama ± SD (standart sapma) olarak belirtilen sonuçlar, çoklu karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve iki gruplu karşılaştırmalar için Student'in t dağılımı ile % 95 güven düzeyinde istatistiksel olarak analiz edildi.



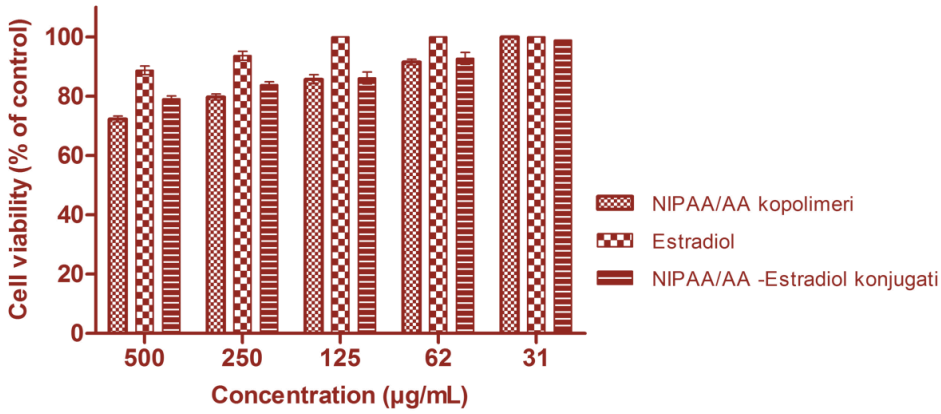
Şekil 5.31 Betulinin, PAA polimerinin, SOCl2 varlığında sentezlenen PAA-Betulin konjugatının (PAA-Betulin 1.yöntem) , EDC varlığında sentezlenen PAA-Betulin konjugatının (PAA-Betulin 2.yöntem), L929 fibroblast hücrelerinde in vitro sitotoksik etkisi *p < 0.05 kontrol.

Şekil 5.30'da gösterilen grafikteki tüm maddelerimizin sitotoksisitesi doza bağımlı olarak düştü. Dört maddemizinde 500 µg/mL kontrolle kıyasladığımızda anlamlı farklı ($p<0.05$), yani toksiktir. Buna ek olarak, betülinin 250 ve 125 µg/mL dozları da toksiktir. Bunun dışında diğer dozlar toksik değildir.500 µg/mL dozundaki konjugatlar toksik özellik göstermekte ancak 250 µg/mL ve 125 µg/mL dozlarında betulin tek başına toksik iken konjugatlar bu dozlarda toksik değildir.



Şekil 5.32 Betulinin, P(MVE-MA) polimerinin, SOCl2 varlığında sentezlenen P(MVE-MA) -Betulin konjugatının (MMA–Betulin 1. yöntem) , EDC varlığında sentezlenen P(MVE-MA) -Betulin konjugatının (MMA–Betulin 2. yöntem), L929 fibroblast hücrelerinde in vitro sitotoksik etkisi. *p < 0.05 control.

Betulin, P(MVE-MA)-Betulin konjugatlarının ve P(MVE-MA) kopolimerinin sitotoksisitesini kıyasladığımızda betülinin 500, 250 ve 125 µg/mL dozları, P(MVE-MA) polimerinin ise 500 µg/mL dozu kontrole göre anlamlı farklı ($p<0.05$), yani toksiktir. Sentezlenen her iki konjugatın da deneyde kullanılan dozlarının toksik olamadığı belirlendi.

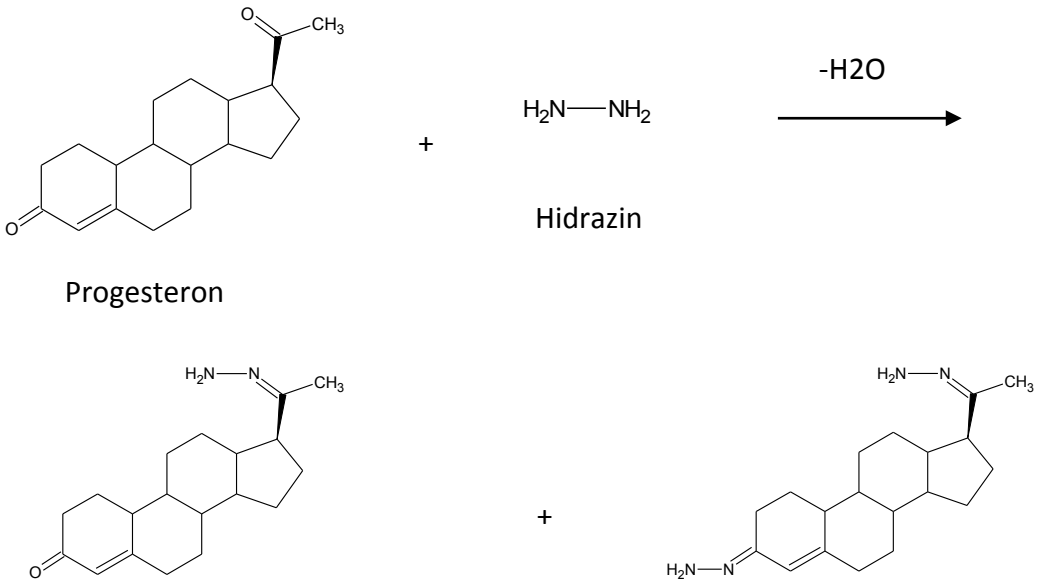


Şekil 5.33 Estradiolün, P(NIPAA-AA) kopolimerinin, SOCl2 varlığında sentezlenen P(NIPAA-AA) – estradiol konjugatının L929 fibroblast hücrelerinde in vitro sitotoksik etkisi.

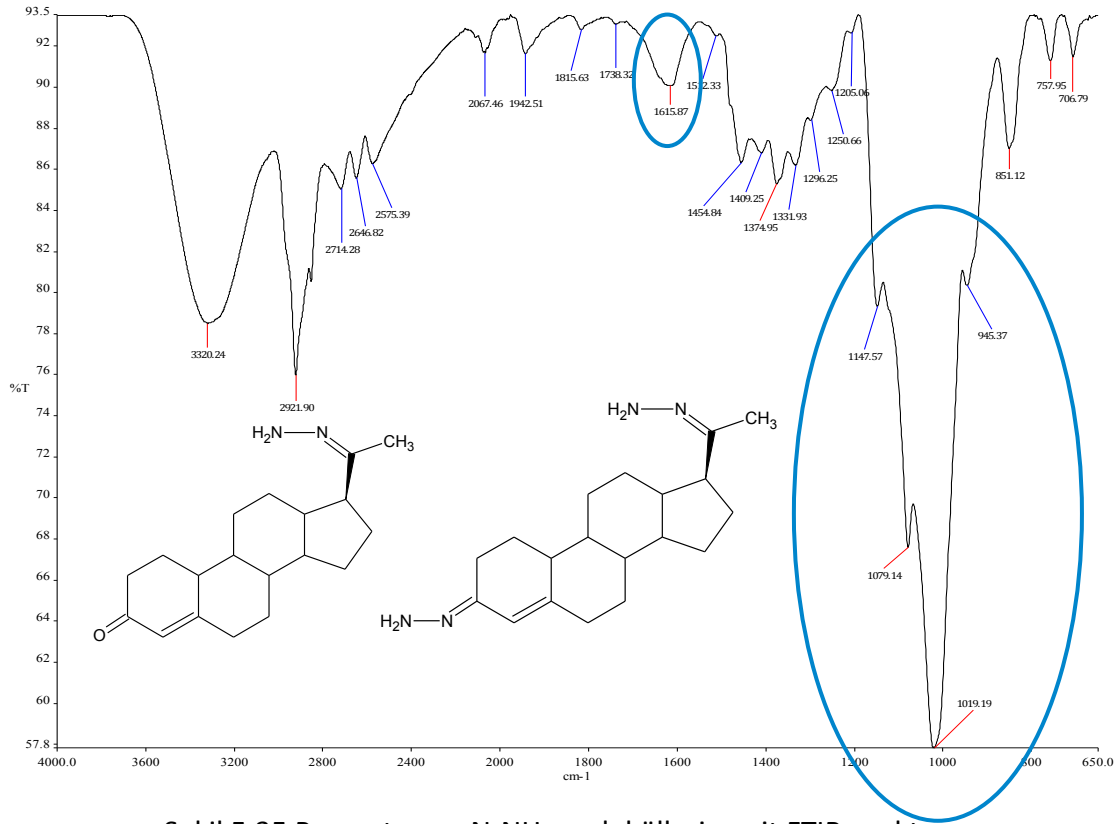
Estradiolün, P(NIPAA-AA)-Estradiol konjugatının ve P(NIPAA-AA) kopolimerinin sitotoksisitesini kıyasladığımızda 500, 250 ,125, 62 ve 31 µg/mL dozlarında tüm numunelerin kontrole göre anlamlı farklı ($p>0.05$), yani hiçbiri toksik değildir.

5.8 EDC Varlığında Sentezlenen P(VP-AA)-Progesteron Konjugatlarına Ait Analiz Sonuçları

5.8.1 Progesteron – $NHNH_2$'nin Hidrazon Reaksiyon Mekanizması



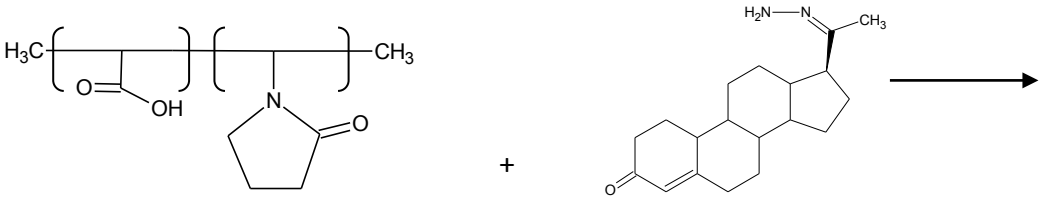
Şekil 5.34 Progesteron – NHNH2'nin Hidrazon Reaksiyon Mekanizması



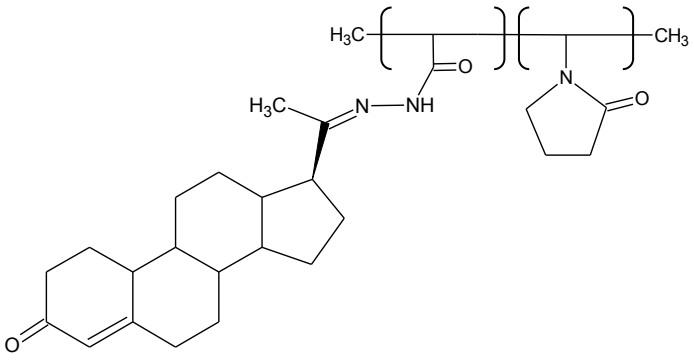
Şekil 5.35 Progesteron=N-NH_2 moleküllerine ait FTIR spektrumu

1000-1250 cm-1 (8197-9804 nm) bandında yer alan FTIR analiz spektrumuna ait 1019 cm-1, 1079 cm-1 ve 1147 cm-1 pikleri literatüre göre alifatik amin gruplarındaki bağ titreşimlerine aittir. Özellikle C=N çift bağına ait band ise 1615–1700 cm−1 (5882-6192 nm) alanındanır ve bu alanda yukarıdaki spektrumda 1615 cm-1' de orta şiddette pik oluştuğu gözlenmiştir. Siklik 6 üyeli ketonlara ait FTIR bandı literatüre göre 1720 cm−1 (5814 nm) alanında ve doymuş alifatik ketonlara ait FTIR bandı ise 1715 cm−1 ile 1745 cm−1 alanında görülmesi gerekmektedir. Bu alanda progsterona ait olan keton grupları üzerinden hidrazon sentezlendiğine dair bu alandaki keton piklerin şiddetlerinin çok zayıfladığı ve neredeyse kalmadığı görülmektedir. Böylece Progesteron=N-NH2 hidrazon molekülünün sentezlendiği sonucuna ulaşılmaktadır.

5.8.2 EDC Varlığında Sentezlenen P(VP-AA)-Progesteron Konjugatlarına Ait GPC Sonuçları

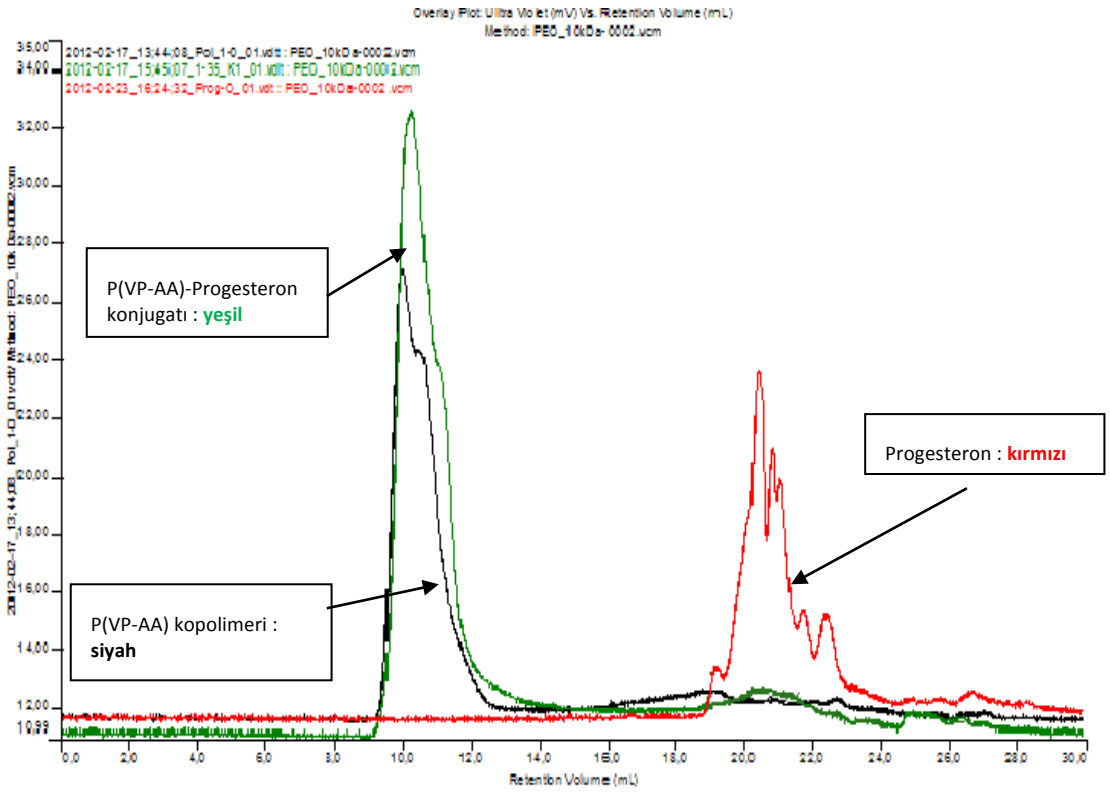


P(VP-AA) kopolimeri Progesteron=N-NH_2



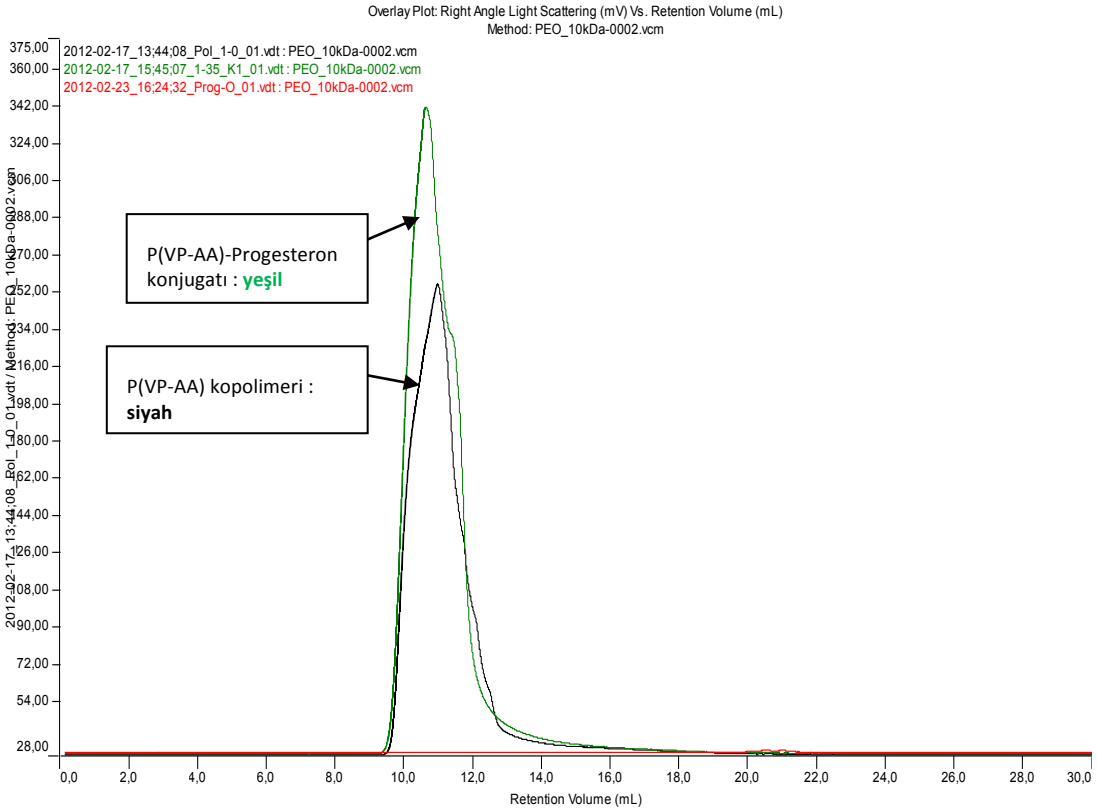
P(VP-AA) – Progesteron konjugatı

Şekil 5.36 P(VP-AA)-Progesteron Konjugasyon Mekanizması



Şekil 5.37 EDC varlığında sentezlenen P(VP-AA)-Progesteron konjugatına ait GPC – UV kromatogramı

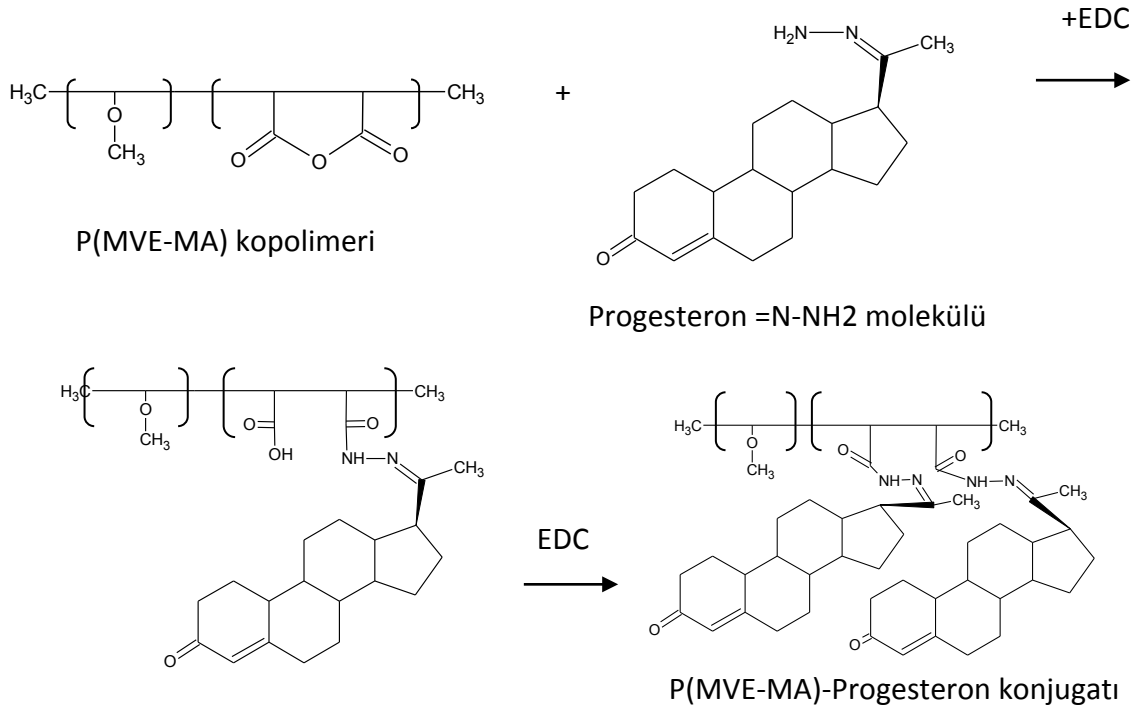
Şekil 5.34'da EDC yöntemi kullanılarak sentezlenmiş P(VP-AA)-Progesteron konjugatlarına ait GPC-UV sonuçları belirtilmiştir. Sonuçlar göz önüne alındığında 9 ve 13. dakikalar arasında konjugatlara ait piklerin, polimer ve betulin piklerinden ziyade daha yüksek şiddette ve toplam alanda bulunması moleküler boyutlarının arttığının göstergesi olarak değerlendirilebilmektedir. Progesteron=N-NH2 molekülüne ait olan kromatogramda ise UV pikleri 20. ve 23. dakikalar arasında dağınık olarak gözlenmektedir. Progesteronun hidrazin ile muamelesi sonucunda hidarazon yapılarının sadece asetil grubu üzerinden değil her iki keton gurubu üzerinden de hidrazon yapılarının oluşmuş olabileceğini düşündürmüştür. Konjugata ait kromatogramda, sadece progesteronun GPC analizi için hazırlanmış çözeltisi içindeki miktar kadar progesteron içermesine ramen 9.-13. dakikaları arasında neredeyse hiç UV piki gözlenmemesi yüksek oranda konjugatların elde edildiğini göstermektedir.



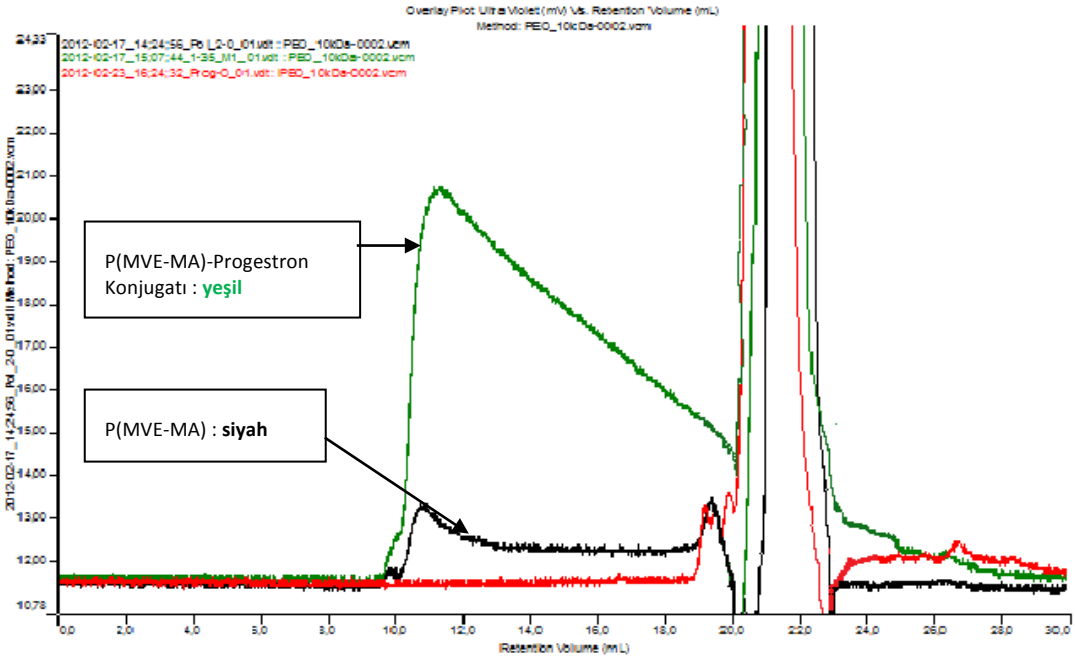
Şekil 5.38 EDC varlığında sentezlenen P(VP-AA)-Progesteron konjugatına ait GPC – LC kromatogramı

Şekil 5.35'de EDC yöntemi kullanılarak sentezlenmiş P(VP-AA)-Progesteron konjugatına ait GPC-LC sonuçları belirtilmiştir. Bu sonuçlara göre 9 ile 14 dakikaları arasındaki alıkonma hacimleri incelendiğinde P(VP-AA) kopolimerinin pik şiddetinden daha yüksek şiddette elde edilen P(VP-AA)-Progesteron konjugatına ait pikte aynı zamanda daha erken alıkonma zamanı bölgesine doğru bir kayma yaptığı gözlenmektedir. Işığın saçılmasına ait olan bu sonuçlar daha büyük moleküllerde ve dolayısıyla daha büyük molekül ağırlıklarında daha fazla saçılmaya sebebiyetten kaynaklı pik şiddetlerindeki artış ve kaymadan konjugatların analizinde bize konjugat oluşumunu gözstermektedir. Moleküler boyuta göre ayırma kromatografisi olan GPC'de progesteron=N-NH2 molekülüne ait ışığın saçılmasına dair blirgin bir pik elde edilmemiştir. Ancak konjugat içerisinde polimerin moleküler büyüklüğünü arttırmış olduğu kromatogramda açıkça gözlenmektedir.

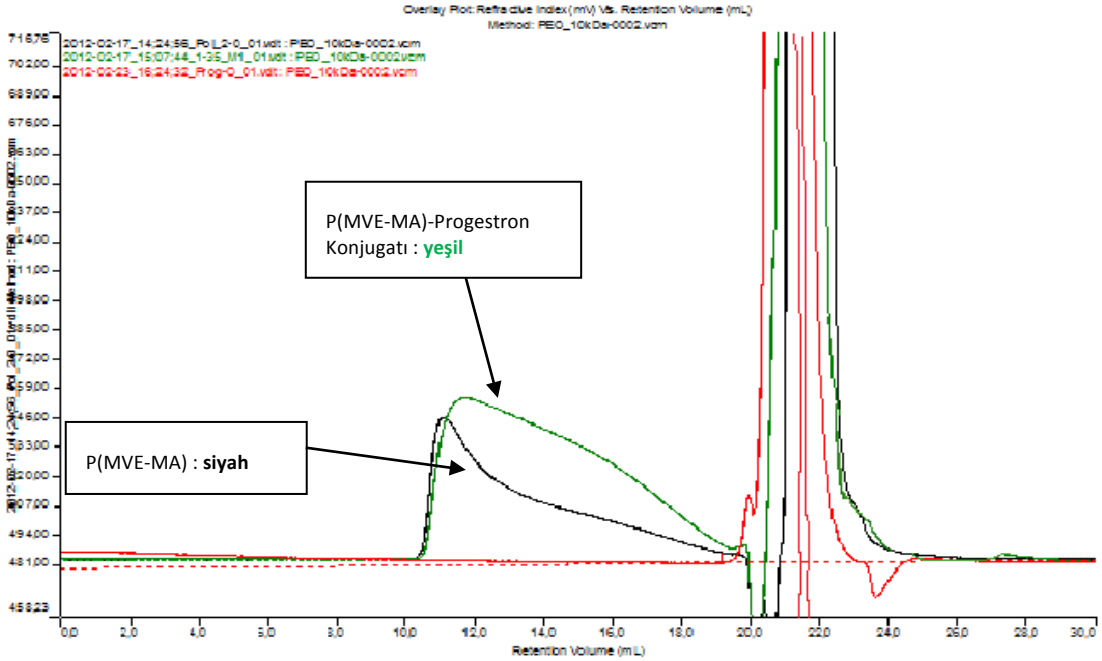
5.8.3 EDC Varlığında Sentezlenen P(MVE-MA)-Progesteron Konjugatlarına Ait GPC Sonuçları



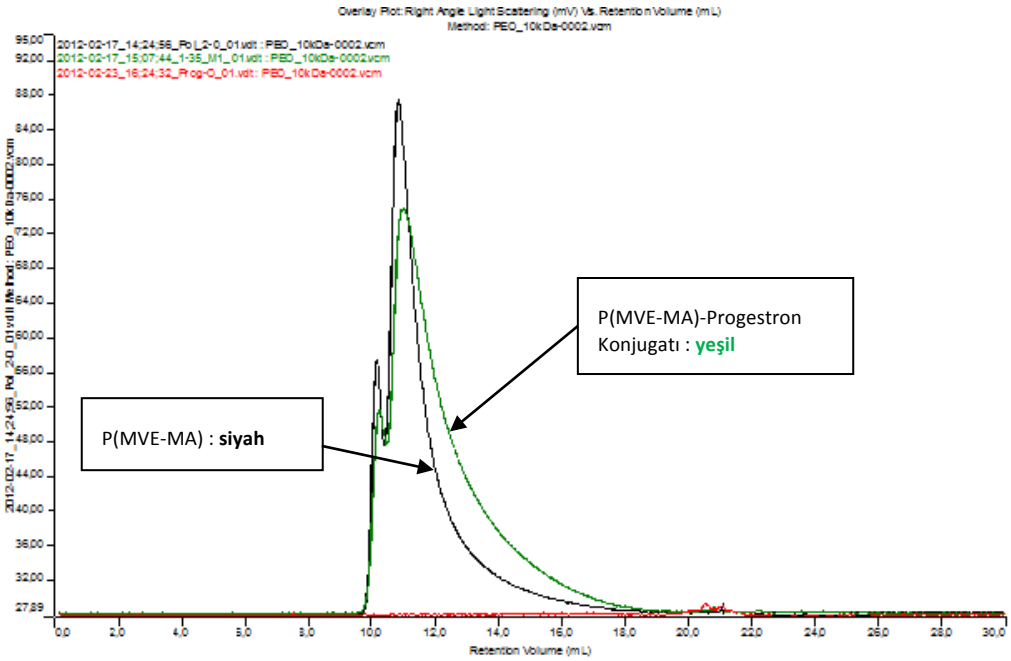
Şekil 5.39 P(MVE-MA)-Progesteron Konjugasyon Mekanizması



Şekil 5.40 EDC varlığında sentezlenen P(MVE-MA)-Progesteron konjugatına ait GPC – UV kromatogramı



Şekil 5.41 EDC varlığında sentezlenen P(MVE-MA)-Progesteron konjugatına ait GPC –RI (kırılma indisi) kromatogramı



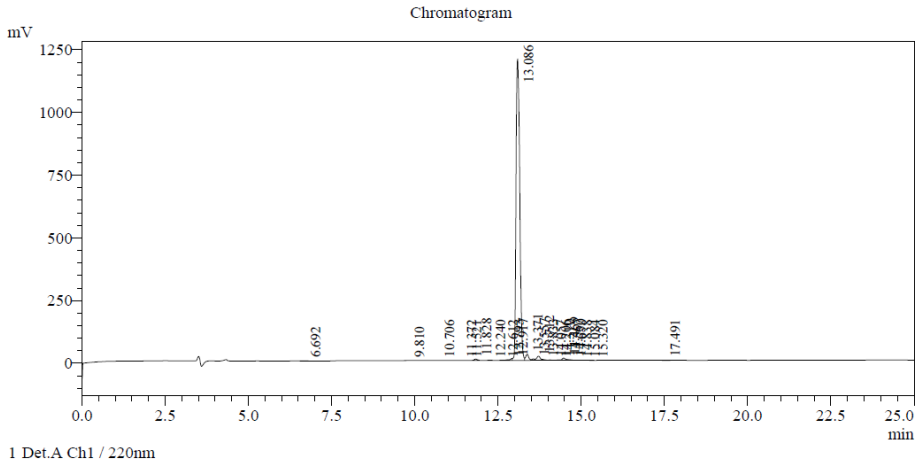
Şekil 5.42 EDC varlığında sentezlenen P(MVE-MA)-Progesteron konjugatına ait GPC –LS (kırılma indisi) kromatogramı

Şekil 5.36'da EDC yöntemi kullanılarak sentezlenmiş P(MVE-MA)-Progesteron konjugatlarına ait GPC-UV sonuçları belirtilmiştir. Sonuçlar göz önüne alındığında 10 ve

20 dakikaları arasında konjugata ait pikin kopolimer piklerinden ziyade daha yüksek şiddette ve toplam alanda bulunması moleküler boyutlarının arttığının göstergesi olarak değerlendirilebilmektedir. Progesteron=N-NH2 molekülüne ait olan kromatogramda ise UV piklerinin 20. ve 23. dakikalar arasında dağınık olarak gözlenmesi beklenirken bu alanda tuz piklerinin var olmasından dolayı bu kısımda perdelenerek gözükmediği sonucuna ulaşılmıştır. Çünkü hem daha önce P(VP-AA) kopolimeri ile yapılan konjugatlara ait analizlerde bu alanda progesteron=N-NH2 molekülünün UV pikleri verdiğini gözlemlemiştik hem de progesteron=N-NH2 molekülüne ait kırmızı renkli kromatogramda 19. İle 20. dakikalar arasında pik oluşumunun başladığını ama tuz piklerinden dolayı 20. dakikadan sonra görülmemektedir. Sonuç olarak P(MVE-MA)-Progesteron konjugat pikinin polimer ile aynı bölgede ancak daha yüksek şiddette gözükmesini beklediğimiz üzere elde edilen analiz sonuçları beklendiği gibi P(MVE-MA)-Progesteron konjugatlarının elde edildiğini göstermektedir. Şekil 5.37 ve Şekil 5.38'de ki kromatogramlar da artan ışık saçılması ve kırılma indisi pik alanlarıyla polimerden daha yüksek moleküler boyutuna ve dolayısıyla molekül ağırlığına sahip konjugatların elde edildiğini açıkça desteklemektedir.

5.9 EDC Varlığında Sentezlenen Polioksidonyum-Peptid Konjugatlarına Ait Analiz Sonuçları

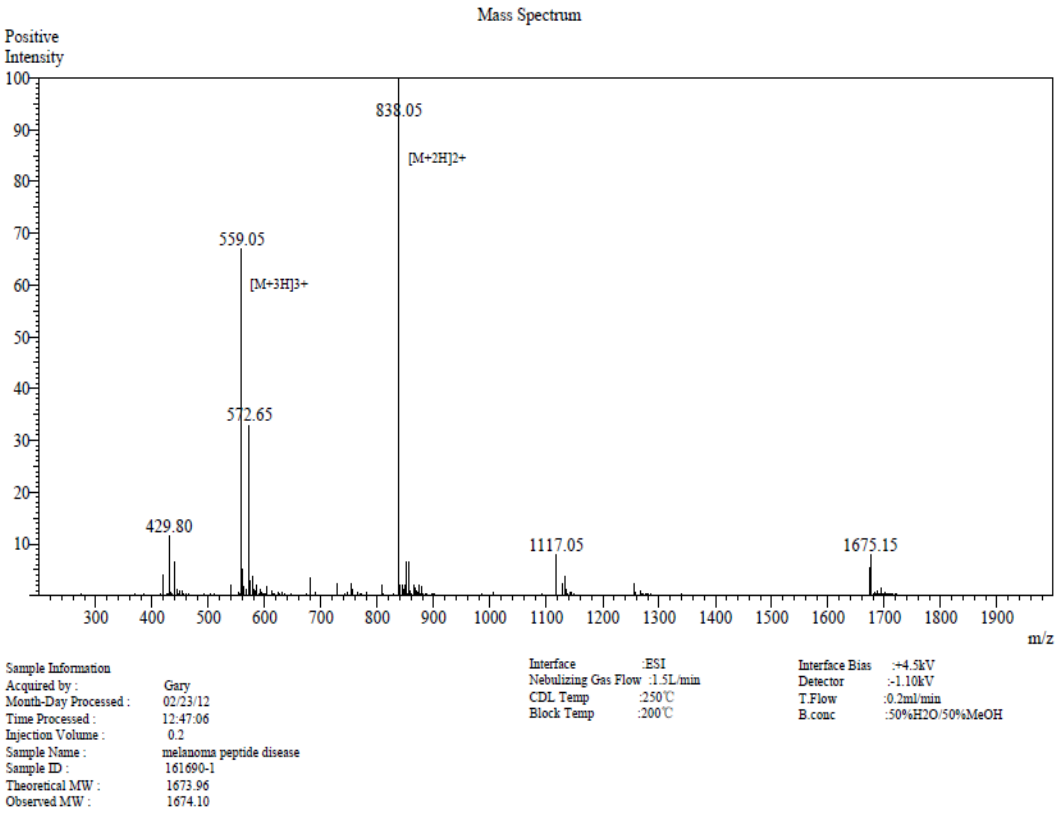
Deneylerde kullanılan peptid dizesi : MAGE 3 (121-134) dizesinin tek harf gösterimi ; LLKYRAREPVTKAE ve üç harf gösterimi; H - Leu - Leu - Lys - Tyr - Arg - Ala - Arg - Glu - Pro - Val - Thr - Lys - Ala - Glu – OH' dir. Molekül ağırlığı 1674.0 g/mol olan sentetik peptid dizesine ait satın alınan firma tarafından sağlanmış HPLC kromatogramı aşağıdaki şekildedir;



Şekil 5.43 Gen Script Firması tarafından sentezlenmiş MAGE (121-134) peptid dizesine ait HPLC kromatogramı

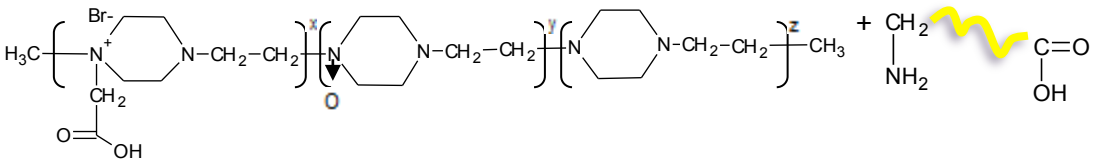
Çizelge 5.11 MAGE (121-134) dizesine ait HPLC sonuçları

Pik	Alıkonma	Alan	Yükseklik	% Alan
1	6.692	9875	1134	0.100
2	9.810	5905	749	0.060
3	10.706	1733	456	0.018
4	11.372	1928	373	0.020
5	11.521	1248	260	0.013
6	11.828	32998	5279	0.335
7	12.240	5281	924	0.054
8	12.612	7383	810	0.075
9	12.793	12780	2142	0.130
10	12.917	29425	7469	0.299
11	13.086	9293554	1201847	94.354
12	13.371	149512	24910	1.518
13	13.557	35289	5635	0.358
14	13.712	126207	16733	1.281
15	13.833	21825	3869	0.222
16	14.057	6381	1105	0.065
17	14.206	3708	541	0.038
18	14.310	7429	1347	0.075
19	14.469	61131	9040	0.621
20	14.567	14274	3603	0.145
21	14.650	10552	2003	0.107
22	14.838	1494	299	0.015
23	15.084	2259	387	0.023
24	15.320	997	210	0.010
25	17.491	6509	999	0.066
Toplam		9849679	1292125	100.000

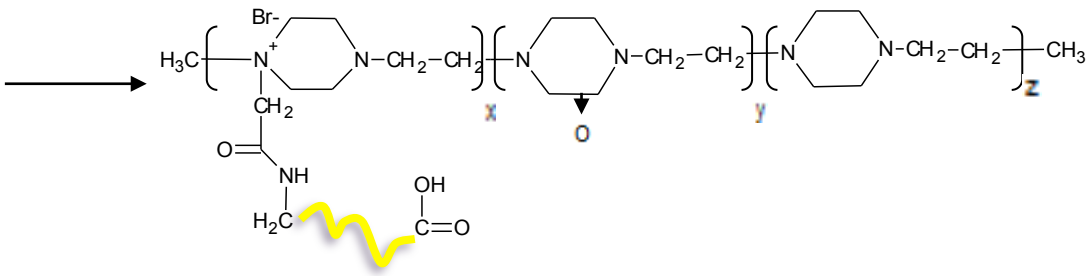


Şekil 5.44 Gen Script Firması tarafından sentezlenmiş MAGE (121-134) peptid dizesine ait Kütle Spektrumu

5.9.1 Polioksidonyum – Peptid Konjugasyon Reaksiyonu

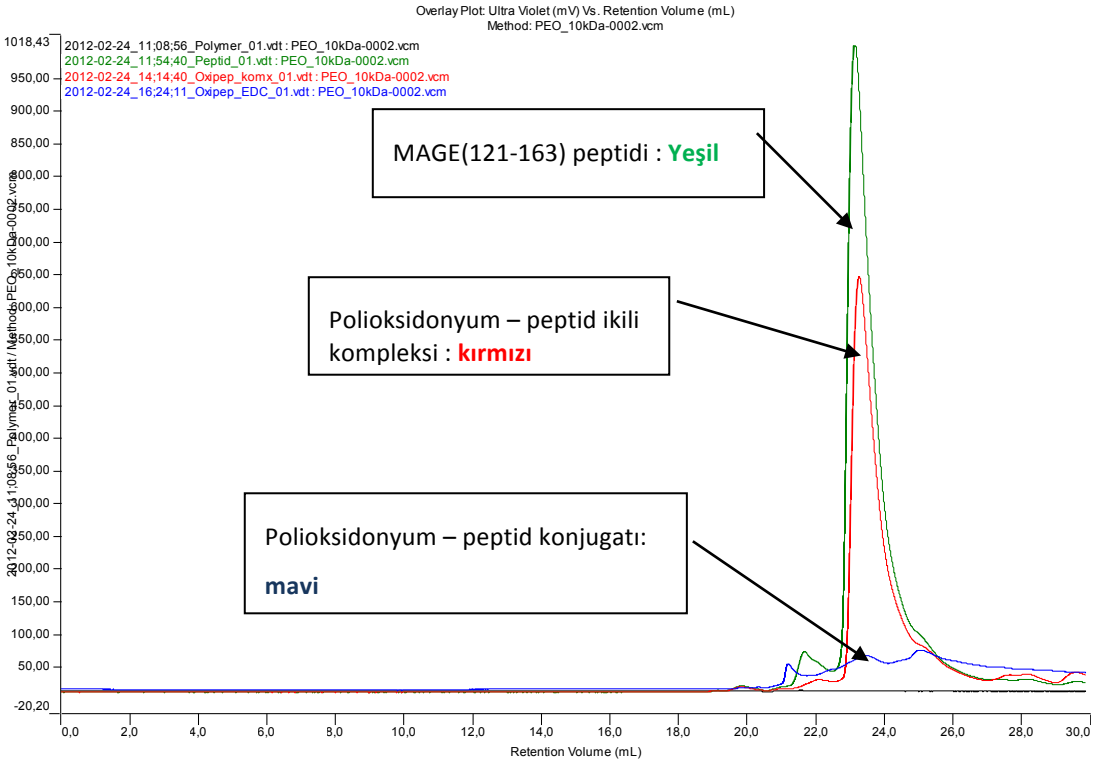


Polioksidonyum polimeri peptid

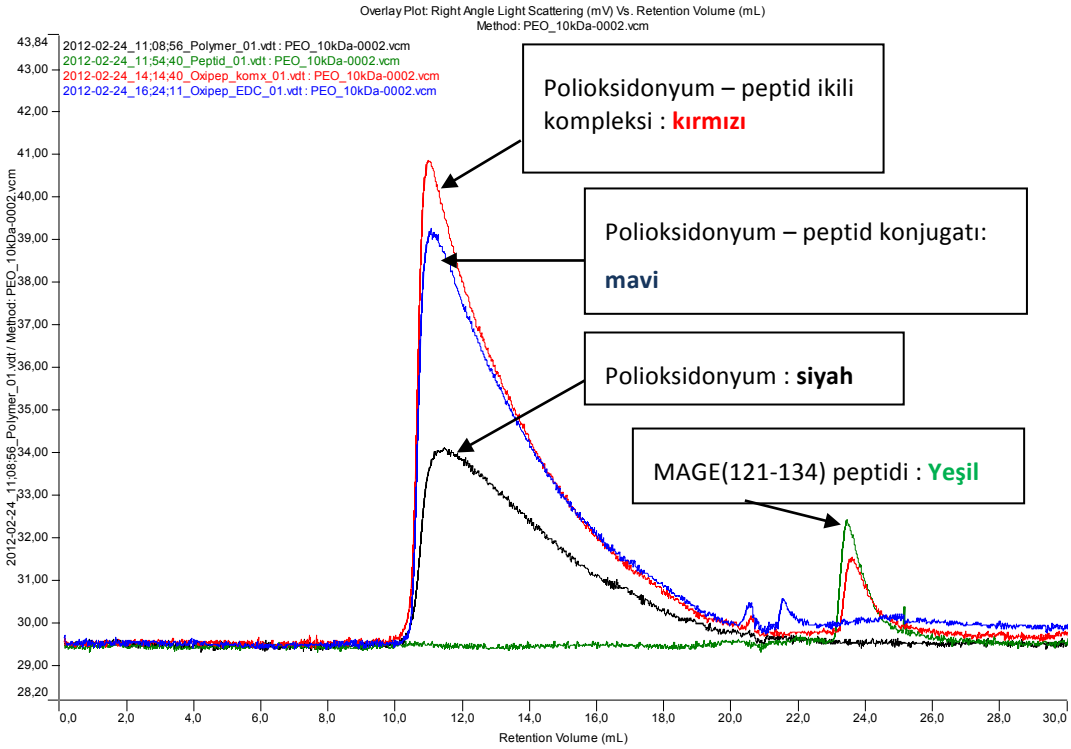


Polioksidonyum – peptid konjugatı

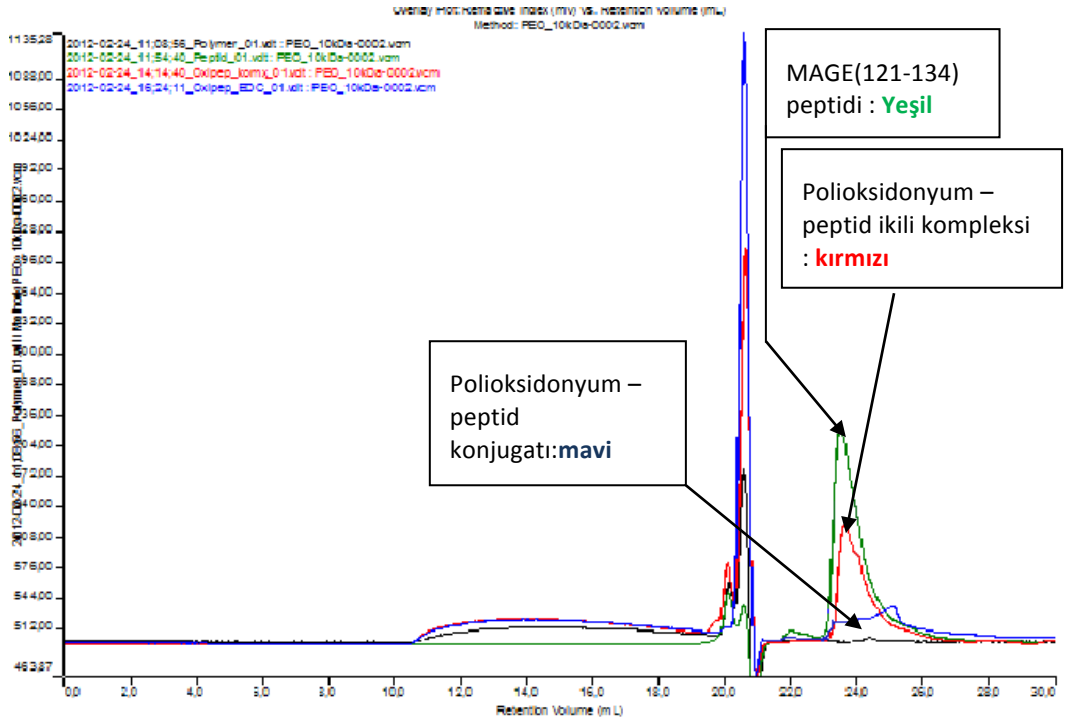
Şekil 5.45 Polioksidonyum – peptid konjugasyon mekanizması



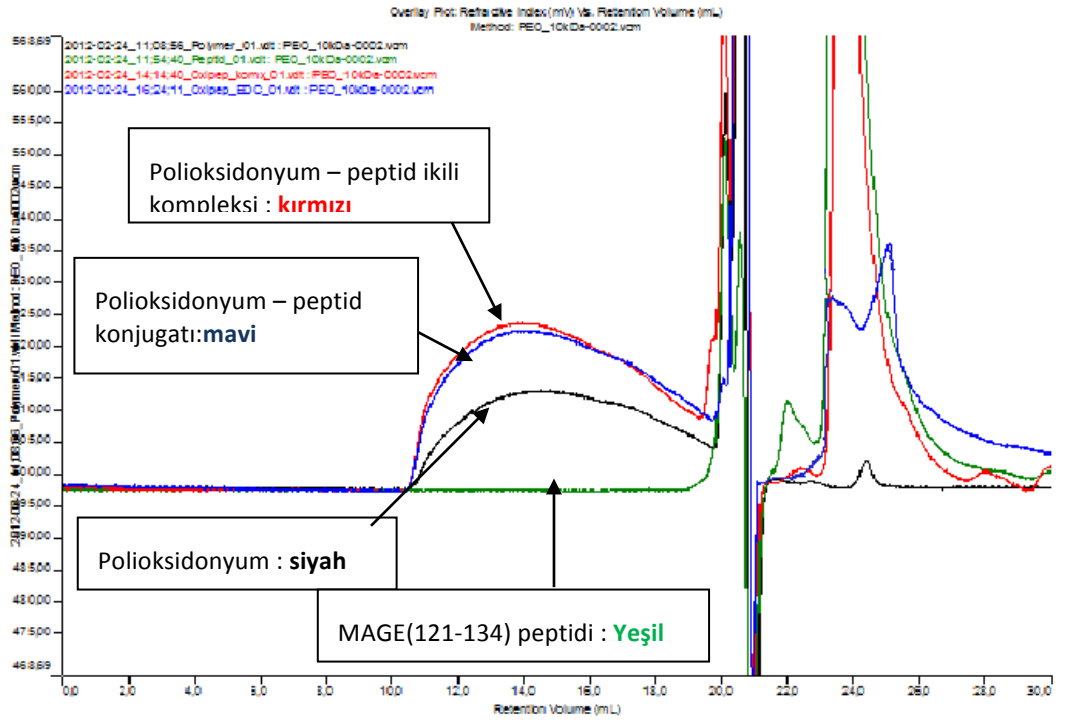
Şekil 5.46 EDC varlığında sentezlenen Polioksidonyum - Progesteron konjugatı ve Polioksidonyum -Progesteron ikili kompleks yapısına ait GPC – UV kromatogramı



Şekil 5.47 EDC varlığında sentezlenen Polioksidonyum - Progesteron konjugatı ve Polioksidonyum -Progesteron ikili kompleks yapısına ait GPC – LS kromatogramı



Şekil 5.48 EDC varlığında sentezlenen Polioksidonyum - Progesteron konjugatı ve Polioksidonyum -Progesteron ikili kompleks yapısına ait GPC – RI kromatogramı



Şekil 5.49 EDC varlığında sentezlenen Polioksidonyum - Progesteron konjugatına ait ve Polioksidonyum -Progesteron ikili kompleks yapısına ait 'yakından görünümlü' GPC – RI kromatogramı

Şekil 5.41'de EDC varlığında sentezlenen Polioksidonyum - Progesteron konjugatı ve Polioksidonyum -Progesteron ikili kompleks yapısına ait GPC – UV kromatogramı göstermiştir ki 20. ile 26. dakikalar arasında MAGE (121-134) peptidine ait 280nm'de UV piki alınmaktadır. Ancak peptid ile polioksidonyum ikili kompleksine ait kromatogram incelendiğinde bu çözelti içindeki peptid miktarı aynı olmasına karşın 20-26 dakikaları arasında azalan bir pik şiddeti gözlenmektedir. LS kromatogramında moleküllere göre ışığın saçılmasına bakıldığında ise komplekse ait daha yüksek LS kromatogramının oluştuğunu gözlemlemekteyiz. Böylece 100.000 g/mol molekül ağırlıklı polimer ile kıyaslanarak bakıldığında kompleks yapıda daha yüksek molekül ağırlığının olduğunu görmekteyiz. Konjugata ait kromatogramda ise yine polimere kıyasla daha büyük pikin elde edilmiş olması konjugatın gerçekleştiğini ancak kompleks yapıya kıyasla daha küçük molekül ağırlığına sahip olduğu sonucuna ulaşılmaktadır. Ayrıca ışığın kırınımı (RI) sonucu da bu yapıyı desteklemektedir.

Ayrıca polioksidonyum tek başına UV piki vermemekte ve konjugat ile komplekste de peptidin görüldüğü alan dışında herhengi bir bölgede pik gözlenmemektedir. Bu durum peptidin konjugat ve kompleks yapılarında polimerin iç bölgelerinde kaldığını düşündürmektdir.

Peptid dizesi incelendiğinde olası reaktif grupların etkilerini şu şekilde açıklayabiliriz;

H-Lösin-Lösin-Lizin-Tirozin-Arjinin-Alanin-Arginin-Glütamikasit-Prolin-Valin-Treonin Lizin-Alanin-Glütamikasid-OH dizesindeki amino asitlerden;

N-terminal ucunda bulunan Lösin amino aside ve dize içindeki valin aminoasidi apolar ve hidrofobik yan gruplara sahip olmasından dolayı genellikle dizenin iç kısmına doğru yönelme içerisindedir ve polipeptidin üçüncül yapılarından sorumlu olabilmektedir.

Dize içinde bulunan tirozin ve treonin amino asidleri ise sahip oldukları hidroksi grupları peptid dizesinin genellikle yüzey kısmında bulunma eğilimi gösterir ve hem inter hem de intra moleküler hidrojen bağlarının oluşmasından sorumludurlar.

Peptid dizesinde var olan lizin ve arginin ise NH_2 primer amin grupları içermektedir ve bu gruplar genellikle peptid dizesinin yüzey kısmında yer almaktadır.

Kovalent bağ oluşumunu sağladığımız EDC yüntemi ile N- ucundaki lösin amino asidleri peptid dizesinin iç kısmına doğru yönelmiş olacağından lizin ve arginin amino

asitlerindeki primer aminler üzerinden oluşabilmektedir. Ancak aynı aminoasitler molekül içi bağlar da oluşturabilir, MAGE (121-134) dizesinde de genel lizin ve arginine moleküllerinin yüzeyde bulunduğunu dizenin sahip olduğu pirolin amino asidinden kaynaklandığını söyleyebiliriz. Çünkü polipeptid dizesindeki prolin veya hidroksi prolin amino asidlerinin varlığı α-sarmal yapının oluşmasını engellemektedir. Bu amino asitlerin azot atomları beş üyeli halkalının parçaları olduklarından, azota bağlı gruplar, α-karbon bağı yeterince dönmediğinden bir sarmal yapıyı oluşturamazlar.

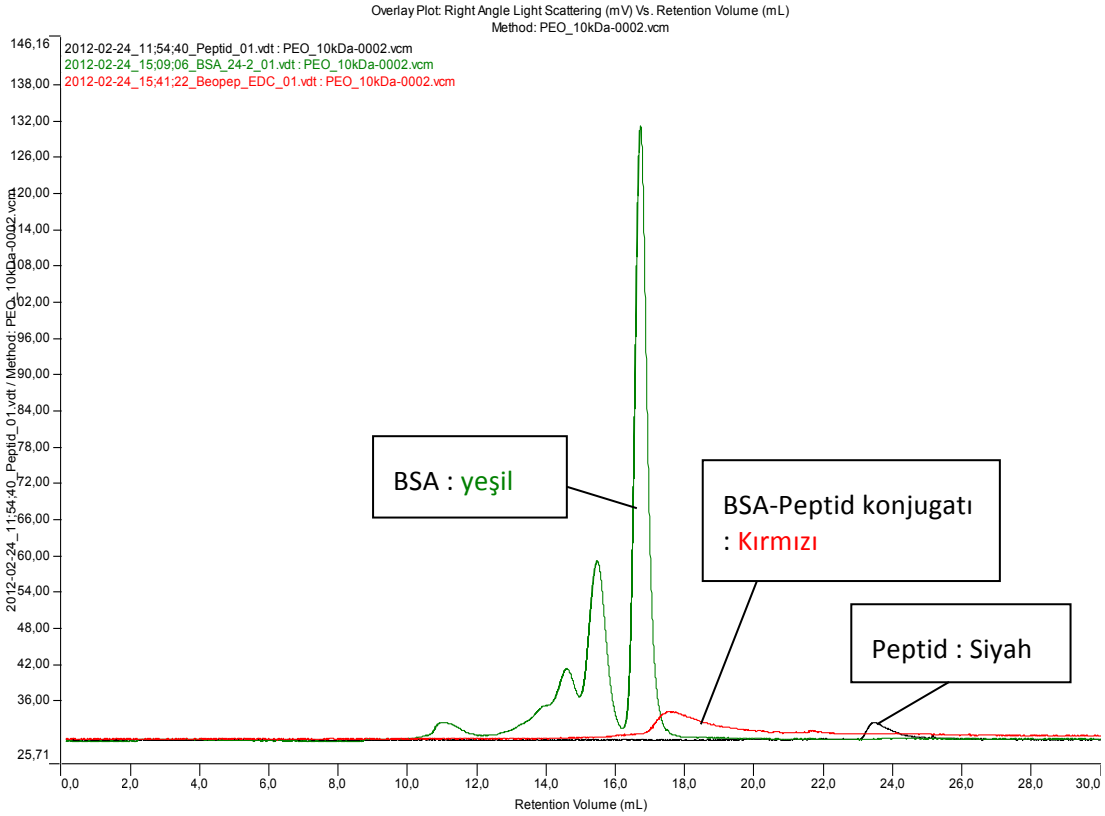
İkili kompleks için ise tirozin ve treonin amino asitleri hidrojen bağını oluşturabilen fonksiyonel yan gruplara sahiptir. Polioksidonyum polimerinde de var olan oksitlenmiş azot atomu ile aralarında hidrojen bağı oluşumu söz konusu olabilmektedir. Ayrıca polimerdeki karboksilik asidin hidroksi grubuyla da hidrojen bağları kurmaktadırlar.

Metal kompleksleriyle ise peptid dizesinde bulunan lizin ve arginindeki -NH2 primer amin grupları ve dizede 2 tane bulunan glutamik asidin –COOH karboksil grupları arasında Cu+2 gibi metaller ile üçlü kompleks yapılar elde edilebilmektedir.

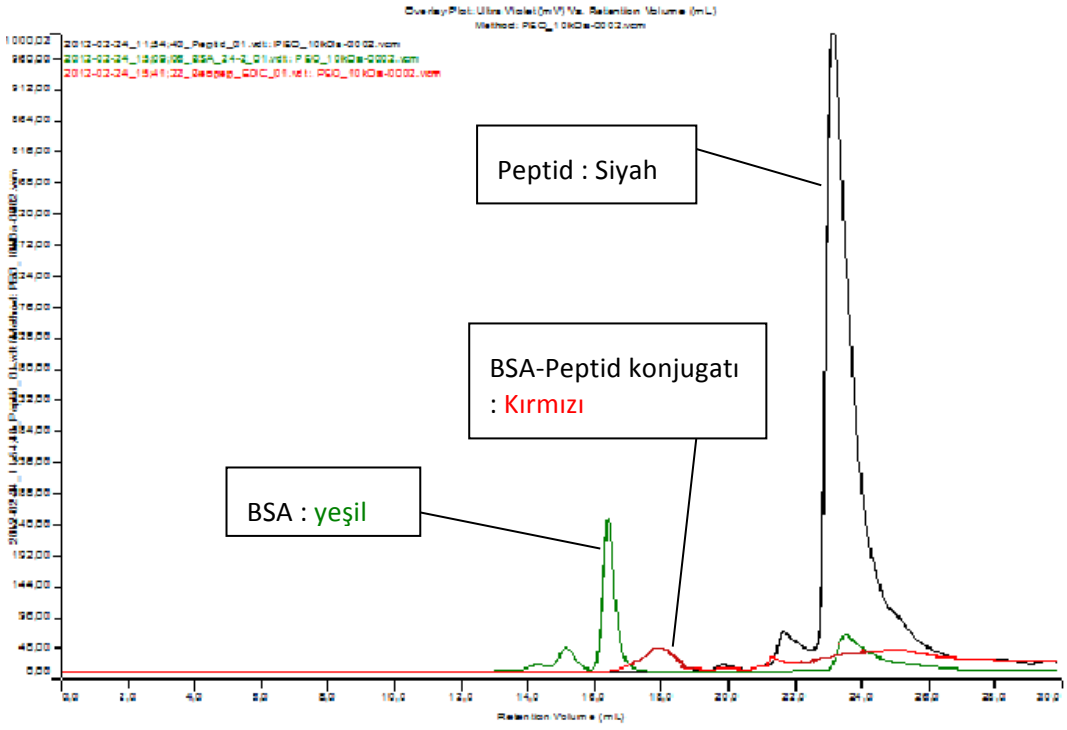
Ayrıca tüm bu etkileşimlerin yanısıra peptidler gelişigüzel halka düzenlenmeleri adı verilen esnek, değişken ve istatistiksel olarak tesadüfi yapılar oluşturmayı da üstlenmektedirler. Örneğin bazı polipeptid dizeleri kimi pH'larda kendi içinde (intra) α-sarmal yapı veya intermoleküler herhangi bir etkileşim göstermezken farklı pH'larda gelişigüzel düzenlenmeler yapmaktadırlar. MAGE (121-134) peptid dizesi içerisinde ise prolin amino asidinin varlığından herhangi bir α-sarmal yapı oluşmaz ve dolaşıklık ile büküme sebep olur. Bu da polimer molekülleri ile farklı bir şekilde gelişigüzel düzenlenmeler ile bir arada bulunmalarına sebep olabilecektir[86].

İmmünostimülan etkisi kanıtlanmış olan polioksidonyum polimeri ile peptidin konjugat ve komplekslerine ait immün yanıtları da incelenmiş ve sonuçlar yapı analizleri hakkında daha iyi fikir elde etmemizi de sağlamıştır.

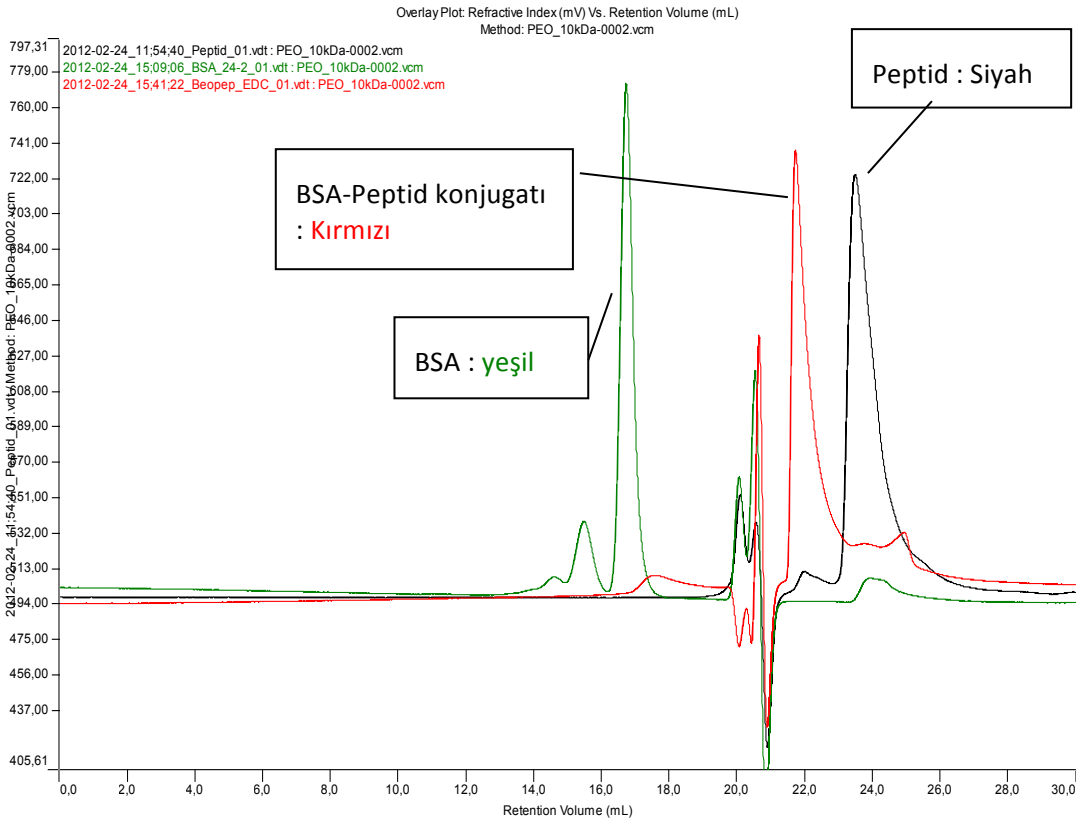
5.9.2 BSA-Peptid Konjugatlarına Ait Analiz Sonuçları



Şekil 5.50 BSA-Peptid konjugatına ait GPC-viscotec analizine ait ışığın kırılması (LS) kromatogramı



Şekil 5.51BSA-Peptid konjugatına ait GPC-viscotec analizine ait ışığın saçılması (LS) kromatogramı



Şekil 5.52 BSA-Peptid konjugatına ait GPC-viscotec analizine ait ışığın kırılması (RI) kromatogramı

Hayvan deneylerinde enjekte edilen peptid içerikli numunelerin antikor titrelerinin ölçüldüğü ELİSA deneylerinde kullanılmak üzere BSA-peptid konjugatları sentezlendi. GPC kromatogramlarından alınan analiz sonuçlarına göre BSA'ya spesifik pikler 14 ile 18 dakikaları arasında gözlemlenirken konjugata ait yeni piklerin oluştuğu gözlenmiştir. Böylece konjugatların elisa platelerdeki her bir kuyu çaşına 500 ng konjugat içerecek şekilde dilüsyonları hazırlandı.

5.10 Hayvan Deneyleri

İmmünojenik ve Aşı Özelliği Taşıyabilen Suda Çözünebilen Farklı Polimer-Peptid ve Polimer-Progesteron Konjugatlarının, İkili ve Üçlü Komplekslerinin Balb/c Farelere enjekte edilmesi çalışmamızda TÜBITAK, Marmara Arastırma Merkezi, Gen Mühendisligi ve Biyoteknoloji Arastırma Enstitüsü. Transgen ve Deney Hayvanları laboratuarında temin edilen 50 adet 8 haftalık 28-32 gr ağırlığında erkek Balb/c türü fare kullanıldı.



Şekil 5.53 Balb/c fare

Enjeksiyon işlemi, eter anestezisi altında intraperitonal olarak 0,5 ml örnek enjeksiyonu ile gerçekleştirildi. Hazırlanan kompleks ve EDC çapraz bağlayıcısı varlığında sentezlenen biyokonjugatların (aşı)enjekte edildiği gruptaki deney hayvanları her bir grupta 3 tane olmak üzere 6 gruba ayrıldı.



Şekil 5.54 Peritondan örnek enjeksiyonu

Çizelge 5.12 Kompleks ve biyokonjugatların enjekte edildiği balb/c türü fare grupları ve enjekte edilen aşı örneklerinin içeriği

Grup Adı	Enjekte Edilen Aşı İçeriği	Gruptaki fare sayısı
1	0,5 mg peptid ve 1 mg polioksidonyum içeren 0,5ml peptid-polioksidonyum konjugatı	3
2	0,5 mg peptid ve 1 mg polioksidonyum içeren 0,5ml peptid-polioksidonyum ikili kompleksi	3
3	0,5 mg peptid ve 1 mg polioksidonyum içeren 0,5ml peptid-Cu-polioksidonyum üçlü kompleksi	3
4	0,5 mg peptid içeren 0,5ml peptid-BSA konjugatı	3
5	0,5 mg peptid içeren 0,5 ml peptid-Fraud's adjuvanı	3
6	0,5 mg peptid içeren 0,5 ml peptid çözeltisi	3
7	1 mg polioksidonyum içeren 0,5 ml polioksidonyum çözeltisi	3
8	0,5 mg peptid ve 1 mg NIPAA-AA kopolimeri içeren 0,5ml peptid-polioksidonyum konjugatı	3
9	0,5 mg peptid ve 1 mg NIPAA-AA kopolimeri içeren 0,5ml peptid-polioksidonyum ikili kompleksi	3
10	0,5 mg peptid ve 1 mg NIPAA-AA kopolimeri içeren 0,5ml peptid-Cu-polioksidonyum 3'li kompleksi	3
11	1 mg NIPAA-AA kopolimeri içeren 0.5 ml NIPAA-AA çözeltisi	3
12	0,5 mg progesteron ve 1 mg polioksidonyum içeren 0,5ml peptid-polioksidonyum konjugatı	3

Çizelge 5.12 Kompleks ve biyokonjugatların enjekte edildiği balb/c türü fare grupları ve enjekte edilen aşı örneklerinin içeriği (devam)

13	0,5 mg progesteron ve 1 mg polioksidonyum içeren 0,5ml peptid-polioksidonyum ikili kompleksi	3
14	0,5 mg progesteron içeren 0,5ml progesteron-BSA konjugatı	3
15	0,5 mg progesteron içeren 0,5 ml progesteron-Fraud's adjuvanı	3
16	0,5 mg progesteron içeren 0,5ml progesteron çözeltisi	3
17	0,5 ml 0,154 M NaCl	2

5.10.1 Fare Serumlarının Alınması

Eter anestezisi altında kuyruk ucu kesilerek 7 günde bir 7 hafta boyunca kan alındı. 20 µl sodyum sitrat içeren eppendorflara alınan kan örnekleri 2500 rpm devirde 3 dakika santrifuj edildi. Santrifuj sonrasında üst fazdan 20 µl serum dikkatlice alınarak başka birer eppendorfa nakledildi. Ölçümler kan alınması ile aynı gün yapıldı. Analiz sonunda arta kalan serumlar deneylerin tekrarlanabilirliğini sağlamak için -20 °C'de saklandı.

Dolaylı yoldan Enzim Bağlı İmmün Assay (ELISA) Yöntemi Kullanılarak Farelerden Alınan Serum Örneklerinde Kompleks ve Konjugatlara Karşı Oluşan Antikor Miktar Tayini

Bu test; aşılama işlemi sonrasında enjekte edilen biyokonjugata karşı oluşan konjugataspesifik antikor miktarini tayini etmek amacıyla kullanıldı. Antikorlar ELISA plaka kuyucuklarına kaplanmış antijenlerle tanımlandı. Özgün antikorları ihtiva eden serum çözeltisi ile antijen kaplı kuyucuklar inkübe edildi ve fare serum çözeltisindeki antikorlara (türe özgü) karşı geliştirilmiş (anti-fare) ve alkalen fosfataz ile konjuge polyvalent antikorlara bağlandı. Ortama substrat ilave edilmesi ve substratın enzim tarafından hidroliz edilmesi sonucu oluşan ürün miktarı spektroskopik olarak belirlendi.

5.10.2 Kullanılan Çözeltiler

5.10.2.1 Sodyum Sitrat Çözeltisi

0,22 g D-(+) Glukoz ($C_6H_{12}O_6$; Mw=180,16 g/mol) tartılarak 3 ml ultra saf suda çözünür. Daha sonra 0,08 g sitrik asit $C_6H_5O_7Na_3$ (Mw= 258.07 g/mol) tartılarak 3 ml ultra saf suda çözünür. 0,231 g sodyum sitrat (C6H5Na3O7 2 H_2O; Mw= 294.10g/mol) 3 ml ultra saf suda çözünür. Bu üç çözelti birbine eklenir ve son hacim ultra saf su ile 1 L' ye tamamlanır.

5.10.2.2 0,5 M PBS Tamponu (pH=7,2)

5,22 g potasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4; Mw=174 g/mol) tartılarak 500 ml ultra saf suda çözünür. 2,72 g potasyum dihidrojen fosfat (KH2PO4; Mw=136 g/mol) tartılarak çözünür. K_2HPO_4 baz çözeltisi üzerine K_2HPO_4 asid çözeltisi eklenir. 0,15 M olacak şekilde 8,77g NaCl eklenir. Son hacim 5 litreye tamamlanır ve pH 7,2' ye ayarlanır. Kaba süzgeç kağıdı ile süzülür.

5.10.2.3 Yıkama Tamponu

0,5 M PBS (pH 7,2) den litresi başına üzerine 0,5 ml Tween 20 ($C_{58}H_{114}O_{26}$; Mw=1227,72 g/mol) eklenir ve karıştırılır.

5.10.2.4 Substrat Tamponu

0,015 g glisin ($C_2H_5NO_2$; Mw=75,07 g/mol) 50 ml ultra saf su içerisinde çözündükten sonra 5M KOH çözeltisi ile pH 10,4' e ayarlanır. Daha sonra 0,027 g çinko klorür ($ZnCl_2$; Mw= 136,29 g/mol) tartılarak 50 ml ultra saf su içerisinde çözünür. 0,04 g magnezyum klorür ($MgCl_2$; Mw=95,3 g/mol) tartılarak 50 ml ultra saf su içerisinde çözünür. Bu üç çözelti karıştırılır ve ultra saf su kullanılarak çözelti hacmi 200 ml olacak şekilde hacim tamamlanır.

5.10.2.5 %0,1 Süt Tozu Çözeltisi

60 mg süt tozu tartılarak 60 ml 0,5 M PBS (pH 7.2) tamponu içerisinde çözünür.

5.10.2.6 Polivalent İmmünoglobulin Alkalin Fosfataz Çözeltisinin Dilüsyonu

0,5 M 30 ml PBS (pH 7) çözeltisi üzerine 15 µl Polivalent immünoglobulin alkalin fosfataz eklenir ve vorteksle karıştırılarak 1/2000 dilüsyonu hazırlanır.

5.10.2.7 4-Nitrofenil Fosfat Substrat Çözeltisinin Hazırlanması

4-nitrofenil fosfattan ($C_6H_6NO_6P.2C_4H_{11}NO_3$; Mw 461.4 g/mol) 2,5 mg alınıp 25 ml substrat tamponunda çözünür ve karanlıkta saklanır.

5.10.3 ELISA Deneyinin Yapılışı

96 kuyu içeren ELISA plağı (Greiner) 0,5 µg antijen (npeptid/nBSA=5 oranında sentezlenen 0.5 mg MAGE 121-134 peptid dizisi içeren BSA-Peptid biyokonjugatı) 100 µl kuyulara eklendi. Antijen ile kaplanan ELISA plakları gece boyu +4 °C'de bekletildi. Kuyular %0,05 Tween20 ihtiva eden 0.5 M PBS pH 7 yıkama tamponu ile 3 defa yıkandı.

ELISA plaklarındaki herbir kuyuya 12 yollu otomatik pipet yardımıyla % 1'lik 200 µl süt tozu çözeltisi eklendi. ELISA plakası 37 °C sıcaklığında etüvde 1 saat bekledi ve 0,05 Tween20 ihtiva eden PBS yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı. Farelerden alınan serumlar 1:50 ve 1:300 oranında dilüsyonları yapıldı. Herbir kuyuya 1:50 ve 1:300 oranında dilüsyonları yapılan serum örnekleri 100 µl olarak eklendi. ELISA plakası +4 °C'de 2 saat bekledi. ELISA plakası 0,05 Tween20 ihtiva eden PBS yıkama tamponu ile 2 kez yıkandı. Antimouse polivalent immünoglobulin alkalin fosfataz 1:2000 oranında sulandırılarak 100 µl herbir kuyuya eklendi. ELISA plakası 1 saat 37 °C'de etüvde bekletildi. ELISA plakası 0,05 Tween20 ihtiva eden PBS yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı. % 0.1 Paranitrofenil fostat (PNFP) substrat çözeltisi eklendi. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 45 dakika bekletildikten sonra ELISA plak okuyucu aletinde A405 nm dalga boyunda okundu.

5.10.4 Dolaylı Yoldan Enzim Bağlı İmmün Assay (ELISA) Yöntemi Kullanılarak Farelerden Alınan Serum Örneklerinde Kompleks ve Biyokonjugatlara Karşı Oluşan Antikor Miktar Tayini Sonuçları

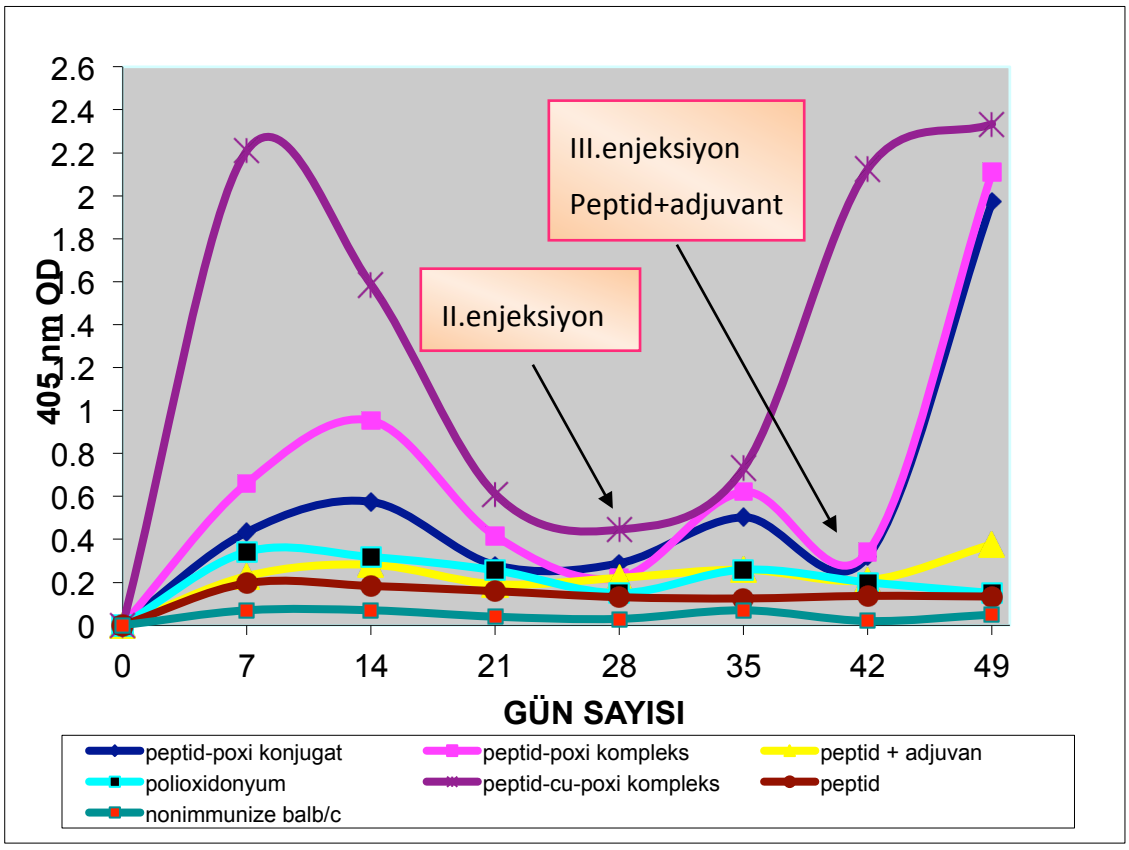
Dolaylı yoldan enzim bağlı immün assay (ELISA) yöntemi kullanılarak farelerden alınan serum örneklerinde kompleks ve biyokonjugatlara karşı oluşan antikor miktar tayini sonuçları aşağıdaki gibidir.

5.10.4.1 Polioksidonyum – Peptid Konjugat ve Komplekslerine Ait ELİSA Sonuçları

Polioksidonyum – peptid ikili kompleksi, EDC çapraz bağlayıcısı varlığında peptid-polioksidonyum konjugatı ve polioksidonyum – Cu – peptid üçlü kompleksi sentezlendi. İkili kompleks ve konjugat npeptid/nPolioksidonyum = 29,94 oranında fare başına 0.5 mg/0,5 ml Mage-3 121-34 peptid dizisini içerecek şekilde hazırlandı. Hazırlanan ikili kompleks ve bakır kompleksi ile sentezlenen biyokonjugat saflaştırıldıktan sonra balb/c farelere intraperitonal olarak enjekte edildi. Analizlerde alternative adjuvant etkiyi gözlemleyebilmek için ayrıca tek başına peptid ve peptid-freud's adjuvant da birer grup fareye enjekte edildi. Yine tek başına polimerlerin doğrudan spesifik immune yanıta sebep olmadığını teyit edebilmek için bir grup fareye peritoneal olarak enjekte edildi. 49 gün boyunca 7 gün aralıklarla alınan tüm fare serumlarındaki antikor miktarı kontrol grubunun serumu ile karşılaştırıldı.

Şekil 5.50'de görüldüğü üzere en yüksek titrede antikor yanıtları peptid-Cu-polioksidonyum üçlü kompleksinin enjekte edildiği fare grubundan elde edilmiştir. Ilk enjeksiyondan 28 gün sonra titre seviyesi ortalama 0,5 OD değerine indiğinde I. enjeksiyon ile aynı dozda II. enjeksiyon yapılmıştır ve serumlardaki antikor titrelerinin maksimum seviyelere ulaştığı 42 ve 49. günlerde de yüksek antikor seviyesinin devam ettiği gözlenmiştir. Monoklonal antikor çalışmalarının devam ettirilmesi için seçilen fare bu grup içerisindendir. Kompleks ve konjugata ait olan antikor titreleri incelendiğinde ise ilk enjeksiyon sonrasında kompleks çözeltisi enjekte edilen fare gruplarında konjugatın enjekte edildiği antikor titrelerinden daha yüksek değerler elde edilmiştir. GC-LC kromatogramları da bu bağlanmda incelendiğinde polioksidonyum ile peptidin kompleksindeki kuvvetli fiziksel etkileşimlerinde, konjugat kovalent bağlarından daha etkin bir etkileşim olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Konjugasyon

reaksiyonlarında peptidin kovalent bağlanacağı polioksidonyumdaki karboksilik asit grubundan ziyade polioksidonyumun yapısında bulunan kuarterner azot atomunun peptidin amino asitlerindeki yüzeysel fonksiyonel gruplar ile arasında daha yüksek verimde etkileşimin olabileceğini ortaya konulmuştur.



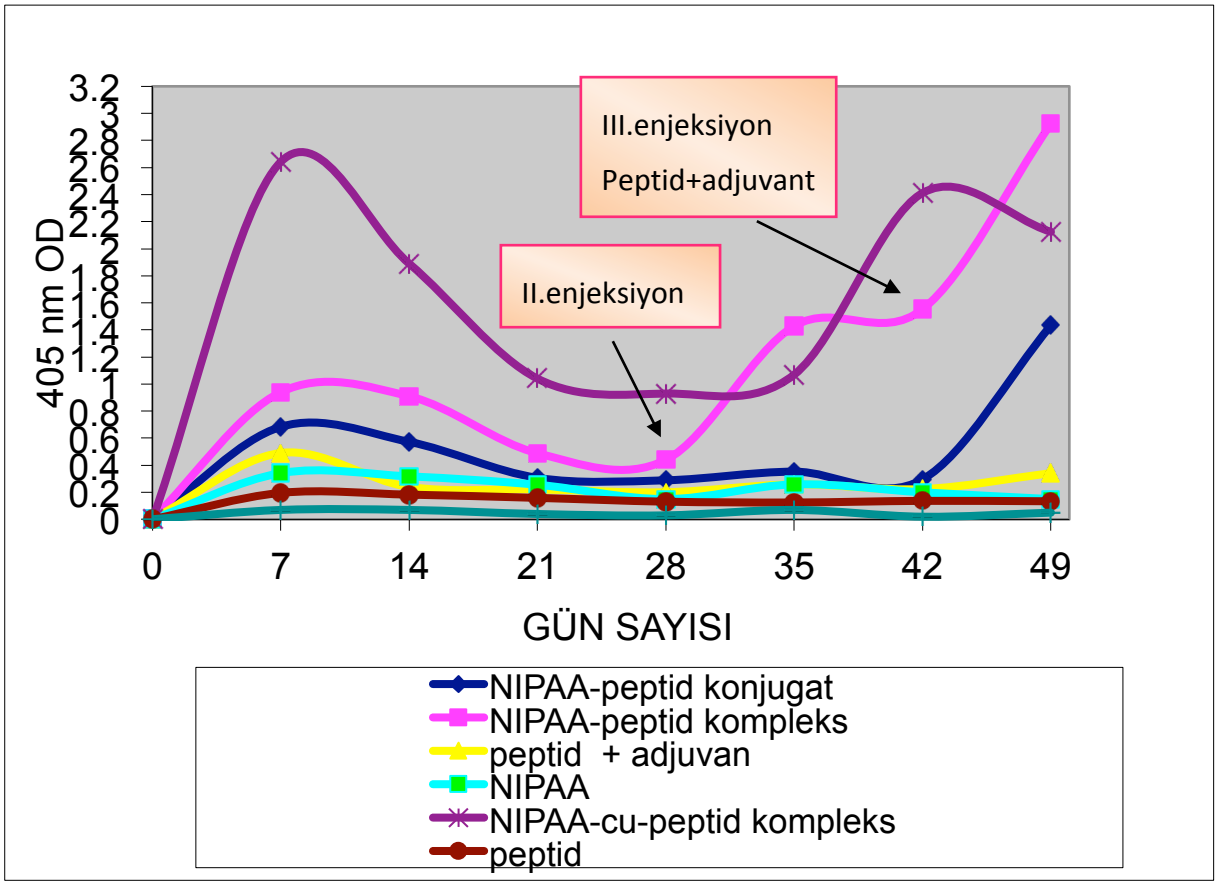
Şekil 5.55 Çizelge 5.12'daki 1,2,3,5,6,7 ve 17 numaralı gruplardaki balb/c farelerinden 49 gün boyunca 7 gün aralıklarla alınan serumlarında ELISA yöntemiyle tayin edilen antikor miktarlarının karşılaştırılması

5.10.4.2 (NIPAA-AA) – Peptid Konjugat ve Komplekslerine Ait ELİSA Sonuçları

(NIPAA-AA) – peptid ikili kompleksi , (NIPAA-AA) – Cu – Peptid üçlü kompleksi hazırlandı ve EDC çapraz bağlayıcısı varlığında Peptid-(NIPAA-AA) konjugatı sentezlendi. Kompleks ve biyokonjugatda fare başına 0.5 mg/0,5 ml Mage-3 121-34 peptid dizisini içerecek şekilde hazırlandı. Sentezlenen ikili kompleks, biyokonjugat ve bakır içeren üçlü kompleksi saflaştırıldıktan sonra balb/c farelere intraperitonal olarak enjekte edildi. Analizlerde alternatif adjuvant etkiyi gözlemleyebilmek için ayrıca tek başına peptid ve peptid-freud's adjuvant da birer grup fareye enjekte edildi. Yine tek başına polimerlerin doğrudan spesifik immune yanıta sebep olmadığını teyit

edebilmek için bir grup fareye peritoneal olarak (NIPAA-AA) kopolimeri enjekte edildi. 49 gün boyunca 7 gün aralıklarla alınan tüm fare serumlarındaki antikor miktarı kontrol grubunun serumu ile karşılaştırıldı.

Şekil 5.52'de görüldüğü üzere en yüksek titrede antikor yanıtları peptid-Cu-(NIPAA-AA) üçlü kompleksinin enjekte edildiği fare grubundan elde edilmiştir. Ilk enjeksiyondan 28 gün sonra titre seviyesi ortalama 0,5 OD değerine indiğinde I. enjeksiyon ile aynı dozda II. enjeksiyon yapılmıştır ve serumlardaki antikor titrelerinin maksimum seviyelere ulaştığı 42. günde en yüksek antikor seviyesine ulaşmıştır ve son hafta hafif bir düşme olmasına karşın yine de 2,00 OD seviyesinin üstünde devam ettiği gözlenmiştir. Monoklonal antikor çalışmalarının devam ettirilmesi için seçilen bir diğer fare de bu grup içerisindendir. İkili kompleks ve konjugata ait olan antikor titreleri incelendiğinde ise ilk enjeksiyon sonrasında ikili kompleks enjekte edilen fare gruplarında konjugatın enjekte edildiği antikor titrelerinden daha yüksek değerler elde edilmiştir. Peptidin gelişigüzel halka düzenlenmeleri EDC yöntemiyle kovalent bağlanmadan ziyade ikili kompleksteki fiziksel etkileşimlerde daha etkin bir düzenlenme yolu olduğunu da ortaya koymaktadır. Ancak sonuç olarak hem hazırlanan (NIPAA-AA) – peptid ikili kompleksi ve (NIPAA-AA) – Cu – Peptid üçlü kompleksi hem de EDC çapraz bağlayıcısı varlığında sentezlenen Peptid-(NIPAA-AA) konjugatı, geleneksel olarak kullanılan freund's adjuvanı ile peptidin enjekte edildiği fare serumlarından daha yüksek antikor seviyelerine yükselmesine sebep olmuştur.



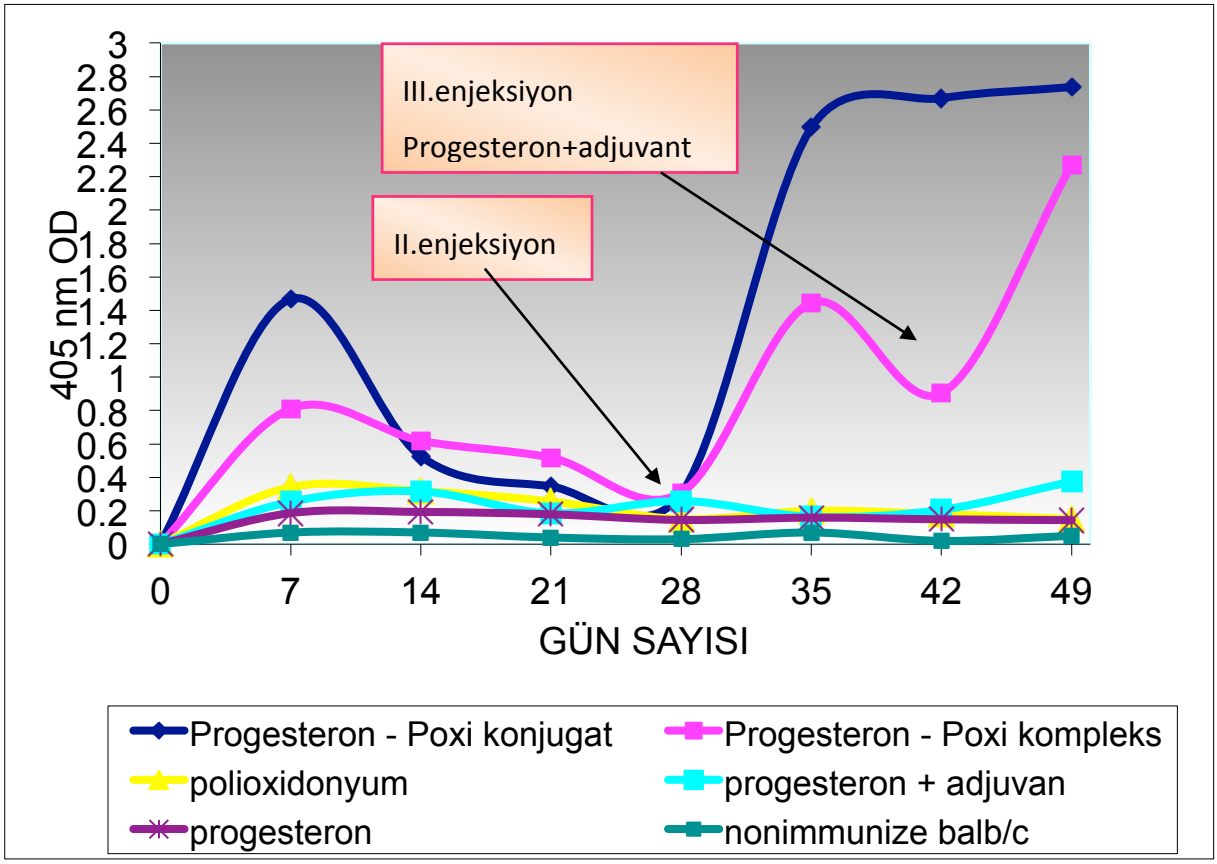
Şekil 5.56 Çizelge 5.12'daki 5,6,8,9,10,11 ve 17 numaralı gruplardaki balb/c farelerinden 49 gün boyunca 7 gün aralıklarla alınan serumlarında ELISA yöntemiyle tayin edilen antikor miktarlarının karşılaştırılması

Polioksidonyum – progesterone kompleksi hazırlandı ve EDC çapraz bağlayıcısı varlığında progesteron-polioksidonyum konjugatı sentezlendi. Kompleks ve biyokonjugat $n_{progesteron}/n_{Polioksidonyum}$ = 143,90 oranında fare başına 0.5 mg/0,5 ml progesteron içerecek şekilde hazırlandı. Hazırlanan kompleks ve sentezlenen biyokonjugat saflaştırıldıktan sonra balb/c farelere intraperitonal olarak enjekte edildi. Analizlerde alternative adjuvant etkiyi gözlemleyebilmek için ayrıca tek başına progesteron ve progsteron-freud's adjuvant da birer grup fareye enjekte edildi. 49 gün boyunca 7 gün aralıklarla alınan tüm fare serumlarındaki antikor miktarı kontrol grubunun serumu ile karşılaştırıldı.

Şekil …'de görüldüğü üzere en yüksek titrede antikor yanıtları EDC varlığında sentezlenen progesteron-polioksidonyum konjugatlarının enjekte edildiği fare grubundan elde edilmiştir. Ilk enjeksiyondan 28 gün sonra titre seviyesi ortalama 0,4 OD değerine indiğinde I. enjeksiyon ile aynı dozda II. enjeksiyon yapılmıştır ve

serumlardaki antikor titrelerinin maksimum seviyelere ulaştığı 42 ve 49. günlerde de yüksek antikor seviyesinin devam ettiği gözlenmiştir. Komplekse ait olan antikor titreleri incelendiğinde ise ilk enjeksiyon sonrasında konjugat enjekte edilen fare gruplarında fiziksl karışımın enjekte edildiği antikor titrelerinden daha yüksek değerler elde edilmiştir. Konjugasyon reaksiyonlarında progesteron molkülünde bulunan keton grupları hidrazin ile reaksiyona sokularak hidrazona dönüştürülmüş ve elde edilen progesterone=N-NH_2 molekülü EDC ile polioksidonyumdaki karboksil gruplarına amid bağı oluşturarak konjuge edilmiştir.

Kompleksleşmedeki fiziksel etkileşimler ile progesteronun polioksidonyuma EDC yöntemi kadar etkin bağlanmamış olduğu sonucuna ulaşılmasına ramen hem konjugat hem de kompleks çözeltiler progesteronun sadece adjuvant ile enjekte edilmesinden çok daha yüksek antikor seviyesini oluşturduğu açıkça gözlemlenmiştir.



Şekil 5.57 Çizelge 5.12'daki 7,12,13,15,16 ve 17 numaralı gruplardaki balb/c farelerinden 49 gün boyunca 7 gün aralıklarla alınan serumlarında ELISA yöntemiyle tayin edilen antikor miktarlarının karşılaştırılması

BÖLÜM 6

SONUÇ VE ÖNERİLER

Polielektrolit özellikteki farklı sentetik polimerlerin biyomoleküller ile etkileşimleri biyolojik açıdan önemli mekanizmaların varlığını ortaya koymakta ve biyomedikal uygulamalar için büyük önem taşımaktadır.

Bu yönde yapılan çalışmamızda sentetik polimerlerin (PAA, P(MVE-MA), P(VP-AA), P(NIPAA-AA), Polioksidonyum) biyolojik açıdan mühim özelliktere sahip biyomoleküller ile (BSA, betulin, estradiol, progesteron, peptid) konjugatlarının sentezi ve komplekslerinin hazırlanması gerçekleştirilmiştir.

BSA - P(MVE-MA) konjugatı EDC varlığında sentezlendi ve daha önce ki çalışmalarda da yapılmış olan konvensiyonel metod ile bu tez çalışmasında mikrodalga destekli şartların sağlandığı metod kıyaslandı. Konjugatların analizlerinin yapıldığı HPLC kromatogramına göre konvensiyonel yöntemde n=5 oranında en yüksek şiddette konjugat piklerini elde ettik (n=5 için ; yaklaşık 0,004 volts – 9 ile 11 dakikaları arasında). Mikrodalga destekli yönteme ait HPLC kromatogramında ise tüm oranlarda konvensiyonel metoda kıyasla daha yüksek şiddette konjugat pikleri elde ettik (n=5 için; 0,006 volts'dan daha yüksek – 9 ile 12 dakikaları arasında). Ayrıca konvensiyonel metod ile mikrodalga destekli metodun reaksiyon süreleri kıyaslandığından konvensiyonel metod ile 17 saat süren reaksiyon süresi mikrodalga şartlar altında toplam 15 dakikaya kısaltıldı.

Betulin biyomolekülü PAA ve P(MVE-MA) kopolimeri ile hem tiyanül klorür varlığında hem de CDI çapraz bağlayıcısı varlığında ester bağı oluşturarak konjuge edilmiş ve yapı işlev analizleri gerçekleştirilmiş ve konjugatların başarıyla elde edildiği gözlenmiştir. İmmunomodulator, antibakteriyel, antitümör, antimalaryal, antiinflamatuar,

anthelmintik, antimutajenik, antipiretik, antioksidan ve insan immün yetmezlik virüsü (HIV) inhibisyonu de dahil olmak üzere çeşitli biyolojik aktiviteye sahip olduğu bilinen pentasiklik triterpen yapıdaki betulin biyomolekülü farklı yöntemlerle polielektrolitlere konjuge edildikten sonra konjugatların sitotoksisitelerine bakılmıştır. Betulin molekülünün PAA polimeri ile SOCl2 varlığında ve CDI çapraz bağlayıcısı varlığında konjugatlarının, tek başına betulin ve PAA'e kıyasla sitotoksisitesine bakılmış 500 µg/mL dozda tüm numunelerin toksik olduğu gözlenirken, 250 µg/mL ve 125 µg/mL dozlarında betulin tek başına toksik olmasına ramen PAA ile her iki konjugatının da bu dozajlarda toksik olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Böylece betulin hem PAA ile konjugasyonu sonucunda, hem çözünürlüğü arttırılmıştır, hem de belirli dozlarda toksikliği azaltılmıştır. Ayrıca betulin biyomolekülü P(MVE-MA) kopolimerine de SOCl2 varlığında ve CDI çapraz bağlayıcısı varlığında konjuge edilmiştir ve PAA ile aynı yöntemle sitotoksisitelerine bakılmıştır. Betulin, P(MVE-MA)-Betulin konjugatlarının ve P(MVE-MA) kopolimerinin sitotoksisitesini kıyasladığımızda betülinin 500, 250 ve 125 µg/mL dozları, P(MVE-MA) polimerinin ise 500 µg/mL dozu toksiktir. Her iki yöntemle de Sentezlenen P(MVE-MA)-Betulin konjugatının da deneyde kullanılan tüm dozlar için toksik olamadığı belirlenmiştir.

Steroid yapısındaki hormonların en iyi bilinenlerinden estradiol ve progesteron molekülleri de farklı yöntemler kullanılarak polielektrolitlerle konjugatları sentezlenmiş ve kompleksleri hazırlanmıştır. Estradiol biyomolekülünün P(NIPAA-AA) biyopolimerine SOCl2 varlığında sentezlenen konjugatının hem yapı işlev analizi gerçekleştirilmiş hem de sitotoksisite testi ile toksikliğine bakılmıştır. Analizler sonucu konjugatın başarılı şekilde elde edildiği sonucuna ulaşılmıştır ve yapılan sitotoksisite testleri sonucu estradiolün, P(NIPAA-AA) kopolimerinin ve P(NIPAA-AA)-estradiol konjugatının 500 µg/mL ve daha düşük dozlarda toksik olmadıkları sonucuna ulaşılmıştır.

Başka bir steroid hormon yapısında olan progesteron biyomolekülünün de P(VP-AA) ve P(MVE-MA) kopolimerleri ile EDC varlığında konjugatları elde edildi ve yapı işlev analizleri gerçekleştirildi. Ayrıca elde edilen bu konjugatların ve P(NIPAA-AA)-estradiol konjugatının progesteron ve estradiole kıyasla antioksidan etkilerinin incelenmesi ile ilgili bir çalışma da Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalında Prof. Dr. Ayşegül Peksel ve çalışma grubu tarafından halen yürütülmektedir.

Progesteron biyomolekülünün polioksidonyum polimeriyle sentezlenen konjugatı ve hazırlanan kompleksi ise TÜBITAK, Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisligi ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü. Transgen ve Deney Hayvanları laboratuarında temin edilen balb/c türünde fareler ile hayvan deneylerinde kullanılmıştır ve kompleksleşmedeki fiziksel etkileşimler ile progesteronun polioksidonyuma EDC yöntemi kadar etkin bağlanmamış olduğu sonucuna ulaşılmasına ramen hem konjugat hem de kompleks çözeltilerin progesteronun sadece freund's adjuvant ile enjekte edilmesinden çok daha yüksek antikor seviyesini oluşturduğu açıkça gözlemlenmiştir. İleride hazırlanabilecek olan monoklonal antikor eldesi ve tanı teşhis kitlerinin geliştirilmesi çalışmaları için spesifik antikorların elde edilmesinde yeni olasılıklar ortaya çıkarmış olan bir ön çalışmadır.

Aşıların bağışıklayıcı gücünün sağlanabilmesi ve arttırılabilmesi için içeriğinde adjuvan ihtiva etmeleri gerekmektedir. Klinik olarak kullanılabilen ve onaylanmış adjuvanların sayısı oldukça azdır, bu sebepten güvenli ve etkili adjuvanların geliştirilmesi için önemli bir gereksinim bulunmaktadır. Bu bağlamda, doğal bağışıklığın yanı sıra aşılar ile sağlanan bağışılığa ilişkin güncel gelişmeler halen devam etmekte polimerik adjuvanların kullanılması ve geliştirilmesine yönelik çalışmalar teknolojik gelişmeler ile daha da ayrıntılı olarak incelenmeye devam etmektedir. Polimerik adjuvanlar 50 yılı aşkın süredir insanlarda kullanılmaktadır. Kolayca üretilebilmesi, güvenli olması, başarılı bir antikor yanıt oluşturması, hastalıklara karşı etkin bir koruma sağlaması ve buna ek olarak bu tip adjuvan içeren aşıların daha yüksek kararlılık göstermesi gibi sebeplerden dolayı günümüzde hala polimerik yapıdaki adjuvanlar güvenle kullanılmaktadır ve bu yapılar geliştirilmeye devam etmektedir.

Bölümümüz kurucu başkanı rahmetli Prof. Dr. Mustafaev Akdeste 'Biyopolimerler ve Aşı Mühendisliği' konusunda 70'li yıllardan bugüne kadar birçok öncü çalışmalarda bulunmuş ve pek çok soruyu aydınlatmıştır. Türkiye' de şap, hepatit, grip (influenza), kuduz ve melanoma hastalıklarına karşı sentetik aşı çalışmalarının öncüsüdür. Hocamızın başlattığı bu yolda çalışmalar Yard.Doç.Dr. Zeynep Akdeste rehberliğindeki çalışma grubumuz tarafından devam ettirilmektedir.

Bu tezde sentetik peptid aşılarının geliştirilmesi çalışması bünyesinde yurt dışında sentezletilmiş olan melanoma hastalık peptid dizesi MAGE-3 121-134

(LLKYRAREPVTKAE) ile immünostimülan etkisi bilinen polioksidonyum ve akıllı (smart) polimer P(NIPAA-AA) kopolimeri ile konjugatlar sentezlendi ve polimer ile peptid arasında fiziksel etkileşime dayalı hem ikili kompleks hem de $CuSO_4$ $5H_2O$ ile hazırlanan bakır içeren üçlü kompleksler hazırlandı. Balb/c deney fareleri ile yapılan hayvan deneyeleri sonucunda polioksidonyum ile peptid dizesini içeren sentetik aşı numunelerine karşı oluşan antikor seviyelerinin incelendiği ELİSA testlerinde görüldüğü üzere en yüksek titrede antikor yanıtları peptid-Cu-polioksidonyum üçlü kompleksinin enjekte edildiği fare grubundan elde edilmiştir. Ilk enjeksiyondan 28 gün sonra titre seviyesi ortalama 0,5 OD değerine indiğinde I. enjeksiyon ile aynı dozda II. enjeksiyon yapılmıştır ve ve serumlardaki antikor titrelerinin maksimum seviyelere ulaştığı 42 ve 49. günlerde de yüksek antikor seviyesinin devam ettiği gözlenmiştir. TÜBITAK, Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisligi ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü ile ortak yürütülen monoklonal antikor çalışmalarının devam ettirilmesi için seçilen farelerden biri bu grup içerisindendir. Kompleks ve konjugata ait olan antikor titreleri incelendiğinde ise ilk enjeksiyon sonrasında kompleks çözeltisi enjekte edilen fare gruplarında konjugatın enjekte edildiği antikor titrelerinden daha yüksek değerler elde edilmiştir. GC-LC kromatogramları da bu bağlanmda incelendiğinde polioksidonyum ile peptidin kompleksindeki kuvvetli fiziksel etkileşimlerinde, konjugat kovalent bağlarından daha etkin bir etkileşim olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Konjugasyon reaksiyonlarında peptidin kovalent bağlanacağı polioksidonyumdaki karboksilik asit grubundan ziyade polioksidonyumun yapısında bulunan kuarterner azot atomunun peptidin amino asitlerindeki yüzeysel fonksiyonel gruplar ile arasında daha yüksek verimde etkileşimin olabileceği ortaya konulmuştur.

MAGE-3 peptidinin P(NIPAA-AA) kopolimeri ile sentezlenen konjugatı ve hem hazırlanan ikili kompleksi hem de CuSO4 5H2O ile hazırlanan bakır içeren üçlü kompleksi balb/c fareleri ile hayvan deneylerinde aşı modeli olarak kullanılmıştır. Numunelere karşı oluşan antikor seviyelerinin incelendiği ELİSA testlerinin sonuçlarının izlenmesiyle gözlemlendiği üzere en yüksek titrede antikor yanıtları peptid-Cu-(NIPAA-AA) üçlü kompleksinin enjekte edildiği fare grubundan elde edilmiştir. Ilk enjeksiyondan 28 gün sonra titre seviyesi ortalama 0,5 OD değerine indiğinde I. enjeksiyon ile aynı dozda II. enjeksiyon yapılmıştır ve serumlardaki antikor titrelerinin

maksimum seviyelere ulaştığı 42. günde en yüksek antikor seviyesine ulaşmıştır ve son hafta hafif bir düşme olmasına karşın yine de 2,00 OD seviyesinin üstünde devam ettiği gözlenmiştir. Monoklonal antikor çalışmalarının devam ettirilmesi için seçilen bir diğer fare de bu grup içerisindendir. İkili kompleks ve konjugata ait olan antikor titreleri incelendiğinde ise ilk enjeksiyon sonrasında ikili kompleks enjekte edilen fare gruplarında konjugatın enjekte edildiği antikor titrelerinden daha yüksek değerler elde edilmiştir. Ancak sonuç olarak hem hazırlanan (NIPAA-AA) – peptid ikili kompleksi ve (NIPAA-AA) – Cu – Peptid üçlü kompleksi hem de EDC çapraz bağlayıcısı varlığında sentezlenen Peptid-(NIPAA-AA) konjugatı, geleneksel olarak kullanılan freund's adjuvanı ile peptidin enjekte edildiği fare serumlarından daha yüksek antikor seviyelerine yükselmesine sebep olmuştur.

Tez çalışması bünyesinde virüs içermeyen sentetik aşılar oluşturulurken pek çok farklı yöntem denenmiştir. Bunun sebepleri; polimer ve antijenin yapısına bağımlı olarak yapı değiştirmeden bağlama, daha teknolojik yöntemin seçilmesi, daha immunojenik yapının eldesi ve suda çözünür konjugatların oluşturulmasıdır.

Bu tez çalışması bünyesinde MAGE-3 (121-134)peptidi çalışmaları ile yüksek immun cevabın elde edilmesi ile melanoma kanserine karşı çeşitli koruyucuların geliştirilmesi ve tümörlerin teşhisinde kullanılabilecek spesifik antikorların, tanı kitlerinin ve biyosensörlerin elde edilmesi yolunda atılmış önemli bir adımdır.

Genel olarak bu tezde, sentetik polielektrolitlerin biyomoleküller ile bağlanmasından elde edilen biyomolekül-polimer sistemlerinin çeşitli fonksiyonel özellikleri, polimer-biyomolkül arasındaki etkileşim sonucu meydana gelen yapıların yapı işlev analizleri incelenmiş, canlı sistemlerdeki etkilerinin saptanması çalışmalarına dair kimi konjugatlarla sitotoksisite çalışmaları gerçekleştirilmiş ve melanoma kanser peptidi MAGE-3 (121-134) ile yapılan çalışmalarda etkin polimerik adjuvant ve yöntem bulunarak sentetik polimerik melanoma kanser aşısı çalışması olarak önemli bulgular elde etmemizi sağlayıp gelecekte melanoma hastalığına ait tanı teşhis kitleri ve biyosensör çalışmalarının gerçekleştirilebilmesi için monoklonal antikor eldesi çalışmalarına olanak sağlamıştır. Böylece bu tez kapsamındaki çalışmaların ülkemizin hedeflediği ileri biyoteknoloji düzeyine ulaşılmasında teorikte ve pratikte önemli katkı

sağlayacağı, ülke ekonomisi açısından mühim değer oluşturabilecek çalışmalara zemin olacağı ön görülmektedir.

KAYNAKLAR

[1] Özkan, Ö., (2007). BSA-Dekstran Sülfat Komplekslerinin Oluşumu ve Karaktrizasyonu, Yüksek Lisans, YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[2] Topuzoğulları, M., (2006). Polianyonlarin Bovin Serum Albumin İle Karişimlarinin Dört Detektörlü Moleküler Eleme Kromatografisi Yöntemiyle Analizi, Yüksek Lisans, YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[3] Sélégny, E., Mandel, M. ve Struss, P.U., (1974). Polyelectrolytes, First Edition , D. Reidel Publishing Company, Bostan-U.S.A.

[4] Mustafaev, M., Yucel, F., Çirakoglu, B. ve Bermek, E., (1996a). "Immune response to progesterone involved in Cu2+-mediated polyanion-protein complex-antigen specificity and affinity of hybridoma clones", Immunology Letters, 52 : 63-68.

[5] Kokufuta, E., Shimizu, H. ve Nakamura, I., (1981). "Macromolecules", 14: 1178.

[6]Wong, S.S., (1993). Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking, First Edition , CRC Press Inc., London.

[7]Kosarev, E. L. ve Muranov, K.O., (2003). "Chromatography + RECOVERY = superresolution chromatography", Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, 502: 764–767.

[8] İşcanı, B,. (2006). Hepatit B Yüzey Antijeni 95-109 Peptid Dizisinin Sentezi Ve Polielektrolitler İle Suda Çözünebilen Biyokonjugatlarının Geliştirilmesi, Yüksek Lisans, YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[9] Higgs, P.G. ve Joanny, J.F., (1991). "Theory of Polyampholyte Solutions", J. Chem. Phys., 94: 1543.

[10] Deliloglu, G., Akdeste, M.M., Akdeste, Z.M., Aynagöz, G., Unver, G., Unal, N. ve Çelik, N., (2002). Preparation of synthetic peptide FMDV vaccine with newly developed antigen-polymere conjugates be used as immunogen and vaccine in veterinary medicine, In:Report of the Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, 30 Apriland 1 May 2002 , Canada, 349-357

[11] Mustafaev, M. ve Mustafaeva, Z., (2002). "Novel polypeptide-comprising biopolimer systems", Technology and Health Care, 10: 217-226.

[12] Acar, S., (2006). Peptid-Protein Kovalent Konjugasyonu, Yüksek Lisans, YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[13] Mustafaev, M. ve Mustafaeva, Z., (2002). “Novel polypeptide-comprising biopolimer systems” Technology and Health Care, 10:217-226.

[14] Hoffman, A.S., (2000). “Bioconjugates of Intelligent Polymers and Recognition Proteins for Use in Diagnostics and Affinity Separations”, Clinical Chemistry, 46:9, 1478–1486.

[15] Mustafaev, M., (2004). “Functionally Biopolymer Systems” Sigma, Journal of Engineering and Natural Sciences, 4 : 1.

[16] Bülbüle, E., (2008). Sap Hastalığı Virüsünün Kapsis Proteininin Antijenik Özellikli 40-60 Amino Asid Dizili, Peptidinin Polanyonlarla Konjugasyonu, Yüksek Lisans, YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[17] Liu, F.T., Zinnecker, M., Hamaoka, T. ve Katz, D.H., (1979). “New procedures for preparation and isolation of conjugates of proteins and a synthetic copolymer of Damino acids and immunochemical characterization of such conjugates”, Biochemistry, 20 (4) :690–693.

[18] Mustafaev, M.I., Osada, Y. ve Endo, T., (1998). Advanced Biopolymer Systems, First Japanese-Turkish Workshop Materials, TUBİTAK- Marmara Arastırma Merkezi, 1998, Gebze, 1-76.

[19] Jacqueline, M., Xiuhua, L., Charles, W., Todd, M.J. ve Newman, B., (2002). “ Influenza Viral and Rickettsial Diseases, National Center for Infectious Diseases”, Centers for Disease Control and Prevention, 51 : 1-31.

[20] Deen, C., Claasen, E., Gerritse, K., Zegers, D.N. ve Boersma, J.A.W., (1990), “A novel carbodiimide coupling method for synthetic peptides enhanced anti-peptide antibodyresponses”, J. Immunol. Methods., 25: 119-129.

[21] Acar, S., (2006), Peptid Protein Kovalent Konjugasyonu,

[22] Friedli, G.L., (1996), Interaction of Deamidated Soluble Wheat Protein (SWP), With Other Food Proteins And Metals, Doktora Tezi, The University of Surrey, England. Yüksek Lisans, YTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[23] Muckerheide, A., (1987). “Cationization of protein antigens. I. Alteration of immunogenic properties”, J. Immunol., 138: 833-837.

[24] Muckerheide, A., (1987). “Cationization of protein antigens. II. Alteration of egulatory properties”, J. Immunol., 138: 2800-2804.

[25] Domen, P.L., (1987). “Cationization of protein antigens. III. Abrogation of oral tolerance”, J. Immunol., 139: 3195-3198.

[26] Apple, R.J., (1988). “Cationization of protein antigens. IV. Increased antigen uptake by antigen-presenting cells” J. Immunol., 140: 3290-3295.

[27] Masaki, T., Matsuura, T., Ohkawa, K., Miyamura, T., Okazaki, I., Watanabe, T. ve Suzuki, T., (2006). "All-Trans Retinoic Acid Down-Regulates Human Albumin Gene Expression Through The İnduction Of C/EBPβ-LIP ", Biochem. J., 397 (2): 345–53.

[28] Harlow, E. ve Lane, D., (1988). Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 5, NY.

[29] Hermanson, G.T., (2008). Bioconjugate Techniques. 2nd edition, Academic Press, 19, New York.

[30] Kunio, S., Haneda, K. ve Shirato K., (1999). "Ovalbumin (OVA) and Mycobacterium tuberculosis Bacilli Cooperatively Polarize Anti-OVA T-helper (Th) Cells toward a Th1-Dominant Phenotype and Ameliorate Murine Tracheal Eosinophilia", Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 20 (6): 1260–1267.

[31] Huntington, J.A. ve Stein, P.E., (2001). "Structure and properties of ovalbumin", Journal of Chromatography, 756(1-2): 189-198.

[32] Thies, C., (1994). Macromolecular Complexes in Chemistry and Biology, first edition ,Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

[33] Kabanov, V.A., (2004). "From Synthetic Polyelectrolytes To Polymer-Subunit Vaccines", Pure Appl. Chem., 76(9): 1659-1677.

[34] Cooper, C.L., Dubin, P.L., Kayitmazer, A.B. ve Turksen, S., (2005). "Polyelectrolyte-Protein Complexes", current opinion in colloid and ınterface science, 10: 52-78.

[35] Çimen, S.N., (2006). Proteinlerin Poliakrilik Asit İle Suda Çözünmeyen Kompleksleri, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[36] Petrov, R.V., Mustafaev, M.I. ve Norimov, A.S.H., (1992). Physico-Chemical Criteria for the Construction of Artificial Immunomodulators and Immunogens on the Basis of Polyelectrolyte Complexes, First Edition, Harwood Acad Publ.,UK.

[37] Karahan,M.,(2009). Metal İçeren Fonksiyonel Biyopolimer Sistemlerin Geliştirilmesi, Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[38] Özeroğlu, C., (1994). Poliakrilamid – Bakır – Protein Üçlü komplekslerinin Oluşumu ve Fizikokimyasal Özellikleri, Doktora Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[39] Hermanson, T., (1996). Bioconjugate Techniques, First Edition, Elsevier Press, California.

[40] Aslam, M., Dent, A., (1998). Bioconjugation: Protein Coupling Techniques for the

Biomedical Sciences, First Edition, Macmillan Reference LTD, London.

[41] Kızılbey, K., (2012). Melanoma Ny-Eso-1 Antijenlerinin 157-167, 155-163 Peptid Dizilerinin Sentezi Ve Polielektrolitler ile Biyokonjugatlarinin Geliştirilmesi, Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul

[42] Mustafaev, M., Mustafaev, Z., Ergen, E., Uraki, Y. ve Sano, Y., (2002). "Novel Betulin Containing Polyelectrolyte Conjugates", Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 17: 251-270.

[43] Malgorzata, D.Z., Kulbacka, J., Saczko, J., Wysocka, T., Zabel, M., Surowiak, P. ve Drag,M., (2009). "Esters Of Betulin And Betulinic Acid With Amino Asid Have İmproved Water Solubility And Are Selectively Cytotoxic Toward Cancer Cells ", Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 19: 4814-4817.

[44] Green, B., Bentley, M.D., Chung, B. Y., Lynch, N. G. ve Jensen, B.L., (2007). "Isolation of Betulin and Rearrangement to Allobetulin A Biomimetic Natural Product Synthesis", Journal of Chemical Education, 84(12): 1985-1987

[45] Hu, Y.M., Benedict, M.A. ve Ding, L.Y., (1999). "Role Of Cytochrome c and dATP/ATP Hydrolysis İn Apaf-I-Mediatcd Caspase-9 Activation And Apoptosis", EMBO Journal, 18: 3586-3595.

[46] Desombre, K.A., McKenzie, S.J., Bast, B.S., Hollis, D.R., Whitaker, R.S., Berchuck , A., Boyer, C.M. ve Bast Jr, R.C., (1993). "Serum Levels of HER-2 neu (C-erbB-2) Correlate With Overexpression of P185neu in Human Ovarian Cancer", Applied bioTechnology, 71(12): 3942–3946.

[47] Li, Y., He, K., Huang, Y., Zheng, D., Gao, C., Cui, L., Jin, YH. ve Carcinog, M., (2010). "Betulin İnduces Mitochondrial Cytochrome C Release Associated Apoptosis İn Human Cancer Cells", Molcular Carcinogenesis, 49(7): 630-640.

[48] Mustafaev, M., Osada, Y., Matsukata, M., Basalp, A., Çirakoglu, B., Bermek, E., (1996). "New Amphiphilic İmmunogens By Poly(N-İsopropylacrylamide)-Modified Bovine Serum Albumin", Polymer Gels and Networks, 4(4): 363-372.

[49] Nguyen, T.Q., (1986). "Interactions Of Human Hemoglobin With High-Molecular-Weight Dextran Sulfate And Diethylaminoethyl Dextran", Makromol. Chem., 187(11): 2567-2578.

[50] Siegbahn, R.H., Eisenstein, P.E.M., Rheingold, A.L. ve Koetzle, T.F., (1996). ''A New Intermolecular Interaction: Unconventional Hydrogen Bonds with Element-Hydride Bonds as Proton Acceptor Crabtree'', Acc. Chem. Res., 29(7):348-354.

[51] Mustafaev M.I., Romanova R.Y., Norimov A.Sh. ve Filatova E.D., (1990). "On The Role Of Chemical Nature Of The Polymeric Carrier İn The İmmunogenic And Protective Activities Of Polyelectrolyte Complexes Of BGG Mycobacteria Cell Envelope Antigens İn A Model Of Tuberculosis İnfection", Immunologiya (Immunology), 6: 35-40.

[52] Franks, F., (2002). "Protein Stability: The Value of Old Literature", Biophysical Chemistry, 96: 117-127.

[53] Wilbur, D.S., (1992). " Radiohalogenation Of Proteins: An Overview Of Radionuclides, Labeling Methods, And Reagents For Conjugate Labeling", Bioconjugate Chem., 3: 433-470.

[54] Munro, C. ve Stabenfeld, G., (1984). "Devolopment Of A Microtitre Plate Enzyme İmmun Assay For The Determination of Progesterone", Journal of Endocrinology, 101: 41-49.

[55] Mallet, C.P., Hale, T.L., Kaminski, R.W., Larsen, T., Orr, N., Cohen, D. ve Lowell, G.H., (1995). "Intranasal Or İntragastric İmmunization With Proteosome-Shigella Lipopolysaccharide Vaccines Protects Againts Lethal Pneumonia İn A Murine Model Of Shigella İnfection", Infection Immunity, 63: 2382-2386.

[56] Wikipedia, Progesteron, http://tr.wikipedia.org/wiki/Progesteron, 23 Mart 2012.

[57] Yücel, F., (1997). Antijenliği Artirmaya Yönelik Yeni Yaklaşimlar , Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi, Sağlik Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[58] Mikrobiyoloji, http://www.mikrobiyoloji.org, 10 Mart 2012.

[59] Mikrobiyoloji,Viral Aşılar,http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFF A79D6F5E6C1B43FF4B5119729FFAA2F9, 3 Nisan 2012.

[60] Topal Sarıkay, A.,Kanser Genetiği, http://www.istanbul.edu.tr/fen/notlar/1260108918.pdf, 10 Nisan 2012.

[61] Akçakaya, P., Azeroglu, B., Even, I., Ates, Ö., Turker, H., Ongen, G. ve Topal-Sarikaya, A., (2012). "The Functional SLC11A1 Gene Polymorphisms are Associated with Sarcoidosis in Turkish Population", Biomedical and Life Sciences , 39(4): 5009-5016.

[62] Wang, X., Gao, X. ve Xu, Y., (2011). " MAGED1: Molecular Insights and Clinical Implications", Annals of Medicine, 43(5):347-55

[63] Anaspec, MAGE-3(121-134), http://www.anaspec.com/products/product.asp?id=45392 , 15 Mart 2012

[64] Horn TD, Ed., Mascaro, JM., Mancini, AJ., Salasche, SJ., Saurat, J-H. ve Stingl, G,(2003). Dermatology, First edition, Mosby, Edinburgh.

[65] Vijayalakshmi, M. A., (2002). Biochromatography Theory and Practice, Taylor and Francis, London.

[66] Lough, W.J. ve Wainer, W., (1992). High Performance Liquid Chromatography-Fundamental Principles and Practice, Blackie Academic & Professional, New York.

[67] Mansuroğlu, B., (2007). Biyohibrid Yapılı ve Biyotaklitçi Polimer-Peptid Konjugatlarının Geliştirilmesi, Doktora Tezi, YTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[68] Wikipedia, ELISA, http://tr.wikipedia.org/wiki/ELISA, 23 Mart 2012.

[69] Coligan, JE., Kruisbeek, AM., Margulies, DH., Shevach, EM. ve Strober, W., (1994). Antibody Detection and Preparation Current Protocols in Immunology, First Edition, John Wiley & Sons, New York.

[70] Weyermann, J., Lochmann, D., ve Zimmer, A., (2005). "A Practical Note On The Use Of Cytotoxicity Assays", Đnternational Journal of Pharmaceutics, 288:369-376.

[71] Barutca, B., ZEYTİNOĞLU, M. ve KOPARAL, A. T., (2006). "Bazı Bitki Ekstrelerinin Memeli Hücre Kültürlerinde Sitotoksik Etkilerininin Vitro Araştırılması", Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, 2 Ağustos 2006, İstanbul.

[72] Putnam, K.P., Bombick, D.W. ve Doolittle, D.J., (2002). "Evaluation Of Eight İn Vitro Assays For Assessing The Cytotoxicity Of Cigarrette Smoke Condansate", Toxicology In Vitro, 16:599-607.

[73] Saw vd., 2005 Saw, T.Y., Cao, T., Yap, A.U. J. ve Lee, M. M., (2005). "Tooth Slice Organ Culture And Established Cell Line Culture Models For Cytotoxicity Assessment Of Dental Materials", Toxicology in Vitro 19:145–154.

[74] Gad, S.C., (2000). In Vitro Toxicology, Second Edition, Taylor & Francis, New York.

[75] Komissarova, E., Saha, S.K. ve Rossman, T.G., (2005). "Dead Or Dying: The İmportance Of Time İn Cytotoxicity Assays Using Arsenite As An Example", Toxicology and Applied Pharmacology, 202:99–107.

[76] Fent 2001 Fotakis, G. ve Timbrell, J.A.,(2006). “In Vitro Cytotoxicity Assays: Comparison Of LDH, Neutral Red, MTT And Protein Assay İn Hepatoma Cell Lines Following Exposure To Cadmium Chloride”, Toxicology Letters, 160:171-177.

[77] Fent, K., (2001). “Fish Cell Lines As Versatile Tools İn Ecotoxicology: Assessment Of Cytotoxicity, Cytochrome P4501A İnduction Potential And Estrogenic Activity Of Chemicals And Environmental Samples” Toxicology in Vitro, 15: 477-488.

[78] Promega, CellTiter 96, https://www.promega.com/tbs/tb245/tb245.pdf, 25 Nisan 2012.

[79] Roche, https://www.roche-applied-science.com/servlet/RCOrderFlow?storeId=10151&langId=-1&catalogId=10151&countryId=tr], 26 Mart 2012.

[80] Jens, W., Volodymyr, B. ve Karl-Friedrich, A., (2007). “Infl Uence Of Grafting On The Solution Properties And The Dissociation Behavior Of İonic/Nonionic Grafted Copolymers”, Macromolecular Chemistry and Physics 208:643 – 650.

[81] Science and Fun, http://www.science-and-fun.de/tools/, 22 Nisan 2012.

[82] Michigan State University, Infrared Spectroscopy, http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/Spectrpy/InfraRed/infrared.htm, 15 Nisan 2012.

[83] Karahan, M., Tuğlu, S. ve Mustafaeva, Z., (2012). “Synthesis Of Microwave-Assisted Poly(Methyl Vinyl Ether-Co-Maleic Anhydride)- Bovine Serum Albümin Bioconjugates” Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology, DOI10.3109/ 10731199.2012.678942.

[84] NIST (National Institute of Standart and Tecnology), IR Spectrum, http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C616477&Mask=80#IR-Spec, 20 Nisan 2012.

[85] Başalp A, Mustafaeva Z, Mustafaev M ve Bermek E., 2000. “Immune Response To 17 Beta-Estradiol İnvolved İn Polymer Gels: Antigen Specificity And Affinity Of Hybridoma Clones”, Hybridoma 19(6):495-499.

[86] Solomons, G. T. W., (1996), Organic Chemistry, Fifth Edition, Wiley, USA.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Sevecen TUĞLU

Doğum Tarihi ve Yeri : 07.10.1984 – İstanbul

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta :tuglusevecen@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	**Alan**	**Okul/Üniversite**	**Mezuniyet Yılı**
Y. Lisans	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2012
Lisans	Kimya	Yıldız Teknik Üniversitesi	2008
Lise	Fen	Tekirdağ Fen Lisesi	2002

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	**Firma/Kurum**	**Görevi**
2009	Biomed İlaç San.	İş Geliştirme Sorumlusu
2008	Ege Kimya Holding	İhracat Sorumlusu

YAYINLARI

Makale

1. Mesut Karahan, Sevecen Tuğlu, Zeynep Mustafaeva, "Polielektrolitler ve biyolojik özellikleri" Yıldız Teknik Üniversitesi Sigma Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi- YTUJENS-2012-178 (Basımda)

2. Mesut Karahan, Sevecen Tuğlu , Zeynep Mustafaeva, "Synthesis of microwave-assisted poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride)- bovine serum albümin bioconjugates" Article No:678942, Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology, DOI10.3109/ 10731199.2012.678942(Basımda)

Bildiri

1. Sevecen Tuğlu, Mesut Karahan, Zeynep Mustafaeva, " Sentetik Polimerik Aşı Model Sistemlerinin Geliştirilmesinde Yeni Yaklaşımlar ", XXV. Ulusal Kimya Kongresi, Medisinal Kimya, 27 Haziran- 02 Temmuz, 2011 Erzurum, Türkiye.

2. Yasemin Budama Kılınç, Mesut Karahan, Sevecen Tuğlu, Zeynep Mustafaeva Akdetse, " Papain Enziminin İkili ve Üçlü Komplekslerinin Spektroskopik İncelenmesi" XII. Ulusal Spektroskopi Kongresi, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 18-22 Mayıs 2011, Side-Antalya.

3. Sevecen Tuğlu, Mesut Karahan, Zeynep Mustafaeva, "Synthesis and Structure Analysis of Water-Soluble Polyelectrolyte –Protein Complexes and Conjugates"; Proceeding of the "International Conference on Materials and Technologies for Green Chemistry" jointly with Workshop of COST Action CM0903 (UBIOCHEM – II), Tallin University of Technology , 5-9 September 2011 , Talin, Estonia .

Proje

1. "Metal İçeren Fonksiyonel Biyopolimer Sistemlerin Geliştirilmesi" ; Proje Yürütücüsü: Dr. Mesut Karahan, Danışman: Yard.Doç.Dr. Zeynep Mustafaeva

Akdetse, Araştırmacı : Sevecen Tuğlu, Yasemin Budama Kılınç, Zafer Özdemir.Destekleyen Kuruluş: Yıldız Teknik Üniversitesi Araştırma Fonu, 2011-2013.(2011-01-02-GEP06)

2. "Polielektrolitlerin Proteinlerle Çapraz Bağlayıcı Ajanlar Varlığında Konjugatlarının Oluşturulması" ; Proje Yürütücüsü: Dr. Mesut Karahan, Danışman: Yard.Doç.Dr. Zeynep Mustafaeva Akdetse, Araştırmacı : Sevecen Tuğlu, . Destekleyen Kuruluş: Yıldız Teknik Üniversitesi Araştırma Fonu , 2012-2014.

ÖDÜLLERİ

1. Başarı Belgesi " Uygulamalı Kalite Yönetim Sistemi İçtetkik Eğitimi" , 17-18 Mayıs 2008, Evrimera - Erenköy / İstanbul