

**T.C.  
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOMEDİKAL UYGULAMALARDA KULLANILAN FONKSİYONEL  
POLİMERLERİN SİTOTOKSİSİTELERİNİN İNCELENMESİ**

**NAZLI IRMAK GİRİTLİOĞLU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI  
BİYOMÜHENDİSLİK PROGRAMI**

**DANIŞMAN  
DOÇ. DR. MUHAMMET ÜBEYDULLAH KAHVECİ**

**EŞ DANIŞMAN  
PROF. DR. ALİ KARAGÖZ**

**İSTANBUL, 2017**

T.C.  
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİYOMEDİKAL UYGULAMALARDA KULLANILAN FONKSİYONEL  
POLİMERLERİN SİTOTOKSİSİTELERİNİN İNCELENMESİ**

Nazlı Irmak GİRİTLİOĞLU tarafından hazırlanan tez çalışması 07.07.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Tez Danışmanı**

Doç. Dr. Muhammet Übeydullah KAHVECİ  
Yıldız Teknik Üniversitesi

**Eş Danışman**

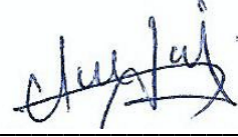
Prof. Dr. Ali KARAGÖZ  
İstanbul Üniversitesi

**Jüri Üyeleri**

Doç. Dr. Muhammet Übeydullah KAHVECİ  
Yıldız Teknik Üniversitesi



Doç. Dr. Aydan DAĞ  
Bezmialem Üniversitesi



Yrd. Doç. Dr. Rabia ÇAKIR KOÇ  
Yıldız Teknik Üniversitesi





Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün 2016-07-04-YL07 numaralı projesiyle (YÜLAP) desteklenmiştir.

## ÖNSÖZ

---

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren ve bu tez çalışmasının gerçekleşmesini sağlayan danışmanım Sayın DOÇ. DR. MUHAMMET Ü. KAHVECİ'ye,

Tezimin deneysel kısmında İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Hayvan Doku Kültürü ve Proteomik laboratuvarlarını kullanmamı sağlayıp bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren eş danışmanım Sayın PROF. DR. ALİ KARAGÖZ'e,

Yüksek lisans eğitimime devam etmemde büyük emeği olan değerli hocam PROF. DR. İBRAHİM İŞILDAK'a ve öğrencilerine karşı her zaman anlayışlı olup bilgileriyle yol gösteren değerli hocam PROF. DR. SEVİL YÜCEL'e,

Tez çalışmalarım sırasında bana her konuda yardımcı olan sevgili arkadaşlarım ve meslektaşlarım GÖZDE DEVECİ, MUSTAFA YASİN ATEŞ ve AHMET ÇETİNKAYA'ya,

Hayatım boyunca maddi-manevi desteğiyle yanımda bulunan annem NURAN TUFAN ve hayatımın önemli parçaları; manevi babam HASAN TUFAN, dayım AHMET HAMARAT, teyzem NURAY HAMARAT AVCI ve eşi MUSTAFA AVCI, kuzenlerim MİRAY HAMARAT ve MİTHAT HAMARAT'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu tez çalışmasını babam CEMAL GİRİTLİOĞLU ve üstün başarılarıyla ışık olup mesleğimi seçmemde büyük önemi olan meslektaşım, dedem MİKTAT HAMARAT'a ithaf ediyorum.

Temmuz, 2017

Nazlı Irmak GİRİTLİOĞLU

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ .....	viii
KISALTMA LİSTESİ .....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ .....	xiii
ÖZET.....	xi
ABSTRACT .....	xvi
<b>BÖLÜM 1</b>	
1.1 Literatür Özeti .....	1
1.2 Tezin Amacı .....	2
1.3 Hipotez .....	3
<b>BÖLÜM 2</b>	
2.1 İlaç Salım Sistemleri .....	4
2.1.1 Kontrollü Salım Sistemleri (KSS) .....	4
2.1.2 Lokalize Terapi İçin İlaç Salım Sistemleri .....	6
2.1.3 Polimerik İlaç Salım Sistemleri.....	7
2.2 Etken Madde Taşınımında PEG .....	9
2.2.1 PEGilasyon Kimyası .....	10
2.2.1.1 İlk Jenerasyon PEG Kimyası .....	12
2.2.1.2 İkinci Jenerasyon PEG kimyası.....	12
2.3 Hedefleme ve Görüntüleme .....	12
2.4 Hücre Kültürü .....	16
2.4.1 Dokudan Hücre Kültürü Eldesi.....	17
2.4.2 Hücrelerde Yaşam Ömrü .....	18
2.4.2.1 Büyüme Döngüsü .....	18
2.4.3 Hücre Kültüründe Kullanılan Temel Besiyeri Bileşenleri .....	20
2.4.3.1 İnorganik Tuzlar .....	21
2.4.3.2 Tampon Sistemleri .....	21

2.4.3.3	Karbohidratlar .....	21
2.4.3.4	Aminoasitler .....	22
2.4.3.5	Vitaminler .....	23
2.4.3.6	Proteinler ve Peptitler .....	23
2.4.3.7	Yağ asitleri ve Lipitler .....	24
2.4.3.8	İz Elementler .....	24
2.4.3.9	Serum .....	24
2.4.3.10	Antibiyotikler ve Antimikotikler .....	26
2.4.4	Hücre Canlılık Testleri .....	27
2.5	Biyolojik Kontaminasyon .....	29
2.6	Biyogüvenlik ve Biyogüvenlik Kabinleri .....	30

### BÖLÜM 3

3.1	Deneylerde Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler .....	33
3.1.1	Kullanılan Cihazlar .....	33
3.1.2	Kullanılan Kimyasallar ve Besiyerileri .....	34
3.2	Fonksiyonel Polimerler .....	34
3.3	Deneylerde Kullanılan Çözeltiler .....	36
3.3.1	1x Phosphate Buffered Saline (PBS) Tamponunun Hazırlanması .....	36
3.3.2	Tripsin-EDTA Solüsyonunun Hazırlanması .....	36
3.3.3	Hücre Kültürü Besiyerinin Hazırlanması .....	36
3.3.4	Hücre Dondurma Solüsyonunun Hazırlanması .....	37
3.3.5	MTT Solüsyonunun Hazırlanması .....	37
3.3.6	Polimer Çözeltilerinin Hazırlanması .....	37
3.4	Hücre Kültürü Çalışmaları .....	37
3.4.1	Hücrelerin Kriyobanktan Çıkarılması .....	37
3.4.2	Hücrelerin Çoğaltılması .....	38
3.4.3	Hücre Besiyerilerinin Değiştirilmesi .....	38
3.4.4	Hücrelerin Pasajlanması .....	38
3.4.5	Hücrelerin Sayılması .....	39
3.4.6	Hücrelerin Dondurulması .....	39
3.4.7	MTT Testiyle Polimerlerin Sitotoksite Analizlerinin Yapılması .....	39
3.5	İstatistiksel Analiz .....	41
3.5.1	UV-Vis Spektroskopisi Sonuçlarının GraphPad Prism Programında Analizi İçin Microsoft Excel'de Düzenlenmesi .....	41
3.5.2	Tek-Yönlü ANOVA ile Tekrarlı Sonuçların İstatistiksel Analizinin Yapılması .....	43
3.5.3	% Canlılık Değerlerine Göre GraphPad'te Standart Sapmanın (SD) Hesaplanması .....	47
3.6	GraphPad'te Grafik Oluşturma .....	50

### BÖLÜM 4

4.1	Polimerlerin Hücre Canlılığına Etkilerinin MTT Testi ile Gösterilmesi .....	52
4.2	İstatistiksel Sonuçlar .....	54
4.2.1	% Canlılık Değerlerine Göre İstatistiksel Sapmalar .....	54
4.2.2	Polimerlerin HeLa ve Vero'daki IC50 Konsantrasyonları .....	56

## BÖLÜM 5

DEĞERLENDİRME VE TARTIŞMA .....	57
KAYNAKLAR.....	59
ÖZGEÇMİŞ.....	59



## SİMGE LİSTESİ

---

$\mu\text{g}$	Mikrogram
$\mu\text{l}$	Mikrolitre
mg	Miligram
ml	Mililitre
nm	Nanometre
rpm	Dakikadaki devir sayısı
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece

## KISALTMA LİSTESİ

---

ATP	Adenozin trifosfat
BVDV	Siğır viral diyare virüsü
BBEMA	2(2-Bromobutyryloxy)ethyl methacrylate
BSL-1	Biyogüvenlik Seviye-1 Laboratuvar
BSL-2	Biyogüvenlik Seviye-2 Laboratuvar
BSL-3	Biyogüvenlik Seviye-3 Laboratuvar
BSL-4	Biyogüvenlik Seviye-4 Laboratuvar
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
EVA	Poli(etilen-ko-vinil asetat)
FBS	Fetal Siğır Serum
HeLa	İnsan Serviks Kanseri Hücre Hattı
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IC50	Medyan İnhibisyon Konsantrasyonu
KSS	Kontrollü Salım Sistemleri
Log	Logaritmik
MEM	Minimum Esansiyel Medyum
M	Mitoz
mPEG	Monometoksi PEG
MRI	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethonphenol)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-3,5-difenil tetrazolyum bromid
N-MAS	N-(methacryloxy) succinimide
NHS	N-hidroksisüksinimid
OD540	540 nm dalga boyunda okunan absorbans
PEG	Poli(etilen glikol)
Pyr-NH <sub>2</sub>	N-(2-aminoethyl)-4-(pyren-1-yl) butanamide
Rb	Retinoblastoma
SD	İstatistiksel Sapma
UV-Vis	Morötesi-Görünür Bölge
Vero	Afrika Yeşil Maymun Böbrek Hücre Hattı

WST-1 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolyum  
XTT 2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenil-5-[(phenylamino)karbonil]-2H-tetrazolium hidroksid



## ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2. 1	Kontrollü salım sistemleri ..... 5
Şekil 2. 2	Kontrollü sakım mekanizmaları..... 6
Şekil 2. 3	Ringsdorf modeli polimer-ilaç konjugatı..... 8
Şekil 2. 4	PEG'in kimyasal yapısı ..... 9
Şekil 2. 5	PEG-Protein konjugatının avantajları..... 11
Şekil 2. 6	İlk jenerasyon amin reaktif PEG türevleri ..... 13
Şekil 2. 7	MRI ve demir oksit nanopartiküller ile lenf düğümü metastazının noninvazif olarak saptanması ..... 14
Şekil 2. 8	Hücrelerde büyüme eğrisi..... 19
Şekil 2. 9	Hücre döngüsünün evreleri ..... 20
Şekil 2. 10	L-glutaminin, pH ve sıcaklığa bağlı olarak amonyaka ve pirolidon karboksilik asite dönüşmesi ..... 22
Şekil 2. 11	GlutaMAX ve L-glutamin eklenmiş besiyeride amonyak seviyeleri ..... 23
Şekil 2. 12	MTT ve renkli formazan ürününün yapısı ..... 28
Şekil 2. 13	U937 hücrelerinin MTT ile 3 saatlik inkübasyonundan sonra oluşan formazan kritalleri..... 28
Şekil 2. 14	Biyogüvenlik kabinlerinin sınıflandırılması..... 32
Şekil 3. 1	ATRP'nin mekanizması ..... 35
Şekil 3. 2	Elde edilen polimerlerin genel yapısı ..... 35
Şekil 3. 3	Hücrelerin 96 kuyucuklu plaklara ekilmesi ..... 40
Şekil 3. 4	Hücrelerin 96 kuyucuklu plaklara ekilmesi ..... 40
Şekil 3. 5	OD540 değerlerinin Microsoft Excel'de görüntülenmesi ..... 41
Şekil 3. 6	Elde edilen polimerlerin genel yapısı ..... 42
Şekil 3. 7	OD540 değerinden % canlılığın hesaplanması ..... 42
Şekil 3. 8	% Canlılık değerleri..... 43
Şekil 3. 9	GraphPad Prism programı..... 43
Şekil 3. 10	GraphPad Prism'da % canlılık değerlerinin girilmesi ..... 44
Şekil 3. 11	GraphPad Prism'da verilerin analizi ..... 45
Şekil 3. 12	Tek-Yönlü ANOVA ile istatistiksel analizin yapılması ..... 45
Şekil 3. 13	Tek-Yönlü ANOVA'da çoklu karşılaştırma yapılması ..... 46
Şekil 3. 14	Tek-Yönlü ANOVA'da uygun istatistiksel testin seçilmesi..... 47
Şekil 3. 15	Tek-Yönlü ANOVA ile Tukey Testi sonuçlarının görüntülenmesi ..... 47
Şekil 3. 16	Graphpad'de SD'nin hesaplanması ..... 48

Şekil 3. 17	Graphpad'te % canlılık değerlerinin ortalamasıyla SD'nin hesaplanması ...	49
Şekil 3. 18	Graphpad'te SD'nin görüntülenmesi .....	49
Şekil 3. 19	GraphPad'te grafik hazırlama .....	50
Şekil 3. 20	Graphpad'te konsantrasyon ve % canlılık değerlerinin girilmesi.....	51
Şekil 3. 21	GraphPad'te girilen verilerle istenilen grafik türünün seçilmesi .....	51
Şekil 4. 1	Teorik olarak %7 süksinimid içeren polimerin (MA046) HeLa ve Vero'daki sitotoksik etkilerinin karşılaştırılması.....	52
Şekil 4. 2	Teorik olarak %17 süksinimid içeren polimerin (MA048) HeLa ve Vero'daki sitotoksik etkilerinin karşılaştırılması.....	53
Şekil 4. 3	Süksinimid içermeyen lineer polimerin (MA066) HeLa ve Vero'daki sitotoksik etkilerinin karşılaştırılması.....	53



## ÇİZELGE LİSTESİ

---

	Sayfa
Çizelge 2. 1 Yaygın olarak kullanılan görüntüleme ajanları .....	15
Çizelge 2. 2 Bazı Serum Bileşenleri.....	25
Çizelge 2. 3 Bazı mikroorganizmalar için biyolojik ajan sınıflandırması.....	31
Çizelge 3. 1 Deneylerde Kullanılan Kimyasallar ve Besiyerileri.....	34
Çizelge 3. 2 Sentezlenen Fonksiyonel Polimerlerin Genel Yapıları .....	36
Çizelge 3. 3 GraphPad’te elde edilen SD verilerinin düzenlenmesi .....	50
Çizelge 4. 1 HeLa için sitotoksosite analizi sonuçlarına göre hesaplanan P ve R <sup>2</sup> değerleri ve istatistiksel açıdan anlamlılıklarının değerlendirilmesi .....	54
Çizelge 4. 2 Vero için sitotoksosite analizi sonuçlarına göre hesaplanan P ve R <sup>2</sup> değerleri ve istatistiksel açıdan anlamlılıklarının değerlendirilmesi.....	54
Çizelge 4. 3 HeLa için sitotoksosite analizi sonuçlarına göre hesaplanan % canlılık değerlerinin istatistiksel sapma aralıkları .....	55
Çizelge 4. 4 Vero için sitotoksosite analizi sonuçlarına göre hesaplanan % canlılık değerlerinin istatistiksel sapma aralıkları .....	55
Çizelge 4. 5 Polimerlerin HeLa ve Vero hücrelerindeki IC50 konsantrasyonları.....	56

**BİYOMEDİKAL UYGULAMALARDA KULLANILAN FONKSİYONEL  
POLİMERLERİN SİTOTOKSİSİTELERİNİN İNCELENMESİ**

Nazlı Irmak GİRİTLİOĞLU

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Muhammet Ü. KAHVECİ

Eş Danışman: Prof. Dr. Ali KARAGÖZ

Günümüzde, poli(etilen glikol) (PEG) bazlı fonksiyonel polimerler tıbbın farklı alanlarında önemli rollere sahiptir. İlaç taşınımında başarılı bir yaklaşım olan PEGilasyonda, PEG-ilaç konjugatlarının birçok avantajı bulunmaktadır. Konjugatın vücutta uzun süre kalabilmesi, metabolik enzimlerle bozunurluğunun az olması ve protein immünojenitesini azaltması veya elimine etmesi bu avantajlardandır.

Bu tez çalışmasının amacı, araştırma grubumuz tarafından %7 (MA046), % 17 (MA048) oranlarında *N*-(metakrilamido)süksinimid (NMAS) ve poli(etilen glikol) metakrilat (PEGMA) ko-monomerlerini içeren ve Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu (ATRP) ile sentezlenen suda çözünebilir süksinimidil ester fonksiyonlu aşırı dallanmış polimerlerin HeLa (İnsan servikal kanser hücre hattı) ve Vero (Afrika yeşil maymun böbrek hücre hattı)'daki sitotoksik etkilerinin incelenmesidir. Ayrıca karşılaştırılma yapılması amacı ile herhangi bir fonksiyonel grup içermeyen lineer yapılı poliPEGMA'nın da (MA066) sitotoksisiteleri incelenmiştir. Polimerlerin %10 fetal sığır serumu (FBS) içeren minimum esansiyel medyum (MEM) ile 0,1, 1, 25, 100 ve 500 µg/ml'lik konsantrasyonları hazırlanmıştır. Bu konsantrasyonlardaki polimer örnekleri HeLa ve Vero ile 72 saat inkübe edilmiş ve bu süre sonunda sitotoksosite analizi için 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-3,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) testi uygulanmıştır. Her bir örnek için testler üç kez tekrar edilmiştir. Hücre canlılıkları morötesi-görünür bölge (UV-Vis) spektroskopisinde 540 nanometre (nm)'deki absorpsiyon değerlerinin ölçümü

ile incelenmiş ve sonuçlar % canlılığa çevirilerek GraphPad Prism programında tek yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Sonuçların güven aralığı  $p < 0,05$  anlamlı kabul edilmiştir. Her bir polimere ait medyan inhibisyon konsantrasyonu (IC50) *Very Simple IC<sub>50</sub> Tool Kit* ile hesaplanmıştır. Tüm fonksiyonel polimerlerde HeLa ve Vero'da % canlılığın kontrol konsantrasyondan (0 µg/ml), 500 µg/ml konsantrasyona çıktıkça düştüğü görülmüştür. IC50 dozları HeLa'da MA046 için 420,6 µg/ml, MA048 için 356,3 µg/ml, MA066 için 529,5 µg/ml; Vero'da MA046 için 482,0 µg/ml, MA048 için 401,5 µg/ml, MA066 için 557,4 µg/ml olarak hesaplanmıştır. IC50 değerinin artan süksinimidil ester miktarıyla düştüğü yani polimerin daha toksik hale geldiği anlaşılmaktadır.

Sentezlenen polimerler, hesaplanan IC50 dozları altında güvenlidir. Bu çalışmaların devamıyla birlikte; hedef hücreler dışında toksik etki oluşturmayan, PEG türevi-etken madde konjugatlarının yeni ilaç salım sistemleri olarak kullanılabileceğini düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Fonksiyonel polimer, PEG, ilaç salım sistemi, sitotoksosite, MTT, Vero, HeLa.

**INVESTIGATION OF CYTOTOXICITIES OF FUNCTIONAL POLYMERS FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS**

Nazlı Irmak GİRİTLİOĞLU

Department of Bioengineering

MSc. Thesis

Adviser: Assoc. Prof. Dr. Muhammet Ü. KAHVECİ

Co-Adviser: Prof. Dr. Ali KARAGÖZ

Nowadays, functional polymers based on poly(ethylene glycol) (PEG) have important roles in different fields of medicine. In PEGylation, a successful approach to drug delivery, PEG-drug conjugates have many advantages. These advantages include the ability of the conjugate to remain in the body for a long time, the degradation by metabolic enzymes being low, and the reduction or elimination of protein immunogenicity.

The aim of this thesis is to investigate cytotoxicities of water-soluble hyperbranched polymers functionalized with succinimidyl ester obtained via Atom Transfer Radical Polymerization (ATRP) of %7 (MA046) or % 17 (MA048) N-(methacryloxy) succinimide (NMAS) with poly(ethylene glycol) methacrylate (PEGMA) monomers on HeLa (Human cervical cancer cell line) and Vero (African green monkey kidney cell line). Concentrations of functional polymers at 0.1, 1, 25, 100 and 500 µg/ml were prepared with minimum essential medium (MEM) which contains 10% fetal bovine serum (FBS). The polymer samples at these concentrations were incubated with HeLa and Vero for 72 hours and end of the time, 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -3,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) test was performed for cytotoxicity analysis. Three replicate experiments were made for each sample. Cell viabilities were measured by ultraviolet-

visible region (UV-Vis) spectroscopy at 540 nanometers (nm) and the results were statistically evaluated by one-way ANOVA in GraphPad Prism program, converted to % viability.  $p < 0.05$  was considered significant. The median inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of each polymer was calculated using the Very Simple IC<sub>50</sub> Tool Kit. It was observed that % viability decreased in HeLa and Vero for all functional polymers from control concentration (0 µg/ml) to 500 µg/ml. IC<sub>50</sub> doses of HeLa for MA046 is 420.6 µg/ml, MA048 is 356.2 µg/ml, MA066 is 529.5 µg/ml; IC<sub>50</sub> doses of Vero for MA046 is 482.0, MA048 is 401.5 µg/ml, MA066 is 557.4 µg/ml. It is understood that the IC<sub>50</sub> dose decreases with increasing succinimidyl ester and the polymer becomes more toxic.

The synthesized polymers are safe under the calculated IC<sub>50</sub> doses. With the continuation of these studies; it is thought that PEG derivative-active agent conjugates, which do not produce toxic effects other than the target cells, may be used as new drug delivery systems.

**Keywords:** Functional polymer, PEG, drug release system, cytotoxicity, MTT, Vero, HeLa.



#### 1.1 Literatür Özeti

Geçtiğimiz 10 yılda, polimer teröpatikler olan polimer-ilaç konjugatları, geniş çeşitlilikte yapıda ve kimyasal özelliklerde gelişim göstermiştir. Birçok farklı ilaç konjugatı suda çözünebilir lineer polimerlerden yararlanılarak sentezlenebilir. Sayısız farklı polimer kompozisyonları sentezlenmesine ve çalışılmasına rağmen PEG gibi basit yapıdaki polimerler yaygın olarak kullanıma sahiptir [1]. Sentetik polimerlerden olan PEG, 500-20.000 g/mol molekül ağırlığına sahip; genel formülü  $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$  olan bir polimerdir. Deterjanlar, kozmetik, kağıt kaplama, tekstil modifikasyonu, yapı kimyası ve birçok farmasötik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır [2]. PEG'in diğer birçok sentetik polimerden farkı, suda ve organik çözücülerin birçok çeşidinde çözünebilmesidir. Yüksek biyouyumlu, toksik olmayan, neredeyse yok denecek kadar az immünojeniteye sahip olması, vücut içerisinde aktif proteinlere ve hücrelere zarar vermemesi gibi özellikleri dolayısıyla biyomedikal çalışmalarda önemli bir yere sahiptir [2], [3].

Bir proteinin, peptidin ya da non-peptid molekülün bir veya birden fazla PEG zincirleriyle bağlanması, PEGilasyon olarak adlandırılmaktadır. İlaç taşınımında başarılı bir yaklaşım olan PEGilasyonda, PEG-ilaç konjugatları birçok avantaja sahiptir. Konjugatın vücutta uzun süre kalışı, metabolik enzimlerle bozunurluğunun az olması ve protein immünojenitesini azaltması veya elimine etmesi bu avantajlara örnek verilebilir. Bu özellikleri sayesinde PEGilasyon ilaç taşınımında peptitlerin, proteinlerin ve teröpotik ajanların kullanılmasını sağlar [3]. PEG, tekrarlı etilen oksit ünitelerinin

reaktif kısımlara sahip olmaması nedeniyle diğer bileşenlere terminal fonksiyonel gruplarla bağlanır. PEG'e bağlanan fonksiyonel gruplarla oluşturulan PEG türevleri, PEG-etken madde konjugatlarının oluşturulmasında büyük öneme sahiptir [4]. Polimerlere bağlanan fonksiyonel gruplar, polimerlerin etken maddelerle etkileşim içerisinde bulunabilmelerinde büyük önem taşımaktadır.

Polimerlerin insan vücudunda kullanılabilmesi için ISO tarafından belirlenen biyouyumluluk testlerinden birisi sitotoksosite analizidir [5]. Sitotoksosite testleri, *in vitro* olarak hücre kültürlerinde yapılmaktadır. Hücre canlılığının belirlenmesinde tetrazolyum bazlı MTT testi, akademik laboratuvar çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir testtir. MTT substratı hazırlanıp hücre kültürüne eklendikten ve hücreler 1-4 saat arası inkübe edildikten sonra ürün olarak oluşan formazan miktarı kantitatif olarak hesaplanabilir. Canlı hücrelerde MTT substratını mor renkli formazan ürününe çevirecek aktif bir metabolizma mevcuttur [6].

## 1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasının amacı; PEG-bazlı fonksiyonel polimerlerin sitotoksosite analizlerinin yapılmasıdır. Bu polimerlerin *in vitro* olarak farklı özellikteki (kansere ve normal) hücre hatlarında meydana getirecekleri etkilerin ortaya çıkarılması hedeflenmiştir. Bulguların gelecekte PEG ile yapılacak olan çalışmalarda yol gösterici olması da amaçlanmıştır.

Fonksiyonel grup içermeyen PEG-1000 ve PEG-2000 gibi polimerler çok düşük sitotoksosite (HeLa için IC<sub>50</sub>: 36,2 mg/mL ve 38,2 mg/mL sırasıyla) göstermekle birlikte akrilat gibi fonksiyonel grup taşıyan oligomerik PEGA-480 yüksek sitotoksosite (HeLa için IC<sub>50</sub>: 0,2 mg/mL) gösterebilmektedir [7]. PEGilasyon işlemlerinde reaktif PEG'in fonksiyonel grubu genellikle süksinimidil esterdir. Akrilat fonksiyonlu PEG'lerle ilgili sitotoksosite çalışmaları olmasına rağmen literatürde süksinimidil ester fonksiyonlu PEG'lerle ilgili sistematik çalışma bulunmamaktadır. Bu tez kapsamında süksinimidil ester fonksiyonlu PEG bazlı dallanmış polimerlerin Vero ve HeLa hücrelerindeki sitotoksitelerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

### 1.3 Hipotez

Amin reaktif (süksinimidil ester fonksiyonlu) suda çözünebilir PEG türevlerinin sitotoksistelerinin belirlenmesi önemlidir. İnert PEG türevleri çok düşük sitotoksikite göstermesine rağmen süksinimidil ester fonksiyonlu reaktif PEG türevleri sitotoksik olabilir. Bu tür polimerlerinin sitotoksikite oranlarının gösterilerek in vivo şartlarda kullanılacak uygun konsantrasyon değerlerinin belirlenmesi özellikle ilaç salım sistemleri için önem arz etmektedir. Hücre kültürlerinde canlılığa ne kadar etki ettiği hesaplanan bu fonksiyonel polimerlerin farmakoloji alanında kullanıma aday olması beklenmektedir.



### GENEL BİLGİLER

#### 2.1 İlaç Salım Sistemleri

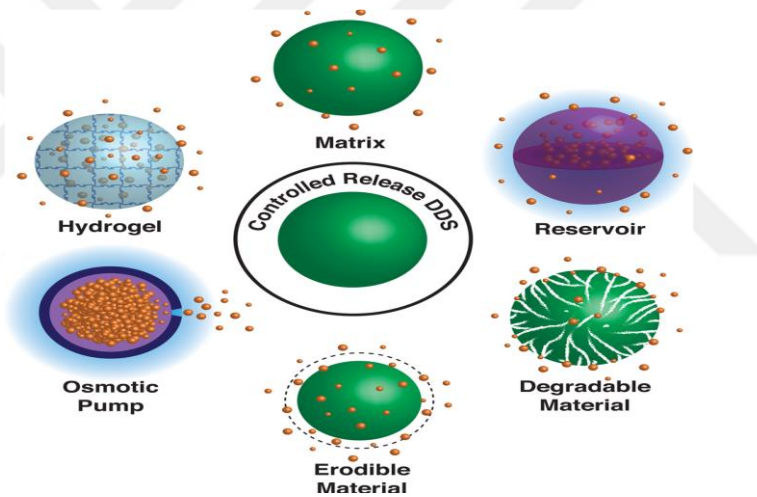
İlaç bilimi, bir hastalığın seyrini yönetmek veya tersine çevirmek için farmakolojik olarak aktif ajanların (terapötikler vb.) kullanımına dayanır. Farmakolojik olarak aktif ajanlar tabii olarak efektif değildir. İlaç farmakokinetiği, absorpsiyonu, dağılımı, teröpatik etkisinin süresi, salgılama ve toksisite ayarlanabilir [8]. Burada “ilaç uygulaması nasıl güvenli ve efektif olmalı?” sorusu karşımıza çıkmaktadır. İdeal olarak; teröpatik *in vivo*ya uygulanmalı ve tam olarak hastalığa sebep olan hücreleri hedef almalıdır. Fakat ilaç taşınımı kolaylıkla kontrol edilemez. İlaç salım oranlarını, hücre- ve doku-spesifik hedeflemeyi ve ilaç stabilitesini tahmin etmek zordur. İlaç taşıyıcı sistemler, geniş çapta materyallerin ve kimyasal stratejilerin kullanımıyla dizayn edilir. Birçok materyal, teröpatiği uzun periyodlarla ve vücutta hedefli olarak salımını sağlar [9].

##### 2.1.1 Kontrollü Salım Sistemleri (KSS)

İlaç taşıyıcı sistemlerin önemli sınıflarından birisi, önceden belirlenmiş olan salım profiline uygun şekilde, ilacı günlerden yıllara kadar sürebilen sürelerde dağıtabilen KSS sistemleridir. İdeal bir KSS, teröpatiği istenen bölgeye lokalize edebilmeli, kendini degrade edebilmeli ya da sistemden temizleyebilmelidir. KSS dizaynında, teröpatiği vücutta kaldığı salım süresi boyunca korumak, potansiyel olarak karşılaşılabilecek engelleri önlemek zordur. Örneğin, dizayn yaparken mutlaka KSS materyalinin

toksisitesi ve degradasyonu sonucunda ortaya çıkan ürünlerin toksisitesi göz önünde bulundurulmalıdır. KSS kesinlikle teröpatiği hızlı salmamalıdır, bu durum akut doku hasarına veya medikal komplikasyonlara yol açabilir [10].

1960'lara kadar bir materyalin, vücutta ilaç salımını kontrol edebileceği bilinmiyordu. Fakat 1960'larda hidrofobik, lipofilik küçük moleküllerin silikon tüplere difüze olabildiği gözlemlendi. Bu durum, silikon kauçukların; atropin, histamin, steroid hormonlar ve antimalariyal veya antişistozomal ilaçları da içeren, biyolojik olarak aktif ajanların kontrollü salımda kullanılabileceği konusunda bilim adamlarına ilham vermiştir [9]. Örneğin, norplant denilen deri altı implantı silikon kauçuk kapsüllerden yapılır ve levonorgestrelin 5 yıla kadar salımını yapabilir [11]. Oral KSS olarak osmotik pompalar oftalmik ilaç taşınım sistemi olarak ilaç-yüklü hidrojeller mikroküre enkapsülasyonu örnek verilebilir [9].

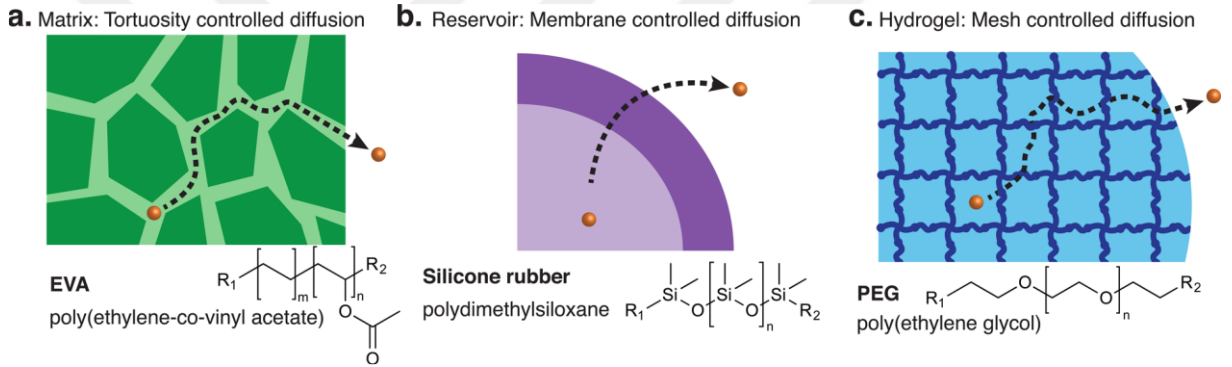


Şekil 2.1 Kontrollü salım sistemleri [9]

ilaç salım sistemleri farklı materyal stratejileri kullanılarak dizayn edilmiştir. Örneğin, matris-bazlı sistemde, ilaç porlara bağlı kıvrımlı bir ağdan difüze edilir. Rezervuarda, ilaç yarıgeçirgen bir membrandan salınır. Bozunabilir ilaç taşınım sisteminde, ilaç materyalin bozunarak oluşturduğu porlardan salınır. Benzer olarak, aşınabilir ilaç taşınım sisteminde, ilaç materyal çözündüğünde yüzeyden salınır. Osmotik pompalar, osmotik gradiyente göre ilacı bir veya daha fazla küçük pordan salar. Son olarak hidrojel-bazlı ilaç taşınım sistemlerinde, ilaç hidrasyona ve polimer yapısına bağlı olarak büyüklüğü değişen sınırlandırılmış bir ağdan salınır. KSS'ler genellikle bu sistemlerin 2 ya da daha fazlasının kombinasyonu ile oluşturulurlar [9].

Moleküler biyologlar, büyük moleküllerin salımını geliştirmişlerdir. Önceleri, büyük moleküllerin implante edilebilir polimerik materyalden kontrollü bir şekilde salımın olabileceği düşünülüyordu. Proteinlerin bu polimerik implantlardan 100 günlük salımın sağlanmasıyla bu düşünce değişmiştir. Hidrofobik polimerler (örneğin poli(etilen-ko-vinil asetat) çözündürülmüş ve liyofilize proteinle karıştırılmıştır. Böylece yavaş protein salımı birkaç ay sürdürülmüştür. Bu metot, anjiyojenik inhibitörlerin salımında kullanılmıştır [12].

Bu çalışmaları takiben, makromoleküllerin kontrollü salımında birçok yöntem geliştirilmiştir. Bunlara örnek olarak; difüzyon kontrollü matrisler ve rezervoirlar, kimyasal olarak regüle edilmiş biyobozunur materyaller, solvent-aktif hidrojeller ve osmotik pompalar verilebilir [9] (Şekil 2.1, Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Kontrollü salım mekanizmaları [9]

(a) Katı matris-bazlı kontrollü salım sistemleri, porlarla ilişkili dolaşık bir ağdan ilacın zamanla difüzyonunu gerçekleştirir. Bu sistemde kullanılan polimere örnek olarak poli(etilen-ko-vinil asetat) verilebilir. (b) Rezervuar ilaç salım sistemi, teröpatiklerin membrandan sınırlı salımını kapsar. Bu sistemde, rezervuardan teröpatik difüzyon oranı kontrol edilebilir. Bu membranlar silikon kauçuğu (kimyasal olarak çapraz-bağlı polidimetilsiloksan) da içeren polimerik materyallerden yapılıdır. (c) Hidrojel ilaç salım sistemlerinde salım oranı kontrollü, şişmiş polimerdeki ağ büyüklüğüyle sağlanır. Hidrojeller, PEG gibi suda çözünebilir polimerlerden yapılıdır.

### 2.1.2 Lokalize Terapi İçin İlaç Salım Sistemleri

Sistemik uygulamanın bir potansiyel sınırlaması, istenilen bölgede yetersiz teröpatik konsantrasyon olmasına neden olmaktadır. İmplant ilaç salım sistemlerinde ise ilaç deposu hedeflenen bölgede lokalize edilir. Örneğin glioblastoma multiform hastalığında, beyinde tumor rezeksiyon alanında, polianhidrit kapsüle yüklenmiş

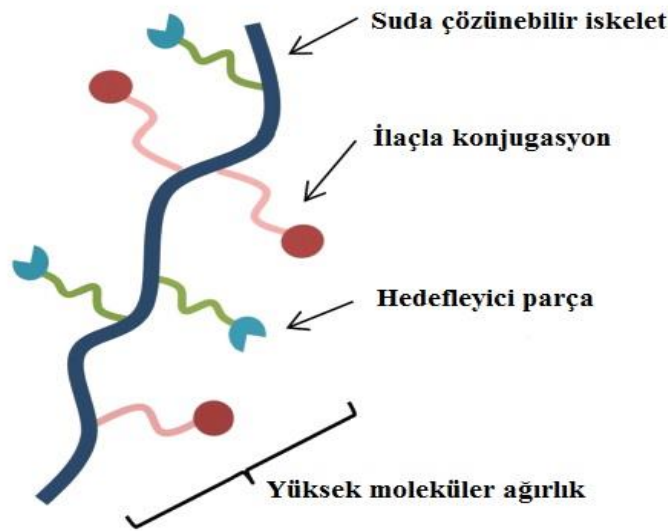
kemoteröpatığın cerrahi implantasyon ile hedef bölgeye salımı gerçekleştirilebilir. Bu strateji hastanın kurtarılmasında ve kemoteröpatığın yol açtığı sistemik komplikasyonları engellemede önemlidir. Benzer olarak, sıkıştırılmış ilaç kapsülleri 1 kDa PEG ve paclitaxel içeren polifosfoester mikroküreler de üretilmiş ve malignan gliomaları tedavi etmek için beyinde implante edilmiştir [13]. İmplantasyondan sonra, PEG yapısı yavaşça çözünerek, mikrokürelerin lokal olarak 90 güne kadar paclitaxel salması sağlanmıştır. Bu örneklerin umut vaat edici olmasına rağmen; cerrahın hedef bölgeye ulaşmasında bir limit söz konusudur. Hedef bölgeye cerrahi olarak ulaşmak zor olduğunda; iğne veya katater yardımıyla teröpatik lokalize bölgeye enjekte edilebilir ve ilacın saatlerden aylara kadar olan sürelerde salınması sağlanır. Lokal yönlendirilebilen ilaç taşınım sistemleri biyolojik engellerin üstesinden gelerek ilacın etkinliğini yükseltebilir, fakat bu durum hastalıktan hastalığa değişir. Örneğin, kemoteröpatikler sıklıkla doz-sınırlayıcı toksisite tarafından kısıtlanır. Hedef dışı etkiyi önlemek ve potansiyeli en üst düzeye çıkartmak için klinisyenler, kemoteröpatikleri doğrudan uygulamak için intratumoral implantasyonu kullanırlar. Bu sistemler, kemoteröpatığı stabilize etmesi, suda çözünmeyen ilaçların yüklenmesine olanak vermesi, direkt olarak hedeflenmiş hücrede biyolojik olarak etki etmesi ve hedef dışı toksisiteyi engellemesi gibi avantajlara sahiptir [14]. Diğer bir klinik problem, hangi terapinin en iyi anti-tümör yanıtı yol açacağına bilinmesinin mümkün olmamasıdır. Bu amaçla, tek bir cihazda birkaç antitümör teröpatik içeren ilaç taşınım sistemi dizayn edilmiştir. Cihazın tümöre implantasyonundan sonra tüm potansiyel terapiler aynı anda analiz edilmektedir. Böylece, en iyi etki yapan teröpatikler ve sistemik olarak en iyi etkiyi oluşturan zaman belirlenebilmektedir [9].

### **2.1.3 Polimerik İlaç Salım Sistemleri**

Polimerlerden teröpotik ajanlar olarak yararlanma senelerdir geniş çapta araştırılan bir konudur. Polimerlerin kan plazma genişletici, yara örtüsü ve enjekte edilebilir ya da implante edilebilir şekilde kullanımı 1960'lı yıllara dayanmaktadır. Farmakolojik aktif polimerlerin kullanımı ilk olarak 1975'te Helmut Ringsdorf tarafından ortaya atılmıştır. Ringsdorf'un kovalent bağlı polimer-ilaç konjugatları modeli hala bu çalışma alanında temel oluşturmaktadır. Ringsdorf modelindeki (Şekil 2.3) biyoyumlu polimer

omurgasında üç komponent bağlıdır: (1) Hidrofilikliği ve suda çözünmeyi sağlayan bir çözündürücü, (2) Genellikle polimere bir linker aracılığıyla bağlı olan bir ilaç, (3) İstenilen fizyolojik noktaya gitmeyi ya da biyolojik bir hedefe bağlanmayı sağlayan hedefleyici bir parça [1].

Verimi arttıran ve toksisiteyi azaltan Ringsdorf modeli ilaç taşınımıyla ilgili çalışan bilim adamlarına göre ilgi çekici bir modeldir. Bu polimer-ilaç konjugatlarının geleneksel küçük moleküllü terapötiklere göre birçok önemli avantajı vardır. İlk olarak, bir ilacın suda çözünürlüğü suda-çözünür polimerle konjugasyonunu önemli ölçüde geliştirebilir. İlaçların %40-60'ı zayıf biyoyararlanıma sahiptir, çünkü suda çözünme oranları düşüktür. İkinci olarak, polimer-ilaç konjugatları ilacın kontrollü bir şekilde taşınmasına olanak sağlar ve konjugattan ilaç salımı belirlenmiş bir zaman aralığında meydana gelir [1].



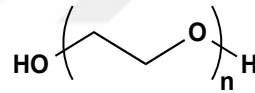
Şekil 2.3 Ringsdorf modeli polimer-ilaç konjugatı [1]

Başlangıçta geliştirilen polimerik ilaç taşınım sistemleri bozunur olmayan polimerlerle yapılmıştır. Fakat; sentetik biyobozunur polimerlerin senteziyle beraber, proteinler gibi makromoleküllerin bu polimer matrislerden taşınması kimyanın bu dalına yeni bir ivme kazandırmıştır. Bu sistemlerde ilaçlar polimer bir matrisle birleştirilir. Böyle bir sistemden ilacın salım oranı; polimer matrisin hammaddesi, matris geometrisi, ilaç özellikleri, başlangıçtaki ilaç yüklemesi, ilaç-matris etkileşimi gibi çoklu parametrelere bağlıdır [15].

Polimerik ilaç taşınım sistemleri için başlangıçta poli(dimetilsiloksan), poliüretan ve poli(etilen-ko-vinil asetat) (EVA) gibi hidrofobik, bozunur olmayan polimerlerle çalışılmıştır. Fakat bozunur olmayan polimer-bazlı ilaç taşınım sistemlerinin dezavantajları mevcuttur. Örneğin, cerrahi olarak implantın yerleştirilmesinden sonra ikinci bir ameliyatla çıkartılması gerekmektedir. Bu dezavantaja rağmen, implantın çıkartılması kolay bir işlemdir. Bu sistemlere örnek olarak Ocusert (EVA bazlı rezervuar sistemi), Norplant (PS bazlı rezervuar sistem), MEDIFILM-400 (PU bazlı transdermal yama sistem) ve TransdermScop (Poliester bazlı transdermal yama sistem) verilebilir [12].

## 2.2 Etken Madde Taşınımında PEG

PEG, özellikle tıp alanında birçok uygulaması olan bir polieter bileşiğidir. PEG'in en yaygın formu, hidroksil gruplarıyla sonlanan lineer ya da dallanmış polieterdir ve genel yapısı  $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$  şeklinde gösterilir (Şekil 2.4). PEG, epoksit halkasında, etilen oksidin anyonik halka açılma polimerizasyonu ile hidroksit iyonuna nükleofilik atak yapması ile sentezlenir [16].



Şekil 2.4 PEG'in kimyasal yapısı

Polipeptit modifikasyonu için en kullanışlı yapı monometoksi PEG (mPEG)'tir ve  $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$  şeklinde gösterilir. mPEG, metoksit iyonlarıyla başlayan anyonik halka açılma polimerizasyonu ile sentezlenir. Ticari mPEG polimerizasyon sırasında çok az miktarda suyun varlığı nedeniyle önemli bir miktarda diol PEG içerir. Bu diol PEG polimerin iki ucundaki polimerizasyon nedeniyle göreceli olarak yüksek moleküler ağırlığa sahiptir. Diol PEG miktarı mPEG kompozisyonu içerisinde %15'i aşabilir [16].

Diğer polimerlerle karşılaştırıldığında PEG, düşük moleküler ağırlıklı PEG'ler (<5kDa) için 1.01'den, büyük moleküler ağırlıklı PEG'ler için 1,1'e kadar olan aralıkta göreceli olarak dar bir polidispersiteye ( $M_w/M_n$ ) sahiptir [16].

PEG'in eşsiz yeteneği, hem sulu çözeltilerde hem de organik solventlerde çözünebilir olmasıdır. Bu da son uç türetme ve uygun fizyolojik koşullar altında biyolojik

moleküllerle konjugasyona olanak sağlar. Çözelti durumdaki PEG ile ilgili yapılan çalışmalarda her etilen oksit ünitesinde bir, PEG'in 2-3 su molekülüne bağlanabildiği gösterilmiştir. PEG'in hem omurga zincirindeki yüksek esneklik hem de su moleküllerine bağlanması nedeniyle PEG molekülü, sanki çözünebilir bir protein gibi 5-10 kat daha büyükmüş gibi davranır. Bu faktörler, PEG'in proteinleri çökeltme yeteneğinin, immünojeniteyi ve antijeniteyi engellemesinin ve memeli hücreleri ile enzimler tarafından degrade olmayı önlemesinin nedeni olarak ileri sürülmüştür [16].

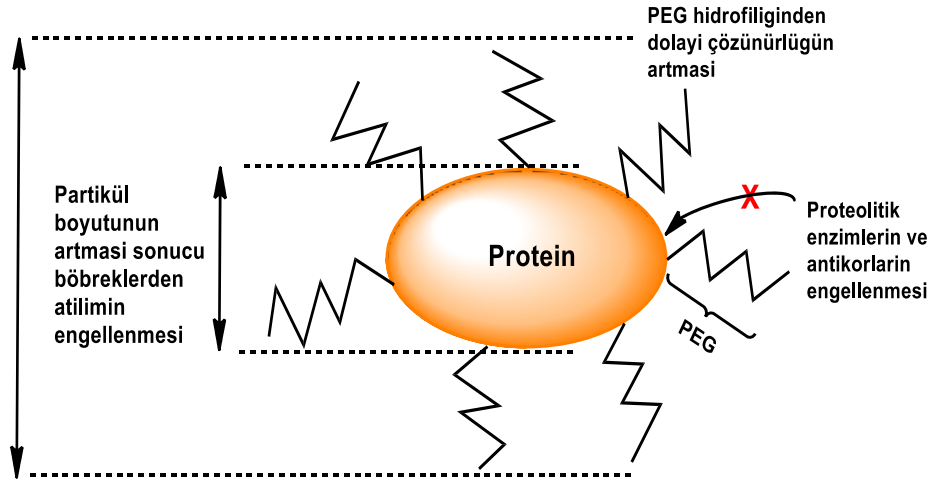
PEG'in düşük moleküler ağırlıklı (<400 kDa) oligomerlerinin *in vivo*da alkol dehidrojenazla degrade olduktan sonra toksik metabolitler oluşturduğu gösterilmiştir. Buna rağmen 1000 kDa'nın üstündeki PEG'ler yıllardır yemek, kozmetik ve farmasötik alanlarında kullanılmaktadır [16].

### **2.2.1 PEGilasyon Kimyası**

PEGilasyon, protein, peptit ya da non-peptit molekülün bir ya da daha fazla PEG zinciriyle bağlanmasıyla oluşan modifikasyonu ifade eden bir terimdir [16]. İlk olarak 1970'lerde Davies ve Abuchowsky tarafından albümin ve katalaz modifikasyonu üzerine olan iki yayında belirtilmiştir [4].

Günümüzde PEGilasyon, peptitlerin ve proteinlerin terapötik ve biyoteknolojik olarak kullanımında popülerliği artan bir prosedürdür ve kimyasal ve enzimatik olarak geniş çapta konjugasyon metotları vardır. Protein veya peptitlerdeki amino gruplar, açılasyon ve alkilasyon reaksiyonlarıyla PEGilasyonun ilk hedefidir fakat şu anda birçok spesifik kimyasal ya da enzimatik yöntemle tiol, hidroksil veya amit gruplarıyla konjugasyonlar da mümkündür [4].

İlaç taşınımında başarılı bir yaklaşım olan PEGilasyonda, PEG-ilaç konjugatları birçok avantaja sahiptir. Konjugatın vücutta uzun süre kalışı, metabolik enzimlerle bozunurluğunun az olması ve protein immünojenitesini azaltması veya elimine etmesi bu avantajlara örnek verilebilir. Bu özellikleri sayesinde PEGilasyon ilaç taşınımında peptitlerin, proteinlerin ve teröpotik ajanların kullanılmasını sağlar [2]. PEG-Protein konjugatının avantajları Şekil 2.5'te görülmektedir.



Şekil 2.5 PEG-Protein konjugatının avantajları [4]

PEG, tekrarlı etilen oksit ünitelerinin reaktif kısımlara sahip olmaması nedeniyle diğer bileşenlere terminal fonksiyonel gruplarla bağlanır. PEG'e bağlanan fonksiyonel gruplarla oluşturulan PEG türevleri, PEG-etken madde konjugatlarının oluşturulmasında büyük öneme sahiptir. PEG türevleriyle ilgili kapsamlı bir çalışma, 2003'te Jing Li ve W. John Kao tarafından yapılmıştır. Li ve Kao, 50 PEG türevi sentezlemiş, yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve nükleer manyetik rezonans ile bu türevlerin karakterizasyon analizini yapmışlardır [18]. PEG'in türevlerine örnek olarak olarak süksinimidil-PEG, tetrazin-PEG ve PEG-amin gösterilebilir. Süksinimidil bağlı PEG'te terminal karboksil grup çok yönlüdür. Bu karboksil grup, polimerin aktif esterlerini hazırlarken kullanılabilirdiği gibi, biyolojik önemi olan moleküllerle direkt olarak bağlanabilir [3]. Aktifleşmiş esterler ve kısmen NHS (N-hidroksisüksinimid) ester, biyokonjugasyon çalışmalarında en çok kullanılan reaktif gruplardır [18]. PEG'in NHS türevi, pH 7-9 arasıdayken, protein moleküllerindeki amino grupla doğrudan etkileşebilmektedir [3]. Tetrazin-PEG türevi, dört adet karbon-hidrojen ünitesi olan, benzen benzeri bir moleküldür ve 1,2,3,4 ve 1,2,3,5-tetrazin izomerleri sentetik polimer çalışmalarında kullanılmaktadır [20]. Son yıllarda, tetrazin yüksek hızı ve spesifitesi nedeniyle birçok hücre görüntüleme, tedavi ve fonksiyonel malzeme alanlarında sıkça kullanılmaktadır. PEG-amin türevinden karbonil bileşiklerinin modifikasyonunda yararlanılmaktadır [3]. Polimerlere bağlanan fonksiyonel gruplar, polimerlerin etken maddelerle etkileşim içerisinde bulunabilmelerinde büyük önem taşımaktadır.

### **2.2.1.1 İlk Jenerasyon PEG Kimyası**

PEG konjugasyonunun birçok uygulaması değişik moleküller içerdiğinden beri eşleşme reaksiyonları ılımlı kimyasal koşullar gerektirmektedir. Polipeptitlerde eşleşmeye katılan en reaktif gruplar lizinin alfa ya da epsilon amino gruplarıdır. Şekil 2.6'da alfa veya epsilon amino gruplarındaki protein PEGilasyonunda kullanılan bazı PEG türevleri gösterilmiştir [16].

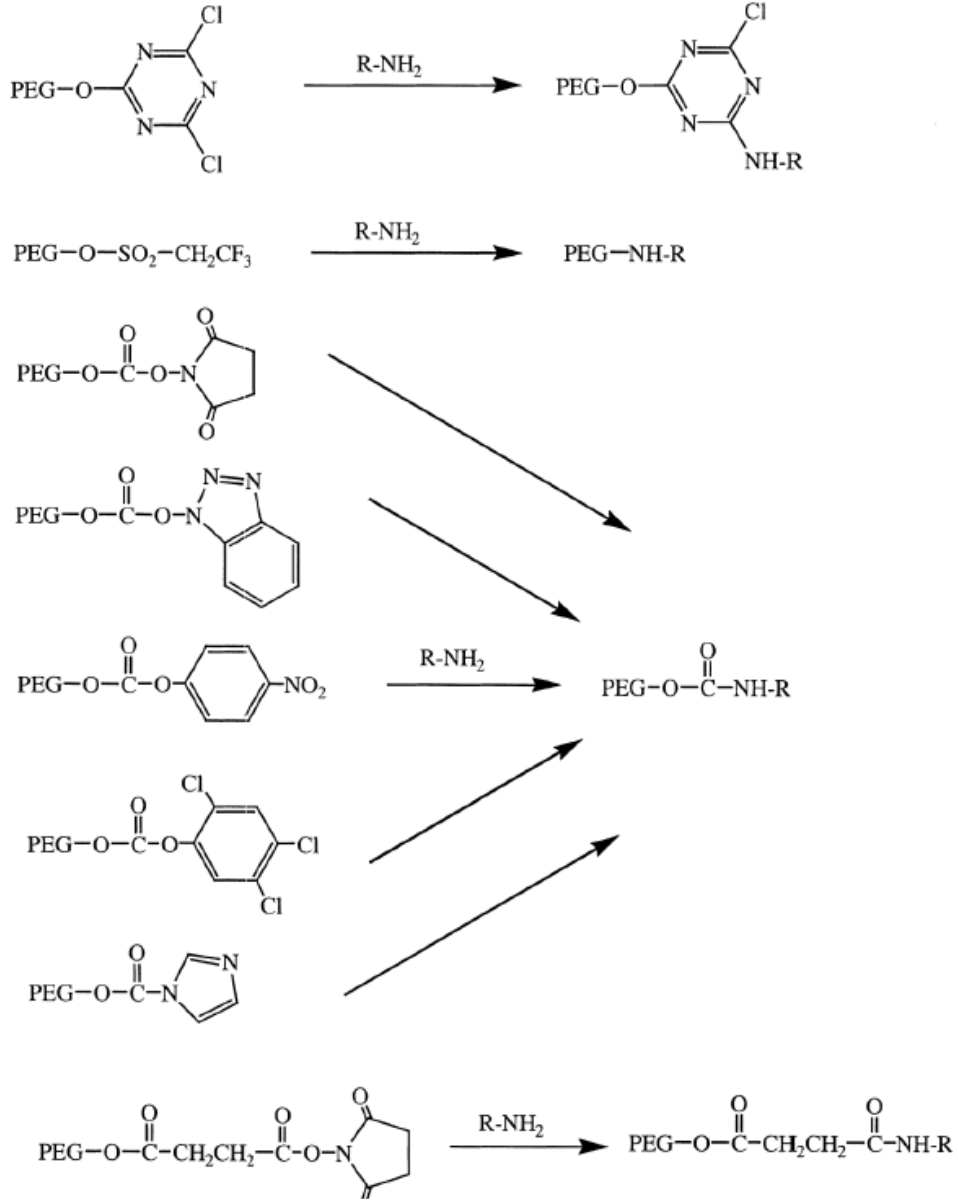
İlk-jenerasyon PEG kimyasında safsızlık, düşük moleküler ağırlık sınırlaması, stabil olmayan bağlar ve modifikasyonda seçicilikte yetersizlik vardır [16].

### **2.2.1.2 İkinci Jenerasyon PEG kimyası**

İkinci-Jenerasyon PEG kimyası diol kontaminasyonu, mPEG için düşük moleküler ağırlık sınırlaması, stabil olmayan bağlar, yan reaksiyonlar ve yer değiştirme reaksiyonlarında seçicilik kısıtlaması problemlerini önlemek üzere ortaya çıkmıştır. İkinci-Jenerasyon PEG kimyasının ilk örneklerinden biri mPEG-propiyonaldehittir. mPEG-propiyonaldehitin hazırlanması kolaydır ve PEG-asetaldehit yerine kullanılabilir; böylece PEG'de safsızlık oluşumunu engellenmiş olmaktadır [16], [17]. İkinci jenerasyon metotlarda diğer bir hedef ise daha büyük PEG polimerleri sentezleyerek farmakokinetik ve farmakodinamik etkinliği artırmaktır. Ayrıca, ikinci jenerasyon PEG kimyasında, birinci kuşakta kullanılan 12 kDa olan yapıların yerini dallanmış 60 kDa PEG molekülleri almıştır [17].

## **2.3 Hedefleme ve Görüntüleme**

Kanser tedavisinde kullanılan teröpatiklerin, diğer dokulara salınmadan sadece hastalıklı hücrelere alınması için, fiziksel olarak hastalıklı hücreleri hedefleme yeteneği uzun zamandır amaçlanmaktadır. Hücre-yüzey markerları, ekstraselüler matriks, çözünabilir faktörler ve proteazlar ve aynı zamanda tümörün eşsiz yapısı ve taşınma özellikleri hedeflemede kullanılabilir [5], [21].



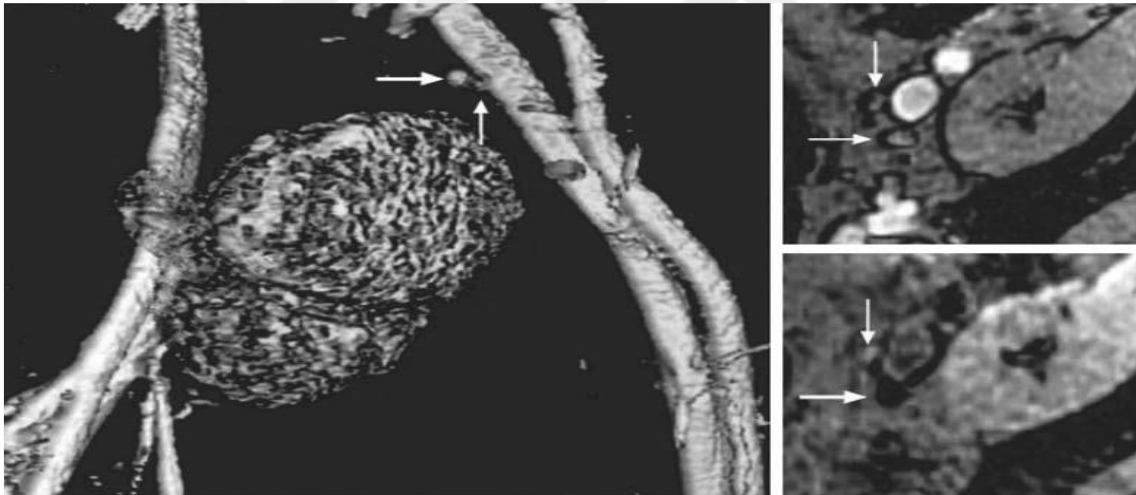
Şekil 2.6 İlk jenerasyon amin reaktif PEG türevleri [16]

Nanopartikül taşınımında hem pasif hem de aktif hedeflemeden yararlanılmaktadır. Pasif hedefleme düşük böbreklerden atılımı ve arttırılmış geçiş ve alıkonmayı (EPR effect) içeren, nanopartüküllerin eşsiz farmakokinetiklerine dayanır. PEG ve poli(etilen oksit) gibi polimerlerin yüzeye bağlanması nanopartüküllerin karaciğerde, dalakta ve lenf nodüllerinde mononükleer fagositler ile alınmasını engeller ve böylece tümörde birikimine olanak tanır. Aktif hedefleme, nanopartüküllerin tümörde eksprese olan reseptörlere ligand-aracılı olarak bağlanmasına dayanır [22].

Bilinen ligandlara bağlanan birçok tümör markerı tanımlanmıştır. Bunlara örnek olarak arjinin-glisin-aspartik asitin anjiyojenik kan damarları yüzeylerinde eksprese olan

integrinlere bağlanması ve folik asitin kanser hücrelerinin yüzeylerindeki reseptörlere bağlanması verilebilir. Monoklonal antikorlar da hedeflemede kullanılmaktadır [22].

Nanopartiküllerin kanser görüntülemesinde birçok model vardır (Çizelge 2.1). Non-invazif olarak karaciğer ve lenf düğümü metastazı saptanabilmektedir. Süperparamanyetik demir oksit nanopartikülleri dokularda lokal manyetik alan gradyanlarına etki ederek MRI'da algılanabilir bir sinyal oluşturur. İntravenöz olarak uygulanan dekstran-kaplı demir oksit nanopartiküller karaciğer ve lenf makrofajları tarafından fagositozla alınır ve bu yöntemle kanserli hücreler tespit edilebilir. Manyetik nanopartiküllerin direkt olarak kanser hücrelerini hedef aldığı çalışmalar da bulunmaktadır. Örneğin; demir oksit nanopartiküllerin yüzeyindeki herseptin mAb ve folik asitin hedeflediği bölgeler (tümör) MRI ile görüntülenebilir. Dendrimerler, miseller ve lipozomlar gibi diğer diğer nanopartikül korları paramanyetik gadolinium ile modifiye edilerek hedeflenen tümör MRI ile görüntülenebilir [22].



Şekil 2.7 MRI ve demir oksit nanopartiküller ile lenf düğümü metastazının noninvazif olarak saptanması [22]

(a) Nanopartikülle arttırılmış MRI ile prostatın 3 boyutlu görüntülenmesi. (b) İki bitişik düğümde, konvensiyonel MRI resminde de benzer sinyal yoğunluğu görülmektedir. (c) Nanopartikülle arttırılmış MRI'da normal düğümde sinyalin azaldığı (kalın ok), metastatik düğümde ise azalmadığı (ince ok) görülmektedir.

Çizelge 2.1 Yaygın olarak kullanılan görüntüleme ajanları [23]

Görüntüleme Modeli	Görüntüleme Ajanı	Uzaysal Çözünürlük	Avantajlar	Dezavantajlar
MRI	Gadolinium, demir oksit, manganaz oksit, <sup>19</sup> F işaretli bileşik	10-100 nm	Klinik translasyon, yüksek çözünürlük, radyasyon yok, derinlik limiti yok, kantitatif sonuçlar	Yüksek fiyat, uzun görüntüleme zamanı, metal implant veya dövmesi olan hastalara uygulanamaz
PET	<sup>18</sup> F, <sup>64</sup> Cu, <sup>11</sup> C, <sup>15</sup> O- işaretli	1-2 mm	Klinik translasyon, yüksek duyarlılık, limitsiz penetrasyon, biyokimyasal prosesli görüntüleme, kantitatif sonuçlar	Yüksek fiyat, radyasyon, düşük çözünürlük
SPECT	<sup>99</sup> mTc, <sup>111</sup> Inkelat	1-2 mm	Klinik translasyon, yüksek duyarlılık, sınırsız penetrasyon, görece düşük fiyat, kantitatif sonuçlar	Rasyasyon, düşük çözünürlük
<b>Optik Görüntüleme</b>	Fluokrom, fotoproteinler	1-5 mm	Yüksek duyarlılık, radyasyon yok, hedef doğrulama için high-throughput tarama ve bileşen optimizasyonu, çok kanallı görüntüleme	Kliniğe uygulaması sınırlı, düşük çözünürlük, düşük derinlik penetrasyonu
<b>Ultrason</b>	Nano/mikobalonlar	50 µm	Yüksek çözünürlük, düşük fiyat, operasyon kolaylığı, radyasyon yok, kantitatif sonuçlar	Düşük derinlik penetrasyonu

Optik görüntüleme ile kullanılan altın nanoshelller, MRI problemlerine alternatiftir. UV'den infrarede kadar dalga boyunda absorblama veya saçılım yapan bu nanopartiküller, dielektrik çekirdek (silikon) ve metalik partiküllerden yapılır. Dokuların minimal absorbansa sahip olduğu bölgeler için bu partiküller yakın-infrarede de saçılım

yapacak şekilde düzenlenebilir. Böylece konfokal mikroskopta ve optik eş fazlı tomografide görüntüleme özellikleri yükseltilebilmektedir [22].

Floresan nanopartiküller de optik görüntülemeyi arttırmada kullanılmaktadır. Bir çalışmada; floresan yarı iletken nanokristaller ve kuantum dotlar, ligand-aracılı nanopartikül olarak tümördeki farklı bölgeleri hedeflemede kullanılmıştır. Şekil 2.7’de PEG ile fonksiyonelleştirilen nanopartiküllerin karaciğeri de içeren retikuloendotelial sistem organlarında saptanabilir bir yığın oluşturduğu görülmektedir [22].

## 2.4 Hücre Kültürü

Hücre kültürü, hücrelerin bir canlıdan alınarak elverişli yapay bir ortama aktarılmasıdır. Hücreler dokudan direkt olarak alınabilir ve kültüvasyondan önce enzimatik ya da mekanik yollarla ayrıştırılabilirler. Önceden kültürü yapılmış bir hücre hattından da hücreler alınarak kültürleri yapılabilir [23].

Hücre kültürü ilk olarak 20. yüzyılın başlarında, sistemik varyasyonlardan uzak hücrelerin davranışlarının incelenmesiyle keşfedilmiştir. Dokudan primer eksplant olarak hücrelerin kültürlenmesi 50 yılı aşkın süredir devam etmektedir. 20. yüzyılın ikinci yarısında “doku kültürü” kavramı kullanılmaya başlanmıştır. Eksplante edilen hücrelerin ayrıştırılması ve dağılmış hücrelerden plak oluşturulması ilk olarak 1885’te Roux tarafından uygulanmıştır. L929, fare L-hücrelerinden klonlanan ilk hücre kültür hattıdır. Dulbecco’nun çalışmaları, tripsinazasyonla tek hücre klonlanmasında büyük kolaylıklar sağlamıştır. Gey ve arkadaşları, 1952’de ilk devamlı hücre kültürü olan HeLa’yı gerçekleştirmiştir. İnsan tümörleriyle ilgili çalışmalar Leonard Hayflick’in kültürdeki hücrelerin yaşam ömrüyle ilgili çalışmasında öncü olmuştur. 1950’ler aynı zamanda hücre kültürü besiyerlerinin gelişmesinde önemli yıllardır. Bu çalışmalar, serum-bağımsız besiyerlerinin gelişmesine öncülük etmiştir [24].

Hücrelerin kültüründe, doku kaynağı olarak farklı kaynaklar tercih edilebilmektedir. Harrison (1907) doku kaynağı olarak soğukkanlı bir hayvan olan kurbağayı tercih etmiştir; çünkü inkübasyon gereksinimi yoktur. Harrison’un uyguladığı teknik, dokunun *in vitro* kültürlenmesine yeni bir bakış açısı getirmiştir. Tıbbi bilimlerde ise tercih

sıcakkanlı hayvanlardan yanadır; çünkü bu hayvanların normal ve patolojik gelişimleri insanlara daha yakındır [24].

Başlangıçta hücreler kültüre edilirken besi ortamında tavuk embriyo ekstraktı gibi vücut sıvıları, serum, lenf gibi doğal ekstraktlar kullanılmıştır. Daha sonraları, vücut sıvıları ve besin biyokimyası analizlerine dayanarak kimyasal besiyeriler yapılmıştır. Eagle's Basal Medium (1955) ve bu besiyerini takiben dana, insan ya da at serumu, protein hidrolizatları ve embriyo ekstraktı gibi çeşitli takviyeler içeren Eagle's Minimum Essential Medium geniş çapta kabul görmüştür (1959). RPMI 1640 gibi farklı hücre tiplerine ya da spesifik durumlara özel modifiye edilmiş (NAHCO<sub>3</sub> ve CO<sub>2</sub> gereksindirmeyen) besiyeriler de üretilmiştir (1963). Günümüzde downstream prosesler ile enfeksiyon riski önlenerek endüstriyel çapta serumsuz besiyeriler üretilmektedir. [24].

Hücre kültürü, genel olarak iki evrede incelenebilir. İlk evre; primer kültürdür. Primer kültür, dokudan izole edilen hücrelerin uygun koşullarda buldukları yüzeyi kaplamasını ifade eden kültür evresidir. Bu evrede hücreler, büyümenin devam etmesini sağlamak için yeni büyüme besiyerinin olduğu bir ortama aktarılmalıdır. İlk subkültürden sonraki primer kültür, ikinci evre olan hücre hattını oluşturur. Normal hücre hatları, çoğalma yeteneklerini kaybetmeden önce sınırlı bölünme sayısına sahiptir. Fakat bazı hücre hatları transformasyon adı verilen bir süreçten sonra bölünme yeteneğinin kaybolmadığı devamlı hücre hatlarına dönüşebilir. Bu durum kendiliğinden, kimyasal olarak ya da viral olarak indüklenerek ortaya çıkabilir. Eğer bir hücre hattının alt popülasyonu, kültürden klonlama veya başka metotlarla pozitif olarak seçilebiliyorsa hücre hattı, hücre soyu ismini alır. Hücre soyu genellikle ana hatta ek olarak genetik değişiklikler içermektedir [23].

#### **2.4.1 Dokudan Hücre Kültürü Eldesi**

Birincil hücre kültürleri genellikle hücrelerin dokudan bazı enzimlerle ayrıştırılması ile oluşturulur. Devamlı hücre kültürlerinde hücreler yapışıkları kültür kabından tripsin, etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) ve kollajenaz solüsyonları ile ayrılırlar [25].

Tripsin, memelilerin gastrointestinden elde edilen bir endopeptidazdır. Ortalama olarak pH 8'de ve 37°C'de optimal işleve sahiptir. Doku kültürü laboratuvarında hücrelerin yeni bir kültür kabına ve yeni bir besiyerine aktarılmaları için buldukları kültür kabının duvarından tripsin enzimi kullanılarak kaldırılır [25].

EDTA, kalsiyum ve diğer iyonlara bağlanıp kelatlama ajanı olarak kullanılır ve bu sayede pasajlama esnasında, kalsiyum-bağımlı hücre adhezyonunda rol oynayan integral membran proteinleri olan kaderinlerin hücreleri birbirine bağlaması önlenir. EDTA'nın çalışma konsantrasyonu 0,02%'dir. Hücreleri ayırmada tripsin ve EDTA kombin olarak kullanılır [25].

Kollajenaz özellikle tripsinin zarar verebileceği ya da efektif olmadığı durumlarda çok fibröz ya da hassas yapılarda kullanılan önemli bir enzimdir. Ayrıştırma genellikle enzimin tüm organa dağıtılarak ya da küçük parçalarının enzimle inkübasyonu ile yapılır. Kollajenazın çalışma konsantrasyonu 0,1-0,3 mg/ml ya da 200000 U/L ve optimal çalışma pH'sı 6.5 civarındadır [25].

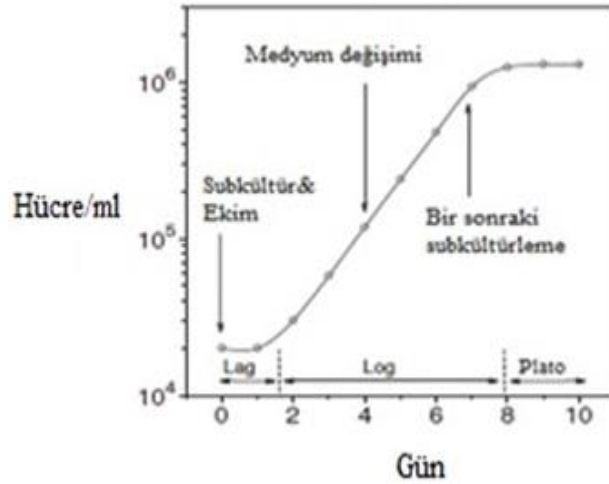
#### **2.4.2 Hücrelerde Yaşam Ömrü**

Çoğu hücre hattının limitli subkültürü ya da başka bir ifadeyle pasajlanma sayısı vardır. Bu limit, hücre popülasyonunun büyümeyi durdurup senesense gittiği ikilenme sayısı ile ifade edilir. Senesens, retinoblastoma (Rb) ve p53 gibi hücre döngüsünü düzenleyen faktörlerle belirlenir ve telomerler minimum kritik uzunluğa ulaştığında hücreler daha fazla bölünemez [26]. Telomer uzunluğu, germ hücreleri dışında down regüle edilen çoğu normal hücrede telomeraz ile korunur. Kök hücrelerde telomer uzunluğu daha yüksek olabilir ve ikilenme sayıları çok daha iyi olduğundan senesens engellenmektedir [27], [28].

##### **2.4.2.1 Büyüme Döngüsü**

Bir hücre kültürü, subkültürlendiği her seferinde subkültürden önceki hücre yoğunluğuna geri döner. Bu süreç, belirli bir aralıkta alınan örneğin büyüme eğrisinin çizilmesiyle tanımlanabilir. Hücreler tekrar ekildikten sonra latent evresi de denilen, lag faza geçerler. Bu periyot, birkaç saatten 48 saate kadar sürebilir, ama genellikle 12-24

saat arasındır. Tripsinizasyondan sonra hücreler; substratta toplanma, hücre iskeletinin yapılandırması, matrikse bağlanma gibi süreçlerden sonra tekrar hücre döngüsüne girer. Hücre popülasyonunun ikilenme zamanı logaritmik (log) faz denilen üssel bir grafikte tanımlanır ve her hücre hattında karakteristiktir [29].



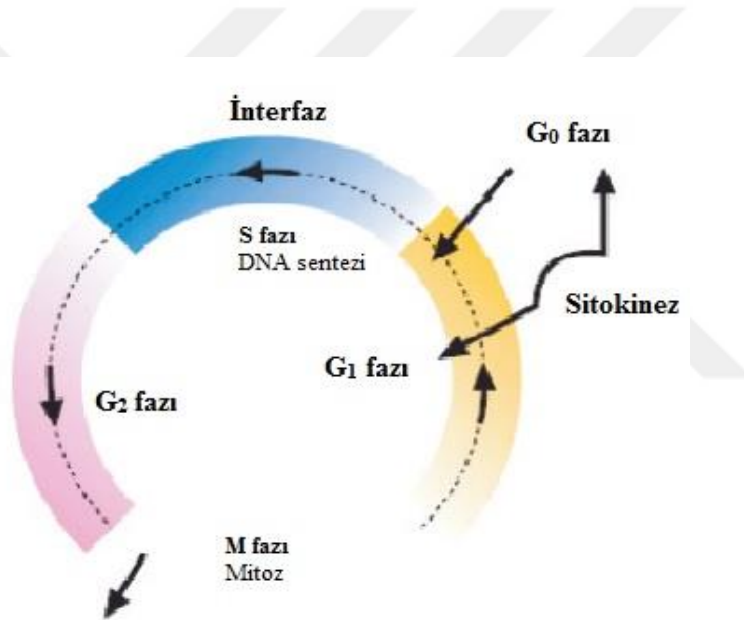
Şekil 2.8 Hücrelerde büyüme eğrisi [29]

Şekilde Log skalasında hücre sayısının artışı-subkültür günleri grafiği verilmiştir. Lag, log (üssel) ve plato fazları görülmektedir. Kültürdeki hücreler genellikle standart bir büyüme paternini takip ederler. İlk faz, kültürün ekildiği andan itibaren girilen lag fazdır. Bu fazda yavaş büyüme, kültür çevresine adaptasyon ve hızlı büyümeye hazırlık söz konusudur. Lag fazı takiben hücreler log faza girer. Log fazda, hücre sayısında üssel bir artış görülür. Büyüme besiyerinin içerdiği besin maddeleri tükendiğinde (bir ya da daha fazla madde bittiğinde) hücreler plato fazına girer ve proliferasyon büyük ölçüde sonlanır.

Hücreler bulunduğu alanı tamamen kapladığında daha az yayılır ve en sonunda hücre döngüsünden çıkar. Bu evreden sonra hücrelerin girdiği faz plato ya da durağan (sabit) fazdır (Şekil 2.8). Bazı hücreler bu fazda farklılaşabilir; diğerleri ise hücre döngüsünden çıkıp  $G_0$  evresine girer. Hücreler plato fazında subkültürlenebilse de plato fazına ulaşmadan subkültürlemek daha doğrudur [29].

Hücre döngüsü dört fazdan oluşur. Mitoz (M) fazında kromatin kromozomlara dönüşür ve kromozomu oluşturan iki kromatid, bölünen hücrelere ayrılır.  $G_1$  fazında hücreler,

DNA (deoksiribo nükleik asit) sentezine karar vermek üzere programlanmıştır ve bu fazdan sonra hücreler döngüye devam edebilir ya da  $G_0$  fazına girerler.  $G_0$  fazında hücreler tekrardan hücre döngüsüne girebilir ya da bu fazda kalırlar.  $G_1$  fazını takiben sentez (S) fazında, DNA replikasyonu gerçekleştirilir [29], [30]. Rb, hücre döngüsünün S fazına girişinde anahtar inhibitör olarak görev almakta ve bu yolla hücre proliferasyonunu düzenlemektedir. Rb protein ailesi, G1 progresyonu, S fazına giriş ve hatta mitozdan çıkış gibi hücre döngüsünün diğer aşamalarını da düzenleyici bir role sahiptir. Apoptozisde rol alan p53 faktörü de hücre döngüsünü durduran ve hücreye DNA'sındaki hasarları onarması için zaman kazandıran bir fonksiyona sahiptir [31], [32]. S fazından sonraki faz  $G_2$ 'dir ve bu fazda hücre tekrardan M fazına girmek için hazırlanır (Şekil 2.9) [30].



Şekil 2.9 Hücre döngüsünün evreleri [30]

#### 2.4.3 Hücre Kültüründe Kullanılan Temel Besiyeri Bileşenleri

Kültürlenmiş hücreler steril bir çevreye ve büyüme için çeşitli besinlere ihtiyaç duyarlar. Son 30 yılda, çeşitli bazal besiyeri tipleri ticari olarak üretilmiştir. Besiyerileri birçok kez modifiye edilmiş ve aminoasit, vitamin, yağ asitleri ve lipitlerle zenginleştirilmiştir. Belirli bir besiyeri formülasyonu, sıklıkla her bileşenin konsantrasyonunun optimizasyonu ile yapılmaktadır [33].

### 2.4.3.1 İnorganik Tuzlar

Organik tuzların besiyerine eklenmesi birçok fonksiyonu gerçekleştirir. Kültürün osmotik dengesini ve sodyum, potasyum ve kalsiyum iyonları sağlayarak membran potansiyelinin düzenlenmesine yardım eder [33].

### 2.4.3.2 Tampon Sistemleri

Çoğu hücre, optimum kültür şartlarından biri olan 7,2-7,4 arası pH gerektirir. Bu değer bazı hücre hatlarında değişebilir. Örneğin fibroblastlar yüksek pH aralığını (7,4-7,7), sürekli transforme hücre hatları ise daha asidik şartları (7,0-7,4) tercih etmektedir. [23].

Hücre ekimini takiben pH kontrolü çok önemlidir. Bu kontrol, genellikle iki tamponlama sistemi ile sağlanır: (i) Natural tamponlama sistemi olan gaz formundaki CO<sub>2</sub>'ye ilaveten kültür besiyerine eklenen CO<sub>3</sub>/HCO<sub>3</sub>, (ii) Zwitteriyon olan 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) kullanan kimyasal tamponlama sistemi. Bikarbonat/CO<sub>2</sub> tamponlama sistemini kullanan kültürler 5-10% CO<sub>2</sub>'ye ihtiyaç duyarlar ve bu sistem genellikle CO<sub>2</sub> inkübatörüyle sağlanır. Bikarbonat/CO<sub>2</sub> düşük maliyetli, toksik olmayan ve hücrelere başka kimyasal yararları da olan bir sistemdir. HEPES'in pH 7,2-7,4 aralığında yüksek bir tamponlama kapasitesi vardır fakat görece pahalı ve yüksek konsantrasyonlarda bazı hücre tiplerinde toksik olabilmektedir. HEPES ile tamponlanmış kültürler kontrollü gaz atmosferi gerektirmez [32]. HEPES hücre kültürlerine 10 mM'dan 25 mM'a kadar eklenebilir [31].

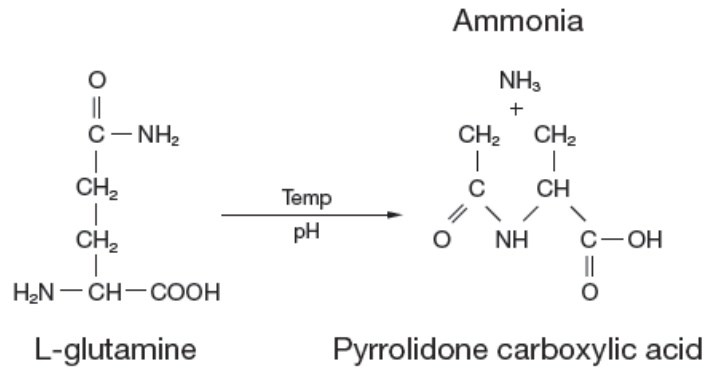
Birçok ticari kültür besiyeri pH indikatörü olarak fenol kırmızısı içerir. Kültürdeki pH değişikliği renk değişimiyle gözlenir. Kültür besiyerindeki pH değişikliğinde genellikle sarı (asidik) ve mor (alkali) renkleri görülür [33].

### 2.4.3.3 Karbohidratlar

Enerjinin ana kaynağı, genellikle karbohidratlardan türetilmiş olan şekerlerdir. Kültür besiyerindeki iki ana şeker glikoz ve galaktoz olsa da bazı besiyerileri maltoz ya da früktoz da içerir. Bazal besiyerindeki şeker konsantrasyonu 1,0 g/L den 4.5 g/L'ye kadar değişmektedir. Yüksek konsantrasyonda şeker içeren besiyeriler birçok hücre tipinde büyümeyi destekler [32].

#### 2.4.3.4 Aminoasitler

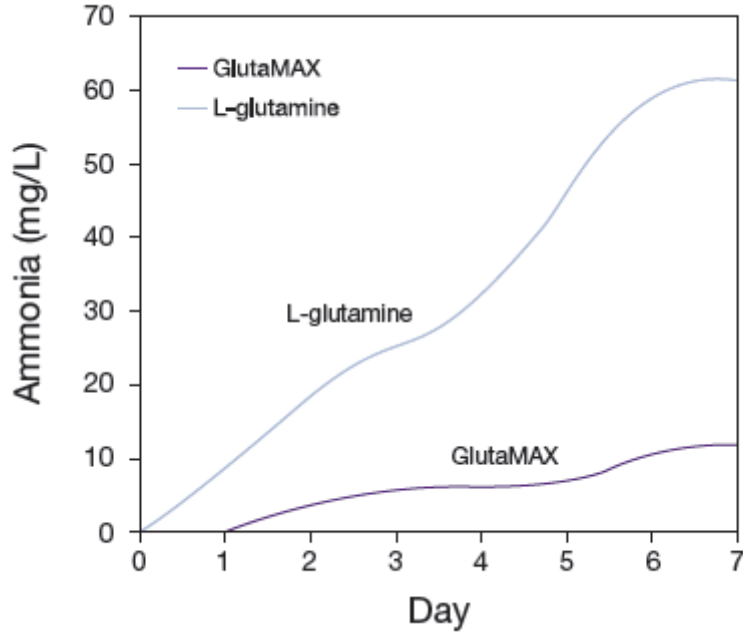
Aminoasitler hücrelerde protein sentezinin hammaddesidir. Tüm hücreler 12 esansiyel aminoasite ihtiyaç duyarlar: Esansiyel aminoasitler, L formundaki arjinin, sistein, izolösin, lösin, lizin, metiyonin, fenilalanin, treonin, triptofan, histidin, tirozin ve valindir. Bu aminoasitler mutlaka kültür besiyerine eklenmelidir çünkü hücreler tarafından sentezlenemez. Hücre metabolizmasında önemli bir rol oynayan glutaminin önemi de çok büyüktür. Nitrojen içeren glutaminin pürin ve pirimidinin kaynağı olmasının yanısıra, tri-, bi-, mono-fosfat asit glikozitlerin sentezi için esansiyeldir. Sıvı besiyerinde glutamin 37<sup>0</sup>C'de hızlı bir şekilde toksik amonyağa degrade olur. Bu yüzden besiyeri sadece kullanılmadan önce, kullanılacak miktar kadar ısıtılmalıdır. En iyi hücre performansını sağlamak için kullanımdan önce besiyerine glutamin takviyesi yapmak gereklidir. Klasik besiyeride L-glutamin genellikle 0,002 mol/L konsantrasyonunda kullanılır [33], [34].



Şekil 2.10 L-glutaminin, pH ve sıcaklığa bağlı olarak amonyağa ve pirolidon karboksilik asite dönüşmesi [32].

Hücre kültürlerinde L-glutamin yerine kullanılabilen başka bir alternatif olan stabil Glutamin (L-alanil-L-glutamin) ya da aynı içeriğe sahip ticari adıyla GlutaMAX (Gibco)'tır [32], [33]. (Şekil 2.10) Uzun süreli kültürlerde GlutaMAX, toksik amonyak oluşumunu minimuma indirmekte, besiyeri stabilitesini yükseltmekte ve hücre performansını arttırmaktadır (Şekil 2.11). Dipeptit yapısı, inkübasyon sırasında veya dışarıda saklanırken degrade olmamaktadır Yapılan bir çalışmada Dulbecco's Modified Eagle Medium; GlutaMAX veya L-glutamin ile takviye edilip tüplere ayrılmış ve 37 °C'de

saklanmıştır. Numuneler her gün alınıp ve -20 °C' de dondurulduktan sonra amonyak seviyeleri, yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile belirlenmiştir [34].



Şekil 2.11 GlutaMAX ve L-glutamin eklenmiş besiyeride amonyak seviyeleri [32]

Esansiyel olmayan aminoasitlerin takviyesi de hücre büyümesini stimule edip canlılık süresini uzatabilir [33].

#### 2.4.3.5 Vitaminler

Hücre kültürlerinde serum, vitaminlerin önemli bir kaynağıdır. Buna rağmen, birçok besiyeri aynı zamanda vitaminlerle zenginleştirilmiştir. Vitaminler, sayısız kofaktörün öncüsüdür. Birçok vitamin, özellikle de B grubu vitaminleri, hücrelerin büyümesi ve çoğalması için gereklidir. B12 vitamini bazı hücre hatları için esansiyeldir. Bazı besiyerilerde A ve E vitaminlerinin seviyeleri yükseltilmiştir [33].

#### 2.4.3.6 Proteinler ve Peptitler

Proteinler ve peptitler bilhassa serumsuz besiyerilerde çok önemlidir. En yaygın proteinler ve peptitler; normalde serumun içerisinde de bulunan albümin, transferrin, fibronektin ve fetuin içerir [33].

#### **2.4.3.7 Yağ asitleri ve Lipitler**

Proteinler ve peptidler gibi, yağ asitleri ve lipitler de serumsuz besiyeride önemlidir. Kolesterol ve steroid gibi esansiyel olan bileşikler normalde serumda bulunmaktadır [31].

#### **2.4.3.8 İz Elementler**

Çinko, selenyum, bakır ve trikarboksilik asit ara ürünler iz elementlerdir. Selenyum, detoksifiye edici özelliğindedir ve serbest radikallerin uzaklaştırılmasını sağlar [33].

#### **2.4.3.9 Serum**

Serum; hemaleucinin plazmasından yapılır ve albümin, büyüme faktörleri ve büyüme inhibitörlerinin bir karışımıdır. Hücre kültür besiyerinin en önemli bileşenidir. En çok kullanılan serum fetal sıgır serumudur. Yenidoğan buzağı serumu ve at serumu da kullanılmaktadır. Fetal sıgır serumu içlerinde en kalitelisidir, çünkü dış çevreden etkilenmemiştir ve en düşük seviyede antikora sahiptir [33], [34]. Bazı serum bileşenleri Çizelge 2.2'de gösterilmiştir. Serumun birçok avantajı bulunmaktadır:

##### *Esansiyel yapı maddeleri içermesi*

Serumda hücre büyümesi için gerekli olan birçok aminoasit, vitamin, inorganik mineral, yağ ve nükleik asit türevi bulunmaktadır.

##### *Adherans ve bağlanma faktörleri içermesi*

İn vitroda kültürü yapılan birçok hücre büyümek için kültür kabına tutunur ve bu durum ekstraselüler matrikse bağlıdır. Hücreler *in vivo*da ekstraselüler matriks salgılar fakat bu yetenekleri pasaj sayısı arttıkça azalır ve hatta kaybolur. Serum hücre adheransını sağlayıcı; fibronektin, laminin gibi çeşitli komponentleri içerir [34].

##### *Hormonlar ve çeşitli büyüme faktörlerini içermesi*

Serum; insülin, adrenokortikal hormon (hidrokortizon, deksametazon), steroid hormon, (estradiol, testosteron ve progesteron) vb. hormonları ve fibroblast büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörü ve trombositik büyüme faktörü gibi çeşitli büyüme faktörlerini içerir [34].

Çizelge 2.2 Bazı Serum Bileşenleri [34]

Bileşen	Ortalama Konsantrasyon	Bileşen	Ortalama Konsantrasyon
Na <sup>+</sup>	137 mol/L	Alkalın fosfomonoesteraz	225,0 U/L
K <sup>+</sup>	11 mol/L	Laktik dehidrojenaz	860,0 U/L
Cl <sup>-</sup>	103 mol/L	İnsülin	0,4µg/L
SeO <sub>3</sub> <sup>-2</sup>	26 µg/L	Tiroit stimülatör	1,2 µg/L
Ca <sup>2+</sup>	136 mg/L	Folikülstimule edici hormon	9,5 µg/L
Fibronektin	35 mg/L	Sığır somatotropin	39 µg/L
Üre Asidi	29 mg/L	Prolaktin	17 µg/L
Kreatin	31 mg/L	T <sub>3</sub>	1,2 µg/L
Hemoglobin	113 mg/L	Kolesterol	310,0 µg/L
Bilirubin (toplam)	4 mg/L	Kortizon	0,5 µg/L
İnorganik fosfat	100 mg/L	Testosteron	0,4 µg/L
Glukoz	1250 mg/L	Progesteron	80,0 µg/L

*Bağlayıcı proteinlerini içermesi*

Bağlayıcı proteinler, düşük moleküler ağırlıklı maddeleri taşır. Örneğin, albümin vitaminleri, yağları (yağ asidi, kolesterol) ve hormonları; transferrin demiri taşır [34].

#### *Bazı spesifik hücreler için koruma sağlaması*

Bazı hücreler (epital, myeloid hücreler) serumdaki anti-proteaz bileşeni tarafından nötralize edilen bir proteaz (tripsin) salar. Serum tripsinin etkisini sonlandırmak için kullanılmaktadır. Serum albümin, serum vizkozitesini arttırır ve özellikle süspanse haldeki hücre kültürlerini mekanik zararlardan korumaktadır. İz elementler de metabolik detoksifikasyonda önemli rol oynamaktadır [34].

Serumun birçok avantajı olmasına rağmen, dezavantajları da bulunmaktadır. Birçok hücrede serum, *in vivoda* fizyolojik bir sıvı değildir. Hücreler sadece zarar gördüklerinde, bu zararı iyileştirmede ya da kan koagülasyonunda serumla bağlantı kurar. Bu nedenle serum kullanımı bazı hücrelerin normal durumunu değiştirebilir. Serum bazı hücrelerde büyümeyi desteklerken (fibroblast gibi) bazı hücrelerde (epidermalkerotosit vb.) ise proliferasyonu engelleyebilir. Bazı bileşenler hücreler için toksik olabilir. Örneğin yüksek çoğalma oranına sahip hücrelerde poliaminoksidaz, poliaminle (spermin ve spermidin gibi) reaksiyona girer ve toksik polispermin oluşturur. Ek olarak, antikolar ve bakteriyotoksin hücre büyümesini etkileyebilir; hatta hücre ölümüne yol açabilir. Her serum serisi diğerlerinden farklıdır ve bileşenler uniform değildir. Serum üretim süreçlerinde mikoplazma ya da virüslerle enfeksiyon olduğunda ve bu serum hücre kültürlerinde kullanıldığında hücreler etkilenir ve yapılan deneylerde yanlış sonuçlar elde edilebilir [34].

#### **2.4.3.10 Antibiyotikler ve Antimikotikler**

Antibiyotikler ve antimikotikler, seçici olarak bakteri ve mantarların üremelerini baskılar. Penisilin, streptomisin, gentamisin ve amfoterisin B geniş çapta kullanılmaktadır. Penisilin ve streptomisin, gram pozitif ve gram negatif bakterilerde protein biyosentezini ve hücre duvarı sentezini önlemektedir. Bu antibiyotikler, profilaksi için hücre kültüründe rutin olarak kullanılmaktadır. Gentamisindeki amino glikozit, bakteriyal ribozomun 30S altbirimine bağlanmakta ve böylece protein biyosentezini engellemektedir. Amfoterisin B, doku kültürlerinde antifungal ajandır. Fungal ve maya hücrelerinin hücre membranlarını, bu hücrelerden katyon kaybıyla etkilemektedir. Membran proteinlerinin inhibisyonu ile birlikte fungi ve maya hücreleri ölmekte fakat virüs ve bakteriler etkilenmemektedir [35].

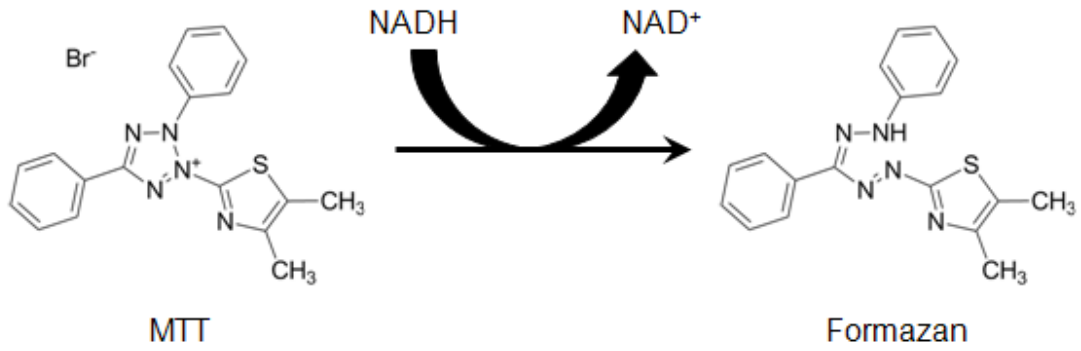
#### 2.4.4 Hücre Canlılık Testleri

Çoklu-kuyucuklu plaklarla hücre canlılığını ölçmede farklı kolorimetrik testler uygulanabilir. Bu testlerde, canlı hücrelere bağlanan marker aktivitesi baz alınır. Hücre bazlı testler genel olarak istenilen moleküllerin hücre çoğalması üzerine etkisini ve sitotoksik aktivitelerinin görüntülenmesi için uygulanmaktadır. Canlı ökaryotik hücre sayısının belirlenmesi amacıyla çok çeşitli testler vardır. Bunlardan bazıları şunlardır: Tetrazolyum redüksiyonu, adenzin trifosfat (ATP) deteksiyonu, proteaz markerları, rezazurin redüksiyonu [36].

Tetrazolyum redüksiyonu, rezazurin redüksiyonu ve proteaz aktivite testleri canlı hücrelerin genel metabolizmasını veya bir enzimatik aktivitesini belirlemede marker olarak kullanılırlar. Tüm bu testler reaktifin hücrelerle inkübasyonunu ve canlı hücrelerde renkli ya da floresan ürün oluşturmasını baz almaktadır. Plak okuyucularla canlı hücre sayısı belirlenebilir. Eğer hücreler ölmüşse, ürün oluşumu da olmayacaktır. ATP deteksiyonunda ise canlı hücrelere reaktifle inkübasyon periyodu yoktur [36].

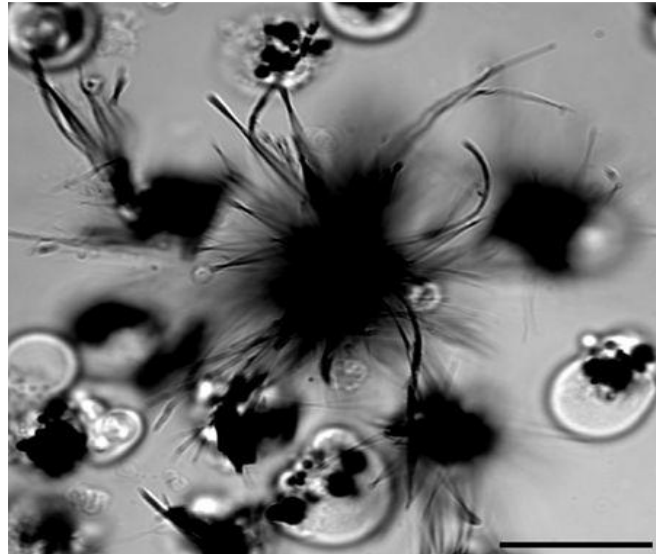
Birçok tetrazolyum bileşeniyle hücre canlılığı tespit edilebilir. En çok kullanılan tetrazolyum bazlı testler; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS), 2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT) ve 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolyum (WST-1)'dir. MTT pozitif yüklüdür ve kolaylıkla canlı hücreye penetre olabilir. MTS, XTT ve WST-1 negatif yüklüdür ve MTT kadar kolaylıkla hücreye penetre olamazlar. Bunlar tipik olarak tetrazolyumun renkli formazan ürününe dönüşüm redüksiyonunu kolaylaştırmak için sitoplazmadan veya plazma membranından elektron transfer eden bir elektron alıcı ile birlikte kullanılırlar [36].

Günümüzde MTT; sitotoksikite analizlerinde, hücre canlılığını ve üremesini ölçmede hücre biyolojisi çalışmalarında geniş çapta kullanılmaktadır [37].



Şekil 2.12 MTT ve renkli formazan ürününün yapısı [36]

MTT substratı dengeli tuz tamponu içerisinde hazırlanır. Genel olarak son konsantrasyonu 0,2-0,5 mg/ml'dir ve hücre kültürüne eklendikten sonra 1-4 saat arası inkübasyon gerektirir [36]. Çözünabilir özellikteki MTT, mitokondriyal dehidrojenazlar ile redüksiyonunda metabolik olarak aktif hücrelerde sarımtırak renkten mor-mavi çözünmeyen formazana dönüşür (Şekil 2.12). Yağda çözünebilen formazan ürünü, organik solventlerle ekstrakte olup UV-Vis spektroskopisiyle maksimum 570 nm dalga boyunda ölçülebilir. Genel olarak referans dalga boyu olarak 630 nm kullanılmaktadır ama çoğu testte gerekli değildir [30], [38]. MTT testi, mitokondriyal fonksiyonu ve mitokondriyal aktivitedeki değişimi değerlendirmede indikatör olarak uygundur [38].



Şekil 2.13 U937 hücrelerinin MTT ile 3 saatlik inkübasyonundan sonra oluşan formazan kristalleri. [38]

Hücreler öldüğünde, MTT'yi formazana dönüştürme yeteneğini kaybederler. MTT redüksiyonunun mekanizması tam olarak anlaşılmamıştır fakat reaksiyon muhtemelen NADH ya da benzer indirgeyici moleküllerin MTT'ye elektron transferini içermektedir [38].

Absorbans okumasında formazanın çözünür olması gerekmektedir. Formazan ürününü çözmede, rengi stabil tutmada, uçuculuğu önlemede ve fenol kırmızısı ya da diğer kültür besiyeri bileşenlerinin etkisini önlemede birçok metot vardır. Çeşitli çözme yöntemleri asitleştirilmiş izopropanol, dimetil sülfoksit (DMSO), dimetilformamid, sodyum dodesil sülfat ve diğer deterjan ya da organik solvent kombinasyonlarını içerir [38].

Hücreler tarafından MTT'nin formazana dönüşümü zaman bağımlı bir reaksiyondur. Uzun inkübasyon süresi renk akümüülasyonunu ve duyarlılığı bir noktaya kadar arttırabilir; fakat reaktiflerin sitotoksitesi dolayısıyla inkübasyon süresi sınırlıdır [38].

## **2.5 Biyolojik Kontaminasyon**

Kültür kontaminasyonu, hücre kültür laboratuvarlarında görülen en yaygın problemdir ve bazen çok ciddi sorunlara yol açar. Kültür kontaminantları, kimyasal ve biyolojik kontaminantlar olmak üzere iki ana başlıkta toplanabilir. Kimyasal kontaminantlara örnek olarak besiyeri, serum, su, endotoksin, plastikleştirici, deterjan verilebilir. Biyolojik kontaminantlar ise diğer hücre hatlarıyla çapraz kontaminasyona girebilen bakteri, küf, maya, virüs ve mikoplazmadır [39].

Bakteriyal kontaminasyon genellikle gözle farkedilebilir. Kültür besiyerindeki aniden artan bulanıklık ve pH değişimi sonucu besiyeride renk değişimi ortaya çıkmaktadır [39].

Mikoplazmalar, hücre duvarı olmayan ve hücre duvarı sentezleyemeyen, 0,3 mikrometre çapında, filamentli ya da koküs yapıda olabilen en küçük prokaryotlardandır. *M. hyorhins*, *M. arginini*, *M. orale*, *M. fermentans* ve *Acholeplasma laidlawii* olarak, kültür kontaminasyonuna yol açan beş büyük türü vardır [39].

Mikoplazma enfeksiyonu, hücre kültüründe bakteriyal ve fungal enfeksiyonlardan çok daha kötü etkilere yol açabilmektedir. Bu etkilere örnek olarak değişen büyüme oranı, morfolojik değişiklikler, kromozom hasarları ve amino asit ve nükleik asit metabolizmasındaki değişiklikler verilebilir [39].

Enfekte serum kullanımı hücre hatlarında viral kontaminasyona yol açmaktadır. Sığır serumu, sığır viral diyare virüsü (BVDV) kontaminasyonu için potansiyel bir kaynaktır. BVDV ile kontaminasyon büyüme oranında küçük bir değişikliğe neden olabilir, ancak bu virüs sitopatik olmadığından kültürdeki makroskopik ve mikroskopik değişiklikler saptanamaz [38]. Bazı hücre hatları endojen virüsleri içerir ve virüs partikülleri salgılar ya da yüzeylerine viral antijenleri eksprese eder (örneğin Ebstein-Barr Virüs transforme hattı). Bu hücre hatları viral kontaminasyon olarak değerlendirilemez [38].

## **2.6 Biyogüvenlik ve Biyogüvenlik Kabinleri**

Biyogüvenlik, özellikle insanlar için potansiyel patojenik tehlike içeren “materyal, infeksiyöz mikroorganizmalar veya onların genetik ya da toksik komponentleri ile yapılan çalışmaların, insan ve çevre için güvenli şekilde yapılmasını sağlamak amacıyla laboratuvar alt yapı, tasarım, ekipman, teknik ve uygulamalarının en uygun kombinasyonu” olarak tanımlanabilir. Biyogüvenliğin amacı çalışanları, diğer insanları ve çevreyi potansiyel tehlikeli mikrobiyolojik ajanlardan korumaktır [40].

Biyogüvenlik tanımına uygun olarak, hücre kültürü çalışmalarının yapılacağı laboratuvarlar, dört farklı seviyede dizayn edilmiştir. Biyogüvenlik seviye 1 (BSL-1) ve seviye 2 (BSL-2) “Temel Laboratuvarlar” dır. Biyogüvenlik seviye 3 (BSL-3) “Tecrit Laboratuvarı”, Biyogüvenlik seviye 4 (BSL-4) laboratuvarı ise “Maksimum Tecrit Laboratuvarı” olarak adlandırılır [40].

Biyogüvenlik seviyelerine uygun olarak tasarlanmış hücre kültürü laboratuvarlarında bulunan biyogüvenlik kabinleri (ya da biyolojik güvenlik kabini) Yüksek-Verim Parçacık Yakalama filtresine sahiptir ve personeli ya da hem personeli ve hem de deneyi sağlığa zararlı maddelerden korur [40].

Çizelge 2.3 Bazı mikroorganizmalar için biyolojik ajan sınıflandırması [40]

Biyolojik Ajan Bakteriler	BSL Sınıfı (risk grubu)	Biyolojik Ajan Virüsler	BSL Sınıfı (risk grubu)	Biyolojik Ajan Parazitler	BSL Sınıfı (risk grubu)
<i>Actinomyces sp.</i>	2	Adenoviridae	2	<i>Leishmania donovani</i>	3
<i>Bacillus anthracis</i>	3	Nopeia	2	<i>Plasmodium falciparum</i>	3
<i>Brucella canis</i>	3	Deng	3	<i>Ascaris lumbricoides</i>	2
<i>Chlamydia psittaci</i>	3	Ebola	4	<i>Echinococcus granulosus</i>	3
<i>Clostridium botulinum</i>	2	Hepatit C ve G	3	<i>Naegleria fowleri</i>	3
<i>Mycobacteria tuberculosis</i>	3	İnfluenza	2	<i>Hymenolepis nana</i>	2
<i>Mycobacteria microti</i>	3	Kızamık	2	<i>Fasciola hepatica</i>	2

Sınıf I, Sınıf II ve Sınıf III olmak üzere üç çeşit biyogüvenlik kabini (hücre kültürü kabini) vardır. Sınıf I tipi kabinlerde laboratuvar personeli ve çevre için önemli koruma dereceleri olmasına rağmen hücre kültürlerinin kontaminasyonu için koruma sağlamaz. Dizayn olarak hava akışlı kabine, karakteristik olarak ise çeker ocağa benzemektedir [39].

Sınıf II biyogüvenlik kültür kabinleri, BSL-1, 2 ve 3 için uygun olarak dizayn edilir ve aynı zamanda hücre kültürü çalışmalar için aseptik çevre koşullarını sağlamaktadır. Potansiyel olarak zararlı materyaller (virüsle enfekte kültürler, radyoizotoplar, karsinojenik veya toksik ajanlar) için kullanılmaktadır [39].



Şekil 2.14 Biyogüvenlik kabinlerinin sınıflandırılması [41]

a) Sınıf I biyogüvenlik kabini, b) Sınıf II biyogüvenlik kabini, c) Sınıf III biyogüvenlik kabini

Sınıf III biyogüvenlik kültür kabinleri, gaz-geçirmezdir ve personel ve çevre için yüksek derecede koruma sağlar (Şekil 2.14). İnsan patojenleri ve diğer BSL-4 materyalleri için kullanılmaktadır [39]. Çizelge 2.3'te bazı biyolojik ajanların dahil oldukları risk grubu sınıfları belirtilmiştir.

#### 3.1 Deneylerde Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

##### 3.1.1 Kullanılan Cihazlar

Deneyisel çalışmalarda kullanılan cihazlar aşağıda verilmiştir:

Laminar flow kabin

CO<sub>2</sub> İnkübatör (Heracell 150i)

Vorteks (WhırlıMixer B-784)

Ters mikroskop (Olympus)

Hassas terazi (Presica)

Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı (Heidolph)

ELISA okuyucu (Biotek Eon)

Distile su cihazı

Buzdolabı

Sıvı azot tankı

Otoklav

Santrifüj

Ph metre (Inolab)

Plate Çalkalayıcı (Heidolph Unimax 1010)

### 3.1.2 Kullanılan Kimyasallar ve Besiyerileri

Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallar, besiyerileri ve üretici firmalarıyla beraber katalog numaraları çizelge 3.1’de verilmiştir.

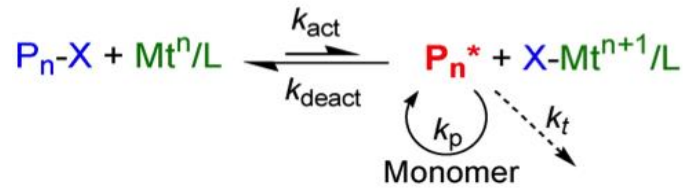
Çizelge 3.1 Deneyslerde Kullanılan Kimyasallar ve Besiyerileri

MADDE ADI	ÜRETİCİ FİRMA	KATALOG NO
Fetal Sığır Serumumu	PAN	P40-1401
Tripsin-EDTA	PAN	P10-023100
MEM	PAN	P04-08050
Glutamax	Gibco	35050061
Antibiyotik-Antimikotik (100x)	Life Tech	15240-062
Disodyum hidrojen fosfat	Merck	1065861000
Sodyum klorür	Merck	1064001000
Potasyum klorür	Merck	1049361000
Potasyum dihidrojen fosfat	Merck	1048771000
Tripan mavisi solüsyonu	Sigma-Aldrich	VWRSAT8154
SDS	Acros Organics	AC230420250
MTT	Acros Organics	AC15899
EDTA	Invitrogen	15576-028
Tripsin	Sigma	T-4799
MEM	Sigma	M0268
DMSO	Sigma	D2650

### 3.2 Fonksiyonel Polimerler

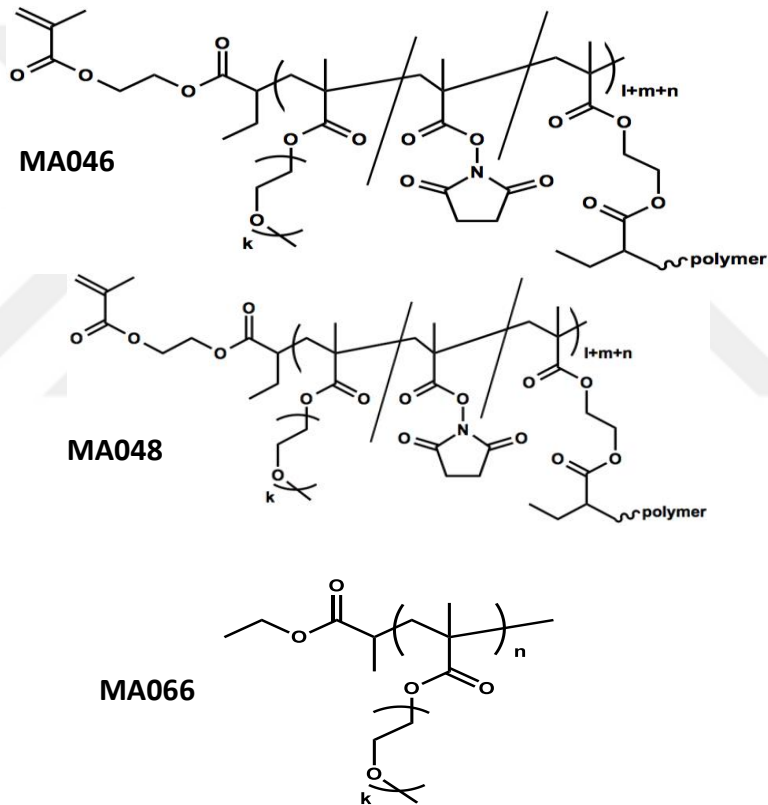
Süksinimidil ester fonksiyonlu dallanmış PEG temelli polimerler N-MAS ve PEGMA’nın kendine yoğunlaşan vinil polimerizasyonu ve ATRP tekniklerinin kombinasyonu rastgele kopolimer oluşturacak şekilde hazırlanan polimerler Mustafa Y. Ateş tarafından sentezlenmiş ve sağlanmıştır. İmimer olarak 2(2-bromobutyryloxy)ethyl methacrylate

(BBEMA), ligand olarak pentamethyldiethylenetriamine (PMDETA) ve katalizör olarak bakır(I) klorür kullanılmıştır. (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 ATRP'nin mekanizması

Şekilde  $P_n-X$  alkil halojenürü, başlatıcı ya da makrobaşlatıcıyı,  $P_n$  aktif polimer radikalini,  $Mt^n$  geçiş metalini,  $Mt^n/L$  geçiş metal kompleksini, L ligandı ve X; Br, Cl gibi bir halojeni ifade etmektedir.



Şekil 3.2 Elde edilen polimerlerin genel yapısı

Sentezlenen fonksiyonel polimerlerin içerdikleri fonksiyonel gruplar ve fiziksel yapıları Çizelde 3.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2 Kullanılan fonksiyonel polimerlerin özellikleri

Polimer	Fonksiyonel grup	Fiziksel Yapısı
MA046	süksinimidil ester	Aşırı dallanmış
MA048	süksinimidil ester	Aşırı dallanmış
MA066	-	Lineer

Fonksiyonel polimerlerin equivalent oranları aşağıdaki gibidir:

MA046: [PEGMA]:[NMAS]:[BBEMA]:[Cu(I)Cl]:[PMDETA] = 90:7:3:1:1,2

MA048: [PEGMA]:[NMAS]:[BBEMA]:[Cu(I)Cl]:[PMDETA] = 80:17:3:1:1,2

MA066: NMAS içermez.

### 3.3 Deneylerde Kullanılan Çözeltiler

#### 3.3.1 1x Phosphate Buffered Saline (PBS) Tamponunun Hazırlanması

Hassas tartıda 8 g NaCl, 0,2 gr KCl, 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tartıldı ve manyetik karıştırıcıda 900 ml distile suda çözündürüldü. pH 7.4'e ayarlanıp distile suyla 1 litreye tamamlandı. Otoklavda 1 atm basınçta, 121°C'te sterilize edildi. Çözelti önce 0,45 mikrometrelik sonra 0,22 mikrometrelik filtreden geçirildi. +4°C'ta 1 ay kullanılmak üzere saklandı.

#### 3.3.2 Tripsin-EDTA Solüsyonunun Hazırlanması

100 mg tripsin ve 20 mg EDTA hassas tartıda tartılarak 50 ml PBS'de çözündürüldü. Hazırlanan bu çözelti 0,22 mikrometrelik filtreden geçirilerek sterilize edildi. 2 ml'lik hacimlere bölünerek -20 °C'ta saklandı.

#### 3.3.3 Hücre Kültürü Besiyerinin Hazırlanması

1 kutu MEM, 100 ml PBS'de çözündürüldü. 0,22 mikrometrelik filtreden geçirildi. 20 ml'si farklı bir şişeye konuldu. Üzerine 20 ml FBS eklendi ve 150 ml'ye kadar distile suyla tamamlandı. 2 ml antibiyotik-antimikotik eklendi. Üzerine yaklaşık olarak 1,5 ml

kadar  $\text{NAHCO}_3$  eklendi (Renk nar kırmızısı olana dek 2 ml'ye kadar  $\text{NAHCO}_3$  eklenebilir.). Çözelti distile suyla 200 ml'ye tamamlandı. +4 °C'de saklandı.

### **3.3.4 Hücre Dondurma Solüsyonunun Hazırlanması**

% 45 FBS, % 10 DMSO ve % 45 MEM içeren solüsyon hazırlandı ve -20 °C'de saklandı.

### **3.3.5 MTT Solüsyonunun Hazırlanması**

1x 1ml PBS'de 5 mg MTT olacak şekilde hazırlandı. 5 ml'lik bir MTT solüsyonu için 25 mg MTT tartılarak 5 ml PBS'de vorteksenerek çözündürüldü ve 0,22 mikrometrelik filtreden geçirilerek sterilize edildi. MTT ışığa duyarlı olduğundan dolayı bu işlemler karanlıkta yapıldı. Solüsyonun uzun süre kullanılması amaçlanmıyorsa -20°C'ta küçük hacimlerde saklandı. Kısa süreli kullanımlar için ise 4°C'ta saklandı.

### **3.3.6 Polimer Çözeltilerinin Hazırlanması**

Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Polimer Laboratuvarı'ndan sağlanan MA046, MA048, ve MA066 kodlu polimerler, steril 50 ml plastik tüpler içerisine sırasıyla 35 mg, 20 mg ve 48 mg alınarak İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Proteomik Laboratuvarı'na getirildi. Konsantrasyonları 10 mg/ml olacak şekilde üzerlerine otoklavlanmış distile su eklenip vorteksenerek, ultrasonikasyonla ve pipetajla çözüldü. Bu stok çözeltilerden 1'er ml alınarak MEM ile 10 ml'ye tamamlandı. Böylece hücrelerle muamele edilen stok konsantrasyonun 1000 µg/ml olması sağlandı. Sitotoksisite analizlerinde kullanılmak üzere MEM içeren 1000 µg/ml'lik stoktan, son hacim 1500 µl olacak şekilde 500, 100, 25, 1, 0,1 µg/ml'lik polimer konsantrasyonları hazırlandı.

## **3.4 Hücre Kültürü Çalışmaları**

### **3.4.1 Hücrelerin Kriyobanktan Çıkarılması**

Sıvı azot tankından çıkarılan Vero ve HeLa hücre hatlarının olduğu kriyotüpler avuç içi ile ısıtılarak eritildi. Çözünen süspansiyon üzerine %10 FBS içeren 5 ml MEM eklendi ve 1000 rpm de 5 dk boyunca santrifüj edildi. Supernatant atıldıktan sonra karışım üzerine

az miktarda besiyeri eklenerek yavaşça pipetaj yapıldı. Hücreler önceden besiyeri eklenmiş 25 cm<sup>2</sup>'lik flaslara ekildi.

#### **3.4.2 Hücrelerin Çoğaltılması**

Hücreler flaslara ekildikten sonra %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 37 °C'de inkübe edilmiştir. Hücrelerin kriyobanktan çıkarıldıktan sonra yeterli büyüme seviyesine ulaşmaları yaklaşık 2 hafta kadar sürmektedir. Bu süreçte iki protokol takip edildi: Hücrelerin besiyerilerinin değiştirilmesi ya da pasaj işlemi uygulanması.

#### **3.4.3 Hücre Besiyerilerinin Değiştirilmesi**

Mikroskopla incelendiğinde hücrelerin %60-70'ten daha az miktarda flaskı kaplaması durumunda, ortamdaki hücresel atıkların uzaklaştırılması sebebiyle besiyeri değişimi yapıldı. Flasklar inkübatörden alınıp flow kabine konuldu. Flasktaki besiyeri uzaklaştırıldı ve flasklar 5'er ml PBS ile birer kez yıkandı. Yıkama işleminden sonra PBS uzaklaştırılarak flaslara önceden 37 °C'ta ısıtılmış olan 5 ml taze besiyeri eklendi. Flask tekrar inkübatöre yatay şekilde konuldu.

#### **3.4.4 Hücrelerin Pasajlanması**

Hücreler flaskı %80 ve daha fazla kapladıklarında pasaj işlemi uygulandı. Flasklar inkübatörden çıkarılarak kabine konuldu. Flasklardaki besiyeri uzaklaştırıldı ve 5'er ml PBS ile yıkama yapıldı. Yıkamadan sonra PBS uzaklaştırılarak flaslara 1'er ml tripsin-EDTA solüsyonu eklendi ve 5 dakika boyunca inkübatörde bekletildi. 5 dakika sonra flask mikroskopta incelendiğinde hücrelerin flask tabanından kalktıkları görüldü. Hücrelerin kalkmadığı görüldüğünde flask tabanına çok yavaş bir şekilde vurularak veya inkübatörde 1 dakika daha bekletilerek yerlerinden kalkmaları sağlandı. Hücrelerin tekrar monolayer oluşturmaması için flask dik bir şekilde kabine konularak üzerine 5 ml MEM eklendi ve tripsin enziminin inhibe olması için pipetaj yapıldı. Bu süspansiyondan 20 µl alınarak üzerine 20 µl tripan mavisi eklendi ve Neubauer lamında sayım yapıldıktan sonra son konsantrasyon 1 x 10<sup>5</sup> hücre/ml olacak şekilde MEM ile sulandırılma yapıldı ve 5 ml'lik hacimler halinde yeniflasklara ekim yapıldı. Vero ve HeLa hücreleri için haftada 2 pasaj işlemi uygulandı.

#### **3.4.5 Hücrelerin Sayılması**

Hücreler belirli bir yoğunluğa ulaştıktan sonra son konsantrasyonu  $1 \times 10^5$  hücre/ml olacak şekilde yeni flasklara ekimi gerçekleştirildi. Bunun için, pasaj işlemi gerçekleştirildikten sonra tripan mavisi-hücre solüsyonu neubauer lamına konularak mikroskopta sayım yapıldı.

#### **3.4.6 Hücrelerin Dondurulması**

Hücreler belirli yoğunluğa ulaştıktan sonradan tekrardan kullanım için bir kısmı dondurulmuştur. Hücre dondurma medyumuna farklı konsantrasyonlarda hücreler konularak  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

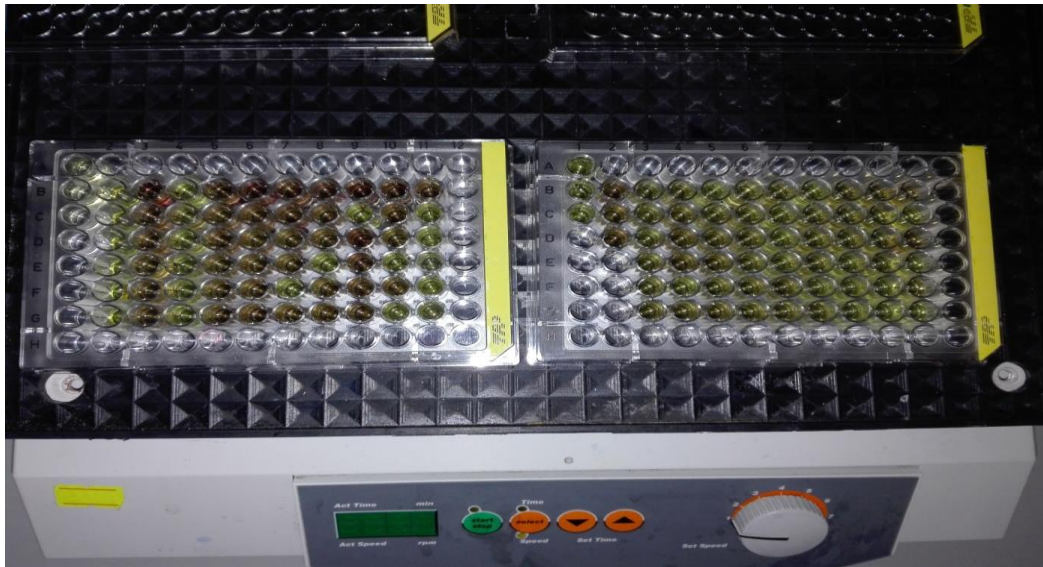
#### **3.4.7 MTT Testiyle Polimerlerin Sitotoksisite Analizlerinin Yapılması**

Hücreler flaskın %80 ve daha fazlasını kapladığında, tripsinizasyon ve sonrasında neubauer lamında sayım yapıldı. Hücreler  $10^5$  hücre/ml konsantrasyonda olacak şekilde MEM ile seyreltildi. Köşelere denk gelen sıralar boşta bırakılacak şekilde hücreler 96 kuyucuklu plağa ekildi (Şekil 3.3). Ekimden sonra plak  $37^{\circ}\text{C}$ , %5  $\text{CO}_2$  içeren inkübatöre kaldırıldı. Diğer günlerde mikroskopta hücrelerin kuyucuk zeminlerini kapladığı görüldüğünde, plak flow kabine alınarak her bir kuyucuktaki besiyeri uzaklaştırılıp PBS ile iki kez yıkama yapıldı. Yıkamadan sonra; 500, 100, 25, 1 ve 0.1 ug/ml konsantrasyonlarında hazırlanan polimer çözeltileri ve kontrol kuyucuklara üç tekrarlı olarak ekildi.



Şekil 3.3 Hücrelerin 96 kuyucuklu plaklara ekilmesi

Hücrelerin polimer çözeltileriyle 72 saatlik inkübasyonu sonucunda plak inkübatörden alınarak flow kabine getirildi. Her bir kuyucuktaki çözelti uzaklaştırılarak PBS ile iki kez yıkama yapıldı. Kuyucuklara önceden 5 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan MTT reaktanından 35'er µl konuldu ve plak 4 saat inkübe edildi. 4 saat sonra plaktaki kuyucuklara 150 µl DMSO eklendi ve Şekil 3.4'te görüldüğü gibi çalkalayıcıya konarak, renk değişimi gözlenene dek beklendi. Renk değişimi olduğunda, mikroskopta formazan kristallerinin oluştuğu gözlenerek plak UV-Vis spektroskopi ile 540 nm dalga boyunda okundu.

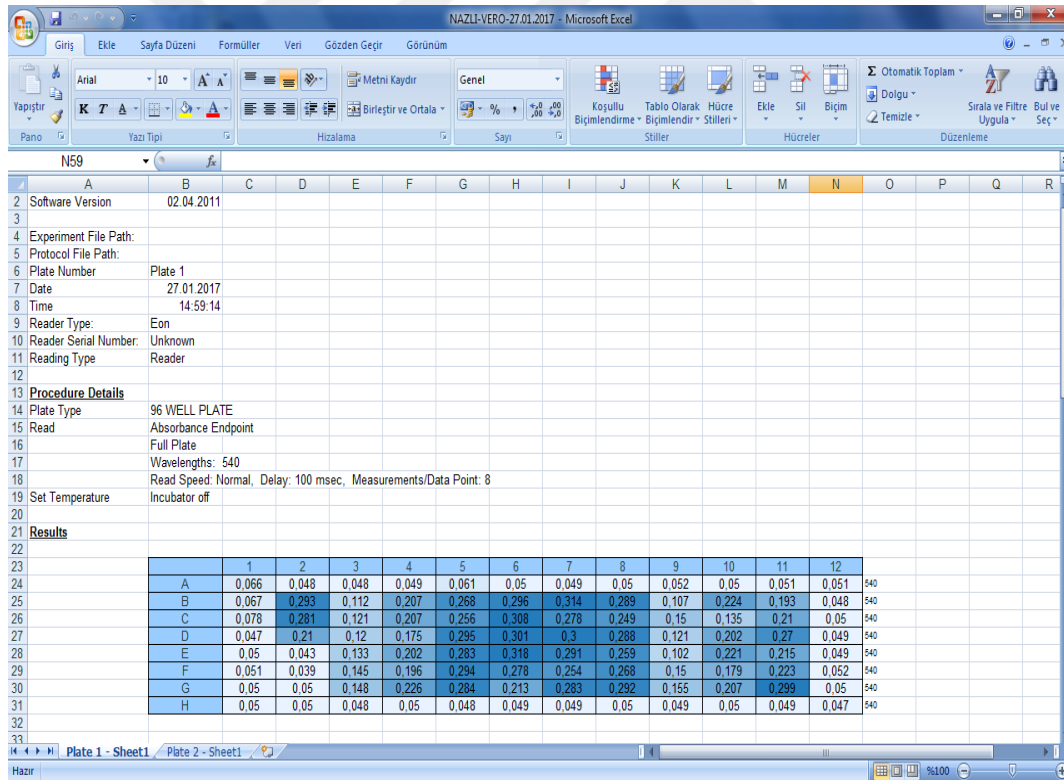


Şekil 3.4 MTT'nin DMSO ile muamelesinden sonra plakların çalkalayıcıya konulması

### 3.5 İstatistiksel Analiz

#### 3.5.1 UV-Vis Spektroskopisi Sonuçlarının Graphpad Prism Programında Analizi İçin Microsoft Excel'de Düzenlenmesi

Verilerin istatistiksel analizi yapılmadan önce, veriler Graphpad'e uyumlu hale getirildi. Spektrofotometrede okumadan sonra genellikle Microsoft Excel programı ile otomatik olarak sonuçlar karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışmada A1, B1 ve C1 blanklerin OD540 (540 nm dalga boyunda okunan absorbans) değerleri, B2 C2 ve D2 kontrollerin OD540 değerleri ve diğer değerler ise farklı konsantrasyonların sadece 1 deney içerisindeki 3 tekrarını içermektedir. Örneğin, B3, C3 ve D3 X polimerinin 500 µg/ml'lik konsantrasyonundaki OD540 değeridir. Bunu sırasıyla 100, 25, 1, 0,1 µg/ml'lik konsantrasyonlar üçer tekrarlı olarak takip etmektedir. Bu örnekte blank değerleri, OD540 değerlerinden çıkartılmamıştır (Şekil 3.5).



The screenshot shows a Microsoft Excel spreadsheet with the following data:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.066	0.048	0.048	0.049	0.061	0.05	0.049	0.05	0.052	0.05	0.051	0.051
B	0.067	0.293	0.112	0.207	0.268	0.296	0.314	0.289	0.107	0.224	0.193	0.048
C	0.078	0.281	0.121	0.207	0.256	0.308	0.278	0.249	0.15	0.135	0.21	0.05
D	0.047	0.21	0.12	0.175	0.295	0.301	0.3	0.288	0.121	0.202	0.27	0.049
E	0.05	0.043	0.133	0.202	0.283	0.318	0.291	0.259	0.102	0.221	0.215	0.049
F	0.051	0.039	0.145	0.196	0.294	0.278	0.254	0.268	0.15	0.179	0.223	0.052
G	0.05	0.05	0.148	0.226	0.284	0.213	0.283	0.292	0.155	0.207	0.299	0.05
H	0.05	0.05	0.048	0.05	0.048	0.049	0.049	0.05	0.049	0.05	0.049	0.047

Şekil 3.5 OD540 değerlerinin Microsoft Excel'de görüntülenmesi

Yeni bir Excel dosyası oluşturularak, Üç blankin, üç kontrolün ve her konsantrasyonun üçer OD540 değerlerinin ortalaması alındı.

blank=0,070				blank=0,070			
kontrol=0,261				kontrol=0,261			
	Konsan.	OD540	OD540-BLANK		Konsan.	OD540	OD540-BLANK
	500	0,118	=G11-0,07		500	0,118	0,048
	100	0,196			100	0,196	0,126
	25	0,208			25	0,208	0,138
	1	0,273			1	0,273	0,203
	0,1	0,287			0,1	0,287	0,217
	0	0,261			0	0,261	0,191

Şekil 3.6 OD540 değerlerinden blank değerinin çıkarılması

Şekil 3.7’de görüldüğü gibi her bir konsantrasyona ve kontrole denk gelen üç OD540 değerlerinin ortalamasından blanklerin OD540 değerlerinin ortalaması çıkartıldı.

blank=0,070				blank=0,070					
kontrol=0,261				kontrol=0,261					
	Konsan.	OD540	OD540-BL	%CANLILIK		Konsan.	OD540	OD540-BL	%CANLILIK
	500	0,118	0,048	=H11*100/0,191		500	0,118	0,048	25,13089
	100	0,196	0,126			100	0,196	0,126	65,96859
	25	0,208	0,138			25	0,208	0,138	72,25131
	1	0,273	0,203			1	0,273	0,203	106,2827
	0,1	0,287	0,217			0,1	0,287	0,217	113,6126
	0	0,261	0,191			0	0,261	0,191	100

Şekil 3.7 OD540 değerinden % canlılığın hesaplanması

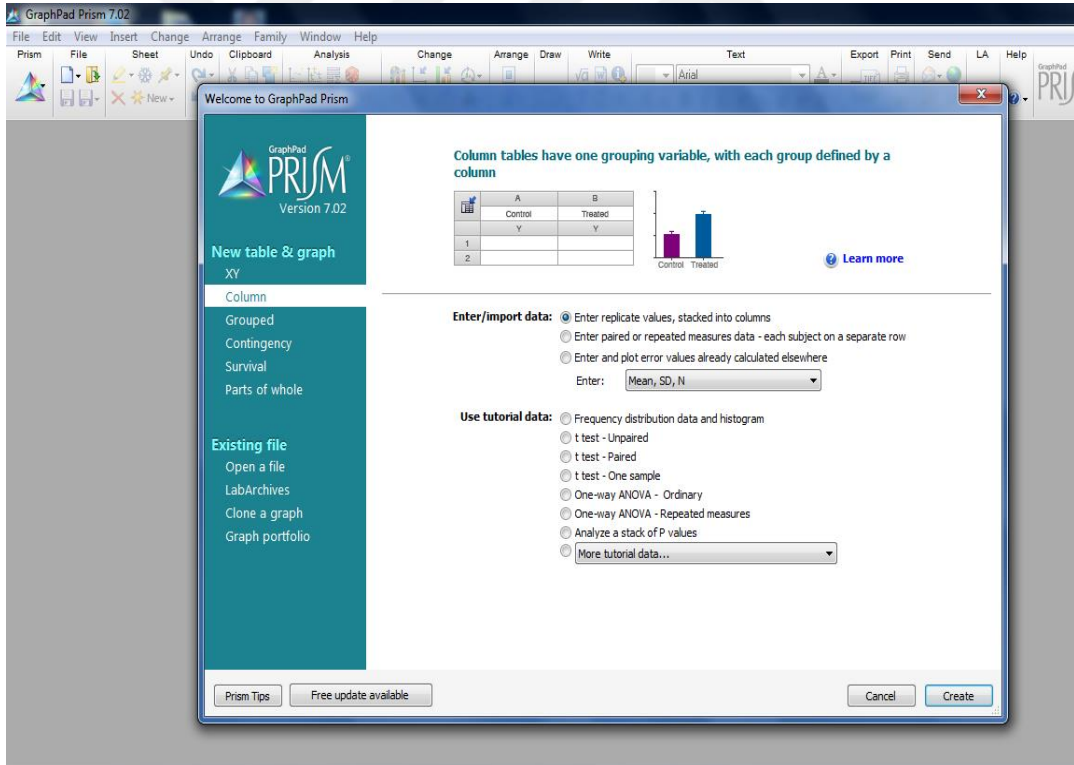
Graphpad’de grafik oluşturmak ve istatistiksel analizi gerçekleştirmek için her bir konsantrasyona ait % canlılık değerleri gerekmektedir. Bunun için de şekil 3.6’da görüldüğü gibi % canlılık hesaplandı. Bunun için her bir absorbans değeri 100 ile çarpılıp 0 µg/ml konsantrasyona denk gelen absorbans değerine bölündü. % canlılık değerleri Graphpad’de kullanılmak üzere kopyalandı (Şekil 3.8).

Polimer X						1.DENEY	2.DENEY	3.DENEY	
1.DENEY		2.DENEY		3.DENEY		100	100	100	
Konsantra	OD540	%Canlılık	OD540	%Canlılık	OD540	%Canlılık	OD540	%Canlılık	
0	0,067	100	0,075	100	0,104	100	113,4328	78,66667	100,9615
0,1	0,076	113,4328	0,059	78,66667	0,105	100,9615	92,53731	60	108,6538
1	0,062	92,53731	0,045	60	0,113	108,6538	107,4627	46,66667	129,8077
25	0,072	107,4627	0,035	46,66667	0,135	129,8077	125,3731	50,66667	108,6538
100	0,084	125,3731	0,038	50,66667	0,113	108,6538	83,58209	58,66667	109,6154
500	0,056	83,58209	0,044	58,66667	0,114	109,6154			

Şekil 3.8 % Canlılık değerleri

Spektrofotometrede ölçülen OD540 değerlerine göre istatistiksel analiz Graphpad Prism programı ile yapıldı.

### 3.5.2 Tek-Yönlü ANOVA ile Tekrarlı Sonuçların İstatistiksel Analizinin Yapılması



Şekil 3.9 GraphPad Prism programı

GraphpadPrism programını çalıştırdığımızda karşımıza ilk olarak hangi türde bir analiz yapacağımıza dair bir seçim ekranı gelmektedir (Şekil 3.9). “New table & graph” seçeneği altında Column seçeneğini tıkladığında, sağ tarafta “Enter replicate values,

stacked into columns” seçip “create” e tıklandığında, karşımıza Y değerlerimizi girebileceğimiz bir sayfa çıkmaktadır. Y (%canlılık) değerleri Group A, Group B ve Group C olarak girildi (Şekil 3.10)

Graphpad seçeneklerinde Analysis kısmında “Analyze” butonuna tıkladığımızda karşımıza birçok alternatif analiz çıkmaktadır. Column analysis başlığı altında One-way Anova’ya tıklanır. Sağ tarafta sadece Y değerlerini girdiğimiz gruplar işaretlenir ve OK’a tıklandı (Şekil 3.11).

OK’a tıklandıktan sonra karşımıza Tek-yönlü Anova parametre seçenekleri çıkmaktadır. Tekrarlı veriler olduğundan dolayı üst kısımda 2. seçenek seçildi ve “Experimental Design” in yanındaki Multiple Comparisons’a geçildi (Şekil 3.12).

GraphPad Prism 7.02 - [Project1:Data 1]

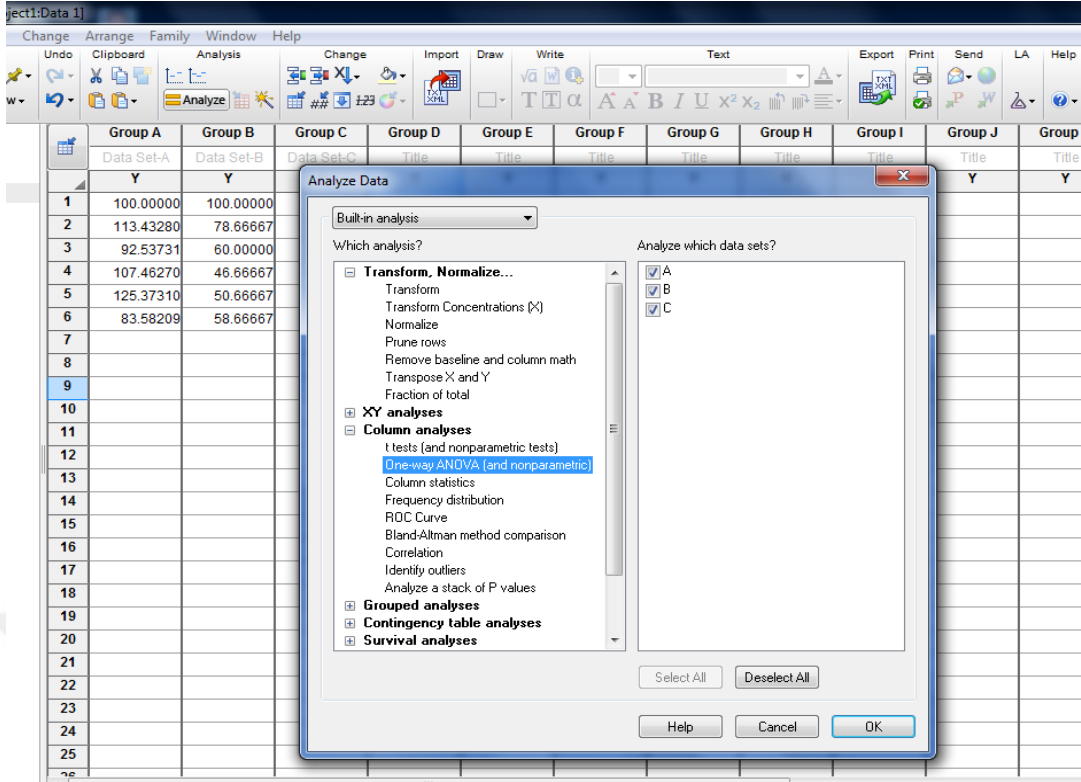
File Edit View Insert Change Arrange Family Window Help

Prism File Sheet Undo Clipboard Analysis Change Import Dra

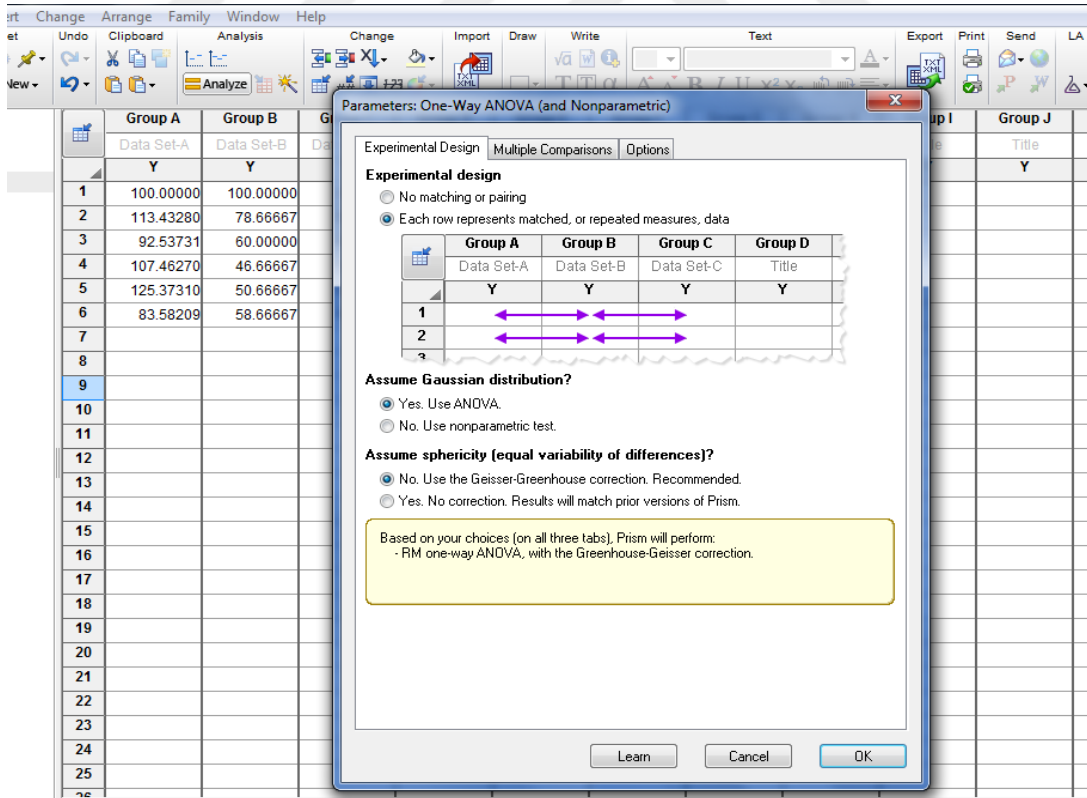
Family Search results Data Tables Data 1 Info Project info 1 Results Graphs Data 1 Layouts

	Group A	Group B	Group C	Group D	G
	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Title	
	Y	Y	Y	Y	
1	100.00000	100.00000	100.00000		
2	113.43280	78.66667	100.9615		
3	92.53731	60.00000	108.6538		
4	107.46270	46.66667	129.8077		
5	125.37310	50.66667	108.6538		
6	83.58209	58.66667	109.6154		
7					
8					
9					
10					
11					

Şekil 3.10 GraphPad Prism’da % canlılık değerlerinin girilmesi

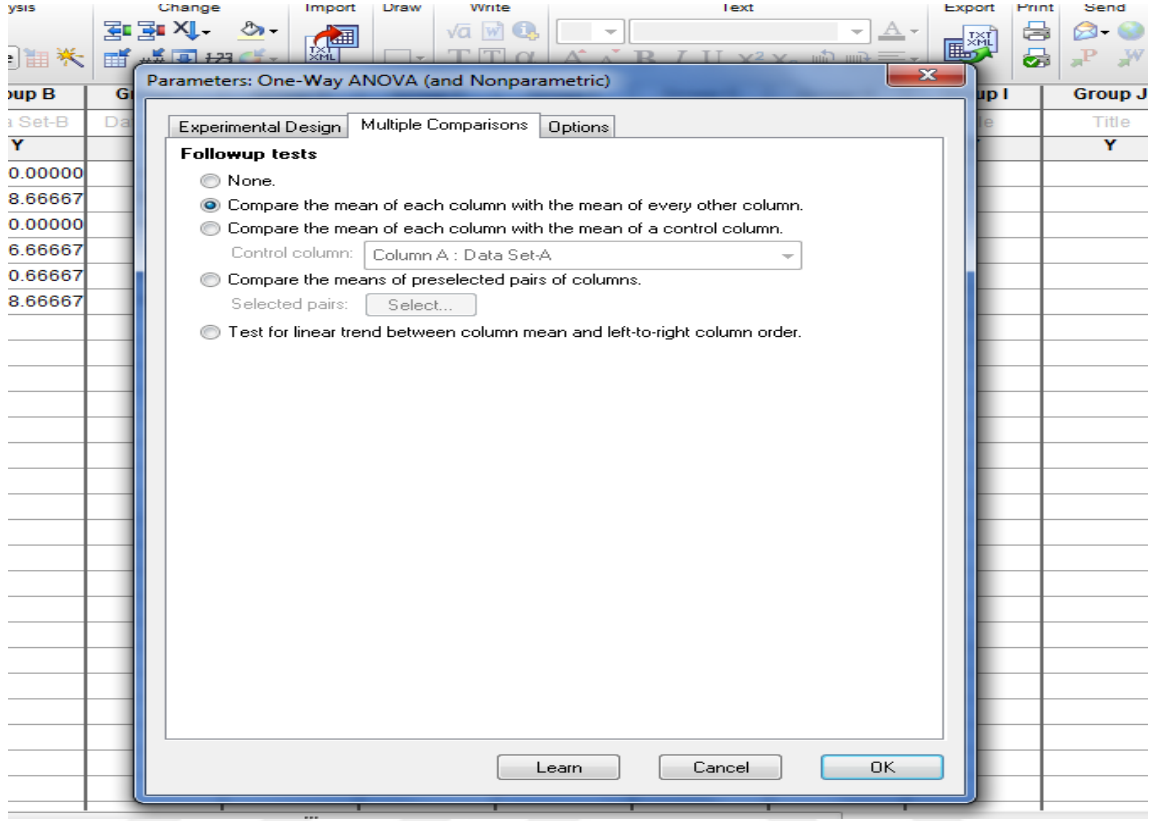


Şekil 3.11 GraphPad Prism'da verilerin analizi



Şekil 3.12 Tek-Yönlü ANOVA ile istatistiksel analizin yapılması

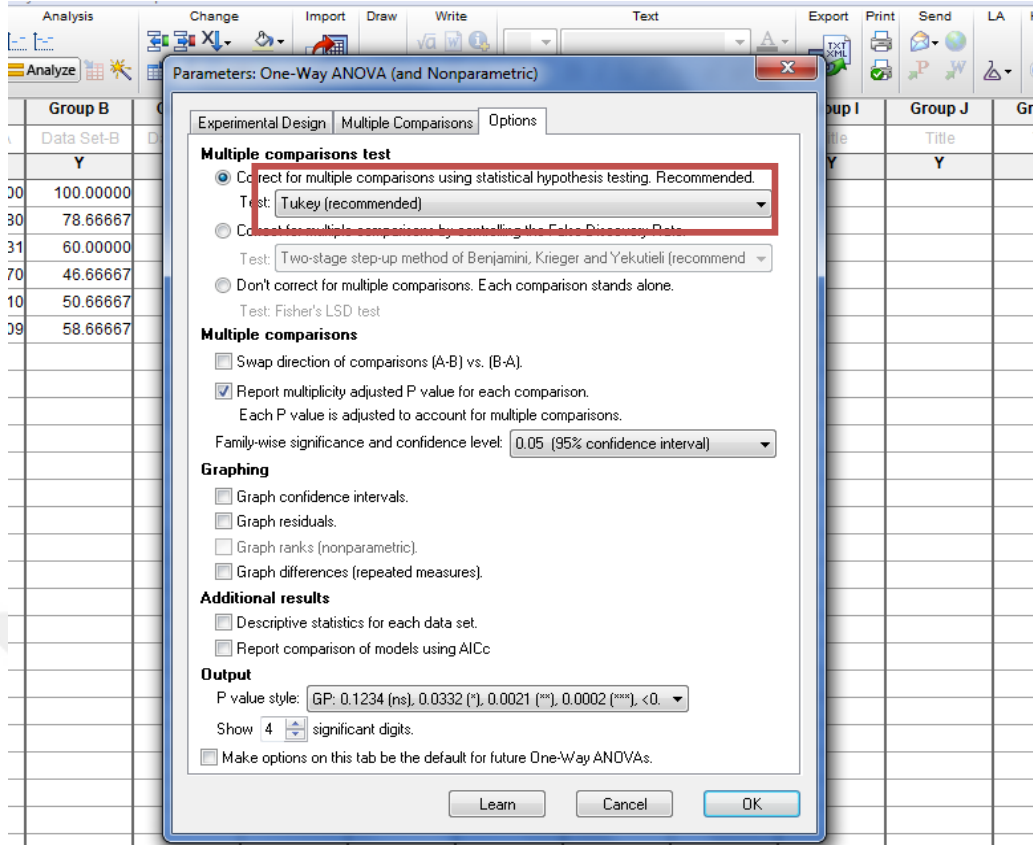
Tüm kolonların birbirleriyle karşılaştırılması gerektiğinden dolayı multiple comparisons kısmında 2. seçenek seçildi (Şekil 3.13).



Şekil 3.13 Tek-Yönlü ANOVA'da çoklu karşılaştırma yapılması

Son olarak Options kısmında uygulanabilecek istatistiksel testler sunulmaktadır. Tukey testi öneri olarak verilmiştir. MultipleComparisons kısmında P değeri 0.05'ten küçük veya büyük olmasına göre değerlendireceği belirtilmiştir. Output kısmında P değerinin stiline göre kaç " \* " işareti konulacağı gösterilmiştir. Örneğin P değeri 0,00002'den küçük ise 4 " \* " simgesiyle gösterilecektir. "Show 4 significant digits" seçildiğinde, 4 " \* " simgesine kadar değerler gösterilecektir (Şekil 3.14).

OK'a tıklandığında tek-yönlü Anova sonuçları verilen bir sayfa çıkacaktır. P değeri 0.05'ten küçük olduğu için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır (Şekil 3.15).



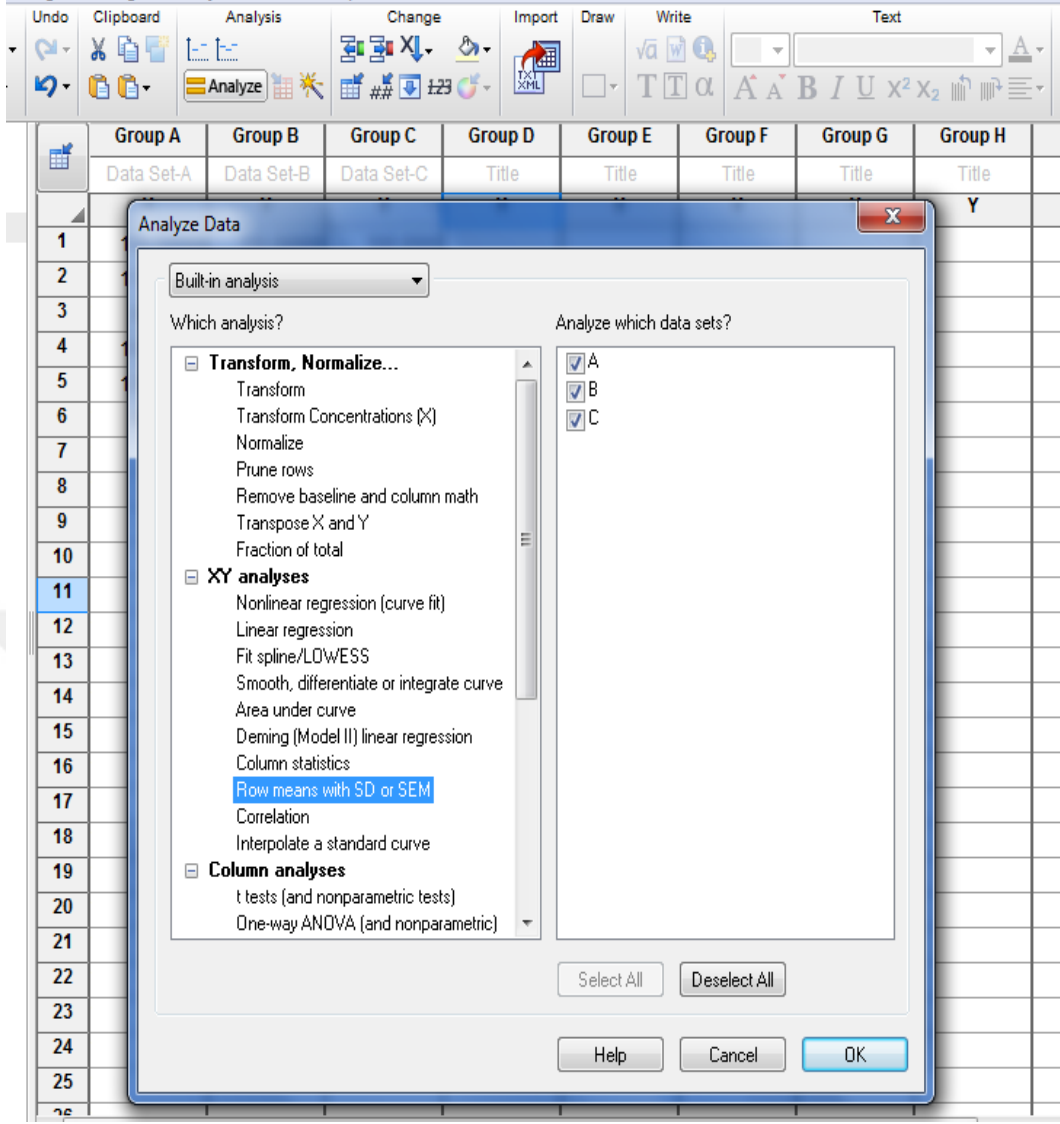
Şekil 3.14 Tek-Yönlü ANOVA'da uygun istatistiksel testin seçilmesi

1way ANOVA		
ANOVA		
1	Table Analyzed	Data 1
2		
3	Repeated measures ANOVA summary	
4	Assume sphericity?	No
5	F	10.85
6	P value	0.0065
7	P value summary	**
8	Statistically significant (P < 0.05)?	Yes
9	Geisser-Greenhouse's epsilon	0.8096
10	R square	0.6846
11		
12	Was the matching effective?	

Şekil 3.15 Tek-Yönlü ANOVA ile Tukey Testi sonuçlarının görüntülenmesi

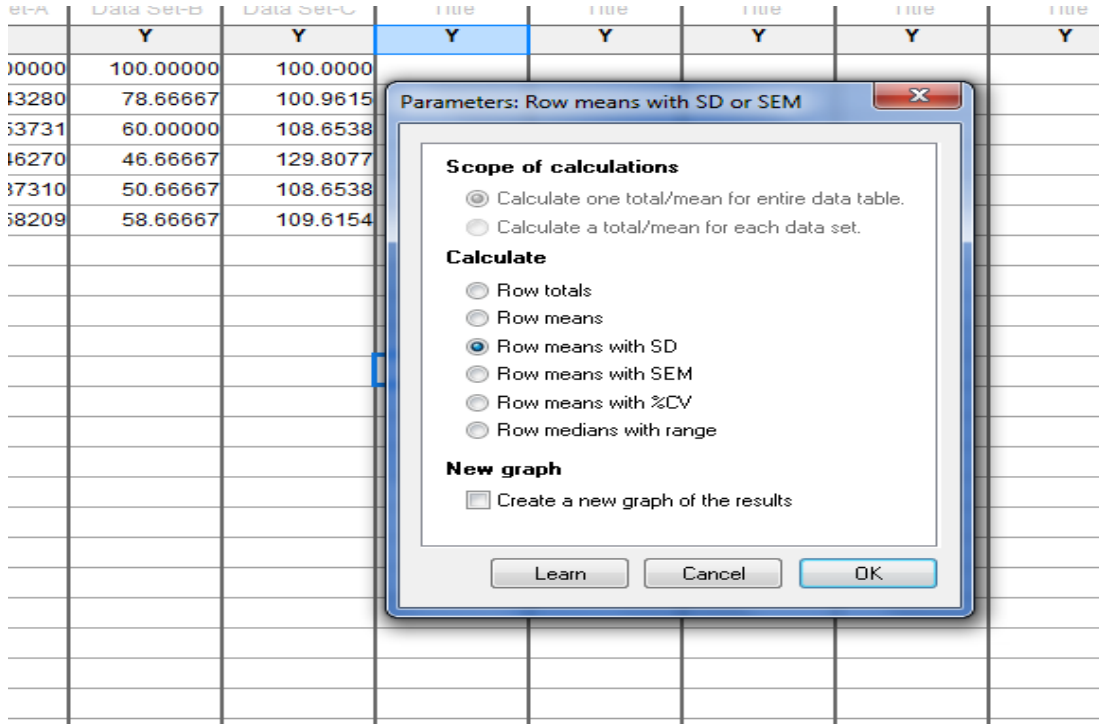
### 3.5.3 % Canlılık Değerlerine Göre GraphPad'te Standart Sapmanın (SD) Hesaplanması

Graphpad'te CTRL+N kısayolu tıklandığında yeni proje dosyası oluşturmak için seçenekler çıkacaktır. Sol taraftan Column seçilip Enter replicate values, stacked into columns seçildi ve Y değerleri tablosuna önceden Excel'de hazırlanan % canlılık değerleri kopyalandı.



Şekil 3.16 Graphpad'de SD'nin hesaplanması

Analyze kısmından XY analysis başlığı altında "Row means with SD or SEM" tıklanıp sağ kısımdan ortalamalarının SD değerleri hesaplanacak olan data setleri seçilip OK'a basıldıktan sonra şekil 3.15'teki seçim ekranında "Row means with SD" seçilip OK'a tıklandı (Şekil 3.17).



Şekil 3.17 Graphpad'te % canlılık değerlerinin ortalamasıyla SD'nin hesaplanması

	X	A			
	X Title	Data Set-A			
	X	Mean	SD	N	Mean
1		100.000	0.000	3	
2		97.687	17.613	3	
3		87.064	24.784	3	
4		94.646	43.027	3	
5		94.898	39.207	3	
6		83.955	25.476	3	
7					
8					
9					
10					
11					
12					

Şekil 3.18 Graphpad'te SD'nin görüntülenmesi

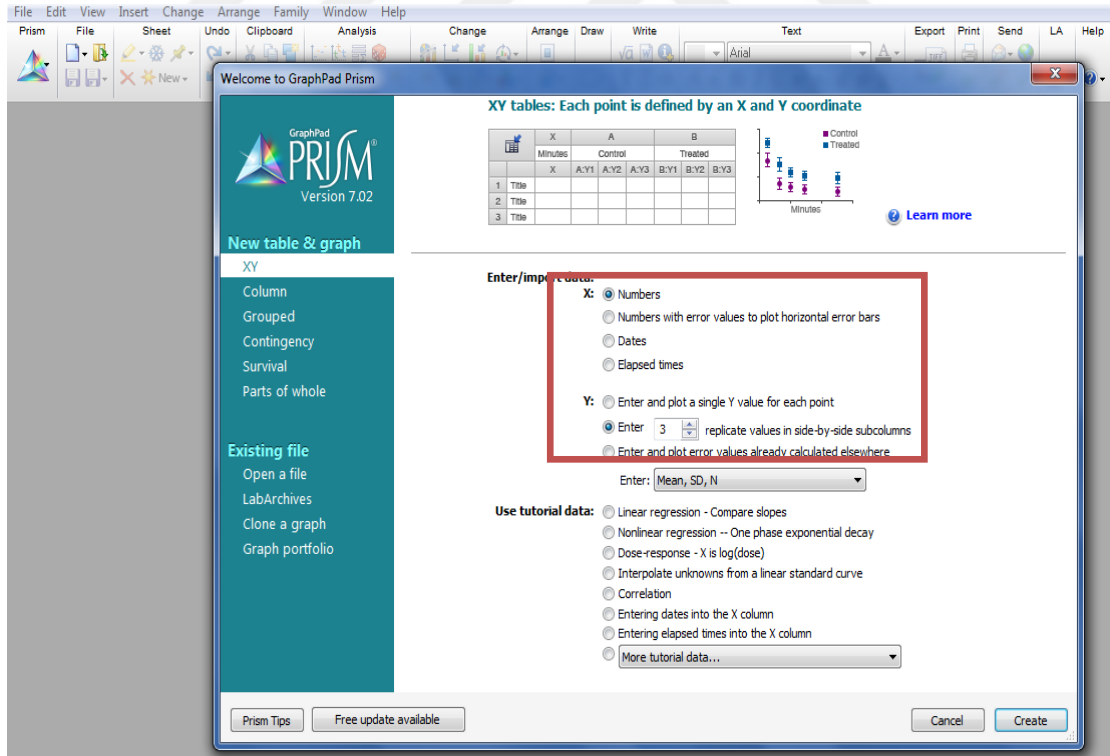
Ortalama değerler (Mean) ve bu değerlere karşılık gelen SD değerleri ve kaç veriden bu sonuçların hesaplandığı (n) Şekil 3.18'deki gibi olacaktır. Sonuçlar Çizelge 3.3' teki gibi düzenlendi.

Çizelge 3.3 GraphPad'te elde edilen SD verilerinin düzenlenmesi

Konsantrasyon	% Canlılık
0	100 ± 0
0,1	97,687 ± 17,613
1	87,064 ± 24,784
25	94,646 ± 43,027
100	94,898 ± 39,207
500	83,955 ± 25,476

### 3.6 GraphPad'te Grafik Oluşturma

Graphpad açıldığında çıkan seçim sayfasında sol tarafta XY ve sağ tarafta belirtilen seçenekler tıklanıp "Create" e basıldı (Şekil 3.19).



Şekil 3.19 GraphPad'te grafik hazırlama

XY tablosunda deneylerde uygulanan konsantrasyonlar ve bu konsantrasyonlara denk gelen 3 deneyin % canlılık değerleri girildi (Şekil 3.20).

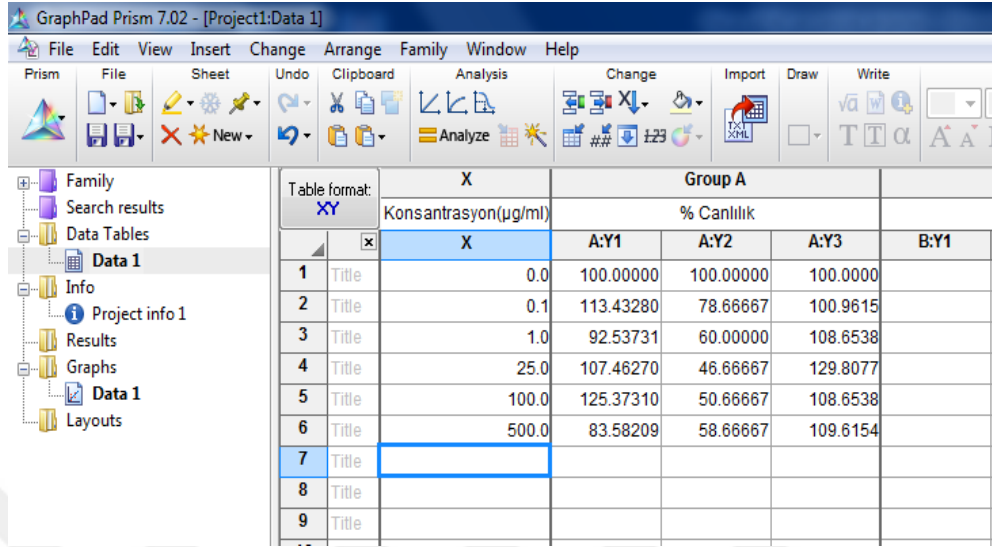
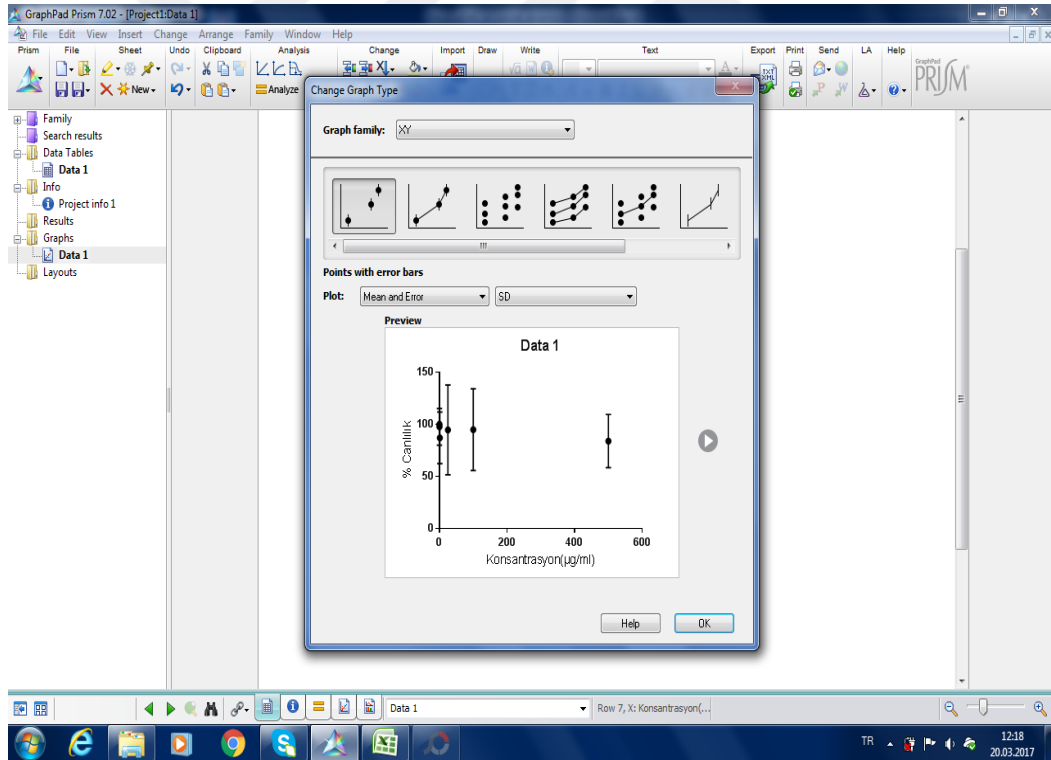


Table format:		X	Group A		
XY		Konsantrasyon(µg/ml)	% Canlılık		
	X	A:Y1	A:Y2	A:Y3	B:Y1
1	Title	0.0	100.00000	100.00000	100.00000
2	Title	0.1	113.43280	78.66667	100.9615
3	Title	1.0	92.53731	60.00000	108.6538
4	Title	25.0	107.46270	46.66667	129.8077
5	Title	100.0	125.37310	50.66667	108.6538
6	Title	500.0	83.58209	58.66667	109.6154
7	Title				
8	Title				
9	Title				

Şekil 3.20 GraphPad'te konsantrasyon ve % canlılık değerlerinin girilmesi



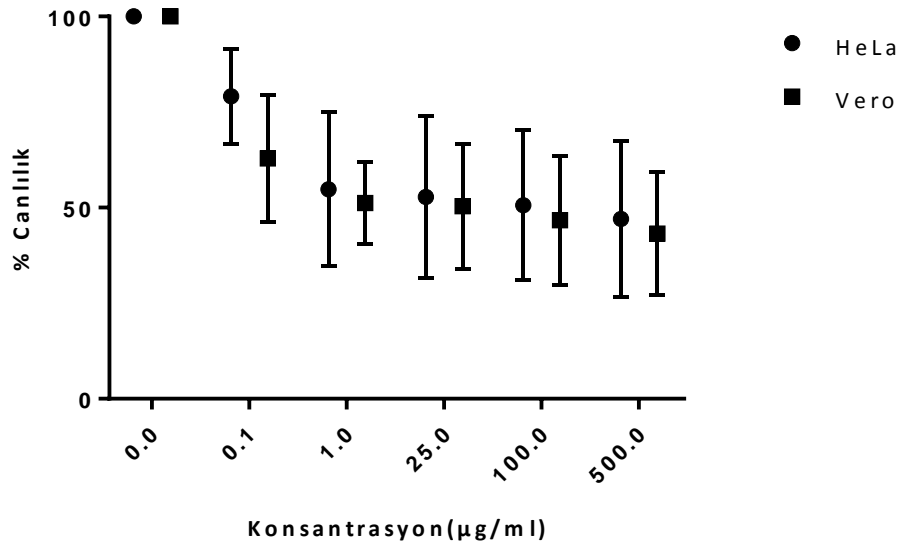
Şekil 3.21 GraphPad'te girilen verilerle istenilen grafik türünün seçilmesi

Sol tarafta Data 1'e tıkladığında, ne tür bir grafik oluşturulmak istendiğine dair seçenekler çıkacaktır. İstenilen grafik türü seçildi ve oluşturuldu (Şekil 3.21).

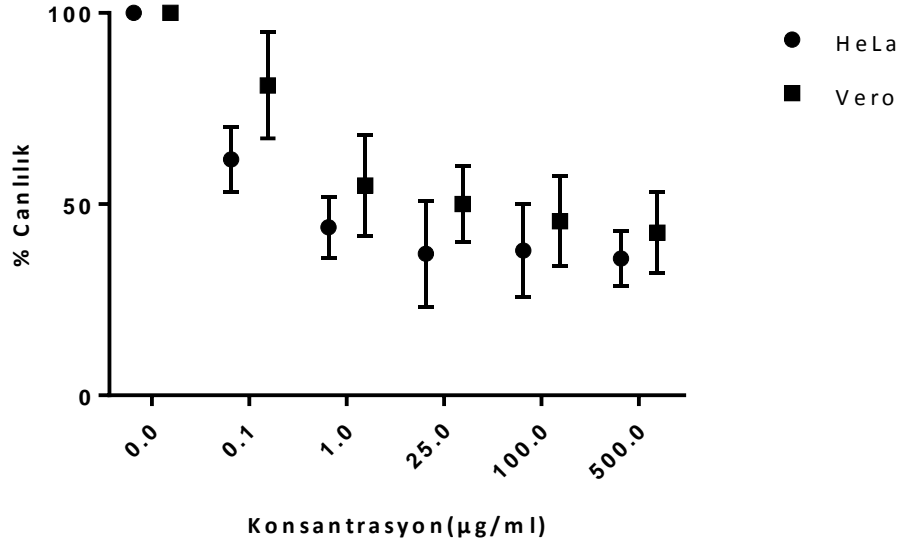
## SONUÇLAR

## 4.1 Polimerlerin Hücre Canlılığına Etkilerinin MTT Testi ile Gösterilmesi

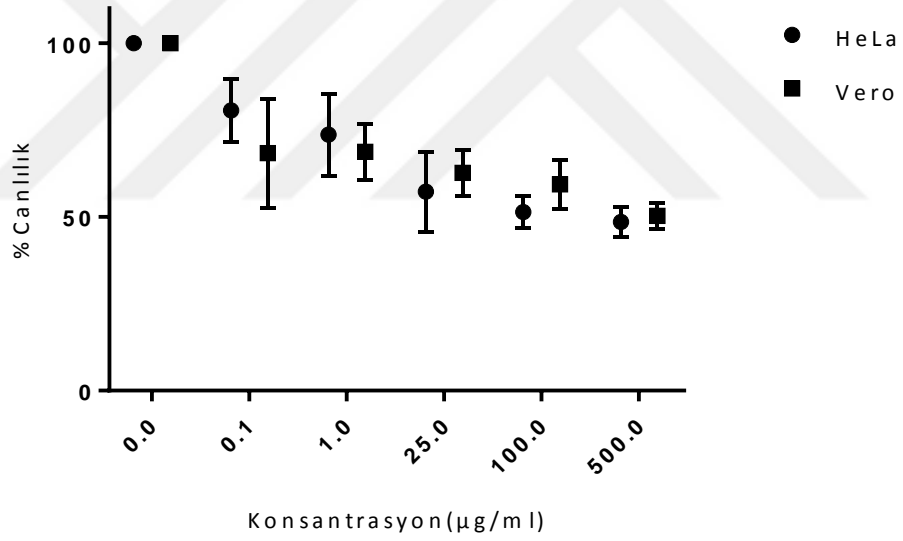
HeLa ve Vero'nun %100 konfluent olduğu durumda polimerlerin kültüre eklenmesinden 72 saat sonra yapılan MTT testi ve 540 nm dalga boyundaki spektral analiz sonrasında elde edilen sonuçlara göre % canlılığın değişimi Şekil 4.1, 4.2 ve 4.3'te gösterilmiştir.



Şekil 4.1 Teorik olarak %7 süksinimid içeren polimerin (MA046) HeLa ve Vero'daki sitotoksik etkilerinin karşılaştırılması



Şekil 4.2 Teorik olarak %17 süksinimid içeren polimerin (MA048) HeLa ve Vero'daki sitotoksik etkilerinin karşılaştırılması



Şekil 4.3 Süksinimid içermeyen lineer polimerin (MA066) HeLa ve Vero'daki sitotoksik etkilerinin karşılaştırılması

Sitotoksiteleri incelenen tüm fonksiyonel polimerler için HeLa ve Vero kültürlerindeki konsantrasyonları arttıkça hem HeLa hem de Vero hücrelerinde % canlılığın düştüğü gözlenmiştir. Grafikler incelendiğinde polimerlerin hücre canlılığında azalmalara sebep olduğu ancak bu azalmanın çok dramatik olmadığı anlaşılmaktadır.

## 4.2 İstatistiksel Sonuçlar

Spektral analiz sonrasında elde edilen OD540 değerlerinin Graphpad Prism programında tek-yönlü ANOVA ile istatistiki açıdan anlamlı olup olmadığı değerlendirilmiştir.  $p < 0,05$  değeri anlamlı kabul edilmiştir. HeLa ve Vero için P ve  $R^2$  değerleri Çizelge 4.1 ve 4.2’de gösterilmiştir.  $R^2$  değerlerinin düşük olmasına rağmen bu tür sitotoksisite çalışmaları için makul olduğu anlaşılmıştır.

Çizelge 4.1 HeLa için sitotoksisite analizi sonuçlarına göre hesaplanan P ve  $R^2$  değerleri ve istatistiksel açıdan anlamlılıklarının değerlendirilmesi

POLİMERLER	$R^2$	P	İstatistiksel olarak anlamlı mı? ( $p < 0,05$ )
MA046	0,7408	0,0056	EVET
MA048	0,586	0,0181	EVET
MA066	0,6524	0,0126	EVET

Çizelge 4.2 Vero için sitotoksisite analizi sonuçlarına göre hesaplanan P ve  $R^2$  değerleri ve istatistiksel açıdan anlamlılıklarının değerlendirilmesi

POLİMERLER	$R^2$	P	İstatistiksel olarak anlamlı mı? ( $p < 0,05$ )
MA046	0,787	0,0041	EVET
MA048	0,534	0,0362	EVET
MA066	0,5085	0,0457	EVET

Tüm verilerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu ( $p < 0,05$ ) görülmektedir.

### 4.2.1 % Canlılık Değerlerine Göre İstatistiksel Sapmalar

Microsoft Excel’de hesaplanan ortalama % canlılık değerlerinin Graphpad Prism programında belirlenen sapma aralıkları Çizelge 4.3 ve 4.4’te gösterilmiştir. Beklendiği üzere artan polimer konsantrasyonu ile tüm örneklerde ve hücre türlerinde % canlılık değerlerini düştüğü gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.3 HeLa için sitotoksosite analizi sonuçlarına göre hesaplanan % canlılık değerlerinin istatistiksel sapma aralıkları

<b>% Canlılık</b>					
<b>Polimerler</b>	<b>500 µg/ml</b>	<b>100 µg/ml</b>	<b>25 µg/ml</b>	<b>1 µg/ml</b>	<b>0,1 µg/ml</b>
<b>MA046</b>	47,024 ± 20,426	50,646 ± 19,588	52,814 ± 21,252	54,811 ± 20,143	79,141 ± 12,517
<b>MA048</b>	36,763 ± 7,169	37,914 ± 12,246	37,012 ± 13,384	43,953 ± 7,958	61,694 ± 8,422
<b>MA066</b>	48,499 ± 4,326	51,393 ± 4,512	57,22 ± 11,397	73,65 ± 11,858	80,606 ± 9,162

Çizelge 4.4 Vero için sitotoksosite analizi sonuçlarına göre hesaplanan % canlılık değerlerinin istatistiksel sapma aralıkları

<b>% Canlılık</b>					
<b>Polimerler</b>	<b>500 µg/ml</b>	<b>100 µg/ml</b>	<b>25 µg/ml</b>	<b>1µg/ml</b>	<b>0.1µg/ml</b>
<b>MA046</b>	43,247 ± 16,134	46,749 ± 16,9	50.39 ± 16,32	51,226 ± 10,67	62,903 ± 16,57
<b>MA048</b>	42,545 ± 10,602	45,541 ± 11,759	50,025 ± 9,85	54,915 ± 13,3	81,069± 13,858
<b>MA066</b>	50,312 ± 3,661	59,384 ± 7,026	62,609 ± 6,757	68,697 ± 8,054	68,31 ± 15,709

#### 4.2.2 Polimerlerin HeLa ve Vero'daki IC50 Konsantrasyonları

Very Simple IC<sub>50</sub> Tool Kit [43] ile % canlılık oranlarına göre hesaplanan IC50 dozları Çizelge 4.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.5 Polimerlerin HeLa ve Vero hücrelerindeki IC50 konsantrasyonları

POLİMERLER	IC50(µg/ml)	
	HeLa	Vero
MA046	420,6	482,0
MA048	356,3	401,5
MA066	529,5	557,4

### DEĞERLENDİRME VE TARTIŞMA

PEG ve PEG temelli polimerler, ilaç salımı ve görüntüleme gibi önemli biyomedikal uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak PEG'in kendisinin inert olması nedeniyle bu tür uygulamalarda muhakkak fonksiyonel bir grup taşıyan PEG türevlerine ihtiyaç bulunmaktadır. Fonksiyonel grup içermeyen PEG-1000 ve PEG-2000 gibi polimerler çok düşük sitotoksosite (HeLa için IC50: 36,2 mg/mL ve 38,2 mg/mL sırasıyla) göstermekle birlikte akrilat gibi fonksiyonel grup taşıyan oligomerik PEGA-480 yüksek sitotoksiste (HeLa için IC50: 0,2 mg/mL) gösterebilmektedir [7]. PEGilasyon işlemlerinde sıkça kullanılan fonksiyonel grup süksinimidil esterdir. Akrilat fonksiyonlu PEG'lerle ilgili çalışmalar olmasına rağmen literatürde süksinimidil ester fonksiyonlu PEG'lerle ilgili sistemetik çalışma bulunmamaktadır. Bu tez kapsamında süksinimidil ester fonksiyonlu PEG bazlı dallanmış polimerlerin Vero ve HeLa hücrelerindeki sitotoksiteleri incelenmiştir. Fonksiyonel grup içermeyen lineer MA066 ise, MA046 (%7 süksinimidil ester içeren) ve MA048 (%17 süksinimidil ester içeren) için kontrol polimer olarak kullanılmıştır. Süksinimidil ester fonksiyonel grubunun oranı arttıkça hem HeLa hem de Vero için % canlılığın ve IC50 dozlarının düştüğü görülmüştür. Hücre kültürlerinde uygulanan en yüksek konsantrasyon 500 µg/ml için % canlılığın genellikle %40-50 aralığında olduğu göz önünde bulundurulursa, PEG'in sitotoksik özelliğinin bu çalışmadaki en yüksek konsantrasyonda bile hücre hatlarında yüksek letal değerlerde olmadığı ispatlanmıştır. FDA tarafından onaylı olan bu polimer türü biyomedikal uygulamalar için oldukça önemlidir.

Bu tez kapsamında sitotoksiteleri incelenen dallanmış PEG türevleri barındırdıkları süksinimidil ester fonksiyonları ile reaktif forma sokulmuş olup belirlenen uygun konsantrasyon aralıklarında toksik özellik göstermeden kullanılabilir. Elde edilen süksinimidil ester fonksiyonlu polimerler amin reaktif olup amin grubu taşıyan her türlü molekülün bağlanmasına olanak tanımaktadır. Bu nedenle bu tür polimerler ilaç, biyomolekül (protein, DNA vb.) taşıyıcısı veya floresans prob bağlanması ile görüntüleyici ajan olarak kullanılma potansiyelleri vardır. Ayrıca, PEG ve PEG türevleri doxorubicin gibi kemoteröpatik ajanların sitotoksik etkisini 10 kata kadar azaltmaktadır [44]. Elde edilen bu polimerler ve bu polimerlerin türevleri grubumuzca halen devam eden çalışmalarda floresans problemleri ile etiketlenerek veya ilaç bağlanarak görüntüleme ve ilaç taşıma çalışmalarında kullanılmaktadır.

## KAYNAKLAR

---

- [1] Larson, N. ve Ghandehari, H., (2012). "Polymeric Conjugates for Drug Delivery", *Chemistry of Materials*, 24(5):840–853.
- [2] Thomas, A., Müller, S.S. ve Frey, H., (2014). "Beyond Poly(ethylene glycol): Linear Polyglycerol as a Multifunctional Polyether for Biomedical and Pharmaceutical Applications", *Biomacromolecules*, 15:1935-1954.
- [3] Kodera, Y., Matsushima, A., Hiroto, M., Nishimura, H., Ishii, A., Ueno, T. ve Inada, Y., (1998). "Pegylation of proteins and bioactive substances for medical and technical applications", *Progress In Polymer Science*, 23:1233-1271.
- [4] Veronese, F.M. ve Pasut, G., (2005). "PEGylation, successful approach to drug delivery", *Drug Discovery Today*, 10:1451-1458.
- [5] Li, J. ve Kao, W.J., (2003). "Synthesis of Polyethylene Glycol (PEG) Derivatives and PEGylated-Peptide Biopolymer Conjugates", *Biomacromolecules*, 4:1055-1067
- [6] Riss, T.L., Moravec, R.A., Niles, A.L., Benink, H.A., Worzella, T.J. ve Minor, L., *Cell Viability Assays*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53196/>, 2 Mart 2016.
- [7] Liu, G.; Li, Y., Yang, L., Wei, Y., Wang, X., Wang, Z. ve Tao, L., (2017). "Cytotoxicity study of polyethylene glycol derivatives", *RSC Advances*, 7 (30):18252-18259.
- [8] Brunton, L.L., (2011). *Goodman&Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 12. Baskı, McGraw-Hill Medical, New York.
- [9] Tibbitt, M.W., Dahlman J.E. ve Langer, R., (2016). "Emerging Frontiers in Drug Delivery", *Journal of The American Chemical Society*, 138:704–717.
- [10] Langer, R., (1998). "Drug delivery and targeting", *Nature*, 30:3925-10.
- [11] Diaz, S., Pavez, M., Miranda, P., Robertson, D.N., Sivin, L. ve Croxatto, H.B., (1982). "A five-year clinical trial of levonorgestrel silastic implants (NORPLANT), *Contraception*, 25 (5), 447.

- [12] Folkman, J., Langer, R., Linhardt, R.J., Haudenschild, C. ve Taylor, S., (1983). "Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone", *Science*, 221(4612):719-25.
- [13] Li, K.W., Dang, W., Tyler B.M., Troiano, G., Tihan, T., Brem, H. ve Walter, K.A., (2003). "Polylactofate microspheres for Paclitaxel delivery to central nervous system malignancies", *Clin Cancer Res.*, 9(9):3441-7.
- [14] Wolinsky, J.B., Colson, Y.L. ve Grinstaff, M.W.J. (2012). "Superhydrophobic Materials for Tunable Drug Release: Using Displacement of Air to Control Delivery Rates", *J Am Chem Soc.*, 134(4): 10.
- [15] Nair, L.S. ve Laurencin, C.T., (2006). "Polymers as biomaterials for Tissue Engineering and Controlled Drug Delivery", *Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.*, 102:47-90.
- [16] Roberts, M.J., Bentley, M.D. ve Harris, J.M., (2002). "Chemistry for peptide and protein PEGylation", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64:116-127.
- [17] Bayındır, Z.S. ve Yüksel, N., (2007). "PEGİLASYON: PEG KONJUGATLARININ HAZIRLANMASI VE UYGULAMALARI", *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 4:249 – 266.
- [18] Delaittre, G., Justribo´-Herna´ndez, G., Nolte, R.J.M. ve Cornelissen, J.J.L.M., (2011). "Amine-Reactive PEGylated Nanoparticles for Potential Bioconjugation", *Macromolecular Rapid Communications*, 32:19–24.
- [19] Zhou, Q., (2012). Synthesis of new tetrazines functionalized with photoactive and electroactive groups, *Doktora Tezi, Ecole ´ normale sup´erieure de Cachan-ENS Cachan, France.*
- [20] Ruoslatti, E. ve Rajotte, D., (2000). "An adress system in the vasculature of normal tissues and tumors", *Annual Review of Immunology*, 18:813-827.
- [21] Jain, R.K., (2001). "Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46:149-168.
- [22] Harris T.J., Maltzahn G. ve Bhatia, S.N., Multifunctional Nanoparticles for Cancer Therapy, [http://lmrt.mit.edu/sites/default/files/documents/Harris\\_chapter\\_5\\_2006.pdf](http://lmrt.mit.edu/sites/default/files/documents/Harris_chapter_5_2006.pdf), 24 Nisan 2017.
- [23] Gibco, Cell Culture Basics Handbook, <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/promotions/global/images/aai-2015/aai-pdfs/GibcoCellCultureBasicsHandbook.pdf>, 24 Nisan 2017.
- [24] Freshney, R.I., (2011). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, Sixth Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- [25] Intech, Culture Conditions and Types of Growth Media for Mammalian Cells, <https://www.intechopen.com/books/biomedical-tissue-culture/culture-conditions-and-types-of-growth-media-for-mammalian-cells>, 24 Nisan 2017.
- [26] Munger, K. ve Howley, P.M., (2002). "Human papillomavirus immortalization and transformation functions", *Virus Research*, 89(2):213-228.

- [27] Bodnar, A.G., Qullette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichsteiner, S. ve Wright, W.E., (1998). "Extention of life span by introduction of telomerase inti normal human cells", Science, 279:349-352
- [28] Cerni, C., (2000). "Telomeres, telomerase, and myc", Mutation Research, 462:31-47.
- [29] Freshney, R. I., Basic Principles of Cell Culture. In Culture of Cells for Tissue Engineering, John Wiley & Sons, Inc.: 2006; pp 1-22.
- [30] Roche, Culture of Animal Cells-Basic Tecniques, <http://www.dynebio.co.kr>, 24 Nisan 2017.
- [31] Akdeniz,D., Tuncer, Ş.B. ve Yazıcı, H., (2014). "Retinoblastoma (RB) gen yolağı ve kanser", Türk Onkoloji Dergisi, 29(4):173-180.
- [32] Ulukaya, E., AKCİĞER KANSERLERİ, <http://biyokimya.uludag.edu.tr/CellCycleApoptosis.pdf>, 24 Nisan 2017.
- [33] Sigma, Fundamental Tecniques in Cell Culture, <http://www.bristol.ac.uk/safety/media/gn/ecacc-handbook-gn.pdf>, 24 Nisan 2017.
- [34] Thermofisher, GlutaMAX Media, <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/glutamax-product-brochure.pdf>, 24 Nisan 2017.
- [35] PAA, Cell Culture Media, [https://www.brunschwigch.com/pdf/downloads/PAA\\_CellCultureMedia.pdf](https://www.brunschwigch.com/pdf/downloads/PAA_CellCultureMedia.pdf), 24 Nisan 2017.
- [36] Riss, T.L., Moravec, R.A., Niles, A.L., Duellman, S., Benink, H.A ve Worzella, T.J., "Cell Viability Assays", <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>, 24 Nisan 2017.
- [37] Mossman, T., (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays", J Immunol Methods, 65:55-63.
- [38] Stockert, J.C., Blazquez-Castro, A., Canete, M. ve Horobin, R.W., (2012). "MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipit droplets", Acta Histochemica, 114:785-796.
- [39] İnvitrogen, Cell Culture Basics, [www.invitrogen.com/cellculturebasics](http://www.invitrogen.com/cellculturebasics), 24 Nisan 2017.
- [40] Biological Safety Cabinets, <http://www.biologicalsafetycabinet.co.uk/>, 24 Nisan 2017.
- [41] Ceyhan, İ., Biyogüvenlik Laboratuvar Seviyeleri ve Biyogüvenlik Kabinlerinin Seçimi, Kullanımı ve Bakımı, <https://www.das.org.tr/kitaplar/kitap2005/57-05.pdf>, 24 Nisan 2017.

- [42] BİYOGÜVENLİK KABİNLERİ (Mikrobiyolojik Güvenlik Kabinleri), <http://www.rotalab.com/tr/urunler/laboratuvar-kabinleri/biyolojik-guvenlik-kabini.html>, 24 Nisan 2017.
- [43] Very Simple IC<sub>50</sub> Tool Kit, <http://www.ic50.tk/>, 10 Mayıs 2017.
- [44] Veronese, F.M., Schiavon, O., Pasut, G., Mendichi, R., Andersson, L., Tsirk, A., Ford, J., Wu, G., Kneller, S., Davies, J. ve Duncan, R., (2005). "PEG-Doxorubin Conjugates: Influence of Polymer Structure on Drug Release, in Vitro Cytotoxicity, Biodistribution, and Antitumor Activity", *Bioconjugate Chem.*, 16(4):775-784.



## ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Adı Soyadı** : Nazlı Irmak GİRİTLİOĞLU  
**Doğum Tarihi ve Yeri** : 25.11.1992, İstanbul  
**Yabancı Dili** : İngilizce  
**E-posta** : nazliirmak.giritlioglu@gmail.com

### ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyomühendislik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2017
Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	İstanbul Üniversitesi	2014
Lise	Fen Bilimleri	Tuzla Anadolu Lisesi	2010

## **YAYINLARI**

### **Bildiri**

Giritlioğlu, N.I., Ateş, M.Y., Kahveci, M.Ü., Karagöz, A., İlaç Salım Sistemlerinde Kullanılmak Üzere Sentezlenen Poli(etilen glikol) Bazlı Polimerlerin Sitotoksitelerinin İncelenmesi, İVEK İlaç ve Eczacılık Kongresi, 3, 2017.

### **Proje**

Biyomedikal Uygulamalarda Kullanılan Fonksiyonel Polimerlerin Sitotoksitelerinin İncelenmesi, YÜLAP, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü, Araştırmacı, 2016-2017.

