

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

**MELANOMA HASTALIĞINI OLUŞTURAN
SENTETİK PEPTİDLERİN
POLİAKRİLİKASİT VE KOPOLİMERLERİ İLE
KONJUGASYONU**

KADRIYE ATICI KIZILBEY

**DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA PROGRAMI**

**DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. ZEYNEP MUSTAFAEVA AKDESTE**

İSTANBUL, 2012

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MELANOMA HASTALIĞINI OLUŞTURAN SENTETİK PEPTİDLERİN
POLİAKRİLİKASİT VE KOPOLİMERLERİ İLE KONJUGASYONU**

Kadriye ATICI KIZILBEY tarafından hazırlanan tez çalışması 27/02/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Zeynep Mustafaeva AKDESTE
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Yrd. Doç. Dr. Zeynep Mustafaeva AKDESTE
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Nesrin EMEKLİ
Medipol Üniversitesi

Prof. Dr. Hüseyin YILDIRIM
Yalova Üniversitesi

Prof. Dr. İbrahim İŞILDAK
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Tuncay ALTUĞ
Bilim Üniversitesi

Bu alışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün 29-07-04-DOP01 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Tez konumu belirleyen, çalışmalarım süresince yaptığı değerlendirmeler ile çalışmamın şekillenmesinde ve ilerlemesinde büyük emeği bulunan, benden hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen, tez hocam Yrd. Doç. Dr. Zeynep Mustafaeva AKDESTE'ye, 2004-2007 yılları arasında doktora tez çalışmam boyunca engin bilgisi ile çalışmalarımızın ilerlemesinde yardımcı olan, bizlerin her yönde önünü açan ve bu gelişmiş teknoloji ile çalışmamıza olanak sağlayan Biyomühendislik Kurucu Bölüm Başkanı, merhum Prof. Dr. Mehmet Mustafaev AKDESTE'ye,

Tez çalışmam boyunca yapmış oldukları değerlendirmeler ile verdikleri destekten ötürü doktora tez izleme jüri üyelerimden Prof. Dr. Nesrin EMEKLİ ve Prof. Dr. Hüseyin YILDIRIM' a,

Doktora tezime mali destekte bulunan YTÜ-BAP Koordinatörlüğüne, çalışmamın yerine getirilmesine imkân sağlayan Kimya-Metalurji Fakültesi Dekanlığına, Fen Bilimleri Enstitüsüne, Biyomühendislik Bölümü Başkanı Sayın Prof. Dr. İbrahim İŞILDAK'a,

TÜBİTAK-MAM GMBE bünyesindeki Transgen ve Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'nda yapmış olduğum deneysel hayvanları çalışmalarındaki yardımlarından dolayı tüm laboratuvar çalışanlarına,

Hücre kültür deneylerindeki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Adil ALLAHVERDİYEVE ve çalışma ekibine,

Deneysel çalışmalarımda benden yardımlarını esirgemeyen asistan arkadaşlarım Arş. Gör. Murat TOPUZOĞULLARI, Arş. Gör. Eray DALGAKIRAN, Araş. Gör. Yunus Sarıçay, Arş. Gör. Zafer Ö. ÖZDEMİR ve Arş. Gör. Yasemin BUDAMA'ya,

Manevi destek ve yardımları ile her zaman yanımda olan değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Banu MANSUROĞLU, Arş. Gör. Sezen CANIM ATEŞ ve Arş. Gör. Serap DERMAN'a

Tüm hayatım boyunca bana her türlü desteğinden dolayı sevgili annem A. Ferda ATICI, babam Ayhan ATICI' ya ve her zaman yanımda olan eşim A. Burkan KIZILBEY ile canım kızım Ela KIZILBEY'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Şubat, 2012

Kadriye ATICI KIZILBEY

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
SİMGE LİSTESİ.....	İX
KISALTIMA LİSTESİ	X
ŞEKİL LİSTESİ.....	Xİ
ÇİZELGE LİSTESİ	XVII
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı	3
1.3 Hipotez	4
BÖLÜM 2	
GENEL BİLGİLER.....	5
2.1 Kanser.....	5
2.2 Cilt Kanseri.....	7
2.2.1 Cilt Kanseri Tipleri	8
2.3 Melanoma Hastalığının Safhaları	10
2.4 Melanoma Hastalığının Dünyadaki Durumu.....	14
2.5 Melanoma Kanserine Karşı Aşı Geliştirilmesi.....	17
2.5.1 Rekombinant DNA Aşıları	17
2.5.2 Sentetik Peptid Aşıları	17
2.5.3 Mutant Aşılar	18
2.5.4 Anti idiotip Aşılar	18
2.5.5 Konjuge Polisakkarid Aşılar.....	18
2.5.6 Polielektrolit Kompleksleri ve Yapay Aşılar.....	19
2.6 Polielektrolit Komplekslerin İmmünolojik Aktivitesi.....	20
2.6.1 İmmünojen Polielektrolit Kompleksinin çalışma modeli.....	23
2.7 Polielektrolitler	25
2.7.1 Doğal Polielektrolit Kompleksler	28

2.7.2	Yapay Polielektrolit Kompleksler	29
2.8	Lineer Polimer Özellikteki Taşıyıcı Moleküller.....	29
2.9	Çapraz Bağlama Reaktifleri.....	34
2.9.1	Homobifonksiyonel Çapraz Bağlayıcılar.....	34
2.9.2	Seçici Gruplara Göre Homobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri	36
2.9.3	Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlayıcılar.....	37
2.9.4	Seçici Gruplara Göre Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri	38
2.9.5	Direkt (Zero-Length) Çapraz Bağlayıcılar	39
2.9.6	Karbodiimidler.....	40

BÖLÜM 3

DENEYSEL ÇALIŞMALARDA KULLANILAN ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ..... 46

3.1	Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar.....	46
3.2	Kullanılan Ölçüm Yöntemleri	47
3.2.1	Moleküler Eleme Kromatografisi	47
3.2.2	Fluoresans Spektroskopisi	49
3.2.3	Boyut ve Zeta Potansiyel Ölçümleri.....	50
3.2.4	LC-MS (Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi)	51
3.2.5	Elisa Yöntemi	52

BÖLÜM 4

DENEYSEL KISIM

4.1	Polivinilpirolidon-akrilik asit Kopolimeri Sentezi	56
4.2	Peptidlerin Kimyasal Sentezi.....	60
4.2.1	Katı Faz Peptid Sentezi.....	61
4.2.2	Mikrodalga Destekli Katı Faz Peptid Sentezi.....	63
4.3	121-134 Mage3 Melanoma Peptidinin Farklı Polimerlerle Fiziksel Karışımları	65
4.3.1	Fiziksel Karışımda Kullanılan Çözeltiler	65
4.3.2	PAA-Peptid Fiziksel Karışımına Ait Hesaplamalar	65
4.3.3	P(VP-co-AA)-Peptid Fiziksel Karışımına Ait Hesaplamalar	65
4.4	121-134 Mage3 Melanoma Peptidinin Farklı Polimerlerle Konjugasyonu	67
4.4.1	Konjugasyonda Kullanılan Çözeltiler.....	67
4.4.2	PAA-Peptid Konjugatlarına Ait Hesaplamalar.....	67
4.4.3	EDC varlığında Sentezlenen P(VP-co-AA)-Peptid Konjugatlarına Ait Hesaplamalar	70
4.5	Mikrodalga Enerjisi Kullanılarak Organik Ortamda Sentezlenen P(VP-co-AA)-Peptid Konjugatlarına Ait Hesaplamalar	73
4.6	Konjugatların Saflaştırılması.....	75
4.6.1	Diyaliz.....	75
4.6.2	Moleküler Eleme Kromatografisi	76
4.6.3	Gaz Basıncılı Filtrasyon.....	76
4.6.4	Santrifüjlü Filtrasyon (Membranlı Santrifüj Tüpleri).....	76

4.6.5	UV-VIS Spektrofotometre Ölçümleri.....	77
4.6.6	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi (HPLC) Analizleri.....	77
4.6.7	4 Detektörlü Moleküler Eleme Kromatografi (Viscotek) Analizleri..	77
4.6.8	Fluoresans Spektrofotometre Ölçümleri.....	77
4.6.9	Boyut ve Zeta Potansiyel Ölçümleri.....	77

BÖLÜM 5

DENEY SONUÇLARI.....	78
----------------------	----

5.1	Melanoma NY-ESO-1 155-163 Dizili Peptidin Sentezi.....	78
5.2	Melanoma Kanserine ait Antijenik MAGE-3 121-134 Dizili Peptidin Sentezi	84
5.3	Mage-3 121-134 peptid dizisinin Poliakrilik asit (PAA) ile Oluşturulan Fiziksel Karışım ve Konjugatların Analiz Sonuçları.....	89
5.4	Farklı Yöntemlerle Sentezlenen VP/AA Kopolimerine ait Deney Sonuçları	105
5.4.1	Klasik (Termal) Yöntemle Sentezlenen VP/AA Kopolimerlerine Ait Deney Sonuçları	105
5.4.2	Mikro Dalga Enerjisi Kullanılarak Sentezlenen VP/AA Kopolimerlerine Ait Deney Sonuçları.....	110
5.5	N-vinil-2-pirolidon-co-akrilik asit Polimeri (P(VP-co-AA)) Kullanarak Hazırlanan Fiziksel Karışım ve Konjugatlara Ait Analiz Sonuçları	113
5.6	Hücre Kültür Çalışmaları.....	127
5.6.1	Fiziksel Kompleks ve Biyokonjugatlarda kullanılan P(VP-co-AA) Kopolimerinin MCF-7 Kanser Hücre Çoğalması Üzerine olan İn Vitro Etkilerinin İncelenmesi.....	127
5.6.2	MTT Deneyinin Hazırlanması	127
5.6.3	Farklı Konsantrasyonlardaki VP/AA Kopolimerin (2:1; Mw 120.000) MCF-7 Hücreleri Üzerinde Etkisi	127
5.6.3.1	Morfolojik İnceleme.....	128
5.6.4	Farklı Konsantrasyonlardaki VP/AA Kopolimerin (66:33; Mw 120.000) MCF 7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin MTT Yöntemi Kullanılarak Tayini.....	129
5.6.4.1	Morfolojik İnceleme.....	129
5.7	Hayvan Deneyleri	131
5.7.1	Peptid-polimer Fiziksel Komplekslerinin Hazırlanması.....	131
5.7.2	Peptid-polimer Biyokonjugatlarının Sentezi	131
5.7.3	Farelere Enjekte edilen Fiziksel Kompleks ve Biyokonjugatların Hesaplamaları	133
5.7.4	İmmünojenik ve Aşı Özelliği Taşıyabilen Suda Çözünebilen Polimer-Peptid Biyokompleks ve Konjugatlarının Analiz Sonuçları	134
5.7.4.1	Yöntem 1' e göre sentezlenen BSA-peptid konjugatı:.....	135
5.7.4.2	P(VP-co-AA)-peptid Kompleksi ile Yöntem 1' e göre sentezlenen P(VP-co-AA)-peptid Konjugatının Karşılaştırmalı Analiz Sonuçları.....	137
5.7.4.3	Yöntem 1 ve Yöntem 2' ye göre sentezlenen P(VP-co-AA)-peptid Konjugatlarının Karşılaştırmalı Analiz Sonuçları.....	139

5.8 İmmünojenik ve Aşı Özelliği Taşıyabilen Suda Çözünebilen Polimer-Peptid kompleks ve konjugatların Sentezi Balb/c farelere enjekte edilmesi	140
5.8.1 Fare Serumlarının alınması.....	142
5.8.2 Dolaylı yoldan Enzim Bağlı İmmün Assay (ELISA) Yöntemi Kullanılarak Farelerden Alınan Serum Örneklerinde Fiziksel Karışım ve Biyokonjugatlara Karşı Oluşan Antikor Miktar Tayini.....	142
5.9 ELISA Deneyinin Yapılışı	144
5.10 ELISA Yöntemi ile Fare Serumlarında Antikor Miktar Tayini	144
5.11 İstatistiksel veri analizi	146
5.11.1 F-test istatistiği (ANOVA).....	146
5.11.2 İki grubun ortalamalarının karşılaştırılması – ttest.....	147
BÖLÜM 6	
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	154
6.1 Anyonik Özellikli Poliakrilik Asit ile Melanoma Tümör Hücrelerine Ait Antijenini İçeren Fiziksel Karışım ve Biyokonjugatların Sentezine Ait Tartışma.....	154
6.2 Anyonik Özellikli N-vinil-2-pirolidon/akrilik asit kopolimeri ile Melanoma Tümör Hücrelerine Ait Antijenini İçeren Biyokonjugatların Sentezine Ait Tartışma	161
6.2.1 Mikrodalga Teknolojisi Kullanılarak Organik Ortamda Sentezlenen Konjugatlara Ait Tartışma.....	166
6.3 ELISA Yöntemi Kullanılarak Farelerden Alınan Serum Örneklerinde Hazırlanan Fiziksel Karışım ve Biyokonjugatlara Karşı Oluşan Antikor Miktarına Ait Tartışma	169
KAYNAKLAR	178
EK-A	
ETİK KURUL TUTANAĞI.....	186
ÖZGEÇMİŞ	187

SİMGE LİSTESİ

Da	Dalton
g	gram
M	Molar
mg	miligram
ml	mililitre
n	mol
°C	Santigrat derece
µl	mikrolitre
mV	milivolt

KISALTMA LİSTESİ

BSA	Bovin serum albumin
HCl	Hidroklorik Asit
PBS	Fosfat Tamponu
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	Disodyum hidrojen fosfat heptahidrate
NaCl	Sodyum klorür
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	Sodyum dihidrojen fosfat dihidrate
NaN ₃	Sodyum azid
RI	Kırılma İndisi
SEC	Moleküler eleme kromatografisi
UV	Ultra Violet
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Ag	Antijen
MBS	m-Maleimidobenzoil-N-hidroksisüksinimid ester
NHS	N-Hidroksisüksinimid ester

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2. 1 A - normal hücre bölünmesi; 1- Apoptosis; 2- Hasarlı hücre B – kanserli hücrenin bölünmesi [1].	5
Şekil 2. 2 Kanser hücreleriyle (pembe) lenfositlerin (sarı) savaşının, renkli scanning elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülenmesi (J.C. REVY, ISM / Science Photo Library)	6
Şekil 2. 3 İnsan vücudunda görülen melanoma tipleri.....	9
Şekil 2. 4 Erken evre melanomunun ciltteki oluşumunu incelemeye yarayan parametreler	10
Şekil 2. 5 Melanoma Hastalığı 0. Evresi [41].....	10
Şekil 2. 6 Melanoma Hastalığı 1. Evresi [41].....	11
Şekil 2. 7 Melanoma Hastalığının 2. Evresi [41].....	12
Şekil 2. 8 Melanoma Hastalığının 3. Evresi [41].....	12
Şekil 2. 9 Melanoma Hastalığının 4. Evresi [41].....	13
Şekil 2. 10 Melanoma kanseri olan kadın hastalar için yaş standardına göre hastalıktan etkilenen hasta sayısı (ASR: Age standardized incidence rate) /100.000 kişi [43]	16
Şekil 2. 11 Melanoma kanseri olan erkek hastalar için yaş standardına göre hastalıktan etkilenen hasta sayısı (ASR: Age standardized incidence rate) /100.000 kişi [43]	16
Şekil 2. 12 Melanoma hastalığının gelişiminin yıllara göre dağılımı [43]	17
Şekil 2. 13 Aynı polimerleşme derecesine ve aynı kimyasal yapıya sahip olan PE kompleksleri (a) Lineer yapıda PE kompleksi (b) Kompakt yapıda PE kompleksinin hücre yüzeyindeki antijenlerle karşılıklı etkileşiminin şematik gösterimi [22, 49].....	21
Şekil 2. 14 Elektrostatik kompleksin (EK;a) ve kovalent konjugatın (KK;b) heparinle karşılıklı etkisinin şematik gösterimi [22].	22
Şekil 2. 15 Yüksek (I) ve düşük immünojen (II) etkili antijen-PE komplekslerin modellerinin yapısı.....	24
Şekil 2. 16 PE çözeltisinin Strauss-Ander Modeli [51].	25
Şekil 2. 17 Rastgele, istatistiksel, blok ve graft kopolimerlerin sembolik gösterimleri. 26	
Şekil 2. 18 Polimerik taşıyıcı olarak kullanılan katyonik ve anyonik polielektrolitlerin genel gösterimi [26, 27].	27
Şekil 2. 19 Kısa zincirli peptid moleküllerinin lineer ve uzun zincirli polimerler ile oluşturdukları konjugatların şematik gösterimi [22, 49].....	33
Şekil 2. 20 Homobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların şematik gösterimi	35

Şekil 2. 21	Konjugasyon reaksiyonlarında kullanılan karboksil grubuna yönelen çapraz bağlayıcılar	37
Şekil 2. 22	Heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların şematik gösterimi	37
Şekil 2. 23	EDC kullanılarak sentezlenen Polimer-Peptid konjugatı reaksiyon mekanizması	43
Şekil 2. 24	EDC Plus Sülfö-NHS kullanılarak sentezlenen Peptid-Protein konjugatı reaksiyon mekanizması	44
Şekil 3. 1	Kolon kromatografisinde molekül büyüklüğüne göre ayrılma ve alıkonma zamanına göre oluşan kromatogram	48
Şekil 3. 2	Negatif yüklü parçacığın Zeta Potansiyeli.....	51
Şekil 3. 3	İndirekt Elisa Yöntemi [75].....	54
Şekil 3. 4	Enzim substratının ilavesinden sonra renk değişiminin görünümü.....	55
Şekil 4. 1	Polimerizasyon işleminde kullanılan, vinil monomerleri olarak adlandırılan akrilik asit (AA) (a) ve vinil pirolidon (VP) (b) monomerlerinin görünümü.	57
Şekil 4. 2	Radikalik polimerizasyonun başlaması için kullanılan Benzol peroksit adındaki başlatıcı.	57
Şekil 4. 3	Radikalik polimerizasyonun başlaması (initiation) için kullanılan benzol peroksitin radikal halini alması.	57
Şekil 4. 4	Polimerizasyonun ilerleme aşamasında (büyüme, propagation) serbest bir radikalın vinil monomere katılması için 2 olası durum söz konusudur.	58
Şekil 4. 5	Reaksiyonun ilerlemesi için ilk monomerin radikale katılımı.....	58
Şekil 4. 6	Reaksiyonun ilerlemesi; monomerin zincirle birleşmesi.....	58
Şekil 4. 7	Sonlanma aşamasında (radikallerin ortadan kalkma aşaması) iki zincir birbiri ile birleşerek reaksiyonun sonlanması.	59
Şekil 4. 8	Akrilik asit-vinil pirolidon kopolimeri	59
Şekil 4. 9	Katı-faz peptid sentezinin; amino asit yan-zincir koruyucu grup, alfa-amino asid koruyucu grup, aktive edici grup, katı destek (resin) ve yeni oluşan peptid bağı belirtilerek şematize edilmesi [79].....	62
Şekil 4. 10	A) Normal şartlarda sentezlenmiş peptid, B) Mikrodalga ile sentezlenmiş peptid.....	64
Şekil 4. 11	Diyaliz işleminin şematik görünümü.....	75
Şekil 4. 12	Membranlı santrifüj tüpü kullanılarak konjugatların konsantre edilmesi ve saflaştırılmasının şematik gösterimi.....	76
Şekil 5. 1	NY-ESO-1 155-163 (QLSLLMWIT) hidrofobik peptid dizisine ait amino asitlerin hidrofobik ve hidrofilik olarak gösterimi.....	78
Şekil 5. 2	Peptid Sentezi sonucu ham olarak elde edilen NY-ESO-1 155-163 peptid dizisinin UV Kromatogramı	79
Şekil 5. 3	Peptid Sentezi sonucu ham olarak elde edilen NY-ESO-1 155-163 peptid dizisinin Toplam İyon Kromatogramı	80
Şekil 5. 4	NY-ESO-1 155-163 dizili peptidin alıkonma zamanı 4,93-6,33 dakikalari arasındaki kütle spektrumu	80
Şekil 5. 5	NY-ESO-1 155-163 dizili peptidin alıkonma zamanı 10,42-11,61 dakikalari arasındaki kütle spektrumu	81
Şekil 5. 6	NY-ESO-1 155-163 dizili saf haldeki peptidin preparatif HPLC kromatogramı	82
Şekil 5. 7	NY-ESO-1 155-163 dizili saf haldeki peptidin UV kromatogramı.....	83
Şekil 5. 8	NY-ESO-1 155-163 dizili saf haldeki peptidin toplam iyon kromatogramı 83	

Şekil 5. 9	NY-ESO-1 155-163 dizili saf haldeki peptidin alıkonma zamanı 4,93-6,33 dakikalari arasındaki kütle spektrumu	83
Şekil 5. 10	MAGE-3 121-134 (LLKYRAREPVTKAE) hidrofilik peptid dizisine ait amino asitlerin hidrofobik ve hidrofilik olarak gösterimi.....	84
Şekil 5. 11	MAGE-3 121-134 (LLKYRAREPVTKAE) hidrofilik peptid dizisine ait UV Kromatogramı	85
Şekil 5. 12	MAGE-3 121-134 (LLKYRAREPVTKAE) hidrofilik peptid dizisine ait toplam iyon kromatogramı.....	86
Şekil 5. 13	MAGE-3 121-134 (LLKYRAREPVTKAE) hidrofilik peptid dizisine ait alıkonma zamanı 8,13- 8.68 dakikalari arasındaki kütle spektrumu	87
Şekil 5. 14	MAGE-3 121-134 (LLKYRAREPVTKAE) hidrofilik peptid dizisine ait alıkonma zamanı 8, 63-9,69 dakikalari arasındaki kütle spektrumu	87
Şekil 5. 15	Melanoma tümör proteininin Mage-3 121-134 ve NY-ESO-1 155-163 peptid dizilerinin BSA molekülü ile karşılaştırmalı HPLC Kromatogramları	88
Şekil 5. 16	Mage-3 121-134 dizili Melanoma Peptidi ve Poliakrilik aside ait HPLC Spekturumları.....	89
Şekil 5. 17	Mage-3 121-134 dizili Melanoma Peptidi-PAA konjugatlarında kullanılan artan miktarlardaki peptidlere ait HPLC kromatogramları.....	90
Şekil 5. 18	Mage-3 121-134 dizili Melanoma Peptidi-PAA konjugatlarında kullanılan artan miktarlardaki peptidlere ait GPC-Kırılma İndisi (a), UV (b), Işık Saçılması (c), Viskozimetre (d) dedektörü dedektörü kromatogramları	90
Şekil 5. 19	PAA- Mage-3 121-134 dizili Melanoma Peptidi Fiziksel Karışımı (II) ile PAA- Mage-3 121-134 dizili Melanoma Peptidi Konjugatına (III) ait Karşılaştırmalı HPLC Kromatogramı	91
Şekil 5. 20	PAA-peptid Fiziksel Karışımı ile PAA-peptid Konjugatına ait Karşılaştırmalı Floresans Spektrumu	92
Şekil 5. 21	Peptid-PAA konjugatlarına ait OD 280 nm değerleri	93
Şekil 5. 22	Artan oranlarda ($n_{peptid}/n_{PAA}=1$, $n_{peptid}/n_{PAA}=3$, $n_{peptid}/n_{PAA}=5$, $n_{peptid}/n_{PAA}=7$, $n_{peptid}/n_{PAA}=9$, $n_{peptid}/n_{PAA}=11$, $n_{peptid}/n_{PAA}=15$, $n_{peptid}/n_{PAA}=19$, $n_{peptid}/n_{PAA}=23$, $n_{peptid}/n_{PAA}=27$, $n_{peptid}/n_{PAA}=30$) Peptid-PAA konjugatları, peptid ve PAA' e ait HPLC kromatogramları.....	94
Şekil 5. 23	$n_{peptid}/n_{PAA} = 1$ (a), 3 (b), 5 (c), 7 (d) olan Peptid-PAA konjugatlarına (III), konjugat oluşturulan serbest peptid (II) ve PAA'e (I) ait HPLC kromatogramları.....	95
Şekil 5. 24	$n_{peptid}/n_{PAA} = 9$ (e), 11 (f), 15 (g), 19 (h), 23 (i), 27 (j), 30 (k) olan Peptid-PAA konjugatlarına (III), konjugat oluşturulan serbest peptid (II) ve PAA'e (I) ait HPLC kromatogramları	96
Şekil 5. 25	Peptid-PAA konjugatlarında kullanılan artan miktarlardaki peptidlere ait Floresans Spektrumları	97
Şekil 5. 26	Artan oranlarda (n_{peptid}/n_{PAA}) Peptid-PAA konjugatlarına ait Floresans Spektrumları.....	98
Şekil 5. 27	Artan oranlarda (n_{peptid}/n_{PAA}) Peptid-PAA konjugatlarına ait GPC-Kırılma İndisi dedektörü kromatogramları.....	99
Şekil 5. 28	Artan oranlarda (n_{peptid}/n_{PAA}) Peptid-PAA konjugatları, PAA ve peptide ait GPC-UV dedektörü kromatogramları	99
Şekil 5. 29	Artan oranlarda (n_{peptid}/n_{PAA}) Peptid-PAA konjugatları, PAA ve peptide ait GPC-Işık Saçılması dedektörü kromatogramları	100

Şekil 5. 30	Artan oranlarda ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}$) Peptid-PAA konjugatları, PAA ve peptide ait GPC-Viskozimetre dedektörü kromatogramları	100
Şekil 5. 31	MAGE-3 121-134 (LLKYRAREPVTKAE) hidrofilik peptid dizisine ait boyut ve zeta potansiyel ölçümü.....	102
Şekil 5. 32	$n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}} = 1, 3, 9$ ve 11 oranlarındaki peptid-PAA konjugatlarına ait boyut dağılımı şiddet ve yoğunluk grafikleri.....	103
Şekil 5. 33	$n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}} = 15, 23, 27$ ve 30 oranlarındaki peptid-PAA konjugatlarına ait boyut dağılımı şiddet ve yoğunluk grafikleri.....	104
Şekil 5. 34	Klasik (Termal) Yöntemle Sentezlenen VP/AA Kopolimerlerine Ait GPC-Refraktif İndeks (a), UV (b), Işık Saçılması (c) ve Viskozimetre (d) Kromatogramları	105
Şekil 5. 35	Termal yöntemle sentezlenen kompozisyon olarak 3 farklı mol yüzdesine sahip VP/AA kopolimerlerine ait FTIR Spektrumları	107
Şekil 5. 36	Termal yöntemle sentezlenen farklı mol yüzdelere sahip VP/AA (VP:AA=1:1; VP:AA=2:1; VP:AA=1:3) kopolimerlerine ait FTIR Spektrumları Çakıştırma	109
Şekil 5. 37	Mikro Dalga enerjisi kullanılarak sentezlenen, bileşenlerinin P(VP-co-AA) (2:1) ve P(VP-co-AA) (1:2) olduğu kopolimerlere ait GPC-Refraktif İndeks (a); Işık Saçılması (b); Viskozimetre (c) dedektörü Kromatogramları.....	110
Şekil 5. 38	EDC ile konjugasyon yöntemi kullanılarak farklı polimerler ve BSA ile yapılan konjugatlara ait HPLC Kromatogramı	112
Şekil 5. 39	Melanoma Peptidi ve P(VP-co-AA) ait HPLC Kromatogramı	113
Şekil 5. 40	P(VP-co-AA)- Peptid konjugatlarında kullanılan artan miktarlardaki peptidlere ait HPLC kromatogramları	114
Şekil 5. 41	P(VP-co-AA)-Peptid Fiziksel Karışımı ile P(VP-co-AA)-Peptid Konjugatına ait Karşılaştırmalı HPLC Kromatogramı	114
Şekil 5. 42	Artan oranlarda ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=1, n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=3, n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=5, n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=7, n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=9, n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=11, n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=19, n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=27, n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=30$) P(VP-co-AA)-Peptid konjugatlarına ait HPLC kromatogramlarının yakından görünümü.	116
Şekil 5. 43	$n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 1$ (a), 3(b), 5(c) olan P(VP-co-AA)-Peptid konjugatlarına ait HPLC kromatogramı.....	117
Şekil 5. 44	$n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 7$ (d), 9 (e), 11 (f) olan P(VP-co-AA)-Peptid konjugatlarına ait HPLC kromatogramı.....	118
Şekil 5. 45	$n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 19$ (g), 27 (h), 30 (i) olan P(VP-co-AA)-Peptid konjugatlarına ait HPLC kromatogramı.....	119
Şekil 5. 46	Membranlı tüp ile santrifüj sonrası, $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 1, 11, 30$ olan P(VP-co-AA)-Peptid konjugatlarına ait alt faz, üst faz, serbest peptid ve P(VP-co-AA) HPLC kromatogramı.....	120
Şekil 5. 47	Membranlı tüp ile santrifüj sonrası, $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 1, 11, 30$ olan P(VP-co-AA)-Peptid konjugatlarına ait alt faz, üst faz, serbest peptid ve P(VP-co-AA) Floresans Spektrumu.....	121
Şekil 5. 48	P(VP-co-AA)-Peptid konjugatlarında kullanılan artan miktarlardaki peptidlere ait Floresans Spektrumları	122
Şekil 5. 49	Artan oranlarda ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}}$) P(VP-co-AA)-Peptid konjugatlarına ait Floresans Spektrumları	122
Şekil 5. 50	Deneylede Kullanılan VP/AA Kopolimerlerine Ait Zeta Sizer Sonucu ..	123
Şekil 5. 51	$n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 1, 3$ ve 5 oranlarındaki P(VP-co-AA)-Peptid konjugatlarına ait boyut dağılımı şiddet ve yoğunluk grafikleri.....	124

Şekil 5. 52	$n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 7, 9$ ve 11 oranlarındaki P(VP-co-AA)-Peptid konjugatlarına ait boyut dağılımı şiddet ve yoğunluk grafikleri.....	125
Şekil 5. 53	$n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 19, 27$ ve 30 oranlarındaki P(VP-co-AA)-Peptid konjugatlarına ait boyut dağılımı şiddet ve yoğunluk grafikleri.....	126
Şekil 5. 54	VP/AA kopolimerinin 48 saatlik inkübasyonu sonucu MCF 7 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskopik incelenmesi (20x); (a) 1 mg/ml (b) 0,5 mg/ml (c) 0,1 mg/ml (d) Kontrol	128
Şekil 5. 55	VP/AA kopolimerinin 48 saatlik inkübasyonu sonucu MCF 7 hücrelerinde oluşturduğu formazan kristal oluşumunun mikroskopik incelenmesi (20x); (a) 1 mg/ml (b) 0,5 mg/ml (c) 0,1 mg/ml (d) Kontrol.....	129
Şekil 5. 56	EDC çapraz bağlayıcısı varlığında sentezlenen BSA-peptid konjugatına ait HPLC Kromatogramı.....	135
Şekil 5. 57	EDC çapraz bağlayıcısı varlığında sentezlenen BSA-peptid konjugatına ait Floresans Spektrumu.....	136
Şekil 5. 58	P(VP-co-AA)-Peptid Fiziksel Karışımı ile P(VP-co-AA)-Peptid Konjugatına ait Karşılaştırmalı HPLC Kromatogramı	137
Şekil 5. 59	P(VP-co-AA)-Peptid kompleks ve konjugatına ait Floresans Spektrumu	138
Şekil 5. 60	Yöntem 1 ve Yöntem 2' ye göre sentezlenen P(VP-co-AA)-peptid konjugatlarına ait HPLC Kromatogramı.....	139
Şekil 5. 61	Balb/c fare.....	140
Şekil 5. 62	Balb-c fareye karınaltından enjeksiyon	140
Şekil 5. 63	(♦) Peptid-P(VP-co-AA) kompleksi (0,5 mg/0,5 ml), (▶) Peptid-P(VP-co-AA) kompleksi (1 mg/0,5 ml) , Yöntem 1'e göre EDC çapraz bağlayıcısı varlığında sentezlenen (▪) Peptid-BSA konjugatı (1 mg/0,5 ml) ve (■) Peptid-P(VP-co-AA) konjugatı (1 mg/0,5 ml), Yöntem 2'ye göre mikrodalga enerjisi kullanılarak organik ortamda sentezlenen (●) Peptid-P(VP-co-AA) konjugatına (1 mg/0,5 ml) karşı 70 gün boyunca 7 gün aralıklarla alınan fare serumlarında ELISA yöntemiyle tayin edilen antikor miktarlarının karşılaştırılması	145
Şekil 5. 64	Her grubun 10 hafta için t değerleri grafiği	148
Şekil 5. 65	I. grubun 10 hafta için t değerleri grafiği.....	149
Şekil 5. 66	II. grubun 10 hafta için t değerleri grafiği	150
Şekil 5. 67	III. grubun 10 hafta için t değerleri grafiği	151
Şekil 5. 68	IV. grubun 10 hafta için t değerleri grafiği.....	152
Şekil 5. 69	V. grubun 10 hafta için t değerleri grafiği	153
Şekil 6. 1	$n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}} = 1, 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 23, 27, 30$ oranlarında sentezlenen peptid-PAA konjugatlarına ait Molekül ağırlığı tayini	155
Şekil 6. 2	$n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}} = 1, 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 23, 27, 30$ oranlarındaki PAA-peptid konjugatlarına ait Viskotek cihazının UV, Işık Saçılması, Refraktif İndeks ve Viskozimetre dedektörlerinden elde edilen piklerin alanları	156
Şekil 6. 3	$n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}} = 1, 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 23, 27, 30$ oranlarındaki PAA-peptid konjugatlarına ait HPLC kromatogramından elde edilen piklerin alanları	157
Şekil 6. 4	Artan oranlarda ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}$) Peptid-PAA konjugatları için kullanılan artan miktarlardaki peptidlere ait maksimum floresans şiddetleri (a); artan oranlarda ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}$) Peptid-PAA konjugatlarına ait Maksimum Floresans Şiddetleri (b).	158

Şekil 6. 5	$n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}} = 1, 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 23, 27, 30$ oranlarındaki PAA-peptid konjugatlarına ait Floresans Spektrumlarındaki $\lambda_{\text{maksimum}}$ ve $\Delta\lambda$ değerleri	159
Şekil 6. 6	Artan $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}$ oranlarına ait moleküllerin ortalama boyutları (d.nm) ...	160
Şekil 6. 7	Artan oranlarda ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}}=1, 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 23, 27$ ve 30) P(VP-co-AA)-Peptid konjugatlarının HPLC kromatogramlarından elde edilen piklerin alanları	162
Şekil 6. 8	Artan oranlarda ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}}$) P(VP-co-AA)-Peptid konjugatları içinde bulunan peptidlerin maksimum floresans şiddetleri (a); artan oranlarda ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}}$) P(VP-co-AA)-Peptid konjugatlarına ait maksimum floresans şiddetleri (b).....	163
Şekil 6. 9	Artan $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}} = 1, 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 23, 27, 30$ oranlarındaki PAA-peptid konjugatlarına ait Floresans Spektrumlarındaki $\lambda_{\text{maksimum}}$ (a) ve $\Delta\lambda$ (b) değerleri.....	164
Şekil 6. 10	Artan $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}$ oranlarına ait moleküllerin ortalama boyutları (d.nm).....	165
Şekil 6. 11	Mikrodalga Teknolojisi ve Klasik yolla ısıtmanın farkı [95].....	167
Şekil 6. 12	Yöntem 1 ve Yöntem 2' ye göre sentezlenen P(VP-co-AA)-peptid konjugatlarına ait HPLC Kromatogramı.....	168
Şekil 6. 13	(♦) Peptid-P(VP-co-AA) kompleksi (0,5 mg/0,5 ml), (▶) Peptid-P(VP-co-AA) kompleksi (1 mg/0,5 ml) , Yöntem 1'e göre EDC çapraz bağlayıcısı varlığında sentezlenen (■) Peptid-BSA konjugatı (1 mg/0,5 ml) ve (■) Peptid-P(VP-co-AA) konjugatı (1 mg/0,5 ml), Yöntem 2'ye göre mikrodalga enerjisi kullanılarak organik ortamda sentezlenen (●) Peptid-P(VP-co-AA) konjugatına (1 mg/0,5 ml) karşı 70 gün boyunca 7 gün aralıklarla alınan fare serumlarında ELISA yöntemiyle tayin edilen antikor miktarlarının karşılaştırılması	170
Şekil 6. 14	Peptid-P(VP-co-AA) kompleksi (0,5 mg/0,5 ml), Peptid-P(VP-co-AA) kompleksine(1 mg/0,5 ml) karşı 70 gün boyunca 7 gün aralıklarla alınan fare serumlarında ELISA yöntemiyle tayin edilen antikor miktarlarının karşılaştırılması	172
Şekil 6. 15	Peptid-P(VP-co-AA) kompleksi (0,5 mg/0,5 ml), Peptid-P(VP-co-AA) kompleksi (1 mg/0,5 ml) , Yöntem 1'e göre EDC çapraz bağlayıcısı varlığında sentezlenen Peptid-BSA konjugatı (1 mg/0,5 ml) ve Peptid-P(VP-co-AA) konjugatı (1 mg/0,5 ml), Yöntem 2'ye göre mikrodalga enerjisi kullanılarak organik ortamda sentezlenen Peptid-P(VP-co-AA) konjugatına (1 mg/0,5 ml) karşı enjeksiyon sonrası (70 gün boyunca) balb/c fare serumlarından elde edilen spesifik antikor düzeyi.....	173
Şekil 6. 16	Peptid-P(VP-co-AA) kompleksi (1 mg/0,5 ml) , Yöntem 1'e göre EDC çapraz bağlayıcısı varlığında sentezlenen Peptid-P(VP-co-AA) konjugatı (1 mg/0,5 ml), Yöntem 2'ye göre mikrodalga enerjisi kullanılarak organik ortamda sentezlenen Peptid-P(VP-co-AA) konjugatına (1 mg/0,5 ml) karşı 70 gün boyunca 7 gün aralıklarla alınan fare serumlarında ELISA yöntemiyle tayin edilen antikor miktarlarının karşılaştırılması	175

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2. 1 Melanoma insidensinin yaş ve cinsiyet dağılımı.....	15
Çizelge 2. 2 Melanomaya bağlı mortalite yaş ve cinsiyet dağılımı.....	15
Çizelge 2. 3 İmmünojen çözeltilerle bağışıklanmış farelerin heparinin vücuda verilme zamanına bağlı olarak dalakta tayin edilen AOH'ların göreceli miktarı ..	23
Çizelge 4.1 Polimer-peptid fiziksel karışımlarının şematik olarak gösterimi	66
Çizelge 4.2 PAA ile EDC kullanarak yapılan konjugat sentezi aşamaları	69
Çizelge 4.3 P(VP-co-AA) ile EDC varlığında yapılan konjugat sentezi basamakları..	72
Çizelge 4.4 P(VP-co-AA) ile organik ortamda mikrodalga enerjisi kullanılarak yapılan konjugat sentezi basamakları	74
Çizelge 5.1 GPC cihazından alınan peptid-PAA konjugatlarına ait piklerin renkleri	101
Çizelge 5.2 Klasik (Termal) Yöntemle Sentezlenen VP/AA Kopolimerlerine Ait GPC ile Molekül Ağırlığı Tayini	106
Çizelge 5.3 Kopolimer içinde yer alan AA ve VP kompozisyonu	108
Çizelge 5.4 Mikro Dalga Enerjisi Kullanılarak Sentezlenen VP/AA Kopolimerlerine Ait GPC ile Molekül Ağırlığı Tayini	111
Çizelge 5.5 Fiziksel kompleks ve biyokonjugatların enjekte edildiği balb/c türü fare grupları ve enjekte edilen aşı örneklerinin içeriği.....	141
Çizelge 5.6 Gruplara ait ortalama ve standart sapma değerleri	146
Çizelge 5.7 Her grubun kontrol grubuna göre t-test ile karşılaştırılması.....	148
Çizelge 5.8 I. Grubun Diğer Gruplarla ttest ile kıyaslanması.....	149
Çizelge 5.9 II. Grubun Diğer Gruplarla ttest ile kıyaslanması	150
Çizelge 5.10 III. Grubun Diğer Gruplarla ttest ile kıyaslanması	151
Çizelge 5.11 IV. Grubun Diğer Gruplarla ttest ile kıyaslanması.....	152
Çizelge 5.12 V. Grubun Diğer Gruplarla ttest ile kıyaslanması	153

**MELANOMA HASTALIĞINI OLUŞTURAN SENTETİK
PEPTİDLERİN POLİAKRİLİKASİT VE KOPOLİMERLERİ İLE
KONJUGASYONU**

Kadriye ATICI KIZILBEY

Kimya Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Zeynep AKDESTE

Sentetik polimerlerin biyomoleküllerle birleştirilmesi tıp, eczacılık ve mühendislik dallarında çeşitli uygulama alanları bulmaktadır. Kontrollü ilaç-salınımı, doku mühendisliği ve hücre üretimi gibi fonksiyonel uygulamalarda kullanılan katı hal (suda çözünmeyen) polimerik sistemlerin yanı sıra suda çözünebilir polimer-biyomolekül konjugatları son zamanlarda enzim kararlılığının artırılmasında, biyosensörler üretiminde, DNA'nın hücre içi transferinde ve antijenlerin immünojenliğinin düzenlenmesi için protein modifikasyonunda kullanılmaktadırlar. Ayrıca, polimerlerin biyomoleküllerle etkileşiminin incelenmesi, gerek canlı organizmadaki davranışlarının anlaşılmasında, gerekse de biyoseperasyon ve biyokonjugasyon teknolojisinin geliştirilmesi için önem taşımaktadır.

Sentetik peptidler zayıf immünojenik özelliklerinden dolayı çeşitli taşıyıcı moleküllere bağlanmaktadır. Taşıyıcı moleküllere bağlanan sentetik peptidler, daha yüksek immün cevap oluşturabilmekte, biyolojik sistemde daha uzun süre kalabilmekte (prolongation time) ve bozucu etkenlere karşı daha kararlı olabilmektedirler.

Bahsedilen avantajlarından dolayı bu tez çalışmasında; sentetik peptidler adjuvant özellikteki polimerlere bağlanmıştır. Bu amaçla öncelikle radikalik benzoilperoksit başlatıcısı kullanılarak akrilik asit ve vinil piroolidon monomerlerinin farklı oranlarında

kopolimerler sentezlenmiştir. Kopolimer sentezine paralel olarak da Melanoma kanserine ait antijenik NY-ESO-1 155-163 (Q-L-S-L-L-M-W-I-T) ve MAGE-3 121-134 (L-L-K-Y-R-A-R-E-P-V-T-K-A-E) dizili sentetik peptidler Katı faz peptid sentezi yöntemi ile sentezlenmiştir. Sentetik peptidler 1-etil-3-(3-dimetil aminopropil karbodiimid çapraz bağlayıcısı kullanılarak PAA ve VP/AA polimerleri ile kovalent olarak bağlanmıştır. Sentezlenen biyokonjugatların ve komplekslerin yapı işlev analizleri bölümümüz laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Fizikokimyasal yapı analizi amacı ile biyokonjugatlar ve kompleks sistemleri Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC), Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC), Floresans Spektrofotometre ve Zeta-Sizer sistemi ile incelenerek üç boyutlu yapılarının analizi, kompleks ve konjugat oluşumu ile moleküler yapılarda meydana gelen değişimler araştırılmıştır.

Bu tez kapsamında elde edilecek bilgiler ışığında immün cevabın elde edilmesi ile Melanoma kanserine karşı çeşitli koruyucuların geliştirilmesi (prophylactics) ve tümörlerin teşhisinde kullanılacak spesifik antikörlerin elde edilmesi için yeni olasılıklar ortaya çıkarabilecek bir ön çalışmadır.

Anahtar Kelimeler: Melanoma, Peptid, Polielektrolit, P(VP-co-AA), Konjugasyon, EDC

ABSTRACT

CONJUGATION OF MELANOMA BASED SYNTHETIC PEPTIDES WITH POLYACRYLIC ACID AND THEIR COPOLYMERS

Kadriye ATICI KIZILBEY

Department of Chemistry

PhD. Thesis

Advisor: Assist. Prof. Dr. Zeynep Mustafaeva AKDESTE

Conjugation of synthetic polymers with biomolecules has been studied for the application in the fields of medicine, pharmacy and engineering. Insoluble polymer-biomolecule conjugates have various functional applications such as drug-release systems, tissue engineering and recovery of cultured cells. At the same time, the water-soluble conjugates are used in the stabilization of enzymes, for the creation of biosensors, transformation of DNA into cells and for the regulation of immunogenicity of antigens. Besides, interaction of polymers with biomolecules is important for understanding the action mechanism of biopolymers in organism, bioseparation and elaboration of conjugation technology.

Synthetic peptides can be conjugated with various carrier molecules because of their weak immunogenic properties. Synthetic peptides linked carrier molecules, create higher immune response, stay longer in biological system (prolongation time), and can be more stable against adverse effects.

Due to the advantages mentioned in this thesis; synthetic peptides bound to polymers which have adjuvant properties. For this purpose, copolymers of acrylic acid and vinyl pyrrolidone monomers in different ratios were synthesized using a radical initiator

benzoilperoxide. In parallel with the synthesis of copolymer, melanoma cancer antigenic NY-ESO-155-163 (Q-L-S-L-L-M-W-I-T) and MAGE-3121-134 (L-L-K-Y-R-A-R-E-P-V-T-K-A-E) peptide sequences were synthesized by solid phase peptide synthesis method. Synthetic peptides covalently linked with PAA and VP/AA polymers by using 1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimid cross-linker. Structural and functional analysis of complexes and bioconjugates were made in our department laboratories.

Three-dimensional structures, molecular structures and changes in the formation of complex and conjugate were investigated with the aim of physicochemical and structural analysis by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Gel Permeation Chromatography (GPC), Fluorescence spectrophotometer and Zeta-Sizer system.

The light of information to be obtained within the scope of this thesis, obtaining immune response against melanoma cancer is a preliminary study of new possibilities for development in various preservatives (prophylactics) and tumor-specific antibodies used in the diagnosis.

Key words: Melanoma, Peptide, Polyelectrolyte, P(VP-co-AA), Conjugation, EDC

1.1 Literatür Özeti

Kanser hastalarında spesifik immun cevaba yol açan tümör antijenleri, tümör hastalıklarının tedavisi için kanser immunolojisinin devam eden araştırma konularından biridir [1-6]. İnsan kanseri için spesifik humoral cevaba yol açan pek çok kanıt mevcuttur. Sentetik peptidlerin kansere karşı iyi bir aşı materyali olacağı önerilebilir [7]. Bilindiği gibi peptidlerin çeşitli fizyolojik terapötik özelliklerinin olduğu gösterilmiştir. Bunun yanı sıra canlı organizmaya verilmeleri ile birlikte sıklıkla biyobozunmaya uğrarlar veya immunojenik tabiata sahiplerse organizmanın immun reaksiyonlarına karşılık vermeye başlarlar. Fakat pek çok tümör antijeninin çok zayıf immunojenliği, organizmanın tümöre karşı immun koruma oluşturmaya izin vermez. Bu nedenle in-vivo çalışmalarda immun cevabın süresi ve şiddeti bu biyoaktif bileşiklerin doğasına bağlıdır ve her defasında düzenlenme ve optimize edilme zorunluluğundadır. Taşıyıcı molekül olarak sentetik polielektrolitlerin (PE) kullanılması klasik yöntemlere kıyasla bazı potansiyel üstünlükler sağlamaktadır. PE'ler peptid molekülü için eş zamanlı hem taşıyıcı ve hem de adjuvant özelliği göstermektedirler. Biyopolimer sistemlerin tabiatı, genelde içerdikleri polielektrolitlerin ve biyomolekülün kimyasal ve biyolojik özellikleri yanı sıra bunların kompozisyonu, yapısı ve ölçüleri ile ifade edilmektedir. Bundan dolayı peptid ve PE arasındaki etkileşimin mikroskobik ölçülerle belirlenmesi ve polikompleksin yapısının anlaşılması, biyopolimer sistemlerin mikroskobik davranışını idare etmek için gerekli olan parametrelerdir.

Peptidlerin polimerlere bağlanması veya modifikasyonu in-vivo ve in-vitro uygulamaların her ikisinde de pek çok yarar sağlayabilir. Yabancı moleküllerin polimer modifikasyonu biyouyumluluğu artırır. Biyouyumluluğun artması ise peptid-polimer sistemlerinin in-vivo dayanıklılığının artması ve retiküloendotelial sistem tarafından bu konjugatların yok edilmenin gecikmesi şeklindedir [8-31].

Polimer-peptid kompleksleri polianyonik zincirli polimerlerin peptidler üzerindeki zıt yüklü grupları ile etkileşimi sonucunda oluşturulabilir. Etkileşim genişliği pH ve iyonik güce duyarlıdır ve proteinlerin izoelektrik noktalarına bağlı olarak değişmektedir. Peptid-polimer kompleksleri aktif fonksiyonel grupları ile (kimyasal bağlanma sonucu) konjugat oluşturan peptid ve polielektrolit moleküllerinin fragmentleri arasındaki etkileşimlerle kararlı hale gelirler.

Sentezlenen biyokonjugatların suda çözünebilirliği ve üç boyutlu yapıları hücre membranı ile etkileşim açısından oldukça önemli özelliklerdir. Fizyolojik şartlarda (pH, iyonik kuvvet vs.); antijen epitoplari biyokonjugat partiküllerindeki serbest bölgelerin varlığında (antijen bağlanmamış bölge) daha yoğun hale gelirler (nonstokiometrik yapı), ve bu serbest bölgeler negatif yüklü hücre membranı ile pozitif yükler, hidrofobik gruplar, geçiş metal iyonları, hidrojen bağı yapabilen fonksiyonel gruplar vb. kuvvetlerin etkisi ile çeşitli etkileşimler oluştururlar.

Bu polikompleksler, bilindiği üzere, organizmanın uzun bir süre boyunca artan immun korumasının sonucu olarak pek çok kez daha yüksek antikor oluşumu sağlarlar. Literatürde yer alan bilgilerde de gösterildiği gibi suda çözünebilen yüklü polimerlerin hayvanlara çeşitli antijenlerle eş zamanlı olarak enjeksiyonu immun cevabı arttırmış ve böylece istenilen adjuvant etkisi oluşturulmuştur.

Bilindiği üzere melanoma NY-ESO-1 antijenlerini ifade eder. NY-ESO-1 antijenleri NY-ESO-1 kanser hastalarında humoral ve hücresele immun cevaba yol açar. Immun sistem tarafından antijen epitoplarından bazılarının tanınması, bu epitopların tanımladığı kanser hücrelerinin yok edilmesine yol açar. Bu epitoplari oluşturan peptidler literatürde tanımlanmıştır [32-34].

MAGE-3 121-134 dizisi ise, 121 den 134 e kadar olan fragmentteki aminoasitlerdir. MAGE-3 tipi genler, erkek üreme hücrelerinin dışında sadece normal hücreler tarafından değil farklı histolojik türdeki birçok tümörler tarafından ifade edilir. Bu

nedenle, MAGE-tipi genler tarafından kodlanan antijenler kesinlikle tümöre özgü ve tümörler için ortaktır [35, 36].

Böylece bu peptidleri yüksek immunojenik aşılarda oluşturmak için kullanmak ve onların anti kanser immunitenin oluşturmadaki etkinliğini incelemek mümkündür.

Bu amaçla öncelikle Melanoma hastalığına ait antijenik peptidler olan hidrofobik NY-ESO-1 155-163 (QLSLLMWIT) ve hidrofilik MAGE-3 121-134 (LLKYRAREPVTKAE) peptid dizili sentetik Melanoma peptidlerinin sentezi geleneksel yöntemlerden daha saf ve daha fazla ürün oluşturan mikrodalga enerjisi kullanılarak mikrodalga peptid sentez cihazında Katı Faz Peptid Sentez Yöntemi uygulanarak sentezlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada taşıyıcı olarak adjuvant özelliğe sahip, düşük toksisiteli ve yüksek biyobozunur polimerler kullanılmıştır. Toksik olmayan ve biyobozunur özellikteki ve monomerlerinin farklı oranlarında Vinilpirolidon-Akrilik asit kopolimerleri (VP:AA = 1:3 ; 1:2 ; 2:1) benzoil peroksit başlatıcısı kullanılarak radikalik polimerizasyon yöntemiyle sentezlenmiştir.

Daha sonra yine tarafımızdan sentezlenen sentetik peptidlerin farklı oranları poliakrilik asit (PAA) polimeri ve VP/AA kopolimeri ile kovalent bağlanma metodu ile konjuge edilmiştir. Farklı oranlarda sentezlenen peptid-polimer biyokonjugatları gelişmiş donanıma sahip olan laboratuvarlarımızda karakterize edilmiştir. Peptid dizilerinin farklı oranlarında sentezlenen biyokonjugatlarının ve polikomplekslerinin yapı analizleri HPLC (Shimadzu), SEC (Viscotek), Zetasizer, Floresans Spektrofotometre (PTI) sistemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bu biyokonjugat ve kompleks sistemlerin biyolojik ortamdaki etkileri üç boyutlu yapılarına ve konformasyonlarına bağlı olduğundan yine bu tez kapsamında oluşturulan kompleks ve biyokonjugatların fizikokimyasal analizleri gerçekleştirilecek ve oluşturulan sistemler karakterize edilmeye çalışılacaktır.

1.2 Tezin Amacı

Bu tezin amacı, sentetik peptidleri yüksek immunojenik aşılarda oluşturmak için kullanmak ve onların anti kanser immunitenin oluşturmadaki etkinliğini incelemektir. Tümör antijenlerinin polipeptid epitoplarını içeren, peptidler ve sentetik polimerlerin

bağlanması ile oluşturulan biyopolimer sistemler yardımıyla zayıf immunojen özellikteki peptidlerin immun özelliğini arttırmak için yeni bir yaklaşım çalışmasıdır.

1.3 Hipotez

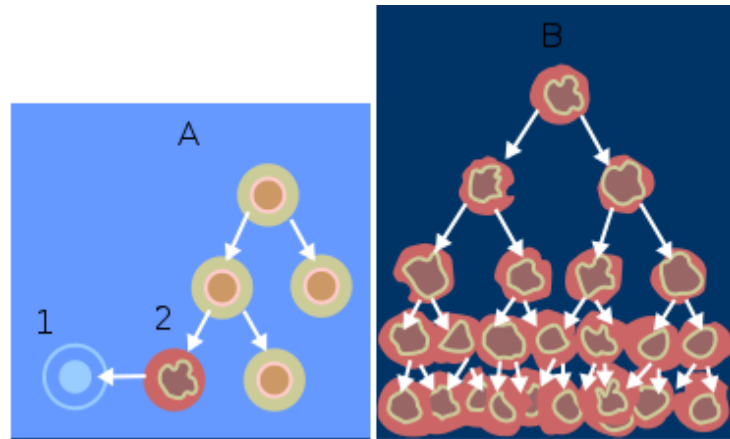
Bu tez çalışmasından sentetik tümör peptidlerinin polimerler ile biyokonjugatları ve komplekslerinin, peptidlerin immunojenik özelliklerini çarpıcı bir şekilde arttırmasının daha sonra gerçekleştirilecek olan hayvan deneylerinde kanda yüksek spesifiklikteki monoklonal antikorların oluşturulmasına olanak sağlaması beklenmektedir. Deney hayvanlarının kanındaki bu antikorlar, hastalardaki çalışmalarda kullanılabilir ve bu antikorların in vivo ve in vitro koşullarda tumor hücreleri üzerindeki etkilerinin araştırılması sağlanacaktır. Sentezlenen biyokonjugatların tümör hücrelerinin büyümesinde önemli bir baskılanma sağlaması beklenmektedir.

Sentezlenen peptid-polimer biyokonjugatları daha sonraki çalışmalarda kullanılacak ve diğer ilgili laboratuvarların yapacakları fazladan sentez ve analizleri önleyecektir. Daha sonra bu uygulamalar için bir protokol geliştirilecektir. Bu da, kanser hastalarındaki tümörlerin tanısı ve bu tümörlerin büyümesinin görüntülenebilmesi için bir sonraki basamağa ilerlenmesine imkan sağlayacaktır.

Bu çalışma nitelik olarak ülkemizin hedeflediği ileri teknolojiye uyum sağlayacak polimer ve protein teknolojisi birlikteliğinde, ileri biyoteknolojik malzemelerin üretilmesine zemin hazırlayacaktır. Bu nedenle sunulan tez çalışması, temel bilimler uygulamalı araştırma alanlarını kapsayan disiplinler arası nitelikte geniş spektrumlu bir çalışmadır.

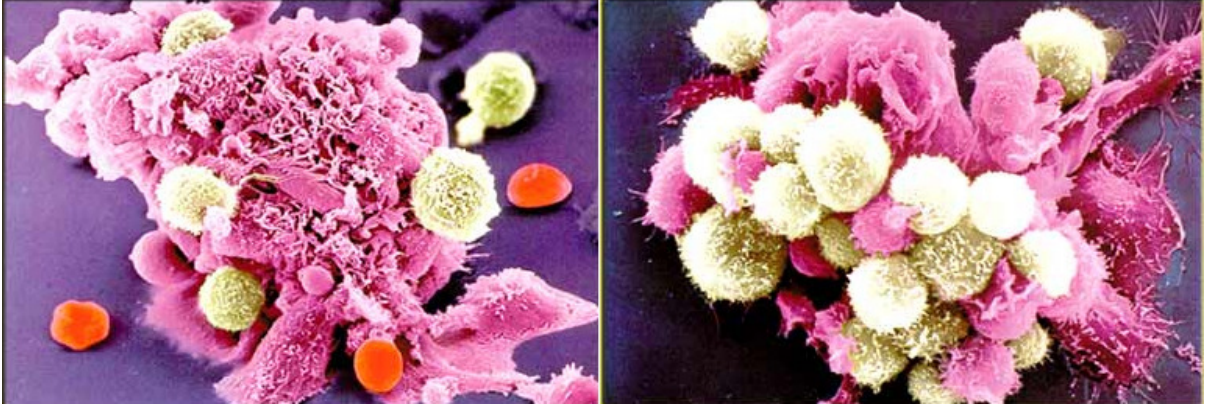
2.1 Kanser

Kanser vücut hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde üreyerek komşu dokuları işgal etmesi (invazyon) veya kaynağını aldığı organdan daha uzak bir yere kan-lenf yoluyla yayılması (metastaz) ile oluşan bir hastalıktır. Hücreler DNA replikasyonları esnasında meydana gelen bozulmalar nedeniyle yapı değiştirirler. Normal vücut hücre ve dokuları, orijinal büyüklük ve yapılarını korurken kanser hücreleri saldırgan bir tablo çizerler [37].



Şekil 2. 1 A - normal hücre bölünmesi; 1- Apoptosis; 2- Hasarlı hücre B – kanserli hücrenin bölünmesi [1].

Kanser potansiyeli olan hücrelerin en önemli özelliği "onkogen" içermesi yani bulunduğu dokudan tamamen farklı bir yeni bir hücre olacak şekilde bozulma potansiyeli olmasıdır.



Şekil 2. 2 Kanser hücreleriyle (pembe) lenfositlerin (sarı) savaşının, renkli scanning elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülenmesi (J.C. REVY, ISM / Science Photo Library)

Bir kanser hücresi oluştuğunda vücudun bağışıklık sistemi bu yabancı hücreyi tanır ve parçalar. Bu sayede vücutta oluşan binlerce kanser hücresi bağışıklık sistemi tarafından yok edilir. Her hücrede, onkogenlerin aktivasyonunu baskılayan antionkogenler (tümör baskılayıcı gen) bulunmaktadır. Antionkogenlerin kaybolması veya inaktive olması durumunda onkogen aktivitesine izin verilmiş olur. Bunu da kanserin oluşumu izler. Vücutta mutasyona uğrayan hücrelerin ancak çok küçük bir kısmı kansere yol açar. Bunun birçok nedeni vardır:

- Mutasyon gösteren hücrelerin yaşama yüzdeleri normal hücrelere göre daha düşüktür.
- Mutasyon gösteren hücrelerin pek çoğunda bile hala aşırı büyümeyi önleyen normal feedback kontrol mekanizması ("Tümör baskılayıcı genler") bulunur. Bu yüzden hayatta kalabilen mutant hücrelerin çok azı kanserli hücreye dönüşür.

Sıklıkla, kanser potansiyeli taşıyan bu hücreler büyüyüp kanser oluşturmadan önce vücudun bağışıklık sistemi tarafından yok edilirler.

Mutant hücrelerin çoğu değişikliğe uğramış genleri nedeniyle kendi içlerinde anormal protein oluştururlar. Bu anormal proteinler vücudun bağışıklık sistemini uyararak antikor yapımına veya kanserli hücreye karşı duyarlılık kazanmış lenfositlerin oluşmasına neden olarak kanserli hücrenin yok edilmesini sağlarlar. Bağışıklık sisteminin etkinliğini bozan durumlar kanseri hazırlayıcı etmenler (*predispozan*) olarak bilinir. Bağışıklık sistemi tarafından yok edilmemiş olan bu hücreler kontrolsüz biçimde üreyerek buldukları dokuyu işgal ederler. Sadece o dokuyla sınırlı kalmayıp komşu dokulara da yayılırlar (*invazyon*). Kan ve lenf dolaşımı yoluyla vücudun ilgisiz bölgelerine de taşınabilirler (*metastaz*).

İyi huylu (*benign*) tümörler genellikle sınırları belirgin kitlelerdir. Ancak kötü huylu (*malign*) tümörler sınırları belirsiz ve çevre dokuya sıkıca yapışık halde bulunurlar.

Kanser hücreleri civarlarındaki dokulara ulaşarak, kan dolaşımı, lenf sistemi ya da vücut boşlukları ve yüzeyleri yollarıyla vücudun diğer taraflarına yayılırlar. Buna metastaz denir.

Kadınlarda en çok meme, rahim ve kalın barsak kanseri; erkeklerde ise en çok akciğer, prostat, mide ve kalın barsak kanserleri görülmektedir.

Vücutta görüldüğü bölgelere bakıldığında; beyin ve omurilik %1, cilt %10, genital bölgeler- erkeklerde %20, kadınlarda %8, meme %14, sindirim sistemi %25, solunum yolları- erkeklerde %2, kadınlarda %3, karaciğer ve safra kesesinde %3' lük bir dilime sahiptir.

Tüm kanser türleri birlikte değerlendirildiğinde erişkin kanserlerinde % 60, çocuk kanserlerinde ise % 77 oranında iyileşme mümkündür. Ancak hastalığın cinsi, yaygınlığı, uygulanan tedavi gibi bazı faktörler tedavi şansını doğrudan etkiler [1].

2.2 Cilt Kanseri

Bütün kanser türleri içinde deri kanseri en sık görülenidir. Deri kanserinden korunmak için yapılması gereken güneşten korunmaktır. Güneşe aşırı maruz kalma deri kanserinin temel sebebidir. Diğer faktörler tekrarlayan tıbbi ve endüstriyel X ışınlarına maruz kalma, yanık veya yara izi bırakarak iyileşen cilt hastalıkları, kömür katranı veya arsenik içeren maddelere mesleki olarak maruz kalma ve ailede cilt kanseri bulunmasıdır. Güneş ışınları deri kanserine sebep olan en önemli neden olduğundan en önemli koruyucu önlem güneşten kaçınmaktır. Cilt kanserleri vücudun herhangi bir

bölgesinde bulunabileceği gibi %80 baş-boyun bölgesindedir. Vücudun güneş gören bölgeleri deri kanserlerine daha çok adaydır.

Cilt 3 tabakadan meydana gelmiştir.

1) Epidermis cildin en üst tabakasıdır. Vücudu dış etkenlerden korur. Su, elektrolit ve ısı kaybını önler. Ortadaki dermis katının hemen üstünde bazal hücreler dizisi, onun da üstünde dikensi hücreler de denen skuamöz hücreler, daha yüzeyde ise granüllü hücrelerin arasında yer alan ve melanosit denen hücreler bulunur. Melanositlerden melanin pigmenti sentezi yapılır. Bu pigment diğer epidermis hücrelerine de geçerek derinin normal rengini verir.

2) Dermis epidermisin altındadır. Kıl follikülleri, ter ve yağ bezleri, damarlar, sinirler bu kattadır.

3) Subcutis deri altı yağ dokusudur.

2.2.1 Cilt Kanseri Tipleri

Üç tip cilt (deri) kanseri bulunmaktadır.

a) Bazal hücreli karsinoma-Bu kanser tipi genellikle deride küçük etli kabarıklık şeklinde sıklıkla yüz, boyun ve el sırtlarında ortaya çıkar. Bu kanser tipi nadiren metastaz yapmasına rağmen, derinin altındaki kemiğe yayılabilir ve kanserli dokunun yakınındaki dokuları harap edebilir.

b) Squamöz Hücreli karsinoma - Deride kabarıklıklar veya kırmızı kabuklu yaralar şeklinde ortaya çıkabilir. Büyük kitleler oluşturabilir. Bazal hücreli karsinomunun tersine diğer organlara yayılabilir. Erken yakalandığında tedavi oranı yüksektir. Bazal hücreli karsinoma ve Squamöz hücreli karsinomada tedavi başarısı % 95 dir.

c) Malign Melanom - Bütün deri kanserleri içinde en öldürücü olanıdır. Bazal hücreli ve squamöz hücreli karsinoma da olduğu gibi melanomda da erken tanı tedavi şansını arttırır.

Melanom melanin denen pigmenti (deriye rengini veren madde) üreten melanosit dediğimiz hücrelerde başlar. Melanin derimizin rengini verir ve güneşten kısmi olarak korur. Melanom hücreleri melanin üretmeye devam eder ve bu nedenle kanser alanı kahverengi veya siyahtır. Fakat melanom beyaz ve kırmızı da olabilir. Melanom yayılma özelliği gösterdiğinden muhakkak tedavi edilmelidir. Melanom dikkat

çekmeden hızla büyüebilir. Genellikle bir ben olarak veya kahve renkli bir benin üzerinde veya yakınında ortaya çıkar. Melanomun kalıtsal özelliği de vardır. Ailesinde melanom olan kişilerin riski daha fazladır [38].



Şekil 2. 3 İnsan vücudunda görülen melanoma tipleri

Koyu renkli tene sahip olmak melanoma olma riskini ortadan kaldırmaz. Esmer kişilerde de özellikle avuç içi, ayak tabanı, tırnak yatağı ve ağızda melanoma gelişebilir [39]. Erken evre melanomu, iyi huylu benlerden ayırmak için ABCD kuralı uygulanır. ABCD kuralındaki her harf, ciltteki oluşumlarda bakılması gereken bir parametreye karşılık gelir. Aşağıda, cilt muayenesinde dikkat etmeniz gereken söz konusu özellikler yer almaktadır:

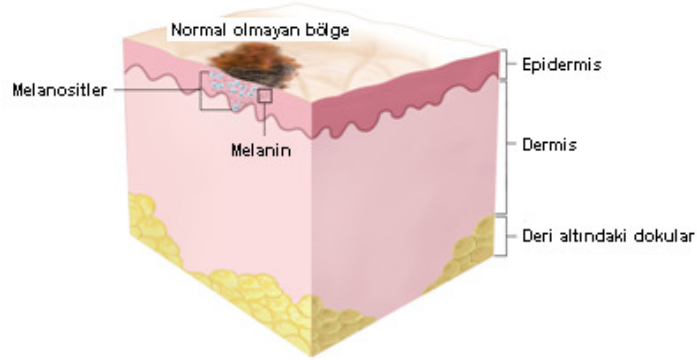
- a) Asimetri (Asymmetry)** - Benin bir tarafının diğer tarafından farklı olmasıdır. Benin ortasından hayali bir çizgi çiziniz. Melanomda genellikle asimetri vardır.
- b) Sınır Düzensizliği (Border)** - Melanomun sınırı veya kenarı genellikle pürüzlü, çentikli veya bulanıktır.
- c) Renk (Color)** - İyi huylu benler herhangi bir renkte olabilir, fakat genellikle tek renklidir. Melanom ise sıklıkla birden fazla rengi içinde barındırır.
- d) Büyüklük (Diameter)** - İyi huylu benler küçük kalırken melanom büyümeye devam eder. Genellikle 6 milimetreden büyüktür çaptadır [40].

	İyi Huylu Ben	Melanom
A		
B		
C		
D		

Şekil 2. 4 Erken evre melanomunun ciltteki oluşumunu incelemeye yarayan parametreler

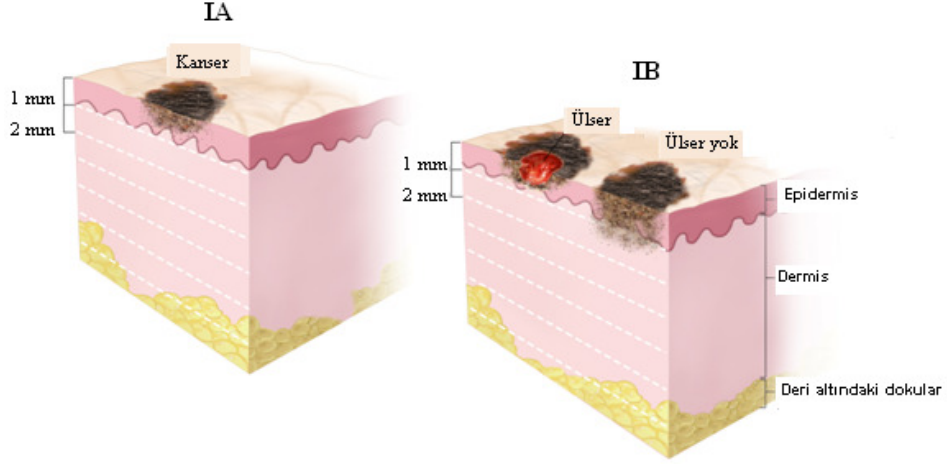
2.3 Melanoma Hastalığının Safhaları

0. Evre: 0. evrede, normal olmayan melanositler epidermiste (cildin en dış katmanı) yer alır. Bu normal olmayan melanosit hücreleri kansere dönüşebilir ve normal dokulara sıçrayabilir. 0. evre melanoma in situ olarak da tanımlanmaktadır.



Şekil 2. 5 Melanoma Hastalığı 0. Evresi [41]

I. Evre: I. evrede kanser oluşmaktadır. I. evre IA ve IB olarak ikiye ayrılır. IA evresinde tümör epidermiste yer alır, 1 milimetreden daha kalın değil ve cilt içinde kesinti oluşturmamıştır. IB evresinde ise hastalık iki şekilde gelişmektedir. Birincisinde tümör 1 milimetreden kalın değil ve cilt içinde kesikler gelişerek tümör dermise doğru yayılmaktadır. İkincisinde ise tümör 1-2 milimetre (mm) arasında oluşur ve ciltte kesikler meydana gelmez. Çünkü cilt kalınlığı vücudun farklı bölgelerinde değişiklikler göstermektedir.



Şekil 2. 6 Melanoma Hastalığı 1. Evresi [41]

II. Evre: II. evre IIA, IIB ve IIC evresi olarak üçe ayrılmaktadır.

- IIA Evresi :

Tümör her iki şekilde de olabilir;

- 1-2 mm arasında ve kanamaya sahiptir
- 2-4 mm arasında cilt içinde kesikler oluşturmaz.

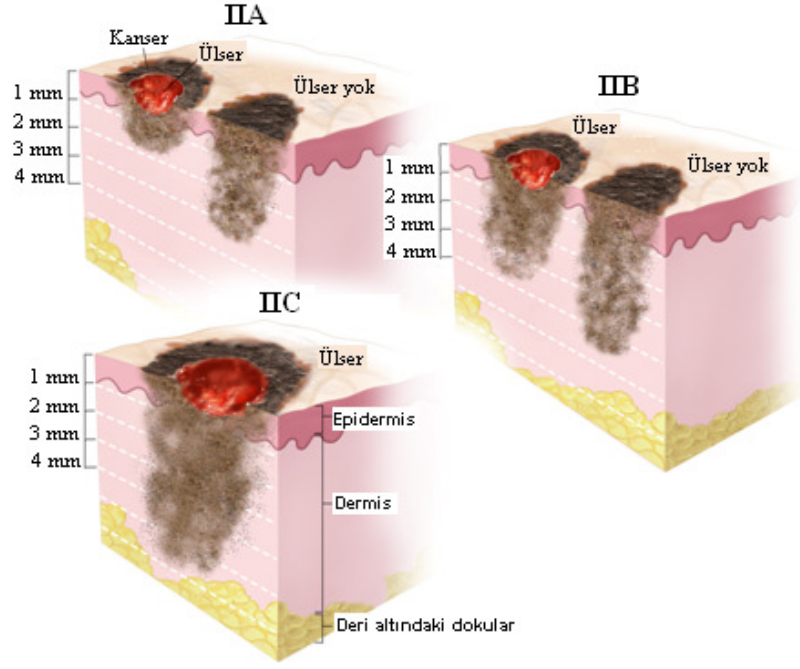
- IIB Evresi:

Tümör her iki şekilde de olabilir;

- 2-4 mm arasında ve cilt içinde kesikler yani ülser (kanama) gerçekleşir.
- 4 mm' den kalın ve kanamaya sahip değildir.

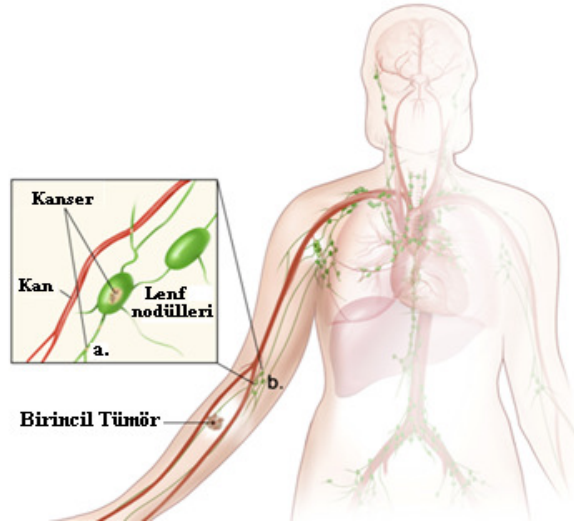
- IIC Evresi:

Tümör 4 mm' den kalın ve kanamaya sahiptir.



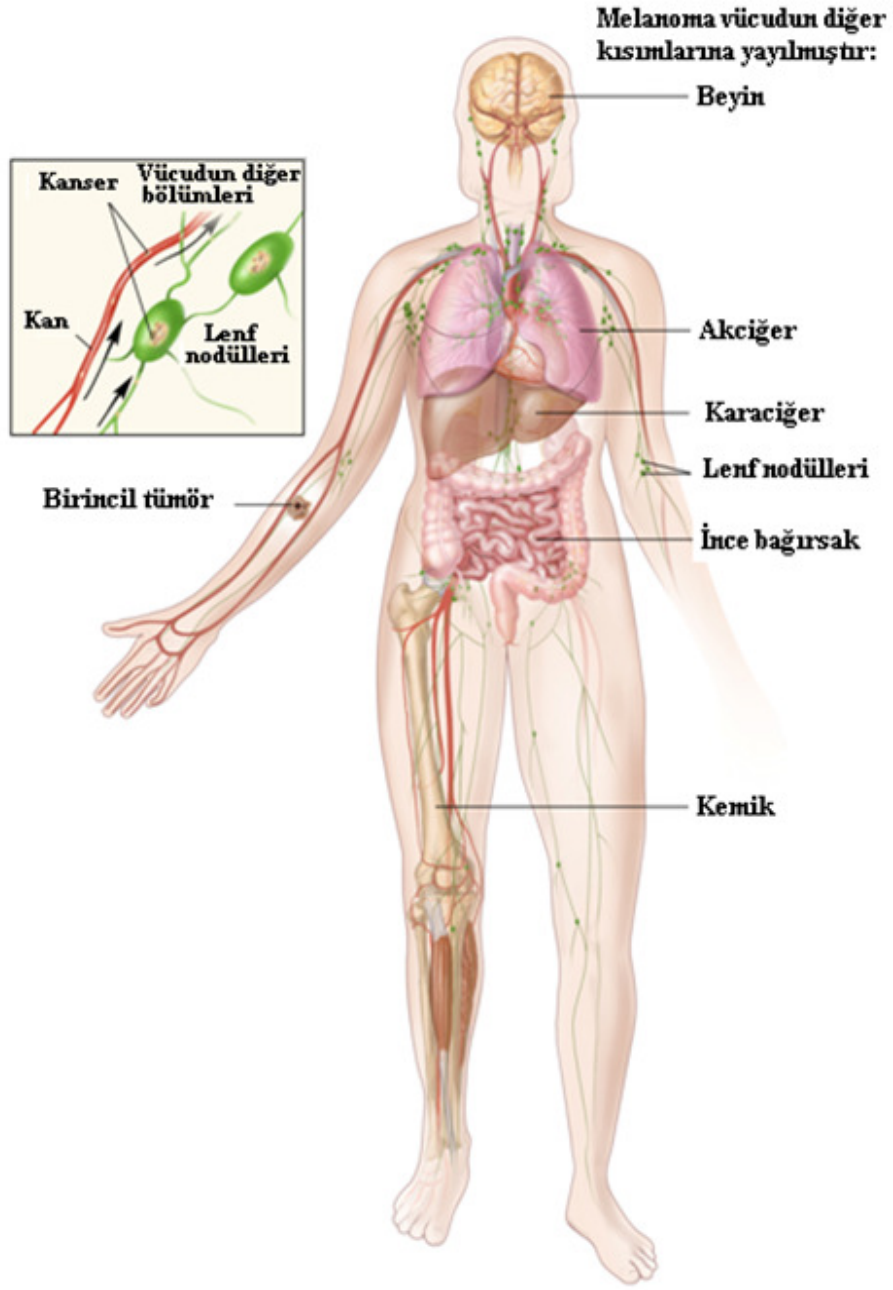
Şekil 2. 7 Melanoma Hastalığının 2. Evresi [41]

III. Evre: Tümör herhangi bir kalınlıkta kanamalı ya da kanamasız olabilir. Tümör, yakında bulunan lenf damarına ve düğümlerine yayılabilir (a) ya da hareketsiz olan birbirine dolanmış bir veya daha fazla lenf düğümüne yayılabilir.



Şekil 2. 8 Melanoma Hastalığının 3. Evresi [41]

IV. Evre: Tümör, vücudun diğer bölümlerine de yayılmıştır.



Şekil 2. 9 Melanoma Hastalığının 4. Evresi [41]

2.4 Melanoma Hastalığının Dünyadaki Durumu

Son yıllarda beyaz ırkta melanoma görülme sıklığı artmıştır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) her yıl 132.000 yeni melanoma olgusu tahmin etmektedir, bu rakam ülkeler arasında 150 kata kadar varan farklı oranlarda değişiklik göstermektedir. En çok Avustralya'da görülmektedir.

Avustralya'da melanoma insidensindeki artış %3-7'dir. Avustralya'da melanoma 100.000 kişide 40 iken, solar radyasyona daha az maruz kalan Kuzey Avrupa'da 100.000 de 5'tir. Tüm Avrupa'da melanoma insidensi 12/100.000, Almanya Münich bölgesinde 14/100.000'tür. Yaşam boyu melanoma riski, Avrupa ve Amerika'da 1/100 ile 1/200 arasında değişmektedir. Avustralya'da yaşam boyu melanoma riski 1/25, ABD'de 1/75'dir. ABD'de melanoma gelişme riski 1935'te 1/1500 iken, 1960'da 1/500, 1980'de 1/250, 1992'de 1/105 ve 2002'de 1/75 dir; 2010 yılında ise 1/50 olduğu tahmin edilmektedir. Tüm kanserler içinde melanoma görülme oranı kadınlarda %4, erkeklerde %5'tir. Non melanoma deri kanserleri melanomadan 18-20 kat daha fazla görülmektedir; bunlar içinde de bazal hücreli karsinom, skuamoz hücreli deri kanserlerinin 4 katıdır. 2004 yılında yeni melanom sayısı 55.000, ölüm sayısı ise 7900'dür. Avrupa dışındaki koyu tenliler arasındaki insidens rakamları çok düşük, fakat güvenilir-tutarlı değildir. Buradaki rakamlar 100.000'de 0.1-3 arasındadır. Togo'da yapılan çalışmada melanoma insidensi yılda 0.07/100.000 olarak bildirilmektedir. En çok görülen kanserler sıralamasında melanoma, Avustralya ve Yeni Zelanda'da dördüncü, Amerika ve Kanada'da yedinci, İskandinavya'da onuncu ve İngiltere'de ise on sekizinci sıradadır.

Melanoma insidensi yaşla artar. Melanoma dışı deri kanserleri genel olarak yaşla bağlantılıdır ve ileri yaşlarda görülür. Melanomada yaşa bağlı olarak artma olmasına rağmen, nispeten genç sayılabilecek 20-45 yaşlarında pik yapar (Çizelge 2.1). Konjenital nevuslardan kaynaklanan melanoma çocuklarda sık iken, lentigo malin melanoma yaşlılarda siktir. Lentigo malin melanoma 65 yaş, yüzeysel yayılan melanoma 30-50 (ortalama 37), nodüler melanoma orta yaş, akral lentiginöz tip 65 yaşlarda görülmektedir. Avustralya ve Amerika'da 1960-1970'ten sonra doğanlarda yapılan yaş grubu analizlerinde insidens hızında duraklama, hatta belirli bir azalma görülmüştür. Bazıları bunu halk sağlığı koruma çalışmalarının erken etkisine bağlamıştır. Diğer

birçok ülkede yükseliş devam etmektedir. Tüm dünyada beyaz ırkta yaşa göre standardize edilmiş melanoma insidensinde bir artış vardır [42].

Çizelge 2. 1 Melanoma insidensinin yaş ve cinsiyet dağılımı

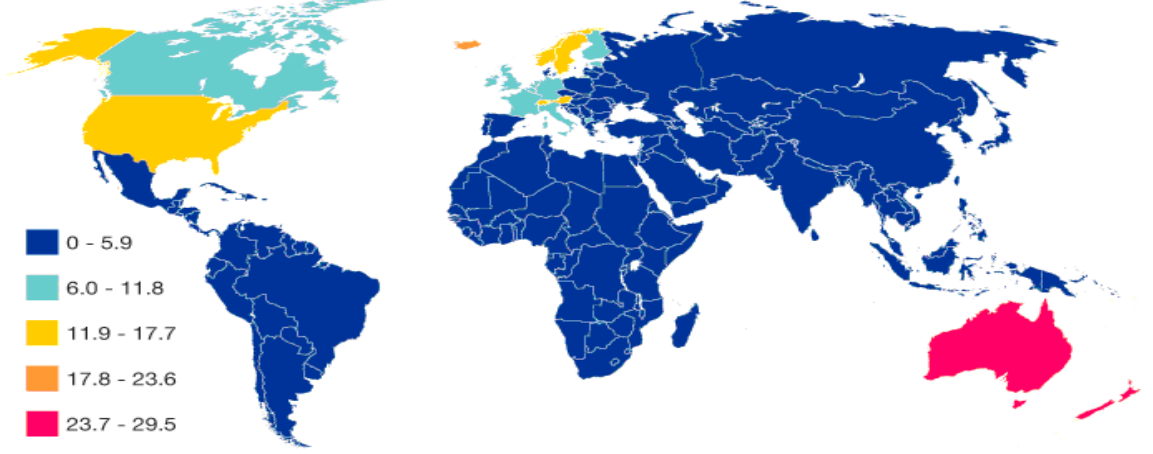
Yaş grupları	İnsidens/100.000	
	Erkek	Kadın
15-39	5	10
50-59	15	20
70-79	35	25
80 +	50	35

Tüm nüfus içinde kadınlarda durum daha iyiye gitmektedir; kadınlarda tümör daha ince fazda yakalanmaktadır. Kadınlarda alt ekstremitelerde daha çok görülmesi ve erkeklere göre daha sık sağlık kontrolü yapturmalarının rolü vardır. Ayrıca östrojenin koruyucu rolünden de bahsedilmektedir. Solar radyasyona daha az maruz olan bölgelerde kadınlarda daha azdır. Avustralya gibi insidensin yüksek olduğu bölgelerde kadın erkek oranı eşittir [42].

Çizelge 2. 2 Melanomaya bağlı mortalite yaş ve cinsiyet dağılımı

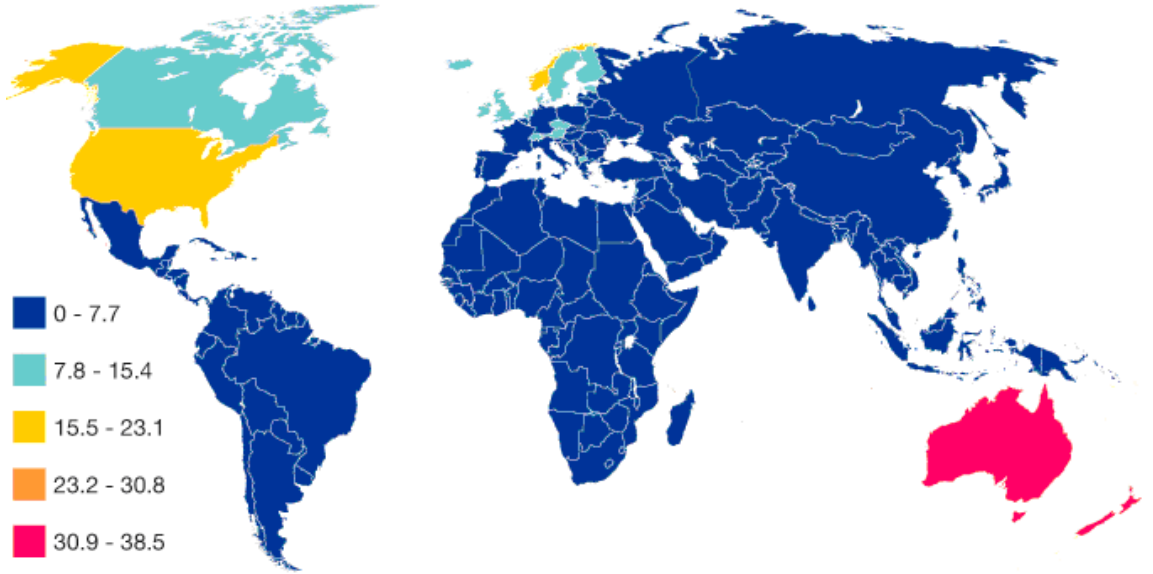
Melanomaya bağlı mortalite yaş ve cinsiyet dağılımı		
Yaş grupları	Mortalite/100.000	
	Erkek	Kadın
50-59	5	4
60-69	8	4,2
70-79	11	9
80 +	18	12

Dünyada Kadınlarda görülme sıklığı

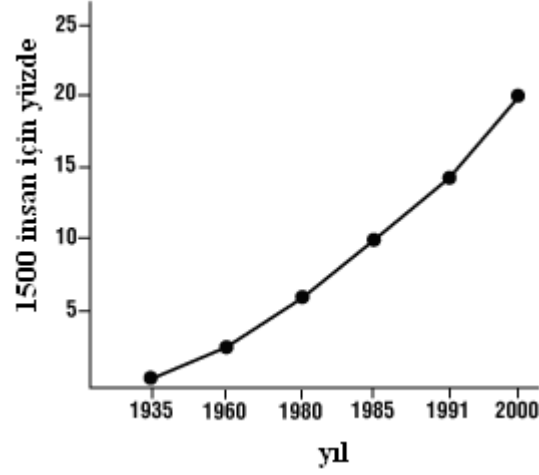


Şekil 2. 10 Melanoma kanseri olan kadın hastalar için yaş standardına göre hastalıktan etkilenen hasta sayısı (ASR: Age standardized incidence rate) /100.000 kişi [43]

Dünyada Erkeklerde görülme sıklığı



Şekil 2. 11 Melanoma kanseri olan erkek hastalar için yaş standardına göre hastalıktan etkilenen hasta sayısı (ASR: Age standardized incidence rate) /100.000 kişi [43]



Şekil 2. 12 Melanoma hastalığının gelişiminin yıllara göre dağılımı [43]

2.5 Melanoma Kanserine Karşı Aşı Geliştirilmesi

Biyoteknolojik aşılarda, aşılamada bazı sorunların yaşandığı hastalıklarda, daha etkili ve yan etkilerinin daha az olduğu aşılarda elde edilmesi için kullanılan yeni ve moleküler biyoteknolojik yöntemlerle hazırlanan aşılardır. Bu tekniklerle hazırlanan aşılarda aşağıdaki gibidir.

2.5.1 Rekombinant DNA Aşılarda

Bu teknikle mikropların bağışıklıkta etkili olan proteinlerini kodlayan genleri ayırılır ve bu genler bir taşıyıcı hücreye aktarılır, orada bol miktarda sentezletirilir. Örneğin Hepatit B virüsünün yüzey antijenini (HBsAg) kodlayan gen bir maya hücresine aktarılır çokça elde edilir ve aşı olarak kullanılır (Rekombinant HBV aşısı). Rekombinant DNA tekniğinin bir başka uygulaması, elde edilen "aşı geni"nin taşıyıcı bir virüse (örneğin herpes virüsüne) rekombine edilmesidir.

2.5.2 Sentetik Peptid Aşılarda

Proteinlerin yapı taşları olan aminoasit dizileri antijen olarak kullanılabilir. Çeşitli peptidler içerisinde belli bir tanesinin seçilmesi avantajdır. Peptid antijenleri sentetik olarak elde edildikleri için canlı mikroorganizmaların üretilmesine ihtiyaç yoktur. Peptidlerin saflaştırılması daha kolaydır. Küçük molekül ağırlı olduklarından immünojen özellikleri azdır. Bu yüzden taşıyıcı protein ve ya adjuvant kullanımına gerek duyulabilir. Hayvan deneylerinde başarılı sonuca ulaşmış peptid aşısı vardır.

2.5.3 Mutant Aşılar

Canlı mikrop aşıları hazırlanırken uygulanan eski virülans azaltma yöntemleri yerine, biyoteknoloji ile patojen mikroplardaki virülans genleri yok edilerek "avirulan mutant" suşlar ile atenüe aşılar hazırlanabilmektedir. Örneğin V.cholerae bakterisinde toksini kodlayan genin yok edilmesi gibi.

2.5.4 Anti idiotip Aşılar

Antikorlar aracılığı ile gerçekleştirilen yeni bir aşı tekniğidir.

2.5.5 Konjuge Polisakkarid Aşılar

Bazı patojenik bakterilerin virülansı hidrofilik polisakkarid kapsüllerinin antifagositik özelliklerine dayanır. Kapsülün antikor ile kaplanması makrofajların ve nötrofillerin o patojeni fagosit etmelerini kolaylaştırır. Polisakkarid aşıların dezavantajı T hücrelerini uyaramamalarıdır. B hücrelerini T-bağımsız olarak uyarırlar ve IgM yapımı gerçekleştirir. Hafıza hücresi oluşmaz. Polisakkarid antijenler zayıf immünojenik özellik gösteren haptentlerdir. Bir protein taşıyıcısı ile bağlanarak haptenin immünojenitesi artırılır. Polisakkarid-protein konjugatının T hücreleri aktive etmesi sonucunda immünoglobulin dönüşümü meydana gelir. Bu aşılar karşı IgG sınıfı antikorlar oluşur. İmmün hafıza oluşur. Hayatın ilk anlarından itibaren korunma sağlanır [44, 45].

Yapılan bir çalışmada en ölümcül kanserlerden biri olan melanomaya karşı geliştirilen bir tür aşı, vücudun bağışıklık sistemini harekete geçirerek kanserli hücelere saldırıyor. Bulgular melanom ve genel olarak kanserdeki aşı tedavisinde önemli bir rol oynuyor [46]. Teksas Üniversitesi M. D. Anderson Kanser Merkezi araştırmacılarına göre yeni tür bir aşı, bir immunoterapi (bağışıklık sisteminin güçlendirilmesine yönelik bir tür aşı tedavisi) ilacı olan Interleukin-2 ile birlikte verildiğinde, dünyanın en ölümcül kanser türlerinden biri olan melanom cilt kanserinde artan tepki oranları gösteriyor ve ilerlemeyi durdurarak hayatta kalmayı süresini uzatıyor. American Society of Clinical Oncology'de (ASCO) Prof. Dr. Patrick Hwu tarafından sunulan bulgular, deneklerin olasılık dağılımına göre gruplara ayrıldığı bir evre III klinik deneyde, hastalığa ve genel olarak kansere karşı klinik faydayı gösteren ilk aşı olma özelliğini taşıyor. Amerikan Kanser Derneği' ne göre melanom görülme sıklığı en hızla artan kanser türlerinden biri. 2009'da ABD'de 68.720'den fazla kişiye melanom teşhisi kondu ve muhtemelen 8.650

kişi bu hastalık yüzünden hayatını kaybedecek. 5 yıllık hayatta kalma oranı bölgesel olması durumunda yüzde 16, diğer organlara yayılması durumunda ise yüzde 65.

Yapılan bir çalışmada, gp100: 209-217 (200M) olarak bilinen peptid aşısının hastaların bağışıklık tepkilerini düzenleyek T hücrelerini harekete geçirdiği gözlenmiştir. Araştırmacılar bu aşının tümör yüzeyindeki antijenleri saptamak için vücudun sitotoksik (sitotoksik maddeler, hücreye toksik şekilde etki edip hücreyi öldüren ya da fonksiyonunu durduran maddelerdir) T hücrelerini faaliyete geçirdiğini ileri sürmektedir. Daha sonra ise T hücreleri tümör hücrelerinin zarında delikler açarak enzimleri salgıladığı ve kanserli hücrenin parçalanmasını sağladığı tespit edilmiştir [47, 48].

NCI tarafından yürütülen bir evre II çalışmasında Interleukin-2 (IL-2) ile birlikte kullanılan aşı metastatik melanom hastalarında yüzde 42'lik bir tepki oranı görüldükten sonra, bu iki bileşeni test eden bir evre III deneyi 10 yıldan da uzun bir süre önce başlatılmıştı.

Dr. Hwu, aşının sadece melanomu olan kişilerin anca yarısına verilebildiğini çünkü aşının hastanın doku tipi veya HLA'sı (insan lökosit antijenler) ile uyumlu olması gerektiğini söylemektedir. En önemli şeyin, yaklaşımlarını genişletmek ve daha fazla hastanın faydalabilmesi için peptidlerin karışımlarını kullanmak gerektiğini söylemektedir [47].

2.5.6 Polielektrolit Kompleksleri ve Yapay Aşılar

Yapılan araştırmalar model antijenlerin yanı sıra (GG, SA-OA v.s.) mikrop ve bakteri antijenlerinin polielektrolit komplekslerinin yüksek immünolojik aktifliğe sahip olduğunu göstermektedir. Bazı hastalıklarda bu konu üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde, örneğin; grip, salmonella, tüberküloz protein (PPD) antijeni, menenjit mikrobunun B-polisakkariti, α -fetoprotein ile (kanser antijeni) polikasyonların kompleksleri, serbest antijenlerle karşılaştırıldığında daha yüksek immünolojik aktiviteye sahip oldukları görülmüştür [20, 22, 30, 49]. PEK'ler timusa bağlı antijenleri timusa bağlı olmayan immünojenlere çevirme imkanı sağlamaktadır ve bir kez enjekte edildikten sonra ilave yardımcılarından yararlanmadan güvenli immünolojik hafıza

meydana getirirler. Böyle PEK'ler aynı zamanda yüksek koruyucu aktifliğe sahiptirler ve bunları temel alan yapay aşuların sentezlenmesinde büyük olanak sağlarlar.

2.6 Polielektrolit Komplekslerin İmmünolojik Aktivitesi

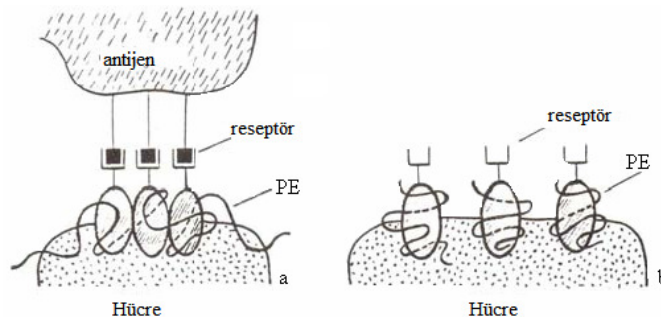
Sentetik polimerlerin, immünolojik aktifliğinin ve polimer yapılı antijenlerin immünolojenliğinin bunların fizikokimyasal etkilerine bağlılığının incelenmesi konusunda birçok çalışma yapılmıştır. Önceden etkisi belli olan yapay immünojenlerin yapılması ve polimer-antijen sistemlerinin çalışma mekanizmasının fizikokimyasal yönden anlaşılması için polielektrolit kompleksler (PEK) daha fazla bilgi verirler. Komplekslerdeki polimer taşıyıcılar küçük ve büyük moleküllu ligantlarla oynak, elektrostatik ve hidrofob bağlarla bağlanmışlardır. Düzenlenebilen yapıya ve bileşime sahip olan polielektrolit komplekslerin sentezi ve incelenmesi, aynı zamanda polikompleks partiküllerinin yapı-kimyasal çevrilmelerinin rolünü immünoloji de analizi bunlara yüksek immünjenli preparatların sentezi için kullanılma imkanı verir [22]. Yapılan bir çalışmada yüklü olmayan veya su ortamında yüklenmeyen polimerlerin (polivinilpirolidon, polietilen glikol) eritrositlerin immün cevabını pratik olarak değiştirmedikleri görülmüştür. Bazı kopolimerlerin yardımcı olarak kullanılması tam zıt etki gösterir. Örneğin akril asitin metilvinil piridin ile kopolimerleri homopolimerden farklı olarak immün cevabını kesin olarak azaltmaktadır [19]. PEK'lerin teorik immünoloji için kimyasal "araç" olduğunu da belirtmek gerekir. Bu alandaki güçlü atılım, çok komponentli biyolojik sistemlerin basit polimer-antijen karışımlarında modellendirilmesinde mümkün olmuştur [22].

Bileşenleri kararlı bağlarla bağlanmış komplekslerde polielektrolitlerin model, bakteri ve virüs tabiatlı yapay antijenler için taşıyıcı gibi kullanılması immün cevabı artırır ve immün koruyuculuğun devamını sağlar. Bu, korunulması mümkün olmayan hastalıklara karşı yapay aşı oluşturma imkanı yaratır. Yapılan araştırmalar immünolojide çok önemli genel prensipleri ortaya koyarak immün cevabın gen düzeyinde fenotipik prensibini doğrulamış ve yapay antijenlerden yapay aşulara geçmenin immünolojik yollarını belirtmiştir [30].

Bazı polielektrolit kompleksleri güçlü ve kuvvetli immün uyarıcılardır. PEK'leri kompaktlaştırıldığında bunlar ya uyarıcı olmaz ya da immüniteyi yatıştırıcı olarak çalışırlar. PE'lerin immünolojik aktifliklerinin oluşmasında protein faktörü önemli rol

oynayabilir, öyle ki kana verildiklerinde, PE makromolekülleri önce burada fazla miktarda olan plazma proteinleri veya hücre yüzeylerindeki reseptör proteinleri ile karşılıklı etkileşimde olmaları gerekir. Oluşmuş çeşitli polimer-protein kompleksleri sonra çeşitli hücrelerin yüzeyleri ile karşılıklı etkide bulunabilirler, makrofajlarla adsorbe olabilirler. Bu hipotezde polielektrolitlerin etki mekanizması bunların kanın proteinleri ile karşılıklı etkide olması ve oluşmuş komplekslerin tabiatında görüldüğü açıklanmıştır. Polikompleksin bileşimi hem polimer zincirinin uzunluğuna hem de onun kompaktlığına bağlıdır.

Kimyasal olarak açık yapı ile karakterize edilen PE kompleksleri immün sistemi güçlü uyarılardandır. PE kompleksleri kompaktlaştığında ya immün sistemi uyarmazlar ya da immüniteyi yatıştırıcı olarak çalışırlar. PE'lerin immünolojik aktifliğinin oluşmasında protein faktörü önemli bir rol oynamaktadır. Öyke ki; kana enjekte edilmiş PE makromolekülleri kanda plazma proteinleri ve ya hücre yüzeyindeki proteinlerle karşılıklı etkileşimde bulunabilirler ve makrofajlar tarafından adsorbe edilebilirler. Ayrıca; PE kompleksinin immün sistemi stimule etmesi; PE kompleks bileşiminin hem polimer zincir uzunluğuna, hem de kompleksin kompaktlığına bağlıdır. Stokiometrik olmayan PE kompleksleri antijen reseptörleri ile hücre reseptörleri arasında birden fazla noktada etkileşim imkanı sağlamaktadır (Şekil 2.13 a). Stokiometrik PE komplekslerinde ise antijen reseptörleri ile hücre reseptörleri arasında karşılıklı etkileşim ihtimali azalmakta ve birbirinden izole olmuş kompleksler oluşmaktadır (Şekil 2.13 b).

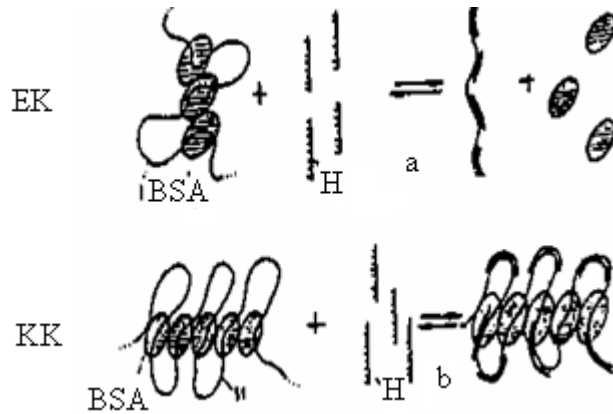


Şekil 2. 13 Aynı polimerleşme derecesine ve aynı kimyasal yapıya sahip olan PE kompleksleri (a) Lineer yapıda PE kompleksi (b) Kompakt yapıda PE kompleksinin hücre yüzeyindeki antijenlerle karşılıklı etkileşiminin şematik gösterimi [22, 49].

Kana verilen serbest PE'lerin veya antijenlerin PE komplekslerinin daha sonraki akıbeti, bunların plazma protein hücreleri veya diğer yüklenmiş biyokomponentlerle karşılıklı etkileşim karakterine bağlıdır. Buna göre model deneylerde, proteinlerin ve bunların

immünolojik aktifliğinin amaca uygun şekilde düzenlenmesi oldukça önemlidir. Bu sorunun çözümü için iki tür yapay immünojen seçilmiştir [22-24]. Bunlardan birisi BSA' nın PVP (R2) ile elektrostatik kompleksi (EK), diğeri ise bu proteinin karboksimetilleşmiş PVP ile kovalent konjugatıdır (KK).

Önce in vitro şartlarında EK ve KK'nın heparin ile birbirinden farklı şekilde karşılıklı etkileşimi olduğu gösterilmiştir. Heparin çözeltisi EK çözeltisine ilave edildiğinde heparin tam olarak proteini EK'dan çıkarır. Çözeltide serbest protein, çöküntü de ise heparin polikasyon kompleksi olur. Heparin çözeltisi KK çözeltisine ilave edildiğinde farklı bir durum gözlenir. Protein ile PE arasındaki kovalent bağ makromoleküller substitusyon reaksiyonunun oluşmasına imkan vermez. Çözeltide kovalent konjugatla heparinin polikompleksi oluşur. Şekil 2.14'te EK ve KK' nin heparin ile karşılıklı etkisinin mekanizması gösterilmiştir.



Şekil 2. 14 Elektrostatik kompleksin (EK;a) ve kovalent konjugatın (KK;b) heparinle karşılıklı etkisinin şematik gösterimi [22].

İmmünolojik deneyler fareler üzerinde gerçekleştirilmiştir. Farelere kuyruk veninden EK veya KK çözeltileri enjekte edilmiştir. Daha sonra hayvanlara çeşitli zamanlarda heparin çözeltisi verilmiştir. Kompleks veya konjugatla immünize olduktan sonra immün cevabının maksimum pikinden antikor miktarı tayin edilmiştir. Çizelge 2.3' de elde edilen sonuçlar verilmiştir. Görüldüğü gibi heparin, EK'nın hemen arkasından veya 30 dakika sonra enjekte edildiğinde vücudun yapay antijene cevabını tam olarak yok etmektedir. Yani heparin EK'sini vücutta "tutar" ve bunu parçalar, polikasyonla birleşerek proteini serbest hale geçirir. Bu zamanda polikomplekse yönelik immün cevabının başlaması mümkün olmaktadır. Ancak kontrole göre (yani heparin

olmadığından) birkaç kat daha zayıftır. 24 saat sonra heparin enjekte ettiğimizde EK'nın immün cevabına hiçbir etkisi olmamaktadır. Çizelge 2.3'de görüldüğü gibi zamana bağlı heparinin KK'nın immün cevabına hiçbir etkisi yoktur. Gerçekten de, heparin KK'yı vücutta "tutsa" bile onunla üçlü kompleks oluşturarak KK partiküllerinin immün hücrelerinin membranları ile karşılıklı etkileşimine bir etkisi olmamaktadır.

Çizelge 2. 3 İmmünojen çözeltilerle bağışıklanmış farelerin heparinin vücuda verilme zamanına bağlı olarak dalakta tayin edilen AOH'ların göreceli miktarı

Preparat	Verilme Zamanı, saat			
	0	0.5	2	24
Kompleks	0	0	0.46	1.08
Konjugat	0.96	1.04	0.94	1.0

Bu sonuçlar kompleksin ve konjugatın *in vitro* şartlarında heparin ilavesiyle alınmış sonuçları ile çok iyi uyum göstermektedir. Elde edilen sonuçlar iki açıdan önemlidir: Birincisi bunlar kanın çeşitli komponentleri varlığında organizma şartlarında makromoleküller arasında substitusyon reaksiyonlarının oluşma imkanının olduğunu göstermektedir. İkincisi, bunlar immün cevabının yapay veya timusa bağlı olmayan antijenlerle bırakıldığı zaman tayin etme yöntemini sağlamaktadır [22].

2.6.1 İmmünojen Polielektrolit Kompleksinin çalışma modeli

Polielektrolit kompleksleri immünolojik etki göstermesi için optimum şekilde yapılmalıdırlar. İmmünolojik aktif (veya "pasif") polielektrolit kompleksleri için aşağıdaki model gösterilmiştir (Şekil 2.15). Gösterilen yüksek immünojen etkili polielektrolit kompleks modelinin ayrı ayrı çizgilerini ifade eden en önemli fizikokimyasal kriterleri şu şekilde yeniden açıklayabiliriz [20, 22, 30, 49].



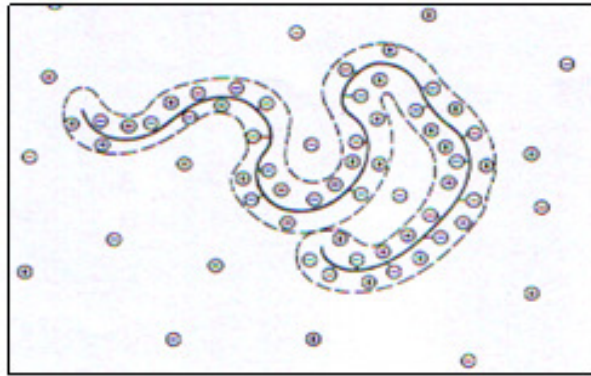
Şekil 2. 15 Yüksek (I) ve düşük immünojen (II) etkili antijen-PE komplekslerinin modellerinin yapısı.

- 1) Antijen ve polimer molekülleri fizyolojik şartlarda parçalanmayan stabil bağlarla (çok noktalı elektrostatik ve hidrofob karşılıklı etki, iyon koordinasyon ve kovalent bağlama) birleşmelidir.
- 2) Stokiyometrik yapıya olmayan PEK'leri antijenin birkaç epitopunu içermelidir.
- 3) Yapısında "ilmik" olan PEK'lerin (polimerin bükülebilen serbest bölümlerinin olması) hem protein yüzeyine yapışmış hem de serbest "ilmik"te bulunan ilave olarak iyonlanmış grupları, PEK yüzeyinde kompleks partiküllerinin çözeltide kalmasına yardım eden yayılmış hidrofil bölge yaratır.
- 4) Antijen moleküllerinden toplanmış ve polimer taşıyıcısı ile stabilleşmiş sert silindirik (çubuk) tipli yapı; hem antijen determinantlarının uygun yerleşmesini hem de büyük yüzey oluşmasını sağlar.
- 5) PEK'in biyosistem komponentleri ile (proteinler, immün hücreler v.b.) çok noktalı kooperatif karşılıklı etkileşimde olma kabiliyeti; yapısında olan "ilmik"lerdeki serbest polimer fonksiyonel gruplarına göre oluşur. Yüksek immünojen etkili PEK'ler biyosistem komponentleri ile yüksek kompleks oluşma kabiliyetine sahiptir.
- 6) Antijen determinantlarının uygun yerleşmesi ve antijen hücre reseptörleri ile çok noktalı karşılıklı etkisi için daha önemli sterik şartlara uygun olan yapıya kompleks. Bu nedenle polivalent aşılarda yapmak için polielektrolit kompleksinin mekanik karışımı daha önemlidir.

2.7 Polielektrolitler

Polielektrolitler, polar çözücülerde yüklü polimer zincirlerine (makro-iyon) ve küçük karşı -iyonlarına ayrılarak iyonize olabilen grupları taşıyan polimerlerdir [50].

Proteinlerden başlayarak hayatın temelini oluşturan moleküllerin hepsi polielektrolit yapısındadır. Kişisel bakım ve temizlik malzemelerinde, su arıtılması, toprak iyileştirilmesi, mantolamada, biyoteknoloji, ilaç sanayinde, tekstil ve kâğıt endüstrisi gibi daha birçok endüstride yaygın olarak kullanılırlar. Polielektrolitlerin teorisinin izahı ilk olarak 1951 yılında Fuoss tarafından hazırlanan derlemede yayınlanmıştır. Polielektrolitler, iyonik olmayan polimerlerden farklı olarak, ana zincirine bağlı halde (+) veya (-) yüklü gruplar bulundurlar. Ortamın pH' ına göre (-) veya (+) yük taşıyan polielektrolitler amaca uygun olarak metal iyonları ile iyon-koordinasyon bağıyla yada çeşitli makromoleküller ile elektrostatik etkiyle bağlanıp suda çözünen veya çözünmeyen polikomplekslerin oluşumunu sağlarlar.



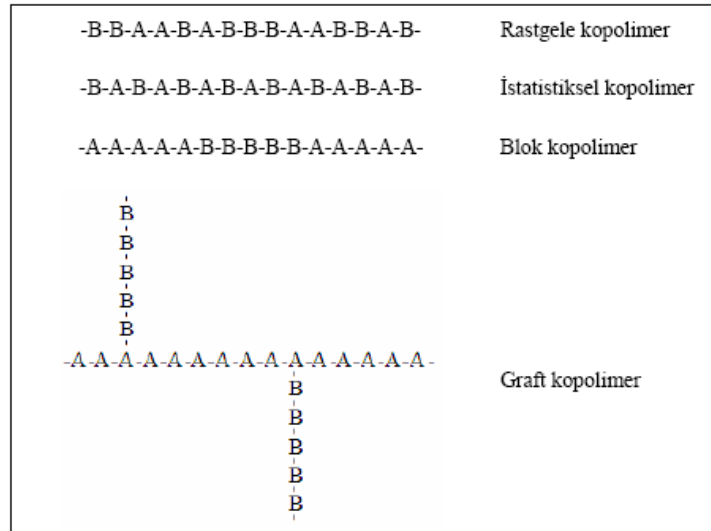
Şekil 2. 16 PE çözeltisinin Strauss-Ander Modeli [51].

PE çözeltilerinin elektrokimyasal özellikleri genellikle poliyonun zincir boyuna bağlıdır. 1958 yılında Strauss ve Ander tarafından diğer modellere oranla daha gerçekçi bir model önerisi ortaya atılmıştır. Bu modele göre, poliyon bölgesinin bobin şeklindeki poliyonunu bütünüyle saran hacmin küresel bir hacim olmadığı, sosis şeklinde olduğu varsayılmaktadır.

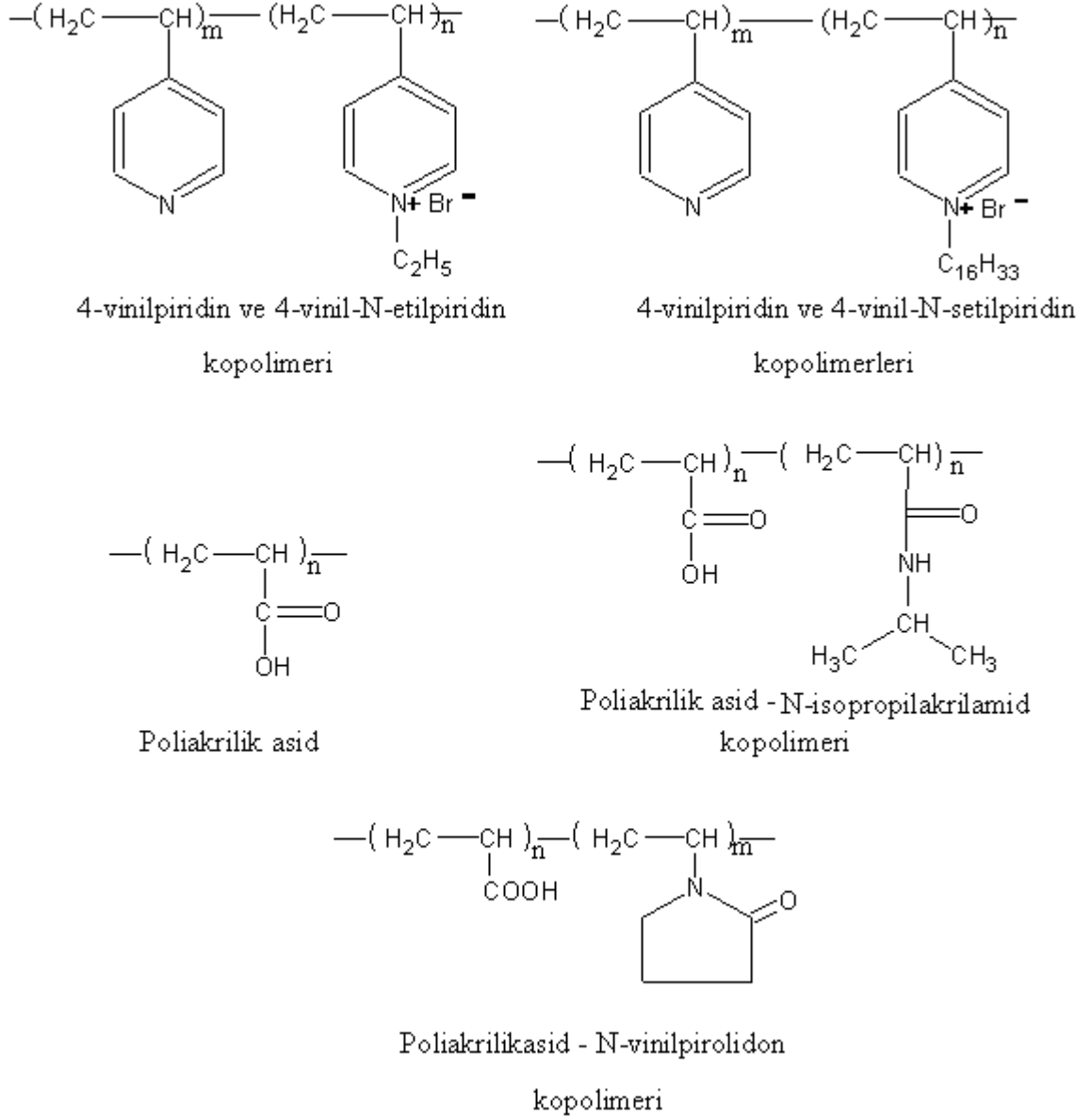
Polielektrolitlerin bir başka özelliği ise, polimerlerde konsantrasyon arttıkça viskozite artarken, polielektrolitlerde konsantrasyon azalırken viskozitenin artmasıdır. Bunun nedeni, azalan konsantrasyon ile (-) veya (+) yüklerin birbirlerini itmeleri ve polielektrolitin şişmesidir (Şekil 2.16). Polielektrolitler tek bir monomeri polimerleştirerek elde edilebildiği gibi birden fazla monomerden de üretilebilirler. Bu

durumda oluşan malzemeye kopolielektrolit denir. Kopolielektrolitlerde her iki monomer de yüklü olabileceği gibi biri yüklü diğeri yüksüz de olabilir. İki ya da daha fazla sayıda farklı monomer birimlerinin bir yüksek polimer içinde bağlanmasına kopolimerizasyon, böyle bir tepkimede elde edilen ürüne de kopolimer adı verilir. Kopolimerleşmenin olması için birbirine katılma tepkimesini gerçekleştirecek iki monomer bulunmalı ve uygun koşullar sağlanmalıdır. İki farklı A ve B monomerlerinin kopolimerleşmesinde, farklı yapılar elde edilir. Rastgele, istatistiksel, blok ve graft kopolimer olmak üzere dört ana başlıkta incelenir. A ve B birimlerinin zincir boyunca sıralanmalarında belli bir düzen yoksa rastgele kopolimer olarak adlandırılır. A ve B monomerleri kopolimerleşme esnasında Şekil 2.17’de görüldüğü gibi bir A monomeri bir B monomeri gelerek sıralanırlarsa istatistiksel kopolimer olarak adlandırılırlar.

Kimyasal yapısı farklı iki homopolimer zincirinin birbirine bağlanmasıyla oluşur. Blok kopolimer, zincir üzerinde A ve B monomerlerinden oluşan sekansların birbirine bağlanmasıyla oluşur. Şekil 2.17’de gösterilen blok kopolimer üçlü’dür. Dördüncü kopolimer türü, bir ya da daha fazla B homopolimer bloklarının A homopolimerinin ana zincirine aşılmasıyla oluşan graft kopolimerdir [52]. Aşağıdaki şekilde örnek olarak bir sıra model veya pratik uygulamalı sentetik PE’lerin kimyasal yapıları verilmiştir Şekil 2.18.



Şekil 2. 17 Rastgele, istatistiksel, blok ve graft kopolimerlerin sembolik gösterimleri.



Şekil 2. 18 Polimerik taşıyıcı olarak kullanılan katyonik ve anyonik polielektrolitlerin genel gösterimi [26, 27].

1970'li yılların başlarında immünologların ve kimyacıların ortak çalışmaları ile bazı sentetik polielektrolitlerin (PE) immün cevabına kuvvetli etkisi aydınlatılmış ve sentetik PE'lerin bu gibi amaçlar için daha uygun olduğu tespit edilmiştir. Çünkü PE'lerin sentezi ve modifikasyonu daha basittir, istenilen molekül ağırlığında, elektrik yükünde, konformasyonda veya yüksek moleküler yapıda elde etmek olasıdır, suda iyi çözünürler ve bilinen yapılarda çeşitli komplekslerini sentezlemek mümkündür. PE'lerin molekül ağırlığı, polimerleşme derecesi ile orantılıdır. Polimerleşme derecesinin artması

istenilen kompleksin oluşumunu destekleyici yönde etki eder ve polimer ile bağlanma miktarında artış gözlenir. Bunun yanı sıra kompleksin çökmesi de polimerleşme derecesine yani, polimerin uzunluğuna bağlıdır [22].

Polielektrolitlerin kullanım alanları incelendiğinde en önemlilerinden biri, belirli geçirgenliği ve seçiciliği olan yarı-geçirgen zarların yapımıdır [53, 54]. Bu zarlar deniz suyu tuzunun ayrılması işlemi için ters osmoz olarak kullanılabilir. Biyomedikal alanda ise, bu zarlar biyolojik kan sıvılarının (kan, idrar) ultrafiltrasyonu, hemodiyaliz için yapay böbrek ve hemoksijenasyon için yapay karaciğer olarak kullanılır.

Polielektrolit komplekslerini iki şekilde inceleyebiliriz.

2.7.1 Doğal Polielektrolit Kompleksler

Doğal polielektrolit kompleksleri canlı organizmada geniş bir uygulama alanına sahiptir ve canlı organizmaların değişiminde büyük rol oynamaktadır. Bu konu birçok araştırmacının ilgisini çekmektedir. Doğada kendiliğinden oluşmuş polielektrolit komplekslerinin incelenmesi, yapay polielektrolit kompleksleri oluşturulması bakımından çok önemlidir. Hücre çekirdeğinde nükleoproteinler şeklinde bulunan nükleik asit kompleksleri veya hücre duvarlarının yapısını oluşturan peptido glikanlar doğal PE kompleksler arasında sayılabilir.

Birçok bilim adamı, organizmada protein ve polielektrolitlerin kooperatif yapı ile oluşturdukları biyosistemlerden esinlenmiş ve amaçları doğrultusunda benzer yapay kompleksler oluşturma çabasına girmişlerdir.

Nükleik Asit Kompleksleri'nin en çok incelenmiş kısmı, (+) yüklü proteinler ve polipeptidlerle, (-) yüklü DNA veya RNA'nın yapmış olduğu komplekslerdir. Bu komplekslere deoksiribonükleik proteinler (DNP) veya ribonükleik proteinler (RNP) denir. Kompleksler protein ligantlarının pozitif yüklenmiş amin grupları ile nükleik asitlerin negatif yüklü fosfat grupları arasındaki elektrostatik etkileşimlerden meydana gelmektedir.

Doğal polikomplekslerin yapılarının karakterini ve organizmadaki uyumunun mekanizmasını anlayabilmek için, in-vitro koşullarda doğal PE'lerin model biyopolimerlerle kompleks oluşturması incelenebilir. Bu sistemlerin doğal polikomplekslerle karşılaştırılması çok daha kolaydır. Bu yöndeki araştırmalar, ortam

koşulları ile gerçekleşen reaksiyonlar arasındaki ilişkiyi ortaya koymakta ve polifonksiyonel doğal PE'lerin reaksiyonunu ve yapısını öğrenme ihtimalini arttırmaktadır. Sentetik sistemlerde araştırmalar doğal nükleoproteinlerin modelini oluşturmak amacıyla yapılmıştır [22]

2.7.2 Yapay Polielektrolit Kompleksler

Polielektrolitlerin proteinlerle reaksiyonlarının incelenmesi Morawetz, Stahmann, Katchalski ve diğer bilim adamlarının çalışmalarıyla başlamıştır [55]. Özellikle BSA'nın fraksiyonsuz PAA ve Ba^{2+} varlığındaki çözünebilir kompleksler Morawetz tarafından incelenmiştir [51]. Bu çalışmalarda esas amaç ve sonuç kompleks oluşumunun belirlenmesi olmuştur. PE'lerin proteinlerle su ortamında kompleks oluşturması genel olarak reaksiyona giren bileşenlerin birbirine zıt yükler taşıması ilkesine dayanmaktadır. Aynı yüklü protein ve polimerlerin birbirine bağlanmasında ise zıt yüklü geçiş metal iyonları ile iyon-koordinasyon bağı oluşturulur.

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, serum albumin (SA), ortamın pH'ının proteinin izoelektrik noktasından daha düşük olduğu zaman, anyonik polielektrolitler olan poliakrilik asit (PAA) veya polimetakrilik asit (PMAA) veya polietilenimin ile suda çözünmeyen kompleksler verirler. Ortamın pH'ının SA'nın izoelektrik noktasından fazla olduğu durumlarda ise, SA (-) yüklenir ve katyonik polielektrolitler ile çökelti verebilir.

Araştırmacılar insan albumini ile onun antikor karışımını, ortamın pH'ını bunların izoelektrik noktasından uzak değerinde PMAA ile karıştırarak incelemek istemişler ancak başarılı olamamışlardır. Buna ek olarak yine de, PAA-(katalaz + SA) karışımına izoelektrik noktaları arasında iki değerli baryum iyonu (Ba^{2+}) ilave edilmiş ve katalazın SA'dan seçici olarak ayrılması sağlanmıştır [22].

2.8 Lineer Polimer Özellikteki Taşıyıcı Moleküller

Poliakrilik asit iyonlaşma derecesi, pH ve sulu çözeltinin iyonik gücüne bağlı olan zayıf bir polielektrolittir. PAA, düşük pH'da ($pH \leq 4$) hemen hemen disosiyasyon olmamasına karşın, $pH \geq 8$ 'de tamamen yüklü bir zincire sahiptir. Poliakrilik asit, proton alabilen

iyonik olmayan çeşitli polimerler, onların türevleri ve katyonik polielektrolitlerle sulu yada organik çözelti ortamında interpolimer kompleks oluşturur.

Kompleks oluşumunda, ortamda karşısındaki ile etkileşim içerisinde bulunan polimerin doğası ve molekül ağırlığı gibi bazı parametrelerin yanı sıra çözücü, pH, çözeltinin iyonik gücü, sıcaklık ve polimerin konsantrasyonu önemli etkiye sahiptir. Bunun için metal iyonlarının yüklü makromoleküller ile ilişkisi, herhangi bir ortamda ve biyolojik sistemlerde sergiledikleri fizikokimyasal davranışları anlamak için önemlidir [56].

Poliakrilik asitler (PAAs) birçok ticari isim halinde (Karbopol, Karbomer, vb.) karşımıza çıkmasının yanı sıra kozmetik, ev ürünleri ve farmasotik preparatlarda da kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak PAA' lar veteriner uygulamalarda kullanılan aşılar da yardımcı olarak görev yapmaktadır. PAA' nın tavuklarda aktif olmayan New Castle virüsüne karşı immün yanıtı arttırdığı görülmüştür. PAA' nın yardımcı rolü uzun yıllar önce tarif edilmiş olmasına karşın araştırmacılar tarafından yakın bir zamanda kabul görmüştür. Bunun yanı sıra proteinlerin PAA' ya kovalent olarak bağlanması antijenlerin immünojenliğini artırır. PAA' nın karboksil grubu oktanol ve bütanol ile esterleşme reaksiyonu vererek PAA-alkil esterlerini meydana getirirler. Buna benzer çalışmaları da yürüten Hilgers ve arkadaşları PAA-alkil esterlerini tavuklar üzerinde uygulayarak bu yardımcıları (adjuvant) sayesinde oluşan ikinci immün cevabı ölçmüşlerdir. Günümüzde PAA alkil esterlerinin kümes hayvanları aşılarında kullanılan W/O yardımcılarına alternatif olarak gösterilebileceği ileri sürülmektedir [57].

Polielektrolitler medikal ve veteriner uygulamalarda pratikte aşı olarak tanıtılmadan önce çözülmesi gereken bazı problemler vardır. Bu gibi çalışmalarda en önemlisi seçilen PE' nin toksik olmaması, biyo-bozunur olması ve düşük molekül ağırlığına sahip olması gerekir. Toksikite incelendiğinde PAA toksik olmasına rağmen, gerçekte polimer taşıyıcıları toksik değildirler. Hatta PAA zincirine, NIPAAm ünitelerinin katılması bu gibi PE' lerin toksisitelerini azaltmaktadır [21].

E. De Clereq ve P. De Somer tarafından yapılan başka bir araştırmada *vesicular stomatitis* (ağız mukozasının iltihabı) virüsü ile letal dozda enfekte olmuş yeni doğan fareye interferon ve poliakrilik asit interperitonal olarak enjekte edilmiş ve bunların virüse karşı koruyucu etkisi tespit edilmiştir. Hayatta kalma süresi ve hayatta kalan farelerin sayısında enfeksiyonla bir artış olduğu gözlenmiştir. İnterferonun ve

poliakrilik asidin antiviral aktivitesi virüsün dozuyla ters orantılıdır. Poliakrilik asit (virüs ile enfekte edilmiş farelerde) ölüm oranını %50 azaltmıştır. In-vivo virüs enfeksiyonlarının profleksisinde (hastalığa tutulmamak için alınan tedbirler) poliakrilik asidin uygun olabileceğine karar verilmiştir [58].

Protein ve peptid ilaçlarının, gastro-intestinal bölgedeki değişik bariyerler tarafından inaktive edilmelerini engellemek ve absorplanmalarını sağlamak amacıyla L-laktat dehidrogenazın taşıyıcı olarak görev yaptığı alginat mikro parçacıklar püskürterek kurutma (spray-drying) tekniği ile geliştirilmiştir. Spray-drying tekniği mikro kapsül hazırlama metodu olarak raporlanmıştır. Fakat aljinat oluşumu ve spray-drying koşulları enzim aktivitesinde kayba neden olduğu için, karboksimetil selülozun sodyum tuzu, poliakrilik asidin sodyum tuzu ve laktoz gibi bazı koruyucuların ilavesi söz konusudur.

Bu koruyucular aljinat ve deney koşullarıyla etkileşime girerek enzim inaktivasyonunu engellemektedir. Burada taşıyıcı olarak nötral polimer hidrojelcer seçilmiştir. Çünkü polimer hidrojelceri biyo-emniyetlidir (biosafe) ve organik çözücülere ihtiyaç duymazlar. Bu çalışmada Scanning Electron Mikroskobu (SEM)'de yapılan analizler, spray-drying yöntemi ile mikro parçacık yapının sadece Na-PAA varlığında sağlanabileceğini açığa çıkarmıştır. Bunun nedeni Na-PAA' nın mikro parçacık oluşumunu engelleyen fizyolojik solüsyonlardaki NaCl' ü etkisizleştirme yeteneğine sahip olmasıdır. Koruyucu maddeler aktivite kaybını azaltmak için kullanılabilirler. Ayrıca çalışılan maddeler arasında, Na-PAA uyumlu, biyoaktivite korumasında bütünleştirici ve morfolojiyi koruyucu olarak düşünölmektedir [59].

Birçok tıbbi alanda olduğu gibi göz ile ilgili de çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların bir bölümü göze uygulanan ilaçlarla ilgili olmuştur. Göz için yapılan ilaçların göz içine iyi bir şekilde absorplanabilmeleri için, tedavide aktif rol oynayan maddelerin daha uzun süreli göz tabakasında bulunabilmeleri üzerine deneyler yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada ayrı ayrı kullanılan polimerler mukoz tabakayla bağ kurarak göz yüzeyinde çözünür, kolloidal ve partikül halde bulunan materyali yakalayabilmektedir. Bu çalışmada kullanılan polimerlerden biri de poliakrilik asittir [60].

Klauser ve arkadaşları IgG ve PAA' yı bağlayarak yapay immün kompleks oluşturmuşlardır. Bu kompleksin doğal immün kompleksi taklit edip etmediğini

araştırmışlardır. PAIGP insan periperal polimorfonüveli lökositlerde kemilüminesans bir cevap oluşturmaktadır. Bu cevap, serum varlığı ile yokluğunda ve tam kanda ortaya çıkmaktadır. Bu cevabın lökositler için serum yokluğunda tam kana oranla daha düşük olduğunu ortaya koymuşlardır. PAIGP doğal antijen-antikor kompleksi oluşmasına neden olarak birçok biyolojik reaksiyonu indüklemektedir [61].

Zayıf immunojenik özellikteki sentetik peptidler antikor oluşturmak için yeterli büyüklükteki moleküler boyutlara sahip olmadıklarından, peptidlere karşı antikor üretiminde immunojenliği arttırmak için peptidlerin proteinlerin yanı sıra lineer özellikteki polimerlere de bağlanabilmektedir. Poliakrilik asid (PAA), PoliN-isopropilakrilamid (NIPAA), PoliN-vinilprolidon (VP), Polivinilpiridin-Polisetilpiridin kopolimeri ve Polivinilpirolidon-Poliakrilik asid kopolimerleri vb. genel olarak kullanılan lineer taşıyıcılardır ve peptidler bu tür taşıyıcılara kararlı kovalent bağlarla bağlanırlar [62].

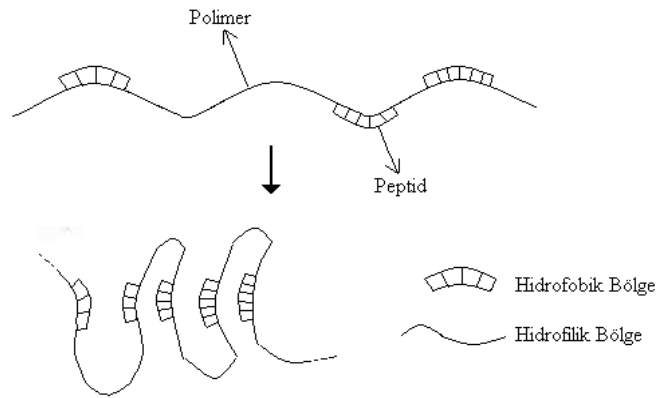
Konjugasyon bölgesi proteinlerde olduğu gibi peptid dizilimine bağlı olarak; dizinin N-ucu, C-ucu ya da içerisindeki bir nokta olabilir. Konjugasyon noktası karboksil (-COOH), amino (-NH₂) ya da sülfidril (-SH) uçları olabilir. Aşı olarak kullanıldığında önemli bir etki oluşturan sentetik peptidler, haptenerler vb. spesifik antikor oluşturmak için günümüzde oldukça yaygın kullanılmaktadır. Ancak tedavi edici ajanların ve sentetik peptidlerin ya da haptenerlerin; düşük çözünürlüğü, kararsızlığı, küçük molekül boyutlarından dolayı antijenik özelliklerinin düşük olması, biyouyumlu ve spesifik olmayışı ya da sitematik toksisitesi gibi istenmeyen özellikleri onların etki yeteneklerini oldukça azaltmıştır. Ancak proteinlerin, antijenlerin ya da ilaç etken maddelerinin suda çözünebilir polimerler ile konjugatlarının oluşturulması, tedavi edici ajanların özelliklerini ve immunojenliğini önemli ölçüde değiştirmektedir. Antijenik peptidlerin suda çözünebilir polimere bağlanması çok yönlü etkilere sahiptir. Bunlardan bazıları;

- Peptidlerin modifikasyonu sağlamak,
- Hidrofobik özellikte olanların suda çözünebilirliğini arttırmak,
- Bölgesel etkilerini yükseltmek,
- İmmunojenik etkilerini ve immunoreaktivliklerini arttırmak ve
- Canlı organizmada daha uzun süre etkili olmasını sağlamaktır [26, 27].

Polimerik konjugatların bu eşsiz özellikleri tedavi edici etkilerini de arttırmaktadır. Böylece klasik adjuvantlara en iyi alternatiflerden bir tanesi olarak da pozitif ya da negatif olarak yüklü, immunolojik olmayan sentetik polielektrolit polimerlerin kullanımıdır [22].

Polielektrolitler, sentetik peptidler ile konjugatlarının güçlü koruma özelliklerinden dolayı yeni nesil aşı bileşenleri olarak düşünülmektedir [26, 27].

Mustafaev ve arkadaşları tarafından geleneksel metodlar kullanılarak, sudaki makromoleküllerin aktive edilmiş fonksiyonel grupları arasında gerçekleşen reaksiyonlar ile protein-lineer polielektrolit, peptid-lineer polielektrolit kovalent konjugatları sentezlenmiştir. Karbodiimid aktivasyonu ile gerçekleştirilen iki basamaklı kovalent konjugasyon reaksiyonu; Polimerin karboksil gruplarının karbodiimid ile aktive edilmesi ve sonrasında karboksil grupları ile proteinin ya da peptidin amino grupları arasında kondenzasyon reaksiyonun oluşumu ile gerçekleşir. Birinci basamak süresince karboksil grubunun karbodiimide saldırması ile O-açilisüüre ara ürünü oluşmaktadır. Daha sonrasında kararsız olan bu ara ürün peptid ya da proteindeki amino gruplarına saldırmakta böylece polimer ile peptid veya protein arasında çapraz bağlanma gerçekleşmektedir.



Şekil 2. 19 Kısa zincirli peptid moleküllerinin lineer ve uzun zincirli polimerler ile oluşturdukları konjugatların şematik gösterimi [22, 49]

Yukarıda anlatıldığı gibi karbodiimid kullanılarak peptidlerin taşıyıcı polimerlerle kovalent konjugasyonu sonucu sentezlenen konjugatların yüksek immunolojik özelliğe sahip olduğu Mustafaev ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarla gösterilmiştir ve konjugatın yüksek immunolojik özelliğinin polimerin adjuvant etkisine bağlı olduğu düşünülmektedir [49].

2.9 Çapraz Bağlama Reaktifleri

Çapraz bağlama reaktifleri (çapraz bağlayıcılar) biyokonjugat prosedürlerinde moleküllerin kovalent olarak bağlanmasını sağlayan ve uygulama amacına göre çok farklı çeşitleri bulunan kimyasallardır. Çapraz bağlayıcılar biyolojik moleküllerin işaretlenmesinde, çapraz bağlanmasında ya da küçük moleküllerin daha büyük moleküllere bağlanarak hedeflenmesi ve dağıtımında kullanılmaktadır. İki farklı molekül intermoleküler (moleküller arası) ya da tek bir molekül intramoleküler (molekül içi) olarak çapraz bağlayıcılar kullanılarak bağlanabilmektedir. Çapraz bağlayıcılar aktif bağın sağındaki ve solundaki R gruplarının eş olup olmamasına göre Homobifonksiyonel (iki eş fonksiyonel R grubu taşıyanlar) veya Heterobifonksiyonel (farklı fonksiyonel R grubu taşıyanlar) olarak sınıflandırılırlar [32].

Kullanılan bağlayıcının cinsine göre bağlanan iki molekül arasında yaklaşık 0-20 Å (1 Å=1x10⁻¹⁰ m) uzunluğunda bir arabulucu (spacer) bulunmaktadır (arabulucu uzunluğu 0 Å olan bağlayıcılar özel bir alt bölüm olan Direkt Çapraz Bağlayıcılarıdır).

Arabulucu içeren bağlayıcıların bazı avantajları;

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

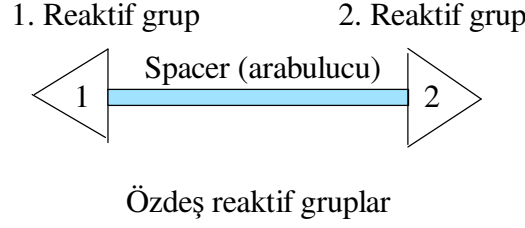
Arabulucu en fazla 6 metilen zincirinden oluşmaktadır ve başka bir fonksiyonel grup içermemektedir. Bu da istenmeyen immunolojik cevapların oluşumunu önleyecektir.

Çapraz bağlanma reaktifleri kullanılarak kovalent bağlanma ile elde edilen konjugatlar her iki molekülün biyolojik aktivitesini birlikte taşımaktadır.

2.9.1 Homobifonksiyonel Çapraz Bağlayıcılar

Homobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar; karbon zincirinden oluşan bir arabulucunun simetrik olarak iki özdeş reaktif gruba bağlanması ile oluşturulmuştur [32].

Arabulucu moleküler bir ip gibi bir protein molekülünü diğer bir moleküle ortak reaktif gruplarına saldırarak kovalent olarak bağlamaktadır. Örneğin bir proteindeki lizine ait ε amino ya da N- ucundaki amino grubu diğer bir moleküldeki amino grubuna homobifonksiyonel bağlayıcı aracılığı ile çapraz bağlanmaktadır.



Şekil 2. 20 Homobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların şematik gösterimi

Bu şekilde iki proteini ya da diğer molekülleri birbirine bağlayabilme yetenekleri homobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların farklı assay (deneme) ya da target (hedefleme) çalışmalarında kullanılmasına olanak sağlamıştır. Bunun yanında homobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların bazı dezavantajları da mevcuttur. Bunların başında;

Genel olarak basit homobifonksiyonel bağlayıcıların kullanılması ile oluşturulan konjugatların yeteri kadar tanımlanamaması,

Konjugasyon esnasında çapraz bağlayıcı tarafından aktive edilen polimer tarafından oluşturulan aktif ara ürünün yine aynı polimer ile çapraz bağlanabilmesi,

Aktif ara ürünün kendi içerisinde aynı polipeptid zincirinde diğer bir fonksiyonel gruba çapraz bağlanarak intramoleküler konjugat oluşturabilmesi,

Diğer bir çapraz bağlayıcının yine bu aktif ara ürüne bağlanması bunun sonucunda aynı molekülün ikili (dimer), üçlü (trimer) vb, oligomerlerinin oluşabilmesi ve bu şekilde polimerize olabilmesi gelmektedir.

Bu şekilde homobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar kullanılarak gerçekleştirilen tek basamaklı konjugasyon reaksiyonlarında tam olarak tanımlanamayan konjugatların oluşumu önemli bir problemdir. Çünkü bu tip reaksiyonlarda tüm reaktiflerin aynı anda reaksiyon karışımına koyulması gerekmektedir. Tüm bu olumsuz nedenlerden dolayı homobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar için iki basamaklı reaksiyon prosedürü geliştirilmiştir [32].

Öncelikle taşıyıcı molekülü (polimer) homobifonksiyonel çapraz bağlayıcı ile aktive edilir ve sonrasında çapraz bağlayıcının fazlası ile yan ürünler uzaklaştırılarak aktive edilmiş polimer saflaştırılır. Sonrasında bağlanacak olan ikinci molekül ile konjugat oluşumu için karıştırılır.

2.9.2 Seçici Gruplara Göre Homobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri

Homobifonksiyonel çapraz bağlama reaktiflerinin konjugasyon çalışmalarında en yaygın olarak kullanılanları yöneldikleri reaktif gruplara göre sınıflandırılarak aşağıda verilmiştir [63].

a) Amino Grubuna Yönelen Homobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri

Amino grubuna yönelen çapraz bağlama reaktifleri amino grubu içeren protein, peptid gibi makromoleküllerin kovalent olarak bağlanmasında kullanılan homobifonksiyonel çapraz bağlayıcılardır.

- NHS Esterleri
- Bis-imidoesterler
- Bis-aldehidler
- Bis-izosiyonatlar ve İzotiyosiyonatlar
- Diflorobenzen Türevleri
- Amino Gruplarının Yönlendirdiği Diğer Çapraz Bağlayıcılar

b) Sülfidril Grubuna Yönelen Homobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri

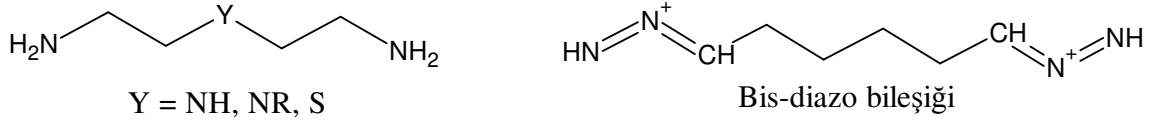
Sülfidril grubuna yönelen çapraz bağlama reaktifleri sülfidril grubu içeren protein, peptid gibi makromoleküllerin tiyol bağı oluşturarak kovalent olarak bağlanmasında kullanılan homobifonksiyonel çapraz bağlayıcılardır [32].

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

c) Karboksil Grubuna Yönelen Homobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri

Karboksil anyonu nükleofilik yapıdadır ancak nötral ve oldukça bazik pH değerleri arasında elektrofiller için reaktifliği amino ya da tiyol grubunun yanında oldukça zayıf kalmaktadır. Ilımlı asidik koşullarda (karboksil grubunun pKa değerleri arasında; yaklaşık pH=3-5) amino ve tiyol grupların protonlanmış formları (NH_3^+ , SH) baskın olduğundan reaktiflikleri azalmakta ve karboksil grupları reaksiyon için tercih edilmektedir. β karbonildiazo bileşikleri bu koşullar altında konjugasyon reaktifi olarak

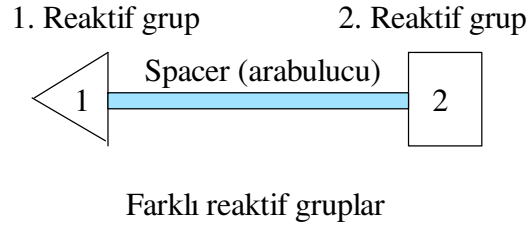
kullanılmaktadır. Bu bileşikler fotoaktive edilebilir formda olup sonrasında karanlık koşullarda nükleofilleri hedefleyerek reaksiyona girmektedir. Genel olarak kullanılan karboksil grubuna yönelen homobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar diazo bileşikleridir [63].



Şekil 2. 21 Konjugasyon reaksiyonlarında kullanılan karboksil grubuna yönelen çapraz bağlayıcılar

2.9.3 Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlayıcılar

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



Şekil 2. 22 Heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcıların şematik gösterimi

İki farklı reaktif grup, kovalent olarak bağlanacak farklı moleküllerdeki iki farklı fonksiyonel gruba saldırarak bu moleküllerin çapraz bağlanmalarını sağlarlar. Örneğin çapraz bağlayıcının bir ucu amino grubuna yönelen reaktif grup içerirken, diğer ucu sülfidril ya da karboksil grubuna yönelen reaktif grup içermektedir. Bunun sonucunda hedeflenen molekülün istenilen bölgesinde çapraz bağlanma reaksiyonu gerçekleştirilebilmekte ve böylece konjugasyon prosesinde daha iyi bir kontrol sağlanmaktadır [32].

Heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar kullanılarak gerçekleştirilen konjugasyon reaksiyonu birkaç basamaktan oluşmaktadır. Tipik bir konjugasyon reaksiyonunda ilk

protein (ya da peptid, makromelekül vb.) heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcının daha reaktif ve reaksiyona meyilli olan ucu tarafından modifiye edilir. Sonrasında modifiye protein, reaktiflerin fazlasının jel filtrasyon ya da diyaliz yoluyla uzaklaştırılması sonucu saflaştırılır. Konjugasyon için ikinci molekül ilave edilmeden aktive edilmiş ara ürünün saflaştırılması sırasında ara ürünün kararlılığını koruyabilmesi için birçok heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar, en az bir tane sulu ortamda uzun süre kararlı kalabilecek reaktif grup içerirler. Örneğin NHS-ester maleimid heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcıları, aminlere karşı oldukça reaktif olan NHS ucu ile proteine bağlanıp molekülün modifikasyonunu gerçekleştirirken, maleimid fonksiyonel grubunun kararlılığından dolayı ara ürünün aktivitesi korunmaktadır. Çünkü maleimid grubu sulu çözeltilerde NHS esterlere göre daha kararlıdır. Hızlı bir saflaştırma işleminden sonra ikinci molekül (sülfidril grubu içeren) ortama eklenerek maleimid ucu ile ilk moleküle çapraz bağlanması sağlanır. Bu şekilde çoklu basamaklı konjugasyon reaksiyonlarında konjugat ürününün molekül boyutu ve çapraz bağlı üründeki bileşen oranları üzerinde daha iyi bir kontrol sağlanmaktadır. Konjugatın konfigürasyonu ve ya da yapısı ilk proteinin başlangıç modifikasyon derecesine bağlı olarak ikinci proteinin konjugasyon reaksiyonuna eklenecek miktarı ayarlanarak düzenlenebilmektedir [32]. Bu şekilde kullanım amacına göre; düşük ya da yüksek molekül ağırlıklı konjugatlar elde edilebilir. Heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar konjugasyon reaksiyonlarında hedef molekülün özel bir bölgesine karşı spesifik yönlendirici olarak kullanılabilirler. Bunun yanı sıra heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar seçici olmayan bağlanma gerçekleştiren ve UV ışınlama ile aktive edilen bir adet fotoreaktif gruba sahip olabilirler.

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

2.9.4 Seçici Gruplara Göre Heterobifonksiyonel Çapraz Bağlama Reaktifleri

Heterobifonksiyonel çapraz bağlama reaktiflerinin konjugasyon çalışmalarında en yaygın olarak kullanılanları yönedikleri reaktif gruplara göre sınıflandırılarak aşağıda verilmiştir [63].

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

2.9.5 Direkt (Zero-Length) Çapraz Bağlayıcılar

Çapraz bağlayıcıların diğer bir grubu ise zero-length olarak da bilinen direkt çapraz bağlama reaktifleridir. Bu alt gruptaki bağlayıcılar iki molekülü arada herhangi bir grup ya da atom olmaksızın birbirine bağlamakta yani ilk moleküldeki bir atom diğer moleküle kovalent olarak bağlanırken arada hiçbir arabulucu ya da bağlayıcı bulunmamaktadır. Ancak birçok konjugasyon reaksiyonu elde edilen konjugattaki moleküller birbirlerine bağlanırken yapıya yabancı bir madde girmiştir ve bu madde konjugatın kullanılmak istendiği yere göre zararlı olabilmektedir. Örneğin peptid-protein konjugatları, taşıyıcı proteine bağlanmış olan peptide karşı immun cevap oluşumu amacı ile sentezlenmiştir. Bazı durumlarda oluşturulan antikorların bir kısmı, konjugasyon reaksiyonunda kullanılan çapraz bağlayıcı ajanlara spesifiktir. Direkt çapraz bağlama reaktifleri iki molekülü birbirlerine arada bir arabulucu ya da bağlayıcı

bulunmadan direkt bağladığı için bu tür istenmeyen antikor oluşumlarını engellemektedirler [32].

Bu tür çapraz bağlayıcılar;

- Primer amino grubu ile karboksilik asid grubunu, kondenzasyon reaksiyonu sonucu amid bağı oluşturarak,
- Organik fosfat grubu ile primer aminleri fosfoamid bağı üzerinden ya da,
- Aldehidler ile primer veya sekonder amino gruplarını Schiff bazı oluşturarak ve bu bileşiğin indirgenmesi sonucu sekonder ya da tersiyer amin bağları ile bağlamaktadır.

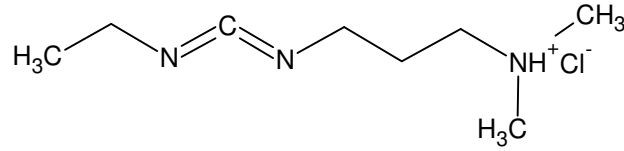
2.9.6 Karbodiimidler

Peptid-protein, protein-protein ve peptid-polimer konjugatlarının oluşturulmasında kullanılan direkt çapraz bağlama reaktifleri arasında en çok tercih edilen karbodiimidlerdir. Suda çözünebilir ve çözünemeyen formlarının bulunduğu karbodiimidler; karboksilat ve primer aminlerin amid bağı ile, fosfat ve amino gruplarının ise fosfoamid bağı ile bağlanmasına arabuluculuk ederler. Suda çözünebilir özellikteki karbodiimidler daha çok biyokimyasal konjugasyonlarda tercih edilmektedir çünkü biyolojik kökenli birçok makromolekül sulu tampon çözeltilerde çözünmektedir. Sadece karbodiimidler değil aynı zamanda yan ürünler olan üre türevleri de suda çözünen özellikte olduğundan konjugatın saflaştırılmasında kolaylık sağlamaktadır. Bunun yanı sıra suda çözünemeyen özellikteki karbodiimidler genel olarak peptid sentezinde ve moleküllerin sadece organik çözücülerde çözünmesi gereken biyokonjugasyon reaksiyonlarında kullanılmaktadır. Bu reaksiyonlarda meydana gelen ürünler ve yan ürünler de sadece organik çözücülerde çözünebilmekte suda çözünmemektedir [32].

a) EDC

EDC ya da EDAC adı ile bilinen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür biyolojik moleküllerin konjugasyonunda en sık kullanılan karbodiimid türevidir. Suda çözünebilir özelliği çapraz bağlayıcıyı reaksiyon ortamında daha önce bir organik çözücüde çözme zorunluluğu olmadan direkt olarak ekleme imkanı

sunmaktadır. Karbodiimidin fazlası ve çapraz bağlama reaksiyonunun yan ürünü olan üre türevleri suda çözünebilir olduğundan diyaliz ya da jel filtrasyon ile kolayca ortamdan uzaklaştırılabilir ve elde edilen konjugatlar saflaştırılabilir [33, 34]. Ancak EDC suyun varlığında kararlı olmadığından kimyasal -20 °C’de saklanmalıdır. Daha sonrasında kimyasal kullanılacağı zaman oda sıcaklığına getirilmeli ve öyle açılmalıdır bu EDC’nin erkenden bozunmasını önlemektedir. EDC’nin küçük miktarlarını reaksiyon ortamına eklemek için suda stok çözeltisi hazırlanabilmektedir ancak bu çözeltinin kimyasalın aktivitesini kaybetmemesi için oldukça çabuk hazırlanması ve kısa sürede kullanılması gerekmektedir.



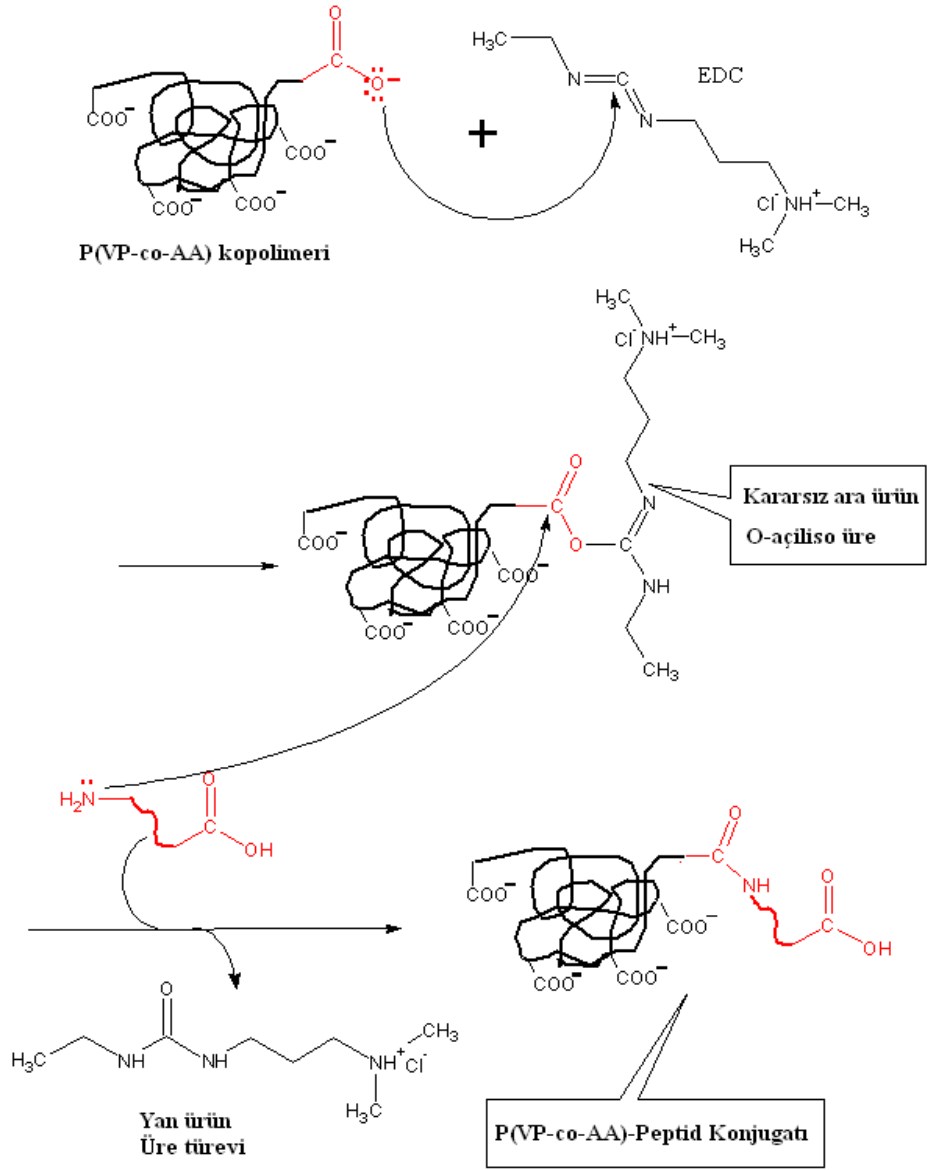
Primer amin ve karboksil grupları içeren birçok molekülün EDC kullanılarak konjugasyonu gerçekleştirilebilmektedir [35, 36, 64, 65]. Konjugat oluşum prosesinde öncelikle N-substitue karbodiimidler (karbon atomuna komşu iki azot atomu karbona göre daha elektronegatif olduğundan karbon atomu \square^+ yüklenir ve karboksilat anyonunun saldırması için oldukça uygun bir yapı oluşur) karboksilik asitler ile reaksiyona girerek oldukça reaktif olan O-açilisüre ara ürününü oluştururlar. Sonrasında bu aktif ara ürün primer amin gibi nükleofil özellikteki gruplar ile reaksiyona girerek amid bağı üzerinden konjugat oluşumunu gerçekleştirir [66]. Reaksiyon esnasında herhangi başka bir nükleofil de reaktif olabilmektedir. Örneğin sülfidril grupları ara ürüne saldırabilmektedir ancak oluşan tiyoester bağı amid bağı kadar kararlı değildir.

Ancak EDC peptidlerin polimerlerle konjugasyonu sırasında moleküllerin kendi içerisinde polimerizasyonu da söz konusudur. Örneğin peptid molekülü hem karboksil grubu hem de amino grubu içerdiğinden karbodiimid tarafından aktive edilen karboksil grubunun oluşturduğu kararsız ara ürüne yine peptid molekülünün amino grubu saldırabilmekte ve peptid-polimer konjugatının yanı sıra peptidin oligomerlerinin oluşumu da söz konusu olabilmektedir. Birçok çalışmada karbodiimidler için referans edilen optimim pH aralığı 4,7 ile 6’ dır.

Genel olarak EDC kullanılarak amino ve karboksil grupları içeren küçük peptid vb. moleküllerin polimer veya proteinler ile konjugasyonu aşağıda verilen protokole göre yapılmaktadır. Protokol pH, kullanılan tampon, reaksiyona giren peptid ya da proteinin oranı, EDC'nin oranı değiştirilerek modifiye edilebilir. Bazı durumlarda ise protokol elde edilen konjugatın çözünürlüğünü ya da aktivitesini kaybetmemesi için modifiye edilmektedir. Örneğin hidrofobik bir peptidin protein yüzeyine kovalent konjugasyonu sırasında kısmi ya da tümüyle çökme problemi oluşabilmektedir. Bu problem EDC miktarının ya da ortama ilave edilen hidrofobik peptid miktarının düşürülmesi ile azaltılabilmektedir [32].

- Modifiye edilecek polimer suda ya da fosfat tamponunda çözünür.
- Konjugasyon yapılacak olan peptid de aynı çözücüde çözünür. Eğer belirli oranlar ile çalışılmıyor ise küçük molekül, reaksiyon ortamına polimerin en az 10 katı molar konsantrasyonda olacak şekilde eklenir. Eğer mümkün ise peptidin gereken miktarı direkt olarak polimer çözeltisine ilave edilir. Az miktarlar ile çalışılacak ise peptidin stok çözeltisi hazırlanarak bundan reaksiyon için gereken miktar kullanılabilir.
- Eğer peptid çözeltisi ayrı olarak hazırlandı ise polimer çözeltisine eklenir.
- Çözeltideki polimerin molar konsantrasyonunun 10 katı olacak şekilde ortama EDC ilave edilir. Eğer düşük miktarda EDC kullanılacak ise hemen tüketilmek kaydı ile karbodiimidin stok çözeltisi hazırlanır ve gereken miktar bu çözeltiden eklenir.
- 2 saat oda sıcaklığında reaksiyon için bırakılır.
- Elde edilen konjugat jel filtrasyon ile ya da uygun bir tampon kullanılarak [birçok konjugat için 0.1 M sodyumfosfat tamponu (0.15 M NaCl, pH = 7.4) tercih edilir] diyaliz ile saflaştırılır. Eğer konjugasyon sırasında herhangi bir bulanıklık gözlenirse bu reaksiyon bitiminde santrifüj ile uzaklaştırılabilir. Ancak EDC ile immunojen konjugatların oluşturulması sırasında oluşan bu bulanıklık genel olarak sorun yaratmamaktadır. Çünkü çökelti halindeki bu immunojenik konjugatlar suda çözünebilir olanlarına göre daha yüksek immunojenlik göstermektedir [32].

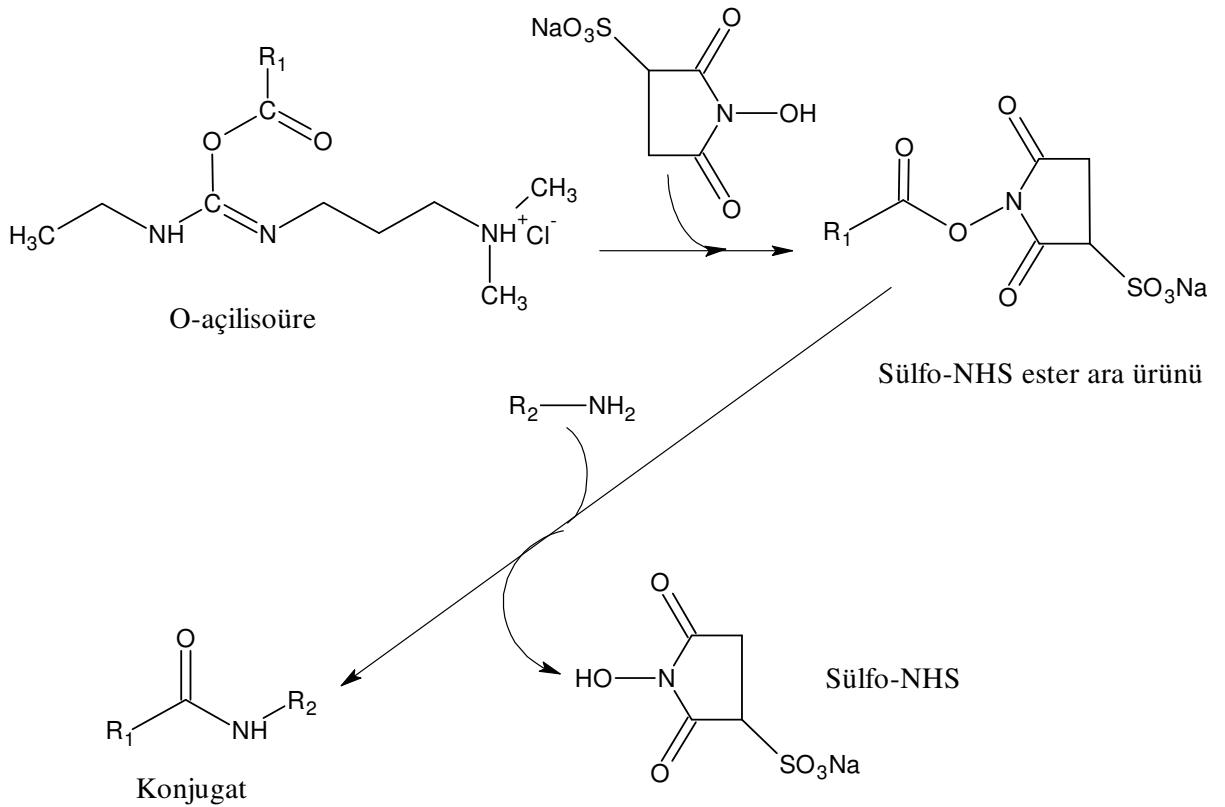
Tüm bu yöntemler kullanılarak elde edilen konjugatların saflaştırılmasında çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları Bölüm 5.6'da detaylı olarak anlatılmıştır.



Şekil 2. 23 EDC kullanılarak sentezlenen Polimer-Peptid konjugatı reaksiyon mekanizması

b) EDC Plus Sülfo-NHS

Suda çözünebilir özellikteki karbodiimidler; karboksil grubu ile aktif ester ara ürünü oluşturmak için suda çözünebilir sülfo-NHS ile birlikte kullanılırlar. Önce karbodiimid ile karboksil grubunun reaksiyonu sonucu O-açilisoüre kararsız ara ürünü oluşur sonrasında sülfo-NHS ile bu ara ürünün reaksiyonundan sülfo-NHS ester ara ürünü oluşur ve bu ara ürünün primer amino grubu ile reaksiyona girmesi sonucu amid bağı üzerinden ile konjugat elde edilir.



Şekil 2. 24 EDC Plus Sülfo-NHS kullanılarak sentezlenen Peptid-Protein konjugatı reaksiyon mekanizması

c) CMC

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

d) DCC

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

e) DIC

Diizopropilkarbodiimid suda çözünmeyen özellikteki ve oda sıcaklığında sıvı olarak bulunan diğer bir karbodiimid çeşididir.

f) N,N-Karbonildiimidazol

N,N-karbonildiimidazol yapısında konjugasyon sırasında ayrılan iki adet açilimidazol grubu taşıyan diğer bir direkt çapraz bağlama reaktifidir [32].

DENEYSEL ÇALIŞMALARDA KULLANILAN ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ

3.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

- Hanna Instruments pH 211
- WTW pH level 1 pH metre
- Precisa XB 220A Hassas Terazi
- Sartorius CP 225D
- Hettich Eba20 Santrifüj Cihazı
- Heraeus Biofuge Stratos
- Heildolph MR 3001 Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı
- IKAMAG Çoklu Karıştırıcı
- Finnpiette Micropipet (1-10 mL, 100-1000 µL, 5-50 µL)
- Viscotek 4 Detektörlü GPC (SEC) Sistemi (Viscotek TDA 302 üçlü detektör dizisi, Viscotek Model 2501 UV detektörü, Viscotek GPCmax VE2001 örnek modülü kısımlarından oluşur.)
- Malvern ZEN 3600 Zetasizer Nano ZS Zetapotansiyel ve Partikül boyut ölçüm cihazı
- Shimadzu HPLC Sistemi
- PTI QM-4/2003 Steady State Floresans Spektrofluorometre
- Jasco V-530 UV-VIS Spektrofotometre
- Milipore-Q Gradient Ultra Saf Su Cihazı

- Shimadzu LC-MS 2010 EV
- Milestone Microsynth Mikro Dalga Sentez Cihazı
- Liberty Mikro Dalga destekli Katı Faz Peptid Sentez Cihazı

Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler

KİMYASALIN ADI	ALINDIĞI FİRMA	KODU
Bovin serum albumin, (BSA)	Sigma	A-4503
1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC)	Sigma	E-7750
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Amresco	0231
Sodyum dihidrojen fosfat, (NaH ₂ PO ₄)	Riedel-de Haën	04361
Sodyum hidrojen fosfat, (Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O)	Fluka	71647
Sodyum klorür, (NaCl)	Fluka	71376
Sodyum hidroksit, (NaOH)	Fluka	06203
Hidroklorik asit, (HCl)	Riedel-de Haën	07102
Sodyum azid, (NaN ₃)	Applichem	A1430

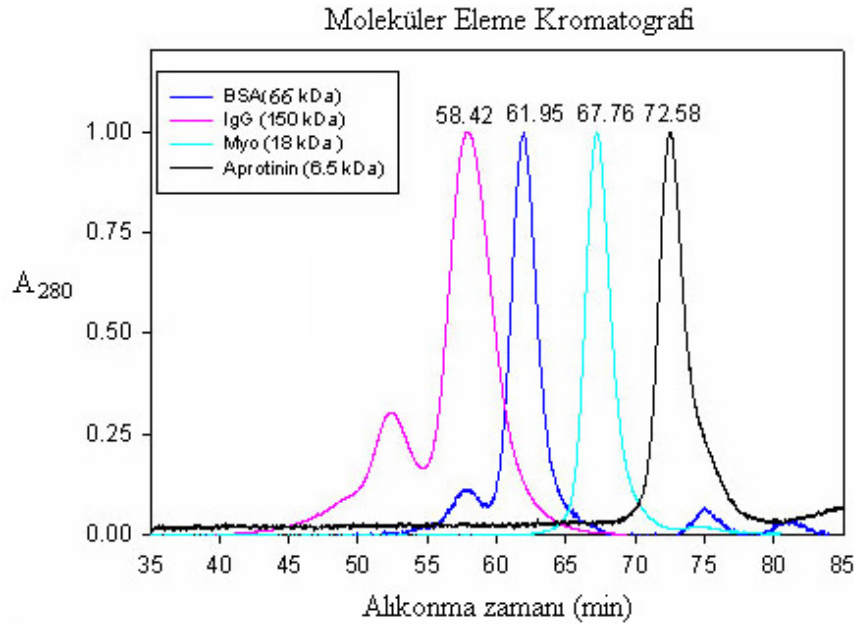
3.2 Kullanılan Ölçüm Yöntemleri

3.2.1 Moleküler Eleme Kromatografisi

Kromatografi çeşitli maddeleri (biyolojik moleküller, sentetik polimerler, sentetik peptidler vb.) incelemek için kullanılan fizikokimyasal bir yöntemdir. Metod bileşenlerin, 10 cm (HPLC) ile 30 cm (GC) arasında değişen boylarda kalibre edilmiş tüplerden oluşan kromatografik kolon içerisinden geçerken ayrılması temeline dayanmaktadır ve kolon silikajel, çapraz bağlı polimer gibi özel dolgu maddeleri ile doldurulur [67].

Moleküler Eleme Kromatografisi polimer, protein, peptid vb. bileşenlerin fiziksel etkileşimler doğrultusunda; molekül ağırlığı, boyutu ve şekli temel alınarak likit kromatografi ile ayrılmasında kullanılmaktadır [68]. Monomerik, oligomerik ya da polimerik çoklu bileşenli sistemler, mikro gözeneklere sahip jelde, moleküler eleme prensibine göre ayrılmaktadır.

Çalışmamızda kullanılan protein, peptid gibi biyolojik moleküllerin molekül boyutları birbirlerinden farklıdır. BSA çözeltilerinde; monomer, dimer ve trimer olarak bulunmaktadır. Çalıştığımız melanoma tümör peptidi ise BSA ya göre çok daha küçük bir molekül boyutuna sahiptir. Bu şekilde farklı boyutlardaki moleküllerin karışımından oluşan çözeltide her bir molekülün hidrodinamik çapı ve hidrodinamik hacmi birbirlerinden farklı olacaktır. Konjugat karışımımızda bulunan serbest peptid ya da üre türevi gibi küçük moleküller gözeneklerde daha uzun kalacakları için kolondan daha geç çıkacaklardır. Oysa molekül çapı çok daha büyük olan BSA gibi moleküllerin gözenekler ile etkileşimi çok daha az olacağından kolonda daha kısa süre kalacak ve sistemden daha çabuk çıkacaktır. Bu şekilde molekül çapı büyüdükçe kolonda kalma süresi buna ters orantılı olarak azalacaktır (Şekil 3.1) [69]. Sistemi terk eden moleküller ise UV, Vizkozite, Işık saçılması ya da RI detektörlerinde saptanacak ve sinyale dönüştürülerek kromatogram elde edilecektir.



Şekil 3. 1 Kolon kromatografisinde molekül büyüklüğüne göre ayrılma ve alıkonma zamanına göre oluşan kromatogram

3.2.2 Floresans Spektroskopisi

Spektroskopi, elektromagnetik dalga ile moleküllerin etkileşmesini inceleyen deneysel tekniklerin en önemlilerinden biridir. Floresans spektroskopisi ise maddenin floresans özelliği üzerine kurulmuştur ve absorpsiyon spektroskopisine benzemektedir ancak absorpsiyon spektroskopisine göre daha hassastır. Floresans spektroskopisi ile birçok madde milyonda birin altındaki hassaslıkla tayin edilebilir. Floresans özelliği gösteren maddelerin sayısının az olması yöntem için bir dezavantaj olsa da metodun seçiciliğinin yüksek olması yöntemin önemli avantajlarından bir tanesidir. Proteinlerin ve peptidlerin yapısında bulunan amino asitlerden floresans özellik gösteren Triptofan, Tirozin ve Fenilalaninden Triptofan en yüksek floresansa sahiptir.

Kullanılan Melanoma peptidinin dizilimlerinde Triptofan bulunmamaktadır. Ancak konjugasyon mekanizmasının ve oluşumunun floresans spektroskopisi ile saptanabilmesi için sentezlenen peptid dizilerinin N- ucuna Trp eklenmiştir.

Serbest haldeki peptidin N-terminalinde yer alan Trp sulu ortamla etkileşim içerisindedir ve daha düşük enerjili ışığa ile uyarılabilmektedir. Konjugasyon gerçekleşip Trp sulu ortamdan uzaklaşıp daha içeriye hidrofobik bölgeye girdikten sonra uyarma için gereken enerji artacaktır.

$$E = \frac{hc}{\lambda}$$

Eşitliğinde de görüldüğü üzere uyarma için gereken enerjinin artması dalga boyunun küçülmesine yani λ_{max} değerinde daha küçük dalga boyuna doğru kaymaya (blue shift) neden olacaktır. Uyarıldığı dalga boyu kayan molekülün yaptığı floresans ışığının λ_{max} değeri de buna bağlı olarak küçülecek ve blue shift verecektir.

Çalışmamızda öncelikle serbest peptidin λ_{max} değeri floresans spektrumu alınarak saptanmıştır. Daha sonra elde edilen konjugatlardaki Trp'ın konformasyon değişikliğine bağlı olarak değişen λ_{max} değerleri saptanış ve gözlenen kaymalar yardımı ile konjugasyon oluşumu incelenmiştir.

3.2.3 Boyut ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

En az bir boyutu 1nm–1µm arasında olan peptid, protein gibi katı bir maddenin sıvı bir çözücü içinde çözünmesiyle oluşan kolloidal sisteme kolloidal süspansiyon denir. Kolloidal sistemlerin doğalarını gösteren en önemli özelliklerden ikisi, parçacık boyutu ve yüzey özellikleridir.

Peptid, protein, polimer çözeltilerinin ya da bunların karışımlarının ortalama boyut analizlerinde Zetasizer Nano ZS cihazında; 633 nm dalga boyunda 4,0 mV He-Ne lazer kullanılarak 25 °C’de Foton Kolerasyon Spektroskopisi Yöntemi uygulanarak ölçüm yapılmaktadır. Vizkozitenin 0,8872 cP ve kırılma indisinin 1.33 olarak alındığı ölçümlerde tüm çözeltiler 0,22 µm’lik membranlardan filtre edilerek analiz edilmiştir. Bir korelatör tarafından kaydedilen zaman ölçümlerinden $G_2(\tau)$ saçılma şiddetine ait otokorelasyon fonksiyonu bulunur, bu fonksiyona en iyi uyan 3. dereceden polinom saptanır, polinomun katsayılarından translasyonel difüzyon katsayısı D ve polidispersite sabiti hesaplanır. Boyut değeri, Stokes-Einstein denkleminde bulunur.

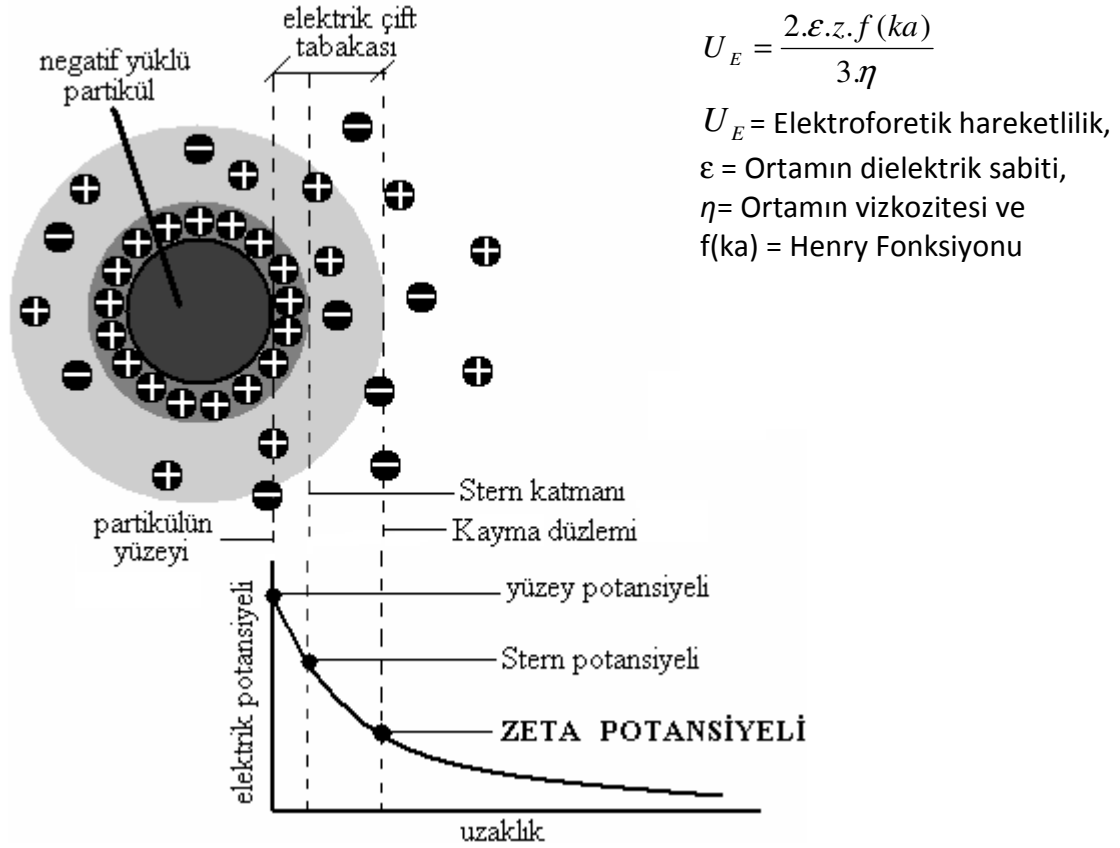
$$D = \frac{k.T}{3.\pi.\eta.R}$$

k= Boltzman Sabiti, T = Mutlak sıcaklık, η = Çözücü vizkozitesi

Peptid, protein, polimer çözeltilerinin ya da bunların karışımlarının Zeta Potansiyeli analizlerinde ise Zetasizer Nano ZS cihazında bir kapiler hücre içerisinde Lazer Doppler Elektroforez (LDE) tekniği uygulanarak ölçüm yapılmaktadır. Vizkozitenin 0,8872 cP, dielektrik sabitinin 79; f(ka)’nın 1.50 (Smoluchowski) olarak alındığı 25°C’de ki ölçümlerde tüm çözeltiler 0,22 µm lik membranlardan filtre edilerek analiz edilmiştir.

Çalışmamızda zeta potansiyel ölçümü için pH=7’de negatif yüklü olan VP/AA kopolimeri ve peptid molekülü temel alınmıştır. VP/AA-peptid biyokonjugat partikülleri ortamda bulunan iyonlarla girdiği elektrostatik etkileşim sonucu pozitif iyonları çekerken negatif iyonları da iterek partikül yüzeyinin hemen dışında, pozitif iyonların yüzeye sıkı bağlı olduğu ve Stern katmanı denilen bir tabaka oluşturmaktadır. Stern katmanından sonra iyonların hareket edebildiği bir difüz bölgesi mevcuttur. Difüz bölgesinde; hayali olarak var olduğu düşünülen bir **Kayma düzlemi** vardır ve bu düzlemin içinde kalan pozitif iyonlar, partikülle birlikte hareket etmeye zorlanırken, dışında kalanlar ise bağımsız olarak hareket edebilmektedirler. Molekülün Stern katmanındaki elektrik potansiyeline **Stern potansiyeli**, kayma düzlemindeki elektrik

potansiyeline ise **Zeta Potansiyeli** denmektedir ve Zeta Potansiyeli Henry denkleminde hesaplanmaktadır [70].



Şekil 3. 2 Negatif yüklü parçacığın Zeta Potansiyeli

3.2.4 LC-MS (Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi)

MS günümüzde biyolojik maddelerin analizinde en çok başvurulan laboratuvar cihazlarından biridir. Bunun altında yatan sebep düşük konsantrasyonlarda analize imkan vermesi, yapısal analizi olanaklı kılması, otomatik olarak kullanılabilmesi vs. Ayırma teknikleri (HPLC, GC, kapiler elektroforez) ile birlikte kullanılarak; fizyolojik sıvıların, ilaç etkileşimlerinin incelenmesi, proteinlerin ve peptidlerin yapı analizleri yapılabilmektedir. HPLC, kütle spektrometresine bağlandığında, kolondan birçok bileşen çıkarken her birinin kütle spektrumu aynı anda alınabilir. Bazı durumlarda, eğer ölçümler yeterli doğrulukla yapılırsa, protein veya peptidin hangi protein veya peptid olduğu saptanabilir.

Kütle spektrometresinde aslında molekülün kütlesi değil, kütle/yük (m/z) oranı tayin edilmektedir. Kütle spektrumu ise iyon miktarıyla m/z arasında çizilen bir grafikdir. Molekülün yüke sahip olması için iyonlaştırılması gerekmektedir ve bu işlem gaz fazında gerçekleştirilir. HPLC-MS cihazı 4 temel kısımdan oluşmaktadır. Bu kısımlar sırasıyla HPLC, iyonlaştırıcı, kütle analizörü ve dedektördür.

3.2.5 Elisa Yöntemi

Elisa testi, son yıllarda viral enfeksiyonların tanısında kullanılan, klasik testlerden bir çoğunun yerini almaktadır. Elisa yönteminde, antijen ya da antikor bir enzimle işaretlenmekte ve immunolojik reaksiyon, enzimatik bir aktivite sonucu ölçülmektedir. Duyarlı spesifik ve çabuk sonuç veren bir testtir. Serodiagnostik’de kolay ve hızlı olmasından dolayı geniş bir uygulama alanı bulmuştur.

Elisa yönteminde antijen, katı bir faza bağlanmaktadır. Katı faz olarak rigid polystyrene, polyvinyl ve polypropilene’den yapılmış tüpler ve mikroplyetlerin daha uygun olduğunu belirtmişlerdir. Antijen ve antikoru uygun bir şekilde adsorbe eden ve diğer safhalarda yer alan komponentleri adsorbe etmeyen özellikte mikroplyetler tercih edilmelidir.

Elisa’da enzim olarak beta galaktozidaz, glukozoksidaz, peroksidaz ve alkalın fosfotaz kullanılmaktadır. Engvall ve Perlmann rutin olarak alkalın fosfatı tercih etmişlerdir [71]. Yüksek aktivite gösterdiğini ve ona karşı seçilen substratın ucuz ve nontoksik olduğunu belirtmişlerdir [72].

Alkalın fosfat konjugatı sodyum azid ile 40 de saklanabilmektedir. Alkalın fosfat ile P-nitrofenil fosfat, substrat olarak kullanılmakta, emniyetli tablet formda bulunmakta ve pozitif reaksiyonda sarı bir renk oluşturmaktadır. Peroksidaz konjugat için substrat olarak, 5 amino salisilik asid ve O-fenilendiamin’den yararlanılmaktadır. Kahverengi bir renk oluşumu pozitif reaksiyon olarak kabul edilmektedir. Enzimlerin katabolik etkileri enzim substrasyon reaksiyonu esnasında immunolojik reaksiyonun hem hızlanmasını hem özgülüğünü sağlamaktadır. Enzim substrat reaksiyonu genellikle 30-60 dakika içinde tamamlanır. Reaksiyon NaOH veya H₂SO₄ ile durdurulabilir ve sonuçlar, kullanılan konjugatın özelliğine göre 400-600 nm de okunur.

Elisa testinin her evresi için aşağıda belirtilen optimum şartlar gereklidir.

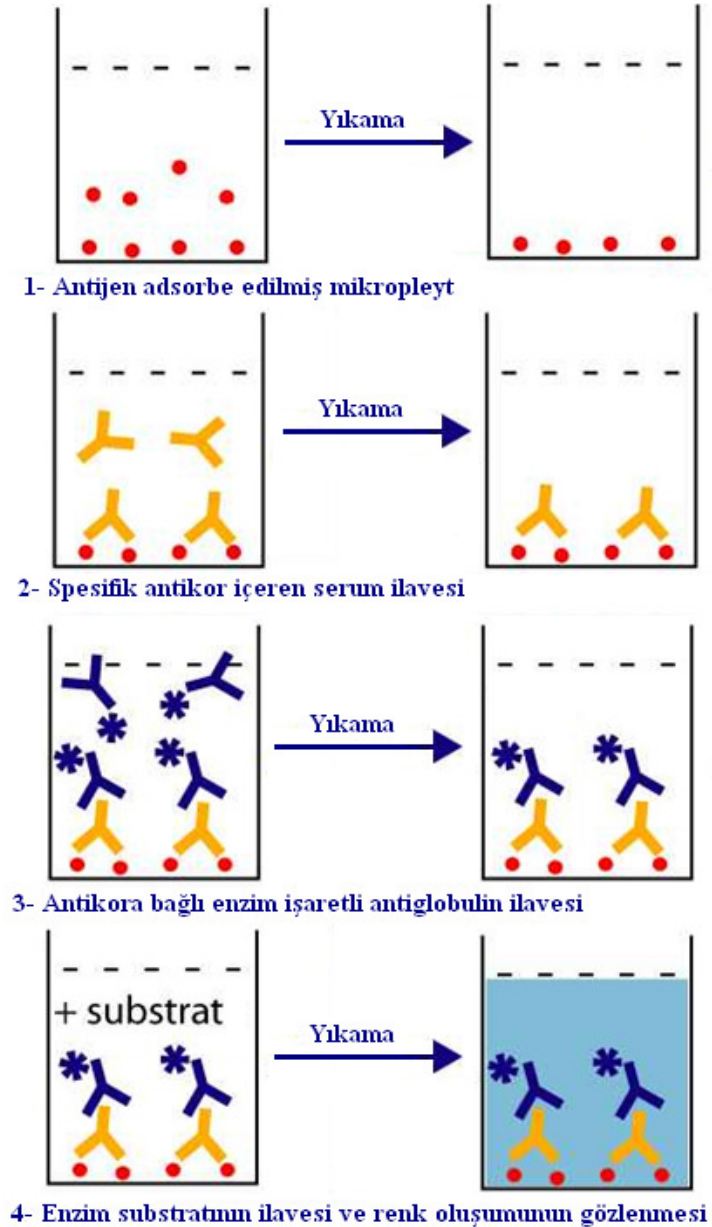
1. Solid fazın kaplamasında antijen veya antikor optimum konsantrasyonda olmalıdır.
2. İnkübasyon süresi ve sıcaklığı optimum olmalıdır.
3. En uygun substrat seçilmelidir.

Çizelge 3. 1 Elisa Protokolleri [73].

ELISA protokolü	Kullanımları	Gerekli kimyasallar	Yorumlar
İndirekt	Antikor aramada	Antijen saf veya yarı saf; antikor içeren test solüsyonu; immünize örneklerde Ig'i bağlayan enzim konjugatı	Önceden varolan spesifik antikorların kullanımına gerek duyulmaz; relatif olarak fazla miktarda antijen gerektirir.
Direkt kompetitif (yarışmacı)	Antijen aramada; çözünür antijeni saptamada	Antijen saf veya yarı saf; antijen içeren test solüsyonu; spesifik antijen için enzim-antikor konjugatı	Sadece iki basamaktan oluşan hızlı test; antijenik çapraz reaksiyonu ölçmede çok kullanışlı
Antikor-sandviç yöntemi	Antijen aramada; çözünür antijeni saptamada	Antikor yakalama (capture) (saf veya yarı saf spesifik antikor); antijen içeren test solüsyonu, antijen için spesifik enzim-antikor konjugatı	En hassas antijen testi; relatif olarak fazla miktarlarda saf veya yarı saf antikor gerektirir (antikor yakalama)
Çift antikor-sandviç yöntemi	Antikor arama	Antikor yakalama (capture) (immünize örneklerde Ig için spesifik); antijen içeren test solüsyonu, antijen için spesifik enzim-antikor konjugatı	Saflaştırılmış antijen gerektirmez; beş basamaklı relatif olarak uzun bir testtir.
Direkt hücresel yöntem	Antijen ekspresse eden hücrelerin aranmasında; hücresel antijen ekspresyonunun ölçülmesi	İlgili antijeni ekspresse eden hücreler; hücresel antijen için spesifik enzim-antikor konjugatı	Fazla miktarda taramalarda hassas bir testtir; heterojen karışık hücre gruplarında hassas değildir.
İndirekt hücresel yöntem	Hücresel antijenlere karşı oluşan antikorların aranmasında	İmmünizasyonda kullanılan hücreler, antikor içeren test solüsyonları; immünize örneklerde Ig bağlayan enzim konjugatı	Düşük miktarda ekspresse edilen hücresel antijenler için spesifik antikorları saptayamayabilir.

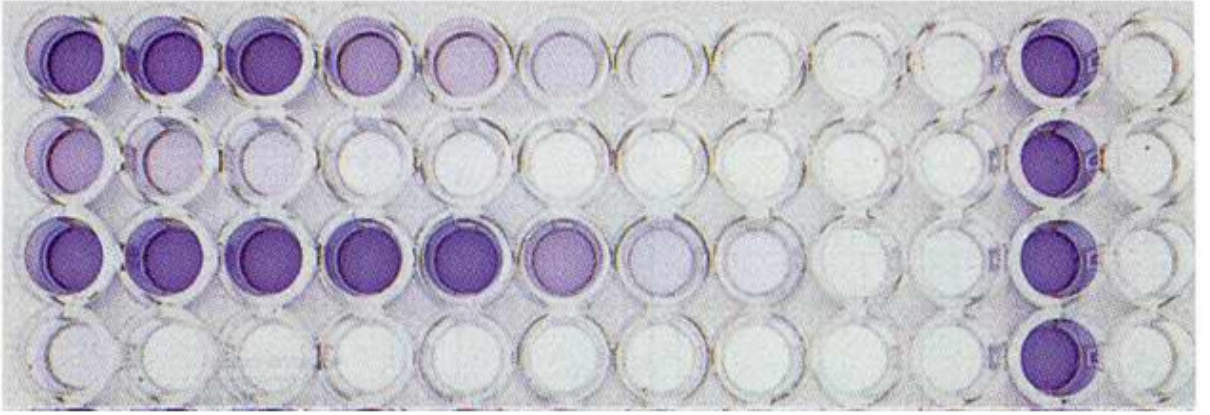
Antijen ve antikorun optimum konsantrasyonunun saptanmasında checker board yöntemi ile referans numuneler kullanılır. Direkt Elisa yöntemi ise yüksek molekül ağırlıklı antijenin miktar tayini için uygundur.

İndirekt metotta antijen, solid faza pasif adsorbsiyonla immobilize edilir. Daha sonra test serumu ilave edilerek belli süre inkübe edilir. Eğer test serumlarında ki antikorlar ile solid fazdaki antijenler uygun ise bağlama meydana gelir. Daha sonra yıkama solusyonu ile yıkama işlemi yapılır. Yıkama ile reaksiyona girmemiş komponentler ortamdaki uzaklaştırılır ve sonra ağır zincir spesifik antihuman IgG konjugatı ilave edilir [72, 74].



Şekil 3. 3 İndirekt Elisa Yöntemi [75].

İndirekt ELISA yöntemi, antikor miktar tayini için çok yaygın olarak kullanılan bir testtir. Ancak IgM gibi küçük miktarlardaki immunoglobulin seviyelerinin ölçümünde dikkatli olunması ve romatoid faktöre bağlı yalancı pozitiflik ile IgG antikorlarının çok yüksek olması halinde yapışmaya bağlı olarak meydana gelen IgM yalancı negatiflik olgularının gözden uzak tutulmaması gerekir. Bu problemleri azaltmak için katı faz anti IgM ELISA yöntemi kullanılmaktadır. Bu amaçla ilk adımda anti-IgM ile kaplı mikroplytler kullanılır. Serum numunesi üzerine işaretli antijen ve uygun substrat edilerek test değerlendirilir [74].



Şekil 3. 4 Enzim substratının ilavesinden sonra renk değişiminin görünümü

İndirekt ELISA'nın problemlerinden biri olan IgM yalancı pozitifliği, spesifik antijene bağlanan spesifik IgG antikorunun Fc parçasına, Igm romatoid faktörün (RF) bağlanmasından kaynaklanmaktadır. RF ile ilgili nonspesifik pozitifliğin eliminasyonu için çeşitli teknikler geliştirilmiş ve bu amaçla agregre olmuş IgG, IgG ile kaplanmış lateks partiküller Stafilococcus aureus protein A ve sepharose kullanılmaktadır [74].

DENEYSEL KISIM

4.1 Polivinilpirolidon-akrilik asit Kopolimeri Sentezi

Vinilpirolidon-akrilik asit kopolimeri radikalik polimerizasyon yöntemi ile Benzoilperoksit başlatıcısı kullanılarak bileşenlerin oranında Vinil pirolidon:akrilik asit = 1:1, 2:1, 1:3 laboratuvarlarımızda sentezlenmiştir. Sentez termal yöntem ve mikrodalga tekniği kullanılarak yapılmıştır. Sentezlenen polimerlerin karakterizasyonu FT-IR analizleri ile gerçekleştirilmiş ve molekül ağırlığı hesaplamaları yine bölümümüzdeki 4 detektörlü GPC cihazında elde edilen sonuçlar ile yapılmıştır.

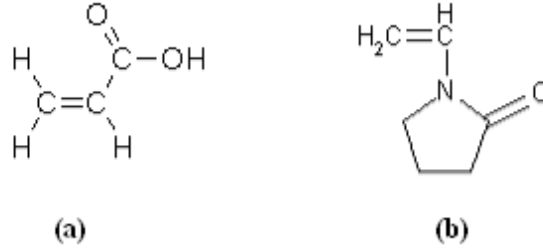
Bu kopolimerizasyon için; propanol, benzen, toluen, ksilen, tetrahidrofur, dioxan ve kloroform gibi birçok solvent denenmiştir. Fakat en iyi sonucu tetrahidrofur (THF) vermiştir. Akrilik asit (AA) ve vinil pirolidon (VP) bu solvent içinde benzoil peroksit ile kobaltnaftanat redoks katalisti varlığında kopolimerleşme reaksiyonu verir.

Karbon-karbon çifte bağı görece olarak düşük kararlılığa sahip olması nedeniyle, özellikle serbest radikallerle kolayca tepkime verebilmektedir [76].

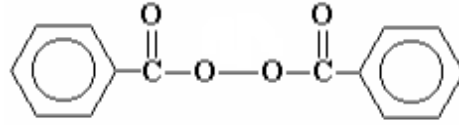
Katılma polimerizasyonun en önemli tiplerinden biri çiftleşmemiş elektron içeren elektriksel olarak nötral serbest radikallerle başlatılan polimerizasyondur. Bu tip polimerizasyonda doymamış monomerler tipik zincir reaksiyonu verirler ve bu da vinil polimerizasyonu olarak bilinmektedir. Polimerizasyon, basit gaz fazı zincir reaksiyonları için kullanılan ultraviyole radyasyon aktivasyon yöntemi, ısı vb.

yöntemler ile başlatılabilir. Tipik bir zincir polimerizasyonunda başlatıcı etkisi binlerce monomer molekülünün polimerizasyonuna neden olabilir.

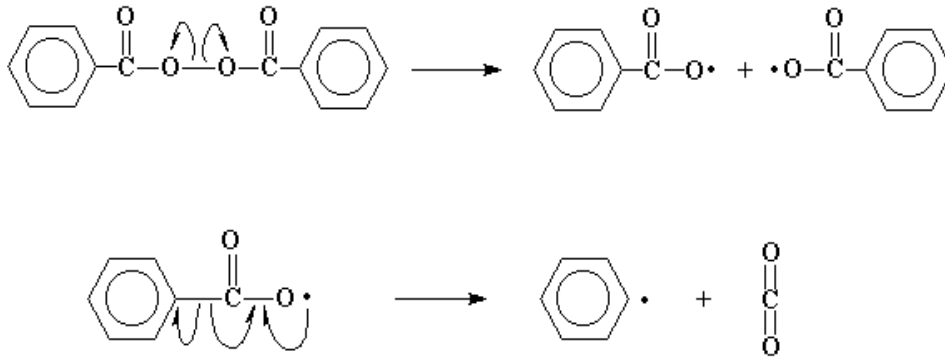
Polimerizasyonda, zincirin büyümesi aktif merkez içeren zincire pekçok monomerin katılmasıyla büyür. Aktif merkez katyonik, anyonik ve serbest radikaller içerebilir. 1937 de Flory radikalik polimerizasyonun kesin şekilde başlama, ilerleme ve sonlanma adımları üzerinden ilerlediğini göstermiştir.



Şekil 4. 1 Polimerizasyon işleminde kullanılan, vinil monomerleri olarak adlandırılan akrilik asit (AA) (a) ve vinil pirolidon (VP) (b) monomerlerinin görünümü.

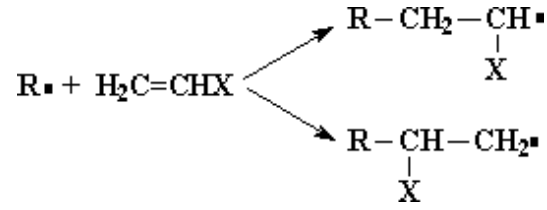


Şekil 4. 2 Radikalik polimerizasyonun başlaması için kullanılan Benzol peroksit adındaki başlatıcı.

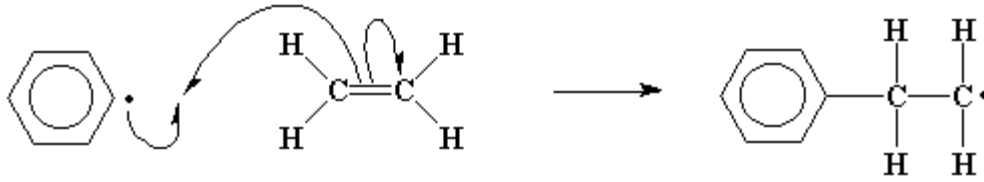


Şekil 4. 3 Radikalik polimerizasyonun başlaması (initiation) için kullanılan benzol peroksitin radikal halini alması.

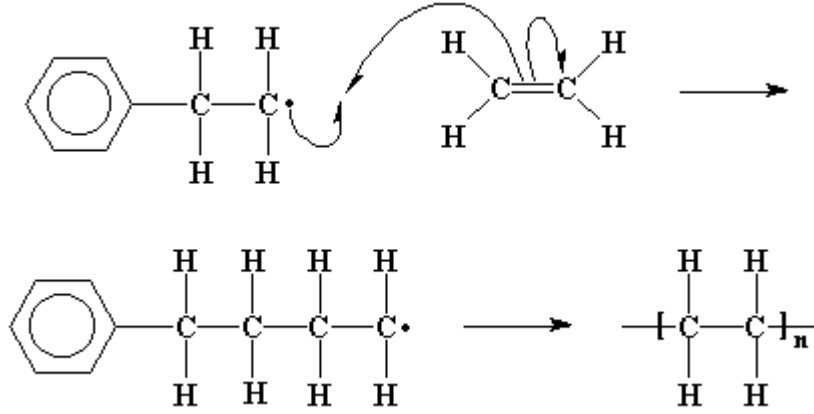
Radikalik polimerizasyonun başlaması için gerekli olan radikaller termal olarak ortaya çıkabildikleri gibi radyasyon etkisi veya kimyasal olarak oluşabilirler.



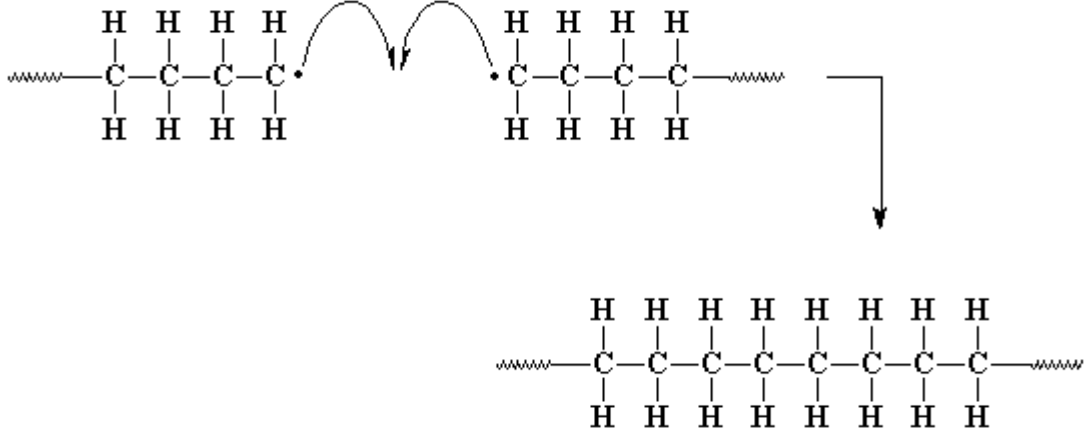
Şekil 4. 4 Polimerizasyonun ilerleme aşamasında (büyüme, propagation) serbest bir radikalın vinil monomere katılması için 2 olası durum söz konusudur.



Şekil 4. 5 Reaksiyonun ilerlemesi için ilk monomerin radikale katılımı.



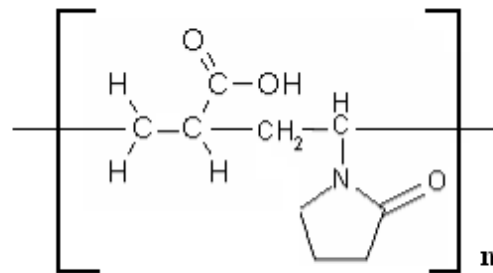
Şekil 4. 6 Reaksiyonun ilerlemesi; monomerin zincirle birleşmesi.



Şekil 4. 7 Sonlanma aşamasında (radikallerin ortadan kalkma aşaması) iki zincir birbiri ile birleşerek reaksiyonun sonlanması.

Molar oran olarak VP:AA = 1:1, VP:AA = 2:1 ve VP:AA = 1:3 denenmiştir. VP organik solventlerde bahsedilen koşullarda polimerleşmeye gitmez iken, AA radikalleri VP' yi kopolimerizasyon için aktive ederler. Reaksiyonda redoks katalisti olarak Benzol-peroksit/ Co-naftanat kullanılmıştır. Çünkü benzol-peroksit kendi başına kullanılarak yapılan deneylerde daha düşük verimle ürün oluşmuştur. Deneylerde benzol-peroksit yerine, sikloheksan peroksit veya hidrojen peroksit kullanıldığında ürün verimi %25-57 arasında olmuştur [76].

Yapılan deneyler sonucunda 1:1, 2:1, 1:3 ve 1:2 VP-AA kopolimeri elde edilmiştir. VP-AA kopolimeri beyaz katı şeklinde oluşmuştur. Suda çözünürler, derişik yada yarı derişik HCl içerisinde çözünürler [76].



Şekil 4. 8 Akrilik asit-vinil pirolidon kopolimeri

AA-VP = 1:1 Kopolimeri Sentezi:

Glacial akrilik asit (360 g) ve vinilpirolidon-2 (555 g) 2,5 kg THF içerisinde karıştırılır. Benzol peroksit (915 mg) ve Kobalt naftanat (50 mg) akrilik asit ve vinilpirolidon karıştırılırken ortama eklenir. Bu işlemler esnasında sıcaklık 65-70 °C' de tutulur. Polimerizasyon N₂ gazı varlığında 3 saat sürer. Reaksiyon sonucunda kopolimer çökelti olarak elde edilir. Çökelti filtre edilir ve 40 °C' de vakum etüvde kurutulur. Reaksiyon sonucunda verim 97 %' dir [76].

AA-VP = 1:2 Kopolimeri Sentezi:

Glacial akrilik asit (48 g) ve vinilpirrolidon-2 (111 g) 350 g THF içerisinde karıştırılır. Benzol peroksit (318 mg) ve Kobalt naftanat (32 mg) akrilik asit ve vinilpirolidon karıştırılırken ortama eklenir. Bu işlemler esnasında sıcaklık 65-70 °C' de tutulur. Polimerizasyon N₂ gazı varlığında 3 saat sürer. Reaksiyon sonucunda kopolimer çökelti olarak elde edilir. Çökelti filtre edilir ve 40 °C' de vakum etüvde kurutulur. Reaksiyon sonucunda verim 98,5 %' dir.

Sentezlenen polimerlerin karakterizasyonu FT-IR analizleri ile gerçekleştirilmiş ve molekül ağırlığı (M_w) hesaplamaları yine bölümümüzdeki 4 detektörlü GPC cihazında elde edilen sonuçlar ile yapılmıştır. Termal yöntem ve mikrodalga tekniği kullanılarak sentezlenen kopolimerler karakterize edilmiş ve karşılaştırılmıştır [76].

4.2 Peptidlerin Kimyasal Sentezi

Peptitler kimyasal olarak sentezi şu aşamalardan oluşmaktadır:

1. Koruyucu gruplu amino asitlerin sentezi
2. Amino asitlerden peptidin sentezi
 - Sıvı fazda peptid sentezi
 - Katı fazda peptid sentezi
 - Koruyucu grupların ayrılması (deprotection)
 - Bağlanma (coupling)
 - Yan grup koruyucu grupların ayrılması ve yarıma
3. Sentezlenen peptidin saflaştırılması
4. Saf peptidin karakterizasyonu [77].

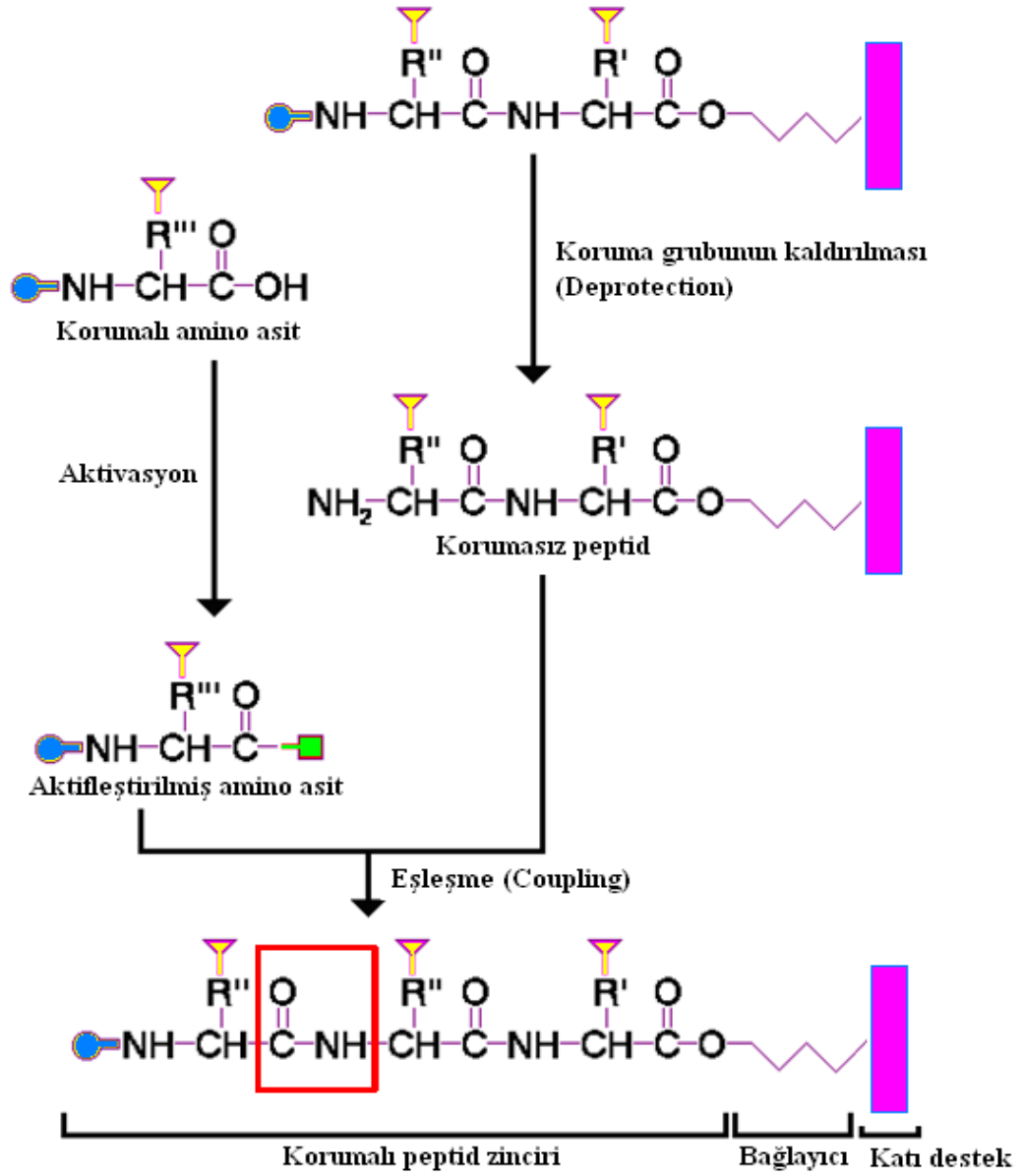
4.2.1 Katı Faz Peptid Sentezi

İlk olarak 1962 yılında R. B. Merrifield tarafından ortaya konmuştur. Bu yıllarda yayınladığı makaleler bugünkü katı faz peptid sentezi yönteminin temelini oluşturmaktadır.

Katı faz peptid sentezi, bir polimer destek maddesi üzerinde yürümektedir. Kullanılan polimerik destek maddeleri aslında bir katıdan çok, jeldir. Peptid sentezi sırasında yürüyen reaksiyonlar, katı polimerlerin yüzeyinde değil partiküller arasında yer alır. Bu amaca uygun olarak seçilecek olan polimerler, kullanılacak çözücülerde şişmeli, reaktanlar bu polimer partikülleri ile difüzyon yolu ile etkileşmelidirler [78].

Katı faz peptid sentezi için temel olarak iki yöntem kullanılmaktadır. Bunlar t-Boc ve Fmoc yöntemleridir. t-Boc yönteminde HF kullanılması uygulama alanını daraltmaktadır. Bu sebeple birçok laboratuvarında Fmoc yöntemiyle katı faz peptid sentezi gerçekleştirilmektedir.

Fmoc yönteminde, ilk olarak Fmoc korumalı amino asit polimer matriks üzerine bağlanır. Ardından Fmoc koruma grubu piperidin ile amino asitten koparılır. Yıkama yapılır. Diziye uygun bir şekilde sonraki Fmoc korumalı amino asit ortama eklenir. Ayrıca aktivatörler ve aktivatör bazlar da amino asitle beraber eklenir. Aktivatörler amino asidin karboksil ucunu aktive ederek polimer matriks üzerindeki amino asidin amino grubuna bağlanmasını sağlar. Yıkama yapılır. Amino asit bağlandıktan sonra tekrar piperidin eklenerek Fmoc grubu uzaklaştırılır [77, 78]. Sonraki amino asitler de aynı işlem akışına göre birbirlerine bağlanırlar (Şekil 4.9).



Şekil 4. 9 Kıta-faz peptid sentezinin; amino asit yan-zincir koruyucu grup, alfa-amino asid koruyucu grup, aktive edici grup, kıta destek (resin) ve yeni oluşan peptid bağı belirtilerek şematize edilmesi [79].

4.2.2 Mikrodalga Destekli Katı Faz Peptit Sentezi

Mikrodalga, 1940'larda beri bilinmektedir, ama ilk kez 1986'da R. Gedye ve R. J. Majetich tarafından organik kimyada kullanılmaya başlanmıştır. Yaptıkları çalışmada mikrodalga kullanıldığında, ısıtıcı kullanılarak gerçekleştirilenlere göre, reaksiyonların çok daha hızlı ilerlediği görülmüştür. İlk başlarda çok rağbet görmemesine rağmen, ilerleyen teknolojiyle birlikte her geçen gün daha çok kullanılan bir yöntem haline gelmektedir.

Mikrodalga elektromanyetik spektrumda X-ışınları, UV-görünür bölge ve IR' den daha az enerjili bölgede yer almaktadır ve 300-300.000 MHz frekans aralığındadır. Mikrodalğanın frekansı, yani enerjisi, çok düşük olduğu için bağları kırmadan sadece dönmelerine sebep olmaktadır. Normal ısıtma sistemlerinde, önce ısıtıcı ısınmakta, bu enerji reaksiyon kabına aktarılmakta, reaksiyon kabı da tüm sistemin sıcaklıkları eşit olana kadar ısı enerjisini reaksiyon çözeltisine aktarmaktadır. Ürünlerin oluşması için gerekli enerji bu şekilde karşılanmaktadır.

Mikrodalga yönteminde ise, örnek doğrudan, reaksiyon kabı tarafından değil, mikrodalga ışınları tarafından ısıtılmaktadır. Bunun iki faydası bulunmaktadır:

- Reaksiyon karışımına daha etkin bir enerji aktarımı olmaktadır.
- Reaksiyon kabının ortasındaki ve kenarındaki bileşenler eşit miktarda enerjiye maruz kalmaktadır.

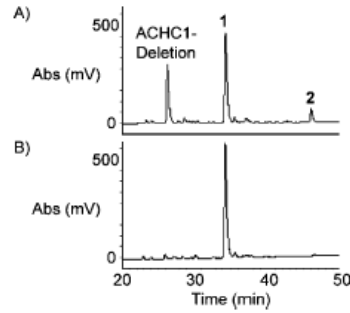
Mikrodalğanın elektrik alanı iyonik tüm moleküllerle etkileşmektedir. Elektrik alandaki osilasyonlar (+ ve - uç arasında) moleküllerin dönmesine sebep olmaktadır. Hareket eden moleküller ısı oluşturmakta ve sıcaklık çok daha hızlı bir şekilde yükselmektedir.

Her organik molekül farklı bir polariteye sahiptir ve mikrodalga enerjisini farklı miktarda absorplamaktadır. Organik moleküller mikrodalga enerjisini absorplama oranlarına göre 3'e ayrılmaktadır; düşük miktarda, orta miktarda ve yüksek miktarda absorplayiciler. Çalışılacak reaksiyonda ulaşılmak istenen sıcaklığa ve süreye bağlı olarak uygun çözücü seçilmesi gerekmektedir. Ayrıca reaksiyon çözeltisinde katalizörlerin, başlangıç maddelerinin de mikrodalga enerjisini absorplayacakları unutulmamalıdır.

Mikrodalgayla enerji transferi çok hızlı gerçekleşmektedir ve bu süre moleküllerin durulması için gerekli süreden daha kısadır. Moleküller tamamen durulmadan tekrar

tekrar enerjiye maruz kaldıklarında, reaksiyonun gerçekleşmesi için gerekli aktivasyon enerjisini aşabilecek duruma gelmektedirler ve reaksiyon tamamlanmaktadır [80].

J. K. Murray ve S. H. Gellman'ın 2005'te yayınladıkları çalışmada peptid sentezinde kullanılan mikrodalga yönteminin etkilerini göstermektedirler [78]. Mikrodalgayla ve mikrodalga olmadan farklı iki peptid SPPS ile sentezlendiğinde, elde edilen kromatogramlar mikrodalga yöntemi kullanıldığında daha saf ve daha yüksek miktarda peptid elde edilmektedir (Şekil 4.10).



Şekil 4. 10 A) Normal şartlarda sentezlenmiş peptid, B) Mikrodalga ile sentezlenmiş peptid

Proteinler, yaklaşık 50 ve daha fazla amino asidin peptid bağıyla birleşmesiyle oluşan makromoleküllerdir. Peptitler, biyokimya, tıp kimyası ve fizyoloji gibi temel bilimlerde her geçen gün daha önemli hale gelen biyomoleküllerdir. Peptitlerle ilişkili yapıların endokrin sistem, sinir sistemi, immun sistem ve enzimatik süreçlerde önemli etkileri bulunmaktadır. Bu sebeple, tıpta çeşitli uygulama alanları bulmaktadırlar ve birçok alanda da potansiyel uygulamaları bulunmaktadır. Örnek; doğurganlığın düzenlenmesi, acının azaltılması, büyüme faktörü olarak, kanser tedavisi, kardiyovasküler problemler, bağ doku hastalıkları, sindirim sistemi bozuklukları, zihinsel rahatsızlıklar, bulaşıcı hastalıklar vs [77].

4.3 121-134 Mage3 Melanoma Peptidinin Farklı Polimerlerle Fiziksel

Karışımları

Deneysel çalışmalarda Melanoma tümör hücresi Mage 3 proteininin 121-134 dizili peptidi ile poliakrilik asit (PAA) ve N-vinil-2-pirolidon/akrilik asit kopolimerleri (P(VP-co-AA)) kullanılarak farklı oranlarda fiziksel karışımlar hazırlandı. Hazırlanan bu fiziksel karışımların oluşum mekanizması, fizikokimyasal özellikleri ve elektriksel yükleri HPLC ve Floresans cihazları ile incelendi. Bu fiziksel karışımların P(VP-co-AA) ile hazırlananlar hayvan deneylerinde kullanıldı. İçerdiği peptid miktarına göre immünolojik deneylerde en iyi sonuç alınan fiziksel karışımlar belirlendi.

4.3.1 Fiziksel Karışımda Kullanılan Çözeltiler

0.01 mol/lt'lik PBS Tamponu (pH=7) : 2.6807g Na₂HPO₄.7H₂O (Mw=268.07 g/mol) tartılarak 500ml ultra saf suda çözünür. Daha sonra 1.56g NaH₂PO₄.2H₂O (Mw=156.01 g/mol) tartılarak 450 ml ultra saf suda çözünür. Hazırlanan 400 ml'lik NaH₂PO₄ çözeltisi 1 L'lik balon joje içerisindeki Na₂HPO₄ çözeltisinin üzerine eklenir ve karıştırılır. Bu karışıma son olarak 8.766 g NaCl eklenir ve tekrar karıştırılır. Karışımın pH'ı ölçülür ve 1 M NaOH ya da 1 M HCl kullanılarak pH=7'ye ayarlanır. Ultra saf su kullanılarak çözelti hacmi 1 L olacak şekilde hacim tamamlanır.

4.3.2 PAA-Peptid Fiziksel Karışımına Ait Hesaplamalar

PAA 'nın çözelti içerisindeki konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde n_{peptid}/n_{PAA} = 30 oranı için fiziksel karışım hazırlandı. (M_{PAA} = 100 000 Da; M_{peptid} = 1860 Da)

n_{pep}/n_{PAA} = **30** olan 6 ml PAA-Peptid Fiziksel Karışımı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{pep}}{n_{PAA}} = \frac{c_{pep} \cdot M_{PAA}}{M_{pep} \cdot c_{PAA}} \Rightarrow 30 = \frac{\frac{xmg}{6ml} \cdot 100000}{1860 \cdot \frac{6mg}{6ml}} \Rightarrow x = 3.348 \text{ mg peptid/ 6 ml}$$

4.3.3 P(VP-co-AA)-Peptid Fiziksel Karışımına Ait Hesaplamalar

P(VP-co-AA)'nın çözelti içerisindeki konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde n_{peptid}/n_{P(VP-co-AA)} = 11 ve 30 oranları için fiziksel karışımlar hazırlandı.

(M_{P(VP-co-AA)} = 120 000 Da; M_{peptid} = 1860 Da)

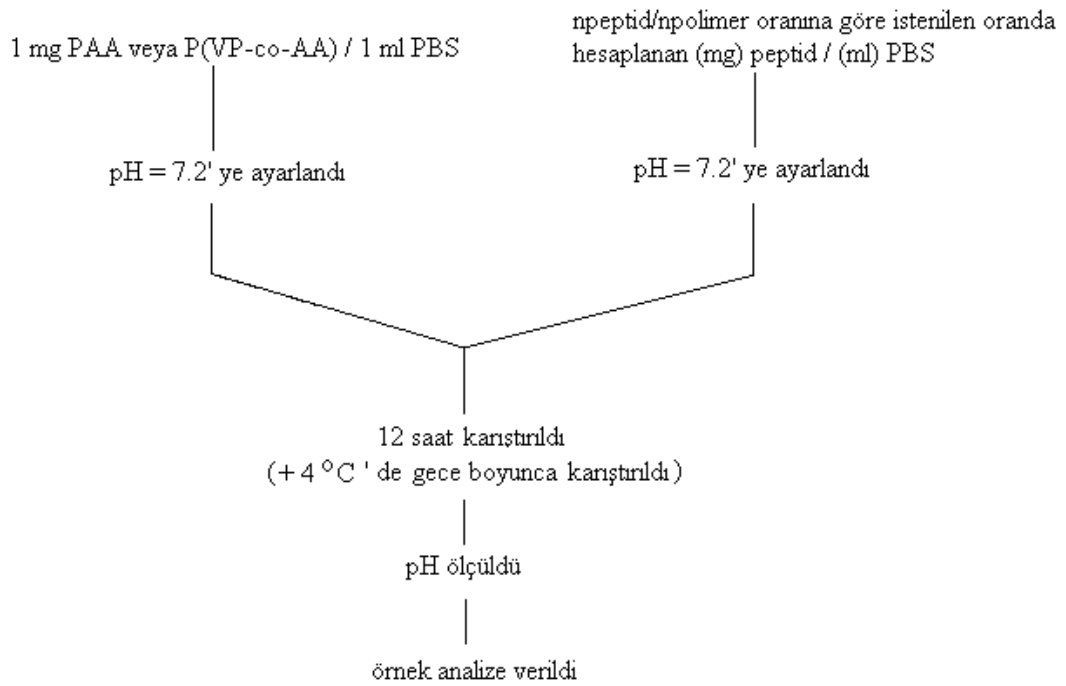
$n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = \mathbf{11}$ olan 6 ml P(VP-co-AA)-Peptid fiziksel karışımı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{\text{pep}}}{n_{\text{VP/AA}}} = \frac{c_{\text{pep}} \cdot M_{\text{VP/AA}}}{M_{\text{pep}} \cdot c_{\text{VP/AA}}} \Rightarrow 11 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 120000}{1860 \cdot \frac{6 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 1.023 \text{ mg peptid/ 6 ml}$$

$n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = \mathbf{30}$ olan 6 ml P(VP-co-AA)-Peptid fiziksel karışımı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{\text{pep}}}{n_{\text{VP/AA}}} = \frac{c_{\text{pep}} \cdot M_{\text{VP/AA}}}{M_{\text{pep}} \cdot c_{\text{VP/AA}}} \Rightarrow 30 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 120000}{1860 \cdot \frac{6 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 2.79 \text{ mg peptid/ 6 ml}$$

Çizelge 4.1 Polimer-peptid fiziksel karışımlarının şematik olarak gösterimi



4.4 121-134 Mage3 Melanoma Peptidinin Farklı Polimerlerle Konjugasyonu

Deneysel çalışmalarda melanoma 121-134 peptid dizisi ile PAA ve P(VP-co-AA) polimerleri kullanılarak 2 değişik yöntemle farklı mol oranlarında konjugatlar sentezlendi. Sentezlenen konjugatların oluşum mekanizması, fizikokimyasal özellikleri ve elektriksel yükleri HPLC, Viscotek, Floresans ve Zetasizer cihazları ile incelendi.

4.4.1 Konjugasyonda Kullanılan Çözeltiler

0.01 mol/lit'lik PBS Tamponu (pH=7) : 2.6807g Na₂HPO₄·7H₂O (Mw=268.07 g/mol) tartılarak 500 ml ultra saf suda çözünür. Daha sonra 1.56g NaH₂PO₄·2H₂O (Mw=156.01 g/mol) tartılarak 450 ml ultra saf suda çözünür. Hazırlanan 400 ml'lik NaH₂PO₄ çözeltisi 1 L'lik balon joje içerisindeki Na₂HPO₄ çözeltisinin üzerine eklenir ve karıştırılır. Bu karışıma son olarak 8.766 g NaCl eklenir ve tekrar karıştırılır. Karışımın pH'ı ölçülür ve 1 M NaOH ya da 1 M HCl kullanılarak pH=7'ye ayarlanır. Ultra saf su kullanılarak çözelti hacmi 1 L olacak şekilde hacim tamamlanır.

4.4.2 PAA-Peptid Konjugatlarına Ait Hesaplamalar

Klasik Konjugasyon Yöntemi ile EDC varlığında n_{pep}/n_{PAA} oranı = 1, 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 23, 27 ve 30 olmak üzere 11 farklı oranda konjugatlar sentezlendi. Sentezlenen konjugatların oluşum mekanizması, fizikokimyasal özellikleri ve elektriksel yükleri HPLC, Viscotek, Zeta Sizer ve Floresans cihazları ile incelendi.

PAA 'nın çözelti içerisindeki konsantrasyonu 1 mg/ml olarak çalışılmıştır.

(M_{PAA} = 100 000 Da; M_{peptid} = 1860 Da)

1. n_{pep}/n_{PAA} = 1 olan 6 ml PAA-Peptid Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{pep}}{n_{PAA}} = \frac{c_{pep} \cdot M_{PAA}}{M_{pep} \cdot c_{PAA}} \Rightarrow 1 = \frac{\frac{xmg}{6ml} \cdot 100000}{1860 \cdot \frac{6mg}{6ml}} \Rightarrow x = 0.1116 \text{ mg peptid/ 6 ml}$$

2. n_{pep}/n_{PAA} = 3 olan 6 ml PAA-Peptid Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{pep}}{n_{PAA}} = \frac{c_{pep} \cdot M_{PAA}}{M_{pep} \cdot c_{PAA}} \Rightarrow 3 = \frac{\frac{xmg}{6ml} \cdot 100000}{1860 \cdot \frac{6mg}{6ml}} \Rightarrow x = 0.3348 \text{ mg peptid/ 6 ml}$$

3. $n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}} = 5$ olan 6 ml PAA-Peptid Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{\text{pep}}}{n_{\text{PAA}}} = \frac{c_{\text{pep}} \cdot M_{\text{PAA}}}{M_{\text{pep}} \cdot c_{\text{PAA}}} \Rightarrow 5 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 100000}{1860 \cdot \frac{6 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 0.558 \text{ mg peptid/ 6 ml}$$

4. $n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}} = 7$ olan 6 ml PAA-Peptid Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{\text{pep}}}{n_{\text{PAA}}} = \frac{c_{\text{pep}} \cdot M_{\text{PAA}}}{M_{\text{pep}} \cdot c_{\text{PAA}}} \Rightarrow 7 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 100000}{1860 \cdot \frac{6 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 0.7812 \text{ mg peptid/ 6 ml}$$

5. $n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}} = 9$ olan 6 ml PAA-Peptid Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{\text{pep}}}{n_{\text{PAA}}} = \frac{c_{\text{pep}} \cdot M_{\text{PAA}}}{M_{\text{pep}} \cdot c_{\text{PAA}}} \Rightarrow 9 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 100000}{1860 \cdot \frac{6 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 1.0044 \text{ mg peptid/ 6 ml}$$

6. $n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}} = 11$ olan 6 ml PAA-Peptid Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{\text{pep}}}{n_{\text{PAA}}} = \frac{c_{\text{pep}} \cdot M_{\text{PAA}}}{M_{\text{pep}} \cdot c_{\text{PAA}}} \Rightarrow 11 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 100000}{1860 \cdot \frac{6 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 1.2276 \text{ mg peptid/ 6 ml}$$

7. $n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}} = 15$ olan 6 ml PAA-Peptid Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{\text{pep}}}{n_{\text{PAA}}} = \frac{c_{\text{pep}} \cdot M_{\text{PAA}}}{M_{\text{pep}} \cdot c_{\text{PAA}}} \Rightarrow 15 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 100000}{1860 \cdot \frac{6 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 1.674 \text{ mg peptid/ 6 ml}$$

8. $n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}} = 19$ olan 6 ml Pep-PAA Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{\text{pep}}}{n_{\text{PAA}}} = \frac{c_{\text{pep}} \cdot M_{\text{PAA}}}{M_{\text{pep}} \cdot c_{\text{PAA}}} \Rightarrow 19 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 100000}{1860 \cdot \frac{6 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 2.1204 \text{ mg peptid/ 6 ml}$$

9. $n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}} = 23$ olan 6 ml Pep-PAA Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{\text{pep}}}{n_{\text{PAA}}} = \frac{c_{\text{pep}} \cdot M_{\text{PAA}}}{M_{\text{pep}} \cdot c_{\text{PAA}}} \Rightarrow 23 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 100000}{1860 \cdot \frac{6 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 2.5668 \text{ mg peptid/ 6 ml}$$

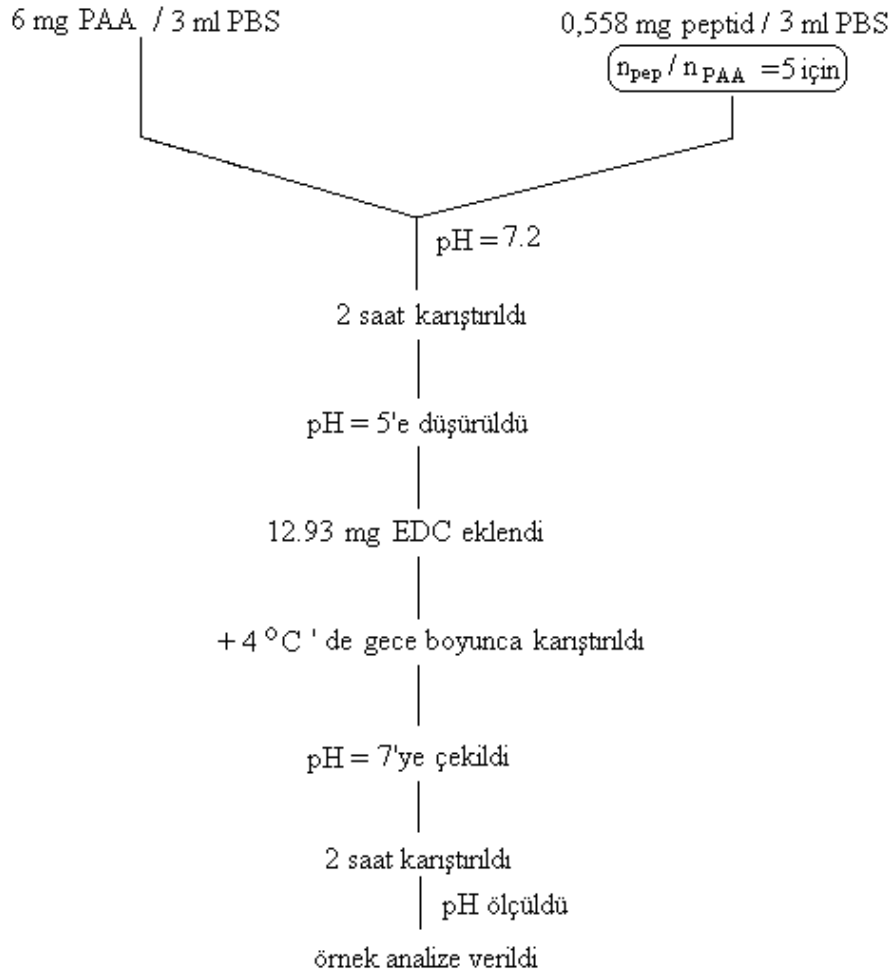
10. $n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}} = 27$ olan 6 ml Pep-PAA Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{\text{pep}}}{n_{\text{PAA}}} = \frac{c_{\text{pep}} \cdot M_{\text{PAA}}}{M_{\text{pep}} \cdot c_{\text{PAA}}} \Rightarrow 27 = \frac{\frac{x \text{mg}}{6 \text{ml}} \cdot 100000}{1860 \cdot \frac{6 \text{mg}}{6 \text{ml}}} \Rightarrow x = 3.0132 \text{ mg peptid/ 6 ml}$$

11. $n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}} = 30$ olan 6 ml Pep-PAA Konjugatı için hazırlanan çözelti içerisinde;

$$\frac{n_{\text{pep}}}{n_{\text{PAA}}} = \frac{c_{\text{pep}} \cdot M_{\text{PAA}}}{M_{\text{pep}} \cdot c_{\text{PAA}}} \Rightarrow 30 = \frac{\frac{x \text{mg}}{6 \text{ml}} \cdot 100000}{1860 \cdot \frac{6 \text{mg}}{6 \text{ml}}} \Rightarrow x = 3.348 \text{ mg peptid/ 6 ml}$$

Çizelge 4.2 PAA ile EDC kullanarak yapılan konjugat sentezi aşamaları



4.4.3 EDC varlığında Sentezlenen P(VP-co-AA)-Peptid Konjugatlarına Ait Hesaplamalar

Çalışmamızda uygulanan yöntemlerden ilki olan EDC varlığında gerçekleştirilen Klasik Konjugasyon Yöntemi ile $n_{\text{pep}}/n_{\text{VP/AA}}$ oranı = 1, 3, 5, 7, 9, 11, 19, 27, 30 olmak üzere 9 farklı oranda konjugatlar sentezlendi. Sentezlenen konjugatların yapıları, oluşum mekanizması ve fizikokimyasal özellikleri HPLC, Viscotek ve Flouresans cihazları ile incelendi.

P(VP-co-AA)'nın çözelti içerisindeki konsantrasyonu 1 mg/ml olarak çalışılmıştır. ($M_{\text{P(VP-co-AA)}} = 120\ 000\ \text{Da}$; $M_{\text{pep}} = 1860\ \text{Da}$)

1. $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 1$ olan 6 mL P(VP-co-AA)-Peptid Konjugatı için hazırlanan örnekte;

$$\frac{n_{\text{pep}}}{n_{\text{VP/AA}}} = \frac{c_{\text{pep}} \cdot M_{\text{VP/AA}}}{M_{\text{pep}} \cdot c_{\text{VP/AA}}} \Rightarrow 1 = \frac{\frac{x\text{mg}}{6\text{ml}} \cdot 120000}{1860 \cdot \frac{6\text{mg}}{6\text{ml}}} \Rightarrow x = 0.093\ \text{mg peptid/ 6 ml}$$

2. $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 3$ olan 6 mL P(VP-co-AA)-Peptid Konjugatı için hazırlanan örnekte;

$$\frac{n_{\text{pep}}}{n_{\text{VP/AA}}} = \frac{c_{\text{pep}} \cdot M_{\text{VP/AA}}}{M_{\text{pep}} \cdot c_{\text{VP/AA}}} \Rightarrow 3 = \frac{\frac{x\text{mg}}{6\text{ml}} \cdot 120000}{1860 \cdot \frac{6\text{mg}}{6\text{ml}}} \Rightarrow x = 0.279\ \text{mg peptid/ 6 ml}$$

3. $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 5$ olan 6 mL P(VP-co-AA)-Peptid Konjugatı için hazırlanan örnekte;

$$\frac{n_{\text{pep}}}{n_{\text{VP/AA}}} = \frac{c_{\text{pep}} \cdot M_{\text{VP/AA}}}{M_{\text{pep}} \cdot c_{\text{VP/AA}}} \Rightarrow 5 = \frac{\frac{x\text{mg}}{6\text{ml}} \cdot 120000}{1860 \cdot \frac{6\text{mg}}{6\text{ml}}} \Rightarrow x = 0.465\ \text{mg peptid/ 6 ml}$$

4. $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 7$ olan 6 mL P(VP-co-AA)-Peptid Konjugatı için hazırlanan örnekte;

$$\frac{n_{\text{pep}}}{n_{\text{VP/AA}}} = \frac{c_{\text{pep}} \cdot M_{\text{VP/AA}}}{M_{\text{pep}} \cdot c_{\text{VP/AA}}} \Rightarrow 7 = \frac{\frac{x\text{mg}}{6\text{ml}} \cdot 120000}{1860 \cdot \frac{6\text{mg}}{6\text{ml}}} \Rightarrow x = 0.651\ \text{mg peptid/ 6 ml}$$

5. $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 9$ olan 12 mL P(VP-co-AA)-Peptid Konjugatı için hazırlanan örnekte;

$$\frac{n_{\text{pep}}}{n_{\text{VP/AA}}} = \frac{c_{\text{pep}} \cdot M_{\text{VP/AA}}}{M_{\text{pep}} \cdot c_{\text{VP/AA}}} \Rightarrow 9 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 120000}{1860 \cdot \frac{6 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 0.837 \text{ mg peptid/ 6 ml}$$

6. $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 11$ olan 6 mL P(VP-co-AA)-Peptid Konjugatı için hazırlanan örnekte;

$$\frac{n_{\text{pep}}}{n_{\text{VP/AA}}} = \frac{c_{\text{pep}} \cdot M_{\text{VP/AA}}}{M_{\text{pep}} \cdot c_{\text{VP/AA}}} \Rightarrow 11 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 120000}{1860 \cdot \frac{6 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 1.023 \text{ mg peptid/ 6 ml}$$

7. $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 19$ olan 6 mL P(VP-co-AA)-Peptid Konjugatı için hazırlanan örnekte;

$$\frac{n_{\text{pep}}}{n_{\text{VP/AA}}} = \frac{c_{\text{pep}} \cdot M_{\text{VP/AA}}}{M_{\text{pep}} \cdot c_{\text{VP/AA}}} \Rightarrow 19 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 120000}{1860 \cdot \frac{6 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 1.767 \text{ mg peptid/ 6 ml}$$

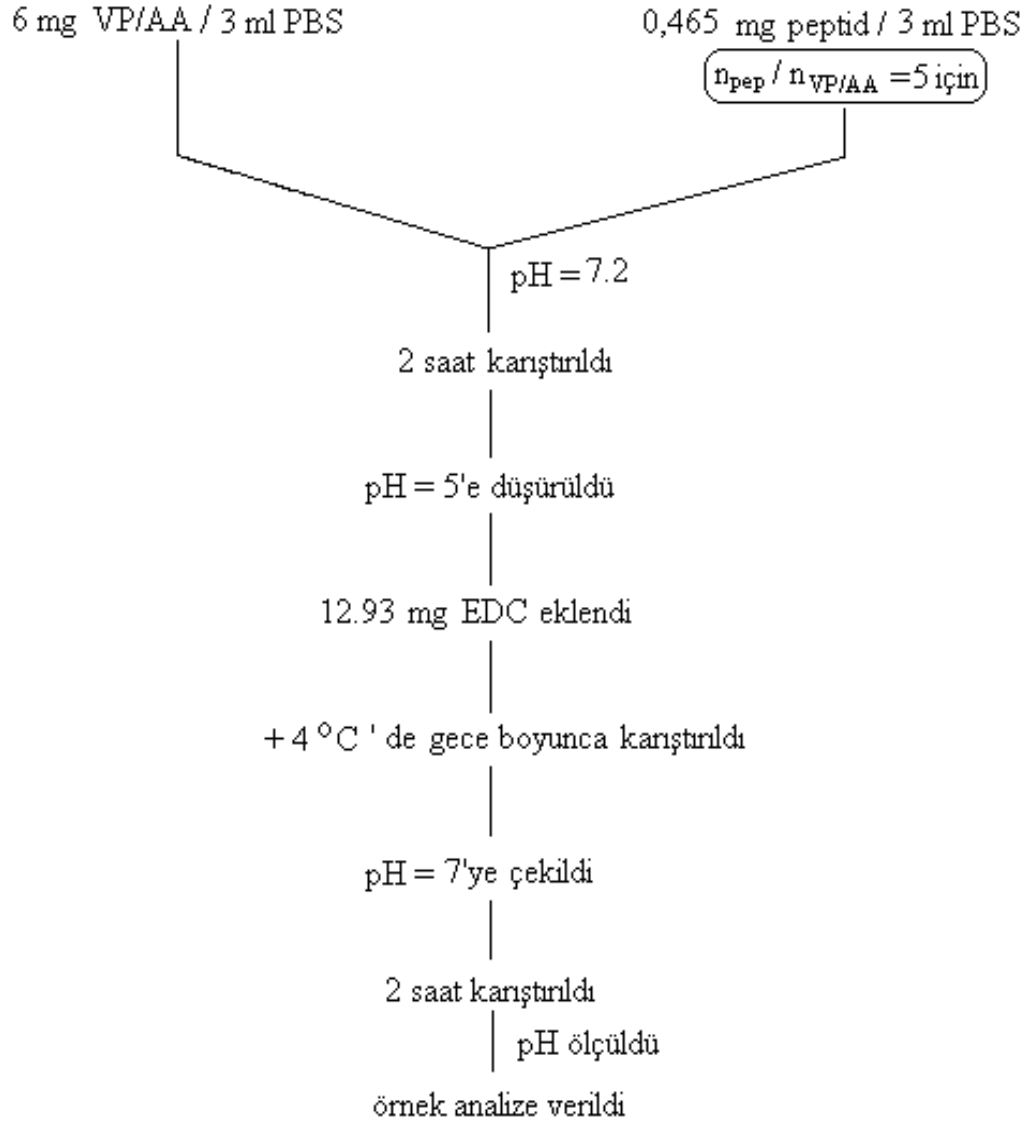
8. $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 27$ olan 6 mL P(VP-co-AA)-Peptid Konjugatı için hazırlanan örnekte;

$$\frac{n_{\text{pep}}}{n_{\text{VP/AA}}} = \frac{c_{\text{pep}} \cdot M_{\text{VP/AA}}}{M_{\text{pep}} \cdot c_{\text{VP/AA}}} \Rightarrow 27 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 120000}{1860 \cdot \frac{6 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 2.511 \text{ mg peptid/ 6 ml}$$

9. $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 30$ olan 6 mL P(VP-co-AA)-Peptid Konjugatı için hazırlanan örnekte;

$$\frac{n_{\text{pep}}}{n_{\text{VP/AA}}} = \frac{c_{\text{pep}} \cdot M_{\text{VP/AA}}}{M_{\text{pep}} \cdot c_{\text{VP/AA}}} \Rightarrow 30 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 120000}{1860 \cdot \frac{6 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 2.79 \text{ mg peptid/ 6 ml}$$

Çizelge 4.3 P(VP-co-AA) ile EDC varlığında yapılan konjugat sentezi basamakları



4.5 Mikrodalga Enerjisi Kullanılarak Organik Ortamda Sentezlenen P(VP-co-AA)-Peptid Konjugatlarına Ait Hesaplamalar

Çalışmamızda uygulanan konjugasyon yöntemlerinden ikincisi olan ve organik ortamda mikrodalga yöntemi ile $n_{\text{pep}}/n_{\text{VP/AA}} = 10$ oranında konjugat sentezlendi. Bu yöntem ile sentezlenen konjugatlar immünojenik deneylerde kullanılmak üzere sentezlenmiştir. Deneme amaçlı olarak da bir oran seçilerek ilk sentez yapılmıştır. Sentezlenen konjugatların yapıları, oluşum mekanizması ve fizikokimyasal özellikleri Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) cihazı ile incelendi.

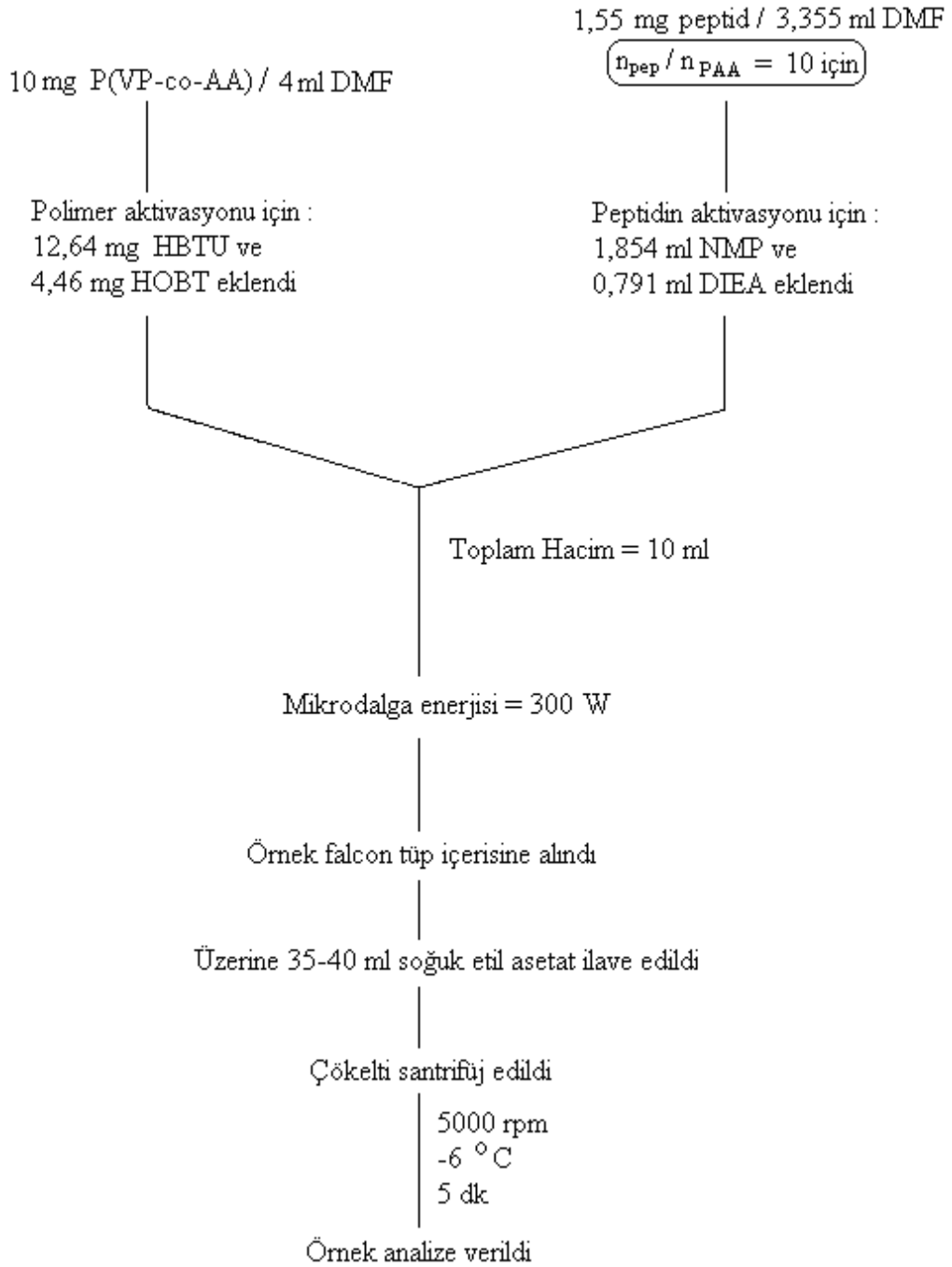
P(VP-co-AA)'nın çözelti içerisindeki konsantrasyonu 1 mg/ml olarak çalışılmıştır.

($M_{\text{P(VP-co-AA)}} = 120\,000$ Da; $M_{\text{peptid}} = 1860$)

$n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 10$ olan P(VP-co-AA)-Peptid Konjugatını hazırlamak için;

$$\frac{n_{\text{pep}}}{n_{\text{VP/AA}}} = \frac{c_{\text{pep}} \cdot M_{\text{VP/AA}}}{M_{\text{pep}} \cdot c_{\text{VP/AA}}} \Rightarrow 11 = \frac{\frac{x \text{ mg}}{6 \text{ ml}} \cdot 120000}{1860 \cdot \frac{6 \text{ mg}}{6 \text{ ml}}} \Rightarrow x = 1.023 \text{ mg peptid/ 6 ml}$$

Çizelge 4.4 P(VP-co-AA) ile organik ortamda mikrodalga enerjisi kullanılarak yapılan konjugat sentezi basamakları

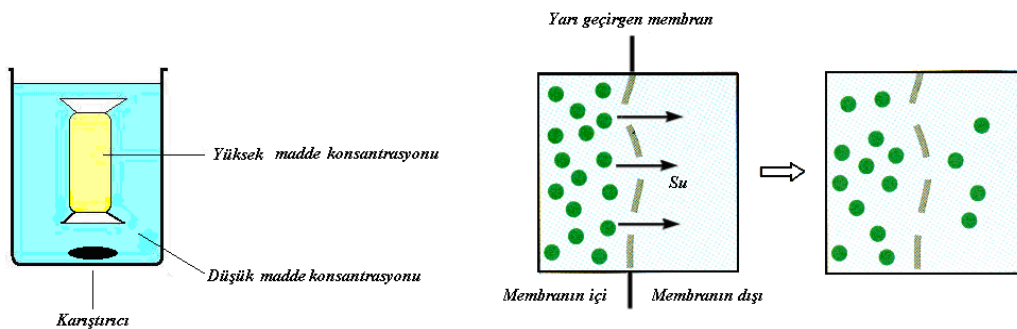


4.6 Konjugatların Saflaştırılması

Konjugasyon işleminden sonra elde edilen Peptid-polielektrolit konjugatları, bu tür reaksiyonlar için kaçınılmaz olan üre türevi ya da reaksiyona girmemiş çapraz bağlayıcıların fazlasından çeşitli yöntemler kullanılarak ayrılarak, saflaştırılabilmektedir. Bu yöntemlerin içerisinde en yaygın olarak kullanılanları; diyaliz, Moleküler Eleme Kromatografisi (Kolon) uygulanması, Gaz basınçlı filtrasyon ya da Santrifüjlü filtrasyon (membranlı santrifüj tüpleri ile) uygulamalarıdır.

4.6.1 Diyaliz

Diyaliz peptid, fiziksel karışım ve konjugat çözeltilerinde küçük iyonların veya moleküllerin uzaklaştırılması amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Peptid, fiziksel karışım ve konjugatların diyaliz işlemindeki asıl amaç, oluşan üre türevlerinin, reaksiyona girmemiş çapraz bağlayıcıların fazlalarının ya da serbest peptidin ortamdan uzaklaştırılmasıdır ve aktivite kayıplarını en aza indirmek amacıyla diyaliz işlemi 4 °C'da gerçekleştirilir. Diyalizde kullanılan yarı geçirgen diyaliz tüpleri genelde gözenek (por) çapı 1-20 nm arasında olan selüloz asetatından üretilmektedir. Şekil 4.11'de [81] şematik olarak gösterilen diyaliz işleminin temel prensibi, tüm maddelerin, kimyasal potansiyellerinin (madde akımının yürütücü kuvveti) büyük olduğu yerden küçük olduğu yere doğru kendiliğinden akmasıdır. Diyaliz işleminde küçük moleküllerin geçişi, membranın her iki yüzeyinde kimyasal potansiyel farkı eşit oluncaya kadar devam eder. Kimyasal potansiyellerin her iki tarafta birbirine eşit olduğu durumda dinamik denge söz konusu olur ve madde geçişi denge halinde devam ettiğinden konsantrasyon değişimi söz konusu olmaz.



4. 11 Diyaliz işleminin şematik görünümü

4.6.2 Moleküler Eleme Kromatografisi

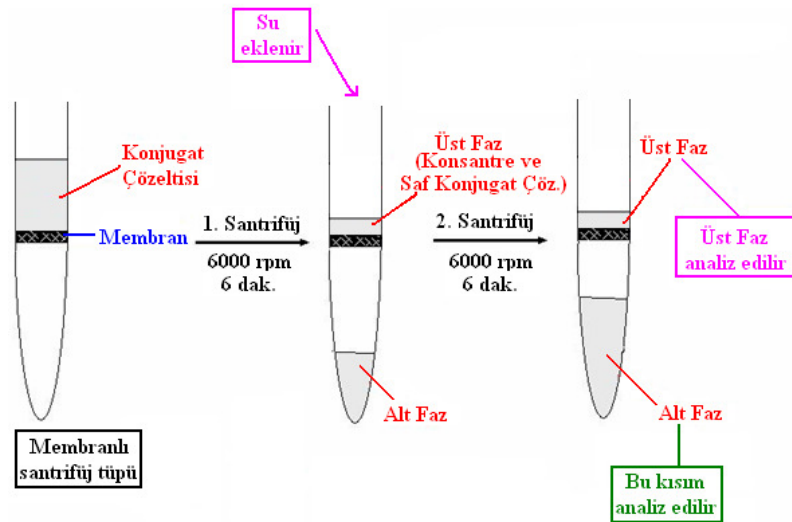
Moleküler eleme kromatografisi Bölüm 3.3.1’de detaylı olarak anlatılmıştır.

4.6.3 Gaz Basıncı Filtrasyon

Ayrılacak olan moleküllerin boyutlarına ve membranların tipik ayırma performanslarına göre en uygun ayırıcı membran seçilmelidir. Membran seçiminden sonra filtrasyon için seçilen gözenek boyutlarına sahip membran filtrasyon yapılacak aparata takılır manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırı ve basıncın da yardımı küçük moleküller (Sentetik peptid, üre türevleri, EDC) membranın altına geçerken büyük moleküller ise membranın üst kısmında (BSA ya da konjugat) kalır ve böylece konjugat saflaştırılmış olur.

4.6.4 Santrifüjlü Filtrasyon (Membranlı Santrifüj Tüpleri)

Çeşitli boyutlardaki molekülleri ayıracak özelliğe sahip membranları içeren santrifüj tüpleri konjugatların istenmeyen küçük moleküllerden ayrılmasında kullanılmaktadır. Bunun için ayrılacak çözelti membranlı tüpe konulur ve tüpün değişen devir ve sürede santrifüjlenmesi sonucu membranın gözeneklerinden daha küçük moleküllerin geçerek alt fazda toplanması ile büyük moleküller (konjugat) üst fazda kalırlar. Böylelikle konjugat hem saflaştırmış hem de konsantre edilmiş olur (Şekil 4.12) [81].



Şekil 4. 12 Membranlı santrifüj tüpü kullanılarak konjugatların konsantre edilmesi ve saflaştırılmasının şematik gösterimi

4.6.5 UV-VIS Spektrofotometre Ölçümleri

Konjugasyon olduktan sonra bulanıklık gözlediğimiz bazı konjugat çözeltilerinin 400 nm deki absorbansları ölçüldü. Sonrasında bu çözeltiler santrifüj edilip çökeltiler ayrıldıktan sonra üst kısımların 280nm'deki absorbanslarına bakıldı.

4.6.6 Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi (HPLC) Analizleri

Konjugat çözeltileri 0.45 µm'lik enjektör filtresiyle süzülerek HPLC cihazına verilmiştir. 25 °C'de, 1.0 mL/dk akış hızında, 20 µL enjeksiyon hacminde ve Shim-Pack Diol-300 kolonunda UV detektörüyle (280 nm'de) çalışılmıştır. pH = 7'de hazırlanan konjugatlar için PBS tamponu hareketli (mobil) faz olarak kullanılmıştır.

4.6.7 4 Detektörlü Moleküler Eleme Kromatografi (Viscotek) Analizleri

Konjugat çözeltileri direkt olarak 0.45 µm'lik enjektör filtresiyle süzülerek 4 dedektörlü moleküler eleme kromatografisi (GPC) cihazına verilmiştir. 25 °C'de, 0.8 mL/dk akış hızında, 100 µL enjeksiyon hacminde ve TSK Gel G3000 SW_{XL} kolonunda UV (280 nm'de), Kırılma İndisi, Işık Saçılması ve Vizkozite detektörleri ile çalışılmıştır. pH = 7'de hazırlanan konjugatlar için PBS tamponu hareketli (mobil) faz olarak kullanılmıştır.

4.6.8 Floresans Spektrofotometre Ölçümleri

Elde edilen konjugatların 1/12 oranında seyreltimle elde edilen çözeltilerinin floresans emisyon spektrumları QM-4/2005 Steady State Spektrofluometre kullanılarak, 2 nm slit aralığı ve 280 nm'de uyarma yapılarak alınmıştır.

4.6.9 Boyut ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

Elde edilen konjugatların yaklaşık % 0.1 konsantrasyonda olacak şekilde hazırlanan çözeltileri 0,22 µm lik membranlardan filtre edilerek Malvern Nano ZS Zetasizer cihazına verilmiş ve Zeta Potansiyeli ile boyut ölçümleri yapılmıştır.

DENEY SONUÇLARI

5.1 Melanoma NY-ESO-1 155-163 Dizili Peptidin Sentezi

NY-ESO-1 antijenleri NY-ESO-1 kanser hastalarında humoral ve hücrel immün cevaba yol açar. İmmün sistem tarafından antijen epitoplardan bazılarının tanınması, bu epitoplara tanımladığı kanser hücrelerinin yok edilmesine yol açar. Bu epitoplara oluşturan peptidler literatürde tanımlanmıştır [82-84].

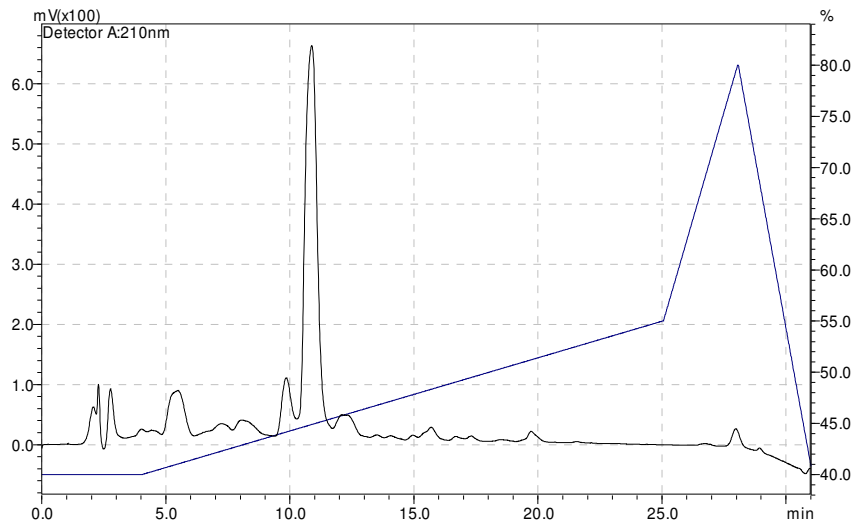
Polimer-peptid konjugatlarının geliştirilmesine yönelik çalışmalarda kullanılan peptidlerden Melanoma kanserine ait antijenik NY-ESO-1 155-163 (Q-L-S-L-L-M-W-I-T) dizili hidrofobik özellikteki peptid (Şekil 5.1), Fmoc korumalı olarak bölümümüzde bulunan CEM Microdalga Peptid sentezi cihazında Solid Phase (Katı Faz) Peptid Sentez Yöntemi ile peptid sentez grubu ile birlikte tarafımızca sentezlenmiştir.

Q	L	S	L	L	M	W	I	T
Q	L	S	L	L	M	W	I	T

Şekil 5. 1 NY-ESO-1 155-163 (QLSLLMWIT) hidrofobik peptid dizisine ait amino asitlerin hidrofobik ve hidrofilik olarak gösterimi

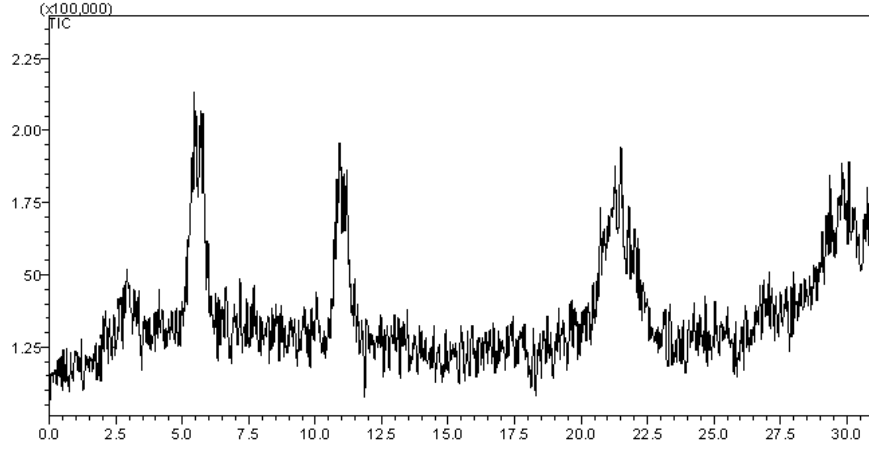
Peptidin LC-MS cihazı ile molekül ağırlığının belirlenmesinin ardından ters faz HPLC sistemi ile saflaştırma gerçekleştirilmiştir. Ham olarak elde edilen NY-ESO-1 155-163 peptid dizisinin LC-MS analizinde mobil faz A olarak su (% 0,1 TFA), mobil faz B olarak ise asetonitril (% 0.085 TFA) çözeltileri hazırlanmıştır. Akış hızı 0,2 ml/dk olarak, 0-4 dakikaları arasında mobil faz B % 40, 4-25 dakikaları arasında % 40-55, 25-28 dakikaları arasında % 55-80, 28-30 dakikaları arasında % 80-40 olacak şekilde ayarlanmıştır.

UV Dedektör Dalgaboyu 210 nm ayarlanmıştır. Ölçümler oda sıcaklığında, Teknokroma Tracer Excel 120 ODS-A 5µm 20x0,21 boyutlarında kolon kullanılarak alınmıştır. İyonlaştırma yöntemi olarak ESI (+) seçilmiştir.



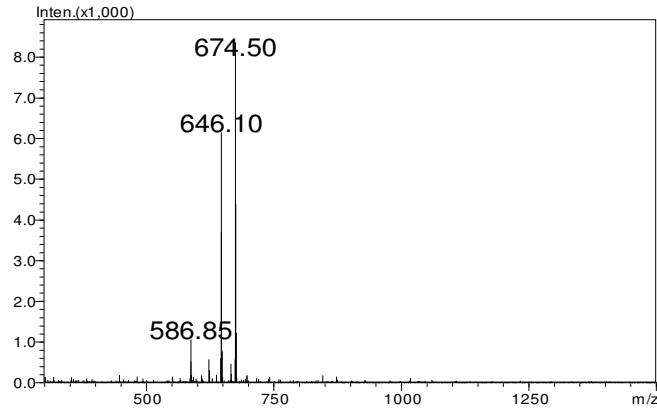
Şekil 5. 2 Peptid Sentezi sonucu ham olarak elde edilen NY-ESO-1 155-163 peptid dizisinin UV Kromatogramı

CEM marka Liberty microdalga destekli peptid sentezi cihazında katı faz peptid sentez yöntemi ile sentezlenen NY-ESO-1 155-163 peptid dizisi, LC-MS cihazında analiz edilmiştir. Ham olarak elde edilen peptid dizisine ait pikler UV Kromatogramında görülmektedir (Şekil 5.2).



Şekil 5. 3 Peptid Sentezi sonucu ham olarak elde edilen NY-ESO-1 155-163 peptid dizisinin Toplam İyon Kromatogramı

Ham olarak elde edilen peptid dizisi MS cihazının iyonlaştırma ünitesinde, ESI (+) yöntemi ile iyonlaştırılmış ve peptide ait toplam iyon kromatogramı elde edilmiştir (Şekil 5.3). Toplam iyon kromatogramında elde edilen piklerden molekül ağırlığı hesabı yapılmıştır.



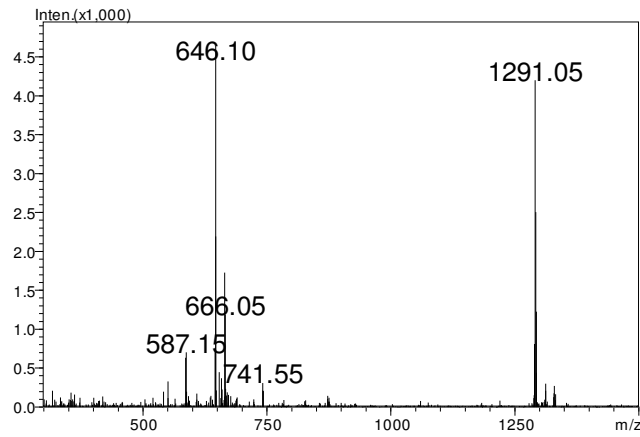
Şekil 5. 4 NY-ESO-1 155-163 dizili peptidin alıkonma zamanı 4,93-6,33 dakikalari arasındaki kütle spektrumu

Toplam iyon kromatogramı piklerinden alıkonma zamanı 4,93-6,33 (Şekil 5.4) dakikalari arasındaki pikin kütle spektrumundan yapılan molekül ağırlığı tayininde, analiz sonucu hesaplanan ($M_{w_{hesaplanan}} = 1290,11$) ile teorik olarak bulunan ($M_{teorik} = 1290,59$) molekül ağırlığı birbirini tutmaktadır.

$646,10 \Rightarrow [M+2H^+]^{2+} \rightarrow M_{whesaplanan} = 1290,11$	$M_{teorik} = 1290,59$
--------------------------------------------------------------------------	------------------------

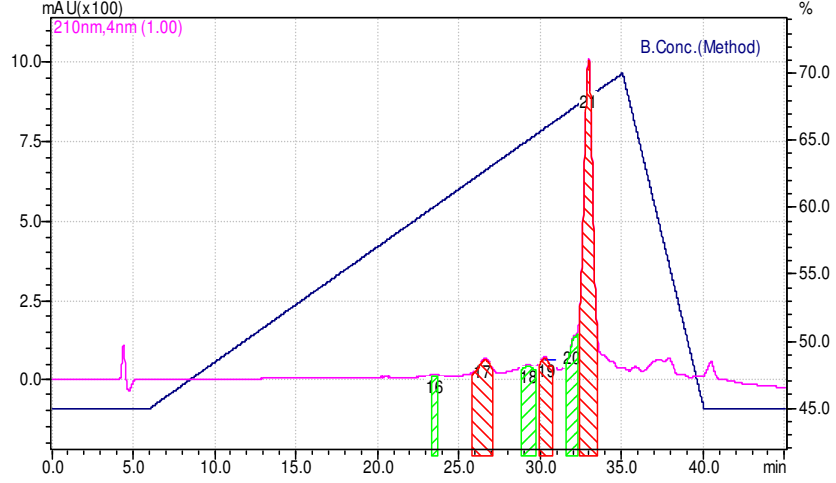
Piklerden alıkonma zamanı 10,42-11,61 (Şekil 5.5) dakikalari arasındaki pikin kütle spektrumundan yapılan molekül ağırlığı tayininde, analiz sonucu hesaplanan ($M_{w\text{hesaplanan}} = 1290,11$) ile teorik olarak bulunan ($M_{\text{teorik}} = 1290,59$) molekül ağırlığı yine birbiriyle uyumludur. Kütle spektrumunda $M_w = 1291,05$ olarak bulunan ise teorik olarak hesaplanan peptidin molekül ağırlığından 1 fazladır. Bunun nedeni sentez sırasında yapıda fazladan yer alan H atomundan kaynaklı olabilir.

1291,05 => $[M+H]^+$		
646,10 => $[M+2H]^{2+}$	$\rightarrow M_{w\text{hesaplanan}} = 1290,11$	$M_{\text{teorik}} = 1290,59$



Şekil 5. 5 NY-ESO-1 155-163 dizili peptidin alıkonma zamanı 10,42-11,61 dakikalari arasındaki kütle spektrumu

18,24-23,08 dakikalari arasında toplam iyon kromatogramında görülen pik mobil faz B konsantrasyonunun %80'e kadar çıkmasından dolayı oluşmuştur. Şekil 5.6' da NY-ESO-1 155-163 peptid dizisinin preparatif HPLC kromatogramı görülmektedir. Bir önceki aşamada LC-MS analizinde kullanılan mobil fazlar, bu sistem için de aynı şekilde hazırlanmıştır. Mobil faz A olarak su (% 0,1 TFA), mobil faz B olarak ise asetonitril (% 0.085 TFA) çözeltileri hazırlanmıştır. Akış hızı 15 ml/dk olarak, 0-6 dakikalari arasında mobil faz B % 45, 6-36 dakikalari arasında % 45-70, 36-40 dakikalari arasında % 70-45 ve 40-45 dakikalari arasında % 45 şeklinde ayarlanmıştır. UV Dedektör Dalgaboyu 210 nm ayarlanmıştır. Ölçümler oda sıcaklığında, Shimadzu PRC-ODS 30x21 boyutlarında kolon kullanılarak alınmıştır.

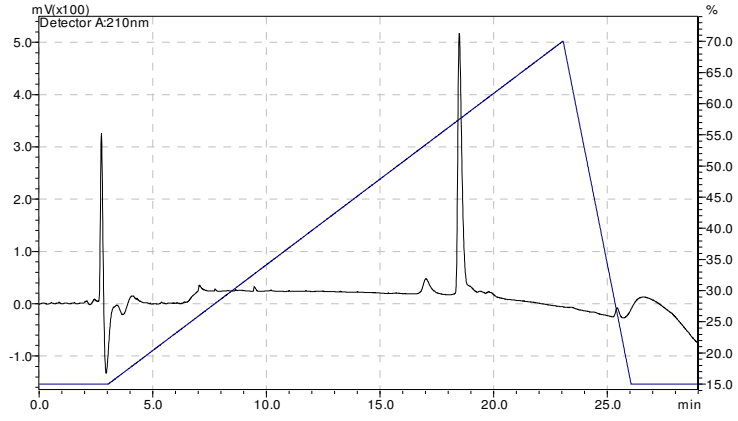


Şekil 5. 6 NY-ESO-1 155-163 dizili saf haldeki peptidin preparatif HPLC kromatogramı

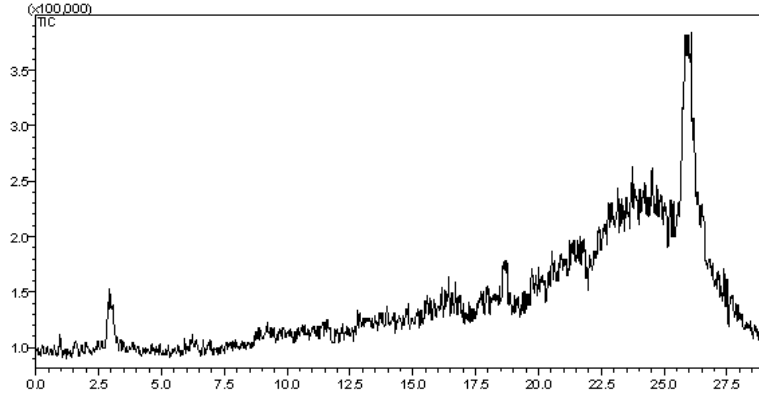
Peptidin sentez sonrasında LC-MS cihazı ile molekül ağırlığının belirlenmesinin ardından HPLC sistemi ile saflaştırma kısmı olarak gerçekleştirilmiştir. Sentez sonrasında ham olarak elde ettiğimiz NY-ESO-1 155-163 peptid dizisi preparatif HPLC’ de saflaştırıldıktan sonra tekrar elde ettiğimiz fraksiyonlar LC-MS cihazında analiz edilmiştir. Analizde mobil faz A olarak su (% 0,1 TFA), mobil faz B olarak ise asetonitril (% 0.085 TFA) çözeltileri kullanılmıştır. Akış hızı 0,2 ml/dk olarak, 0-3 dakikaları arasında mobil faz B % 15, 3-23 dakikaları arasında % 15-70, 23-26 dakikaları arasında % 70-15, 26-30 dakikaları arasında % 15 olacak şekilde ayarlanmıştır..

UV Dedektör Dalgaboyu 210 nm ayarlanmıştır. Ölçümler oda sıcaklığında, Teknokroma Tracer Excel 120 ODS-A 5µm 20x0,21 boyutlarında kolon kullanılarak alınmıştır. İyonlaştırma yöntemi olarak ESI (+) seçilmiştir.

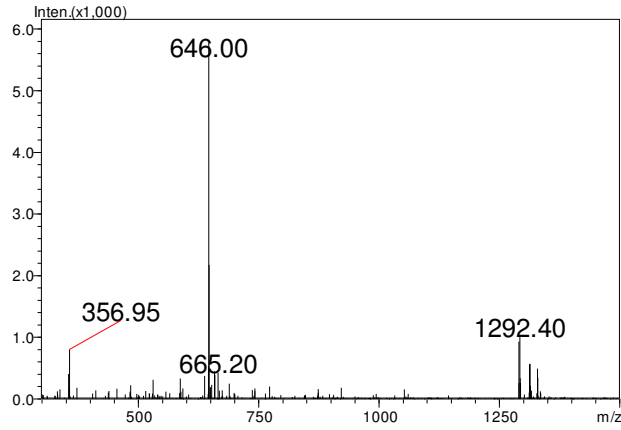
Preparatif HPLC sisteminde fraksiyonlarına ayrılan NY-ESO-1 155-163 peptid dizisi, LC-MS cihazında analiz edilmiştir. Şekil 5.7’ de sentezlendikten sonra preparatif HPLC cihazında kısmi olarak saflaştırılan peptid dizisine ait UV Kromatogramı görülmektedir.



Şekil 5. 7 NY-ESO-1 155-163 dizili saf haldeki peptidin UV kromatogramı



Şekil 5. 8 NY-ESO-1 155-163 dizili saf haldeki peptidin toplam iyon kromatogramı



Şekil 5. 9 NY-ESO-1 155-163 dizili saf haldeki peptidin alıkonna zamanı 4,93-6,33 dakikalari arasındaki kütle spektrumu

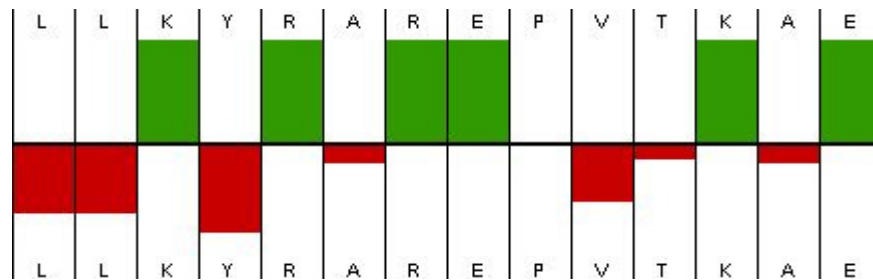
1292,40 => $[M+H^+]^+$
646,00 => $[M+2H^+]^{2+}$ → $M_{\text{whesaplanan}} = 1290$ $M_{\text{teorik}} = 1290,59$

Piklerden alıkonma zamanı 4,93-6,33 (Şekil 5.9) dakikaları arasındaki pikin kütle spektrumundan yapılan molekül ağırlığı tayininde, analiz sonucu hesaplanan ($M_{\text{whesaplanan}} = 1290$) ile teorik olarak bulunan ($M_{\text{teorik}} = 1290,59$) molekül ağırlığı birbiriyle oldukça uyumludur.

5.2 Melanoma Kanserine ait Antijenik MAGE-3 121-134 Dizili Peptidin Sentezi

MAGE-3 121-134 dizisi ise, 121 den 134 e kadar olan fragmentteki aminoasitlerdir. MAGE-3 tipi genler, erkek üreme hücrelerinin dışında sadece normal hücreler tarafından değil farklı histolojik türdeki birçok tümörler tarafından ifade edilir. Bu nedenle, MAGE-tipi genler tarafından kodlanan antijenler kesinlikle tümöre özgü ve tümörler için ortaktır [85, 86].

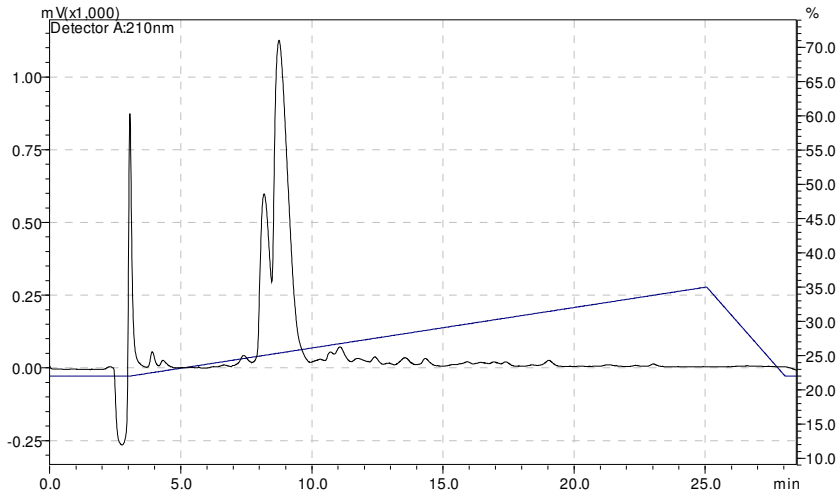
Polimer-peptid konjugatlarının geliştirilmesine yönelik çalışmalarda kullanılan peptidlerden Melanoma kanserine ait antijenik MAGE-3 121-134 (LLKYRAREPVTKE) dizili hidrofilik (Şekil 5.10) özellikteki peptid Fmoc korumalı olarak CEM Microdalga Peptid sentezi aletinde Solid Phase (Katı Faz) Peptid Sentez Yöntemi ile % 77 saflıkta bölümümüzde peptid grubu ile birlikte tarafımızca sentezlenmiştir. Peptidlerin LC-MS cihazı ile molekül ağırlığı ve yüzde safsızlık derecesi bulunmuştur.



Şekil 5. 10 MAGE-3 121-134 (LLKYRAREPVTKE) hidrofilik peptid dizisine ait amino asitlerin hidrofobik ve hidrofilik olarak gösterimi

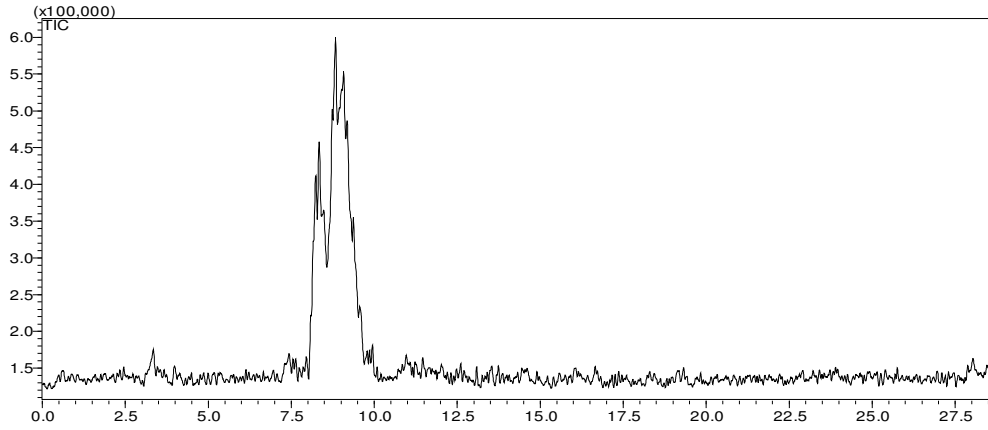
Mage-3 121-134 peptid dizisinin Floresans Spektrofotometre Cihazında ölçümlerini yapabilmek için dizinin N-terminal ucuna Triptofan (W) amino asidi sentez sırasında eklenmiştir. Mage-3 121-134 peptid dizisi için LC-MS cihazında, mobil faz A olarak su (% 0,1 TFA), mobil faz B olarak ise asetonitril (% 0.085 TFA) çözeltileri kullanılmıştır. Akış hızı 0,2 ml/dk olarak, 0-3 dakikalari arasında mobil faz B % 22, 3-25 dakikalari arasında % 22-35, 25-28 dakikalari arasında % 35-22 ve 28-30 dakikalari arasında % 22 şeklinde ayarlanmiştir.

UV Dedektör Dalgaboyu 210 nm ayarlanmıştır. Ölçümler oda sıcaklığında, Teknokroma Tracer Excel 120 ODS-A 5µm 20x0,21 boyutlarında kolon kullanılarak alınmıştır. İyonlaştırma yöntemi olarak ESI (+) seçilmiştir.



Şekil 5. 11 MAGE-3 121-134 (LLKYRAREPVTKAE) hidrofilik peptid dizisine ait UV Kromatogramı

CEM marka Liberty microdalga destekli peptid sentezi cihazında katı faz peptid sentez yöntemi ile sentezlenen Mage-3 121-134 peptid dizisi, LC-MS cihazında analiz edilmiştir. Peptid dizisine ait pikler UV Kromatogramında Şekil 5.11' de görülmektedir.



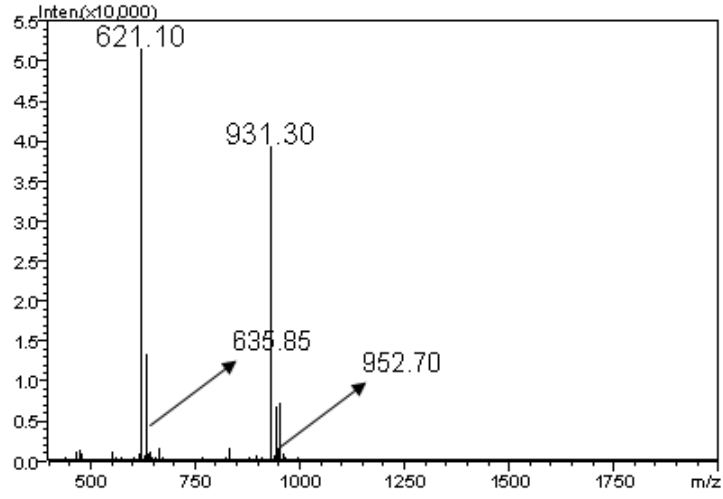
Şekil 5. 12 MAGE-3 121-134 (LLKYRAREPVTKAE) hidrofilik peptid dizisine ait toplam iyon kromatogramı

Ham olarak elde edilen peptid dizisi MS cihazının iyonlaştırma ünitesinde, ESI (+) yöntemi ile iyonlaştırılmış ve peptide ait toplam iyon kromatogramı (Şekil 5.12) elde edilmiştir. Toplam iyon kromatogramında elde edilen piklerden molekül ağırlığı hesabı yapılmıştır. Toplam iyon kromatogramında görülen bu piklerden alıkonma zamanı Şekil 5.13 ve 5.14’ de görülen 8,13-8,68 ile 8,63-9,69 dakikalari arasındaki piklere ait kütle spektrumlarında yapılan molekül ağırlığı tayininde, analiz sonucu hesaplanan ($M_{w\text{ hesaplanan}} = 1904,10$ ve $1860,47$) ile teorik olarak bulunan ($M_{\text{teorik}} = 1860,191$) molekül ağırlıkları birbiri ile karşılaştırıldığında ilk hesaplanan molekül ağırlığı yani $1860,47$ teorik olarak hesaplanan ile daha uyumludur. Bu bilgiden yola çıkılarak bu peptid için saflaştırma yapıldığında $8,63-9,69$ alıkonma zamanlarına sahip pik fraksiyonlaştırılarak elde edilir denilebilir.

$$952,70 \Rightarrow [M+2H^+]^{2+}$$

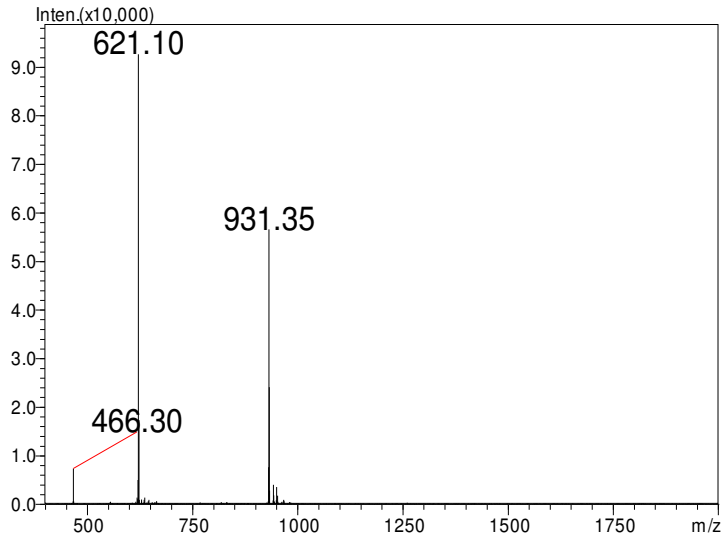
$$635,85 \Rightarrow [M+3H^+]^{3+} \rightarrow M_{w\text{ hesaplanan}} = 1904,10$$

$$M_{\text{teorik}} = 1860,191$$

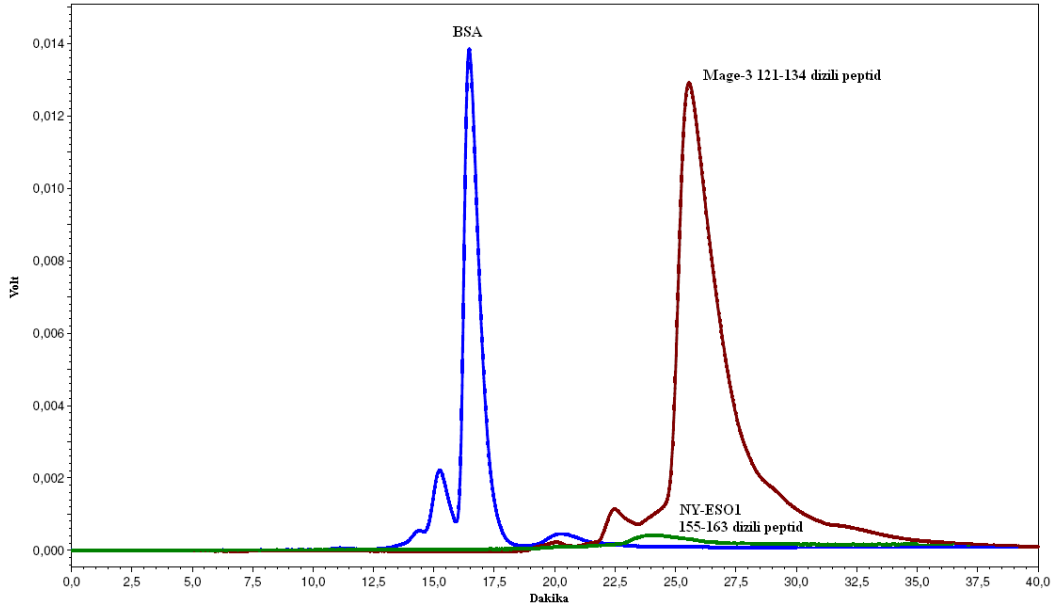


Şekil 5. 13 MAGE-3 121-134 (LLKYRAREPVTKAE) hidrofilik peptid dizisine ait alıkonma zamanı 8,13- 8.68 dakikaları arasındaki kütle spektrumu

931,35 => $[M+2H^+]^{2+}$
621,10 => $[M+3H^+]^{3+}$ → M_w hesaplanan = 1860,47
466,30 => $[M+4H^+]^{3+}$ $M_{teorik} = 1860,191$



Şekil 5. 14 MAGE-3 121-134 (LLKYRAREPVTKAE) hidrofilik peptid dizisine ait alıkonma zamanı 8, 63-9,69 dakikaları arasındaki kütle spektrumu



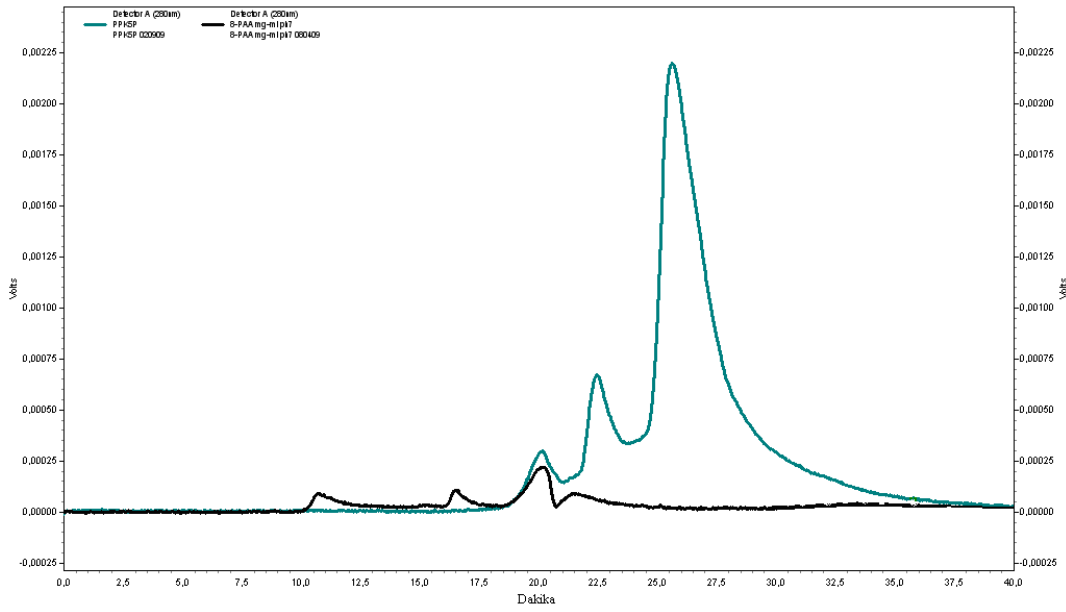
Şekil 5. 15 Melanoma tümör proteininin **Mage-3 121-134** ve **NY-ESO-1 155-163** peptid dizilerinin **BSA** molekülü ile karşılaştırmalı HPLC Kromatogramları

Farklı konsantrasyonlardaki Mage-3 121-134 ve NY-ESO-1 155-163 peptid dizilerinin BSA molekülü ile karşılaştırmalı moleküler eleme prensibine göre analiz yapan HPLC cihazı spektrumları Şekil 5.15' de incelenmiştir. Yapılan analiz sonucunda peptid dizileri ve BSA molekülü, molekül büyüklüklerine göre spektrumda yerlerini almaktadır. Molekül ağırlığı $M_w=66.000$ kDa BSA molekülü 16. dakika kolondan ilk önce gelirken, molekül ağırlıkları $M_w=1860$ ve $M_w=1290$ olan Mage-3 121-134 ve NY-ESO 155-163 peptid dizileri sırayla 26. ve 24. dakikalarda kolondan çıkmıştır. Hidrofobik olan NY-ESO 155-163 peptid dizisi PBS çözeltisinde çözünmediği için kromatogramda tam olarak çıkması gereken yerde belirmemiş ve düzgün bir pik sergilememiştir.

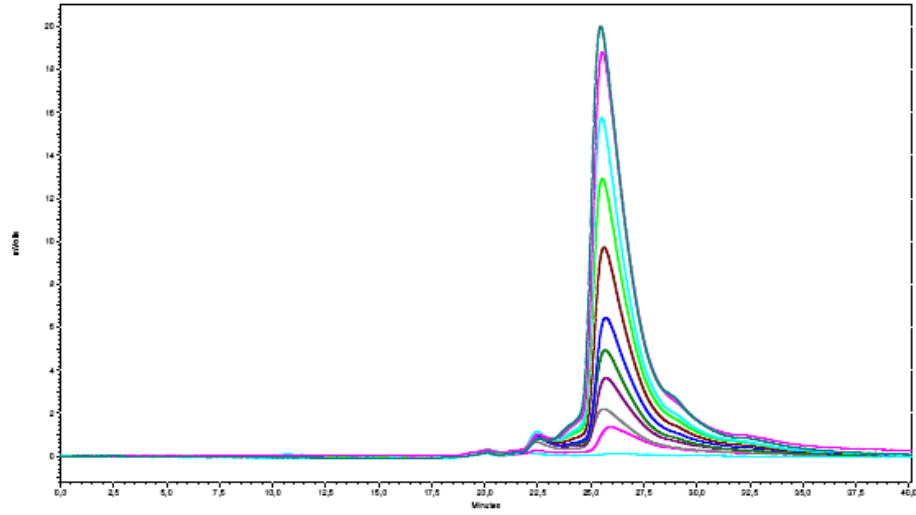
5.3 Mage-3 121-134 peptid dizisinin Poliakrilik asit (PAA) ile Oluşturulan Fiziksel Karışım ve Konjugatların Analiz Sonuçları

Deney serilerinde her iki peptid dizisi ile konjugat yapılmıştır. Fakat ilk sentezlenen NY-ESO-1 155-163 dizisi ile fosfat tamponu (PBS) ortamında konjugat sentezlenmiştir. Hidrofobik bir yapıya sahip olan NY-ESO-1 155-163 peptid dizisi ile suda çözünür kompleks ve konjugatlar hazırlanamadı. Aslında hidrofobik bir peptidin hücre reseptörleri ile etkileşimi kolay ve oldukça kuvvetlidir. İleriki çalışmalarımızda bu peptid ile hücrekültür ve immünolojik deneylerin yapılması düşünülmektedir.

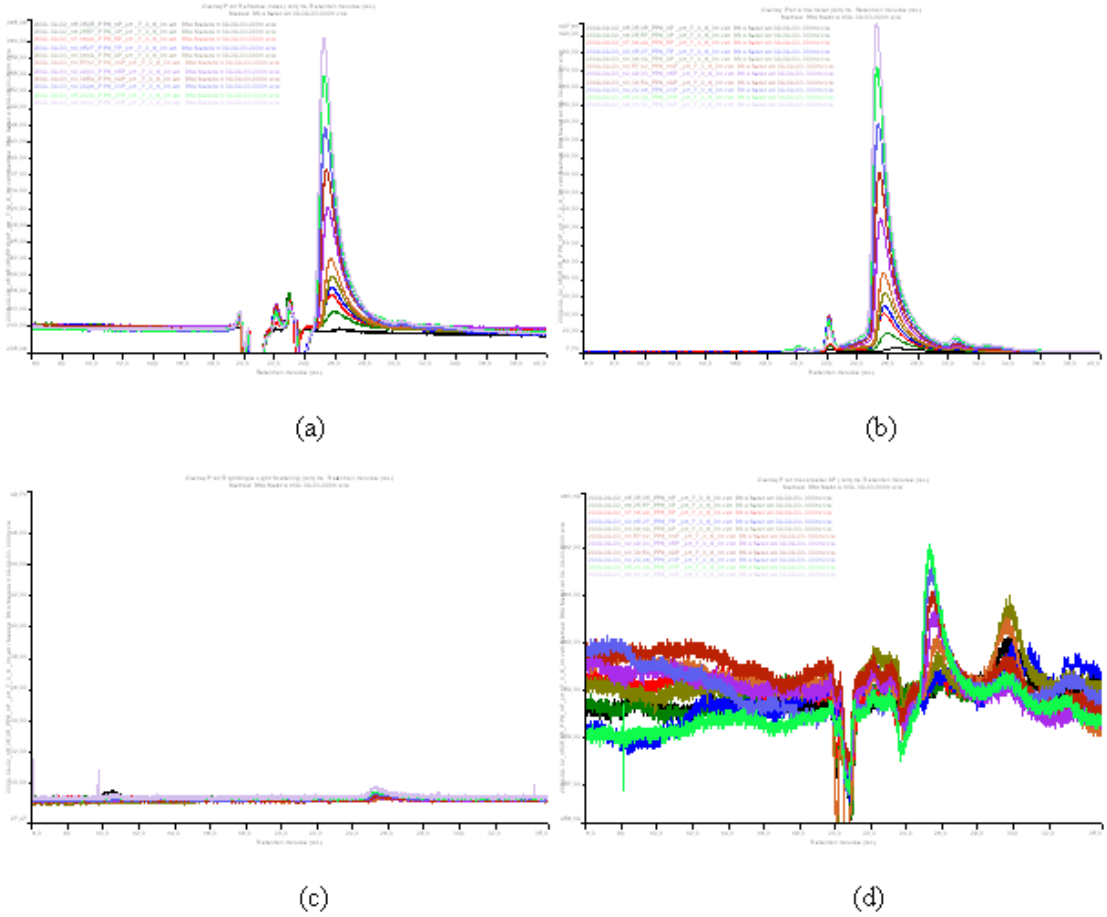
Şekil 5.16' da Mage-3 121-134 dizili peptide ve konjugasyon gerçekleştirilen PAA' e ait HPLC spektrumları görülmektedir. PAA tek başına, normal şartlarda 10. dakikada çok düşük UV' ye sahip karakteristik bir pik göstermektedir. Mage-3 121-134 dizili peptid ise bir önceki şekilde de açıklandığı gibi 26. dakikada karakteristik bir pik göstermektedir.



Şekil 5. 16 Mage-3 121-134 dizili Melanoma Peptidi ve Poliakrilik aside ait HPLC Spektrumları

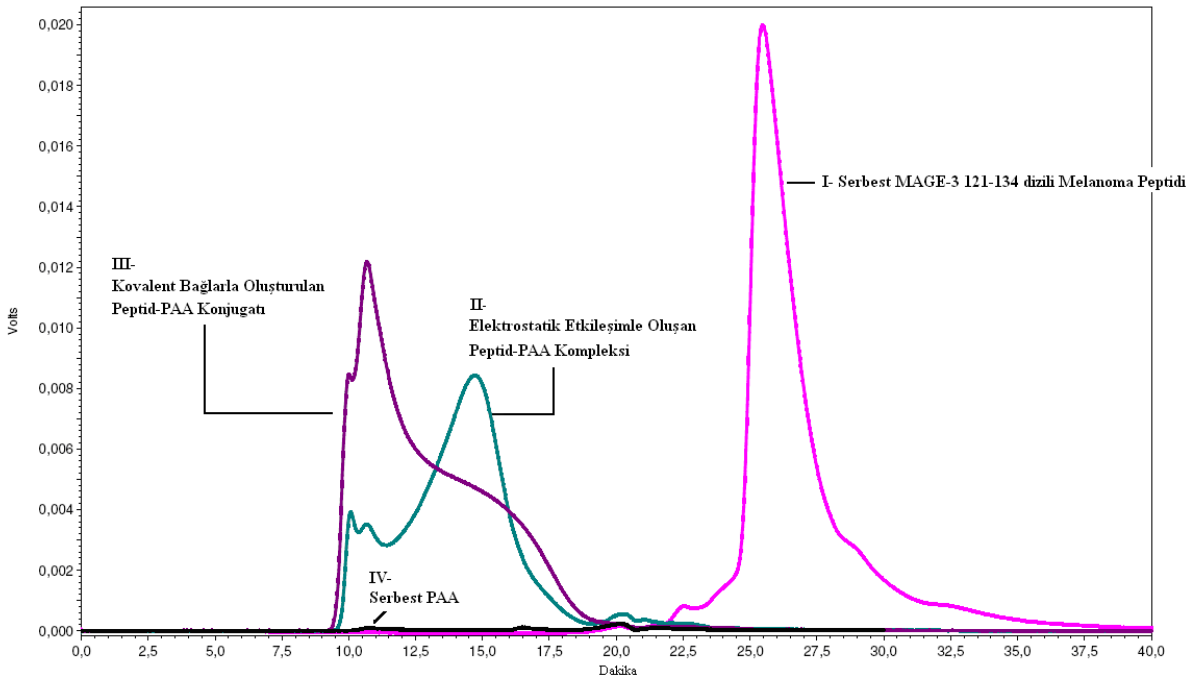


Şekil 5. 17 Mage-3 121-134 dizili Melanoma Peptidi-PAA konjugatlarında kullanılan artan miktarlardaki peptidlere ait HPLC kromatogramları



Şekil 5. 18 Mage-3 121-134 dizili Melanoma Peptidi-PAA konjugatlarında kullanılan artan miktarlardaki peptidlere ait GPC-Kırılma İndisi (a), UV (b), Işık Saçılması (c), Viskozimetre (d) dedektörü dedektörü kromatogramları

PAA ve Mage-3 121-134 peptid dizisi ile yapılan konjugatlarda kullanılan artan konsantrasyonlardaki peptidlere ait HPLC ve GPC kromatogramları sırasıyla Şekil 5.17 ve 5.18’ de verilmektedir. Peptid konsantrasyonu arttıkça piklerin UV şiddeti artmakta ve sergilediği karakteristik pikte hiçbir değişiklik oluşmamaktadır. HPLC ye ait UV dedektör ile GPC’ nin kırılma indisi ve UV dedektörlerinden alınan sonuçlar birbiri ile örtüşmektedir. Peptid çok küçük yapılu bir molekül olduğu için ışık saçılması ve viskozimetre dedektörlerinde çok net bir pik göstermemiştir.

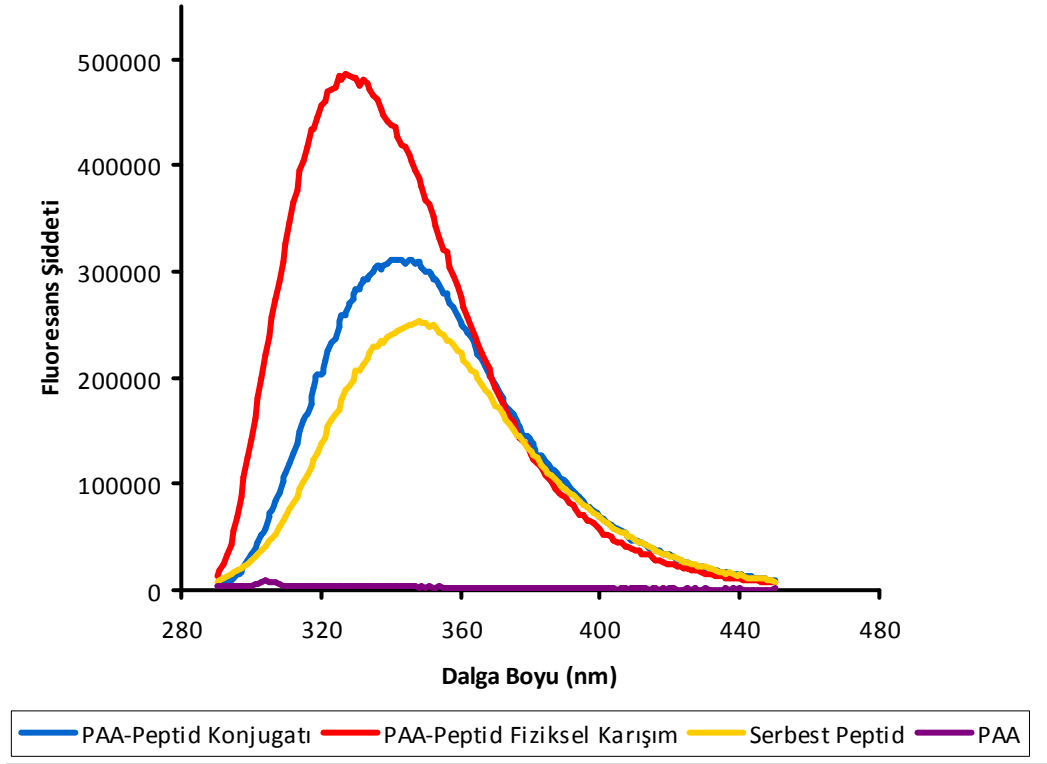


Şekil 5. 19 PAA- Mage-3 121-134 dizili Melanoma Peptidi Fiziksel Karışımı (II) ile PAA- Mage-3 121-134 dizili Melanoma Peptidi Konjugatına (III) ait Karşılaştırmalı HPLC Kromatogramı

Kompleks (fiziksel karışım) (II) ve konjugatı (III) birebir kıyaslayabilmek için her ikisi de paralel olarak hazırlandı. İki sistemde de her bileşen için 1 mg/ml içerecek şekilde reaksiyonlar kuruldu. Şekil 5.19’ da $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}} = 30$ oranı için PAA-peptid fiziksel karışımı ve konjugatına ait HPLC kromatogramı görülmektedir. Kromatogramdan da görüldüğü gibi elektrostatik etkileşimle meydana gelen kompleks ile kovalent bağlarla oluşturulan konjugatın piki çok farklı karakterler sergilemektedir.

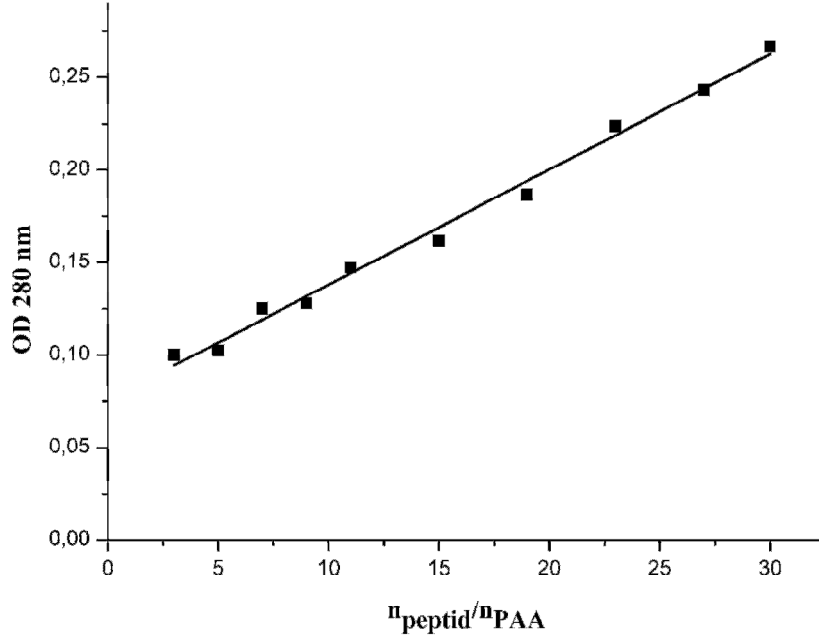
HPLC Kromatogramından elde ettiğimiz sonuçları Floresans Spekturumu (Şekil 5.20) ile karşılaştırdığımızda, $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}} = 30$ oranı için fiziksel karışım ve konjugatın her

ikisinin de λ maksimumu 350 nm olan peptide göre daha solda çıktığını görmekteyiz. Floresans şiddetleri kıyaslandığında fiziksel karışımda yer alan peptidlerin daha yüksek floresans şiddeti gösterebilecek konformasyonda olduğu söylenebilir. Fakat λ maksimumu 328 nm olan fiziksel karışım, λ maksimumu 343 olan konjugata göre daha hidrofobik bir yapı oluşturmuştur.



Şekil 5. 20 PAA-peptid Fiziksel Karışımı ile PAA-peptid Konjugatına ait Karşılaştırmalı Floresans Spektrumu

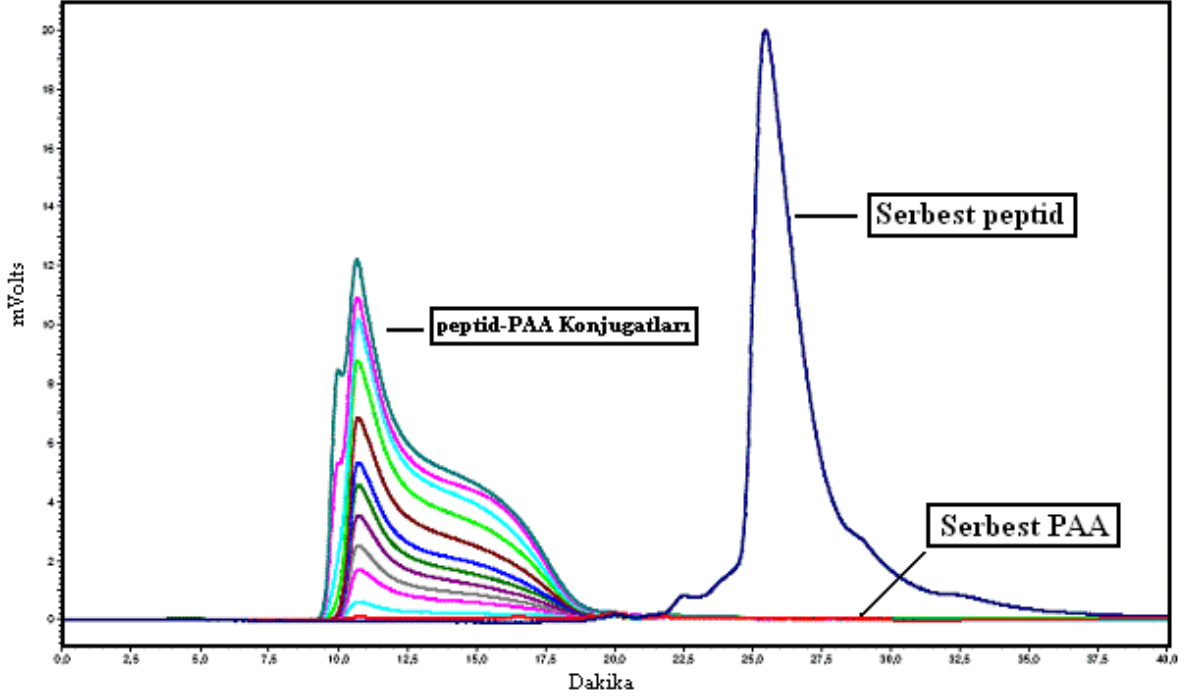
Şekil 5.21' de 11 farklı mol oranında sentezlenen PAA-peptid konjugatlarına ait UV spektrumları görülmektedir. $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}$ mol oranına göre hesaplanan konjugatlarda polimer sabit tutularak peptid miktarı artırılmıştır. Peptid konsantrasyonunun gittikçe artmasıyla yani konjugatta UV veren grupların artışıyla konjugatlara ait UV şiddetleri de lineer bir artış göstermektedir.



Şekil 5. 21 Peptid-PAA konjugatlarına ait OD 280 nm değerleri

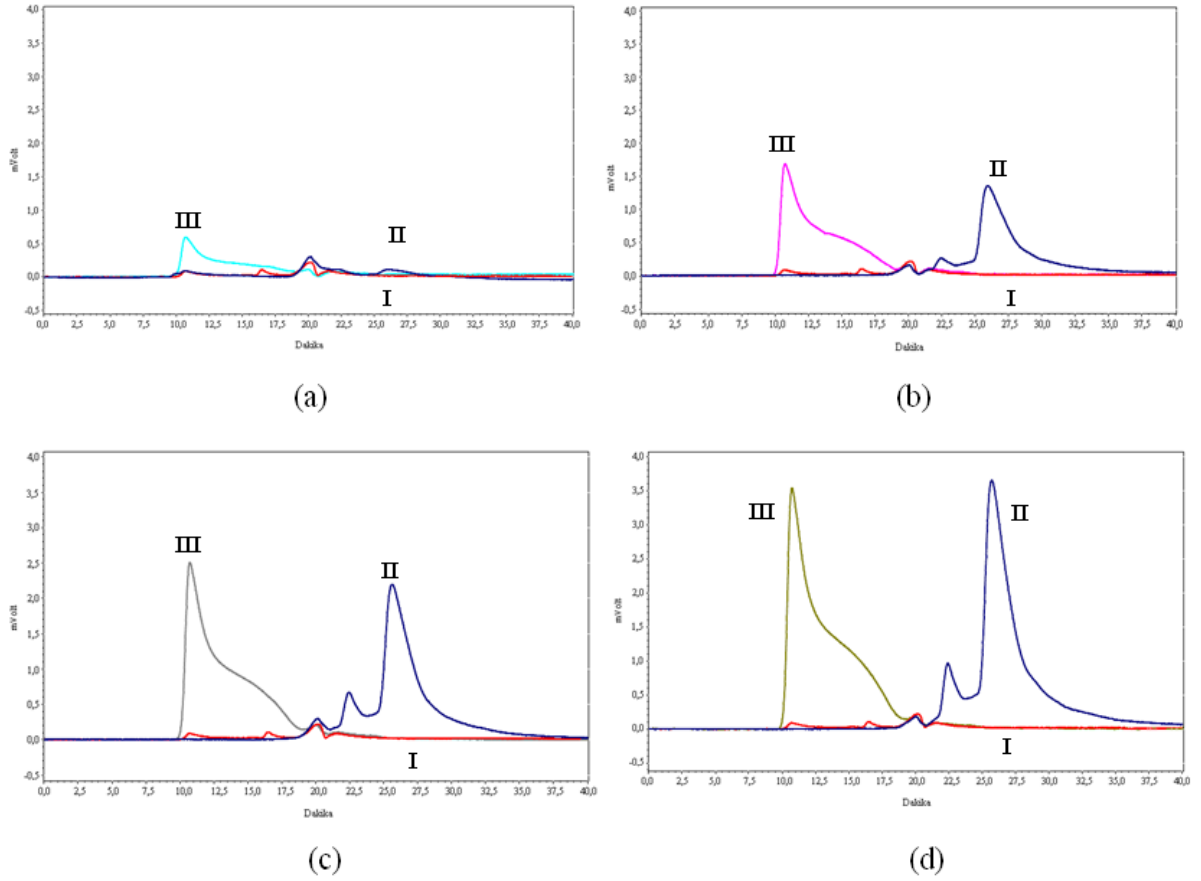
$n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}} = 1, 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 23, 27, 30$ oranları için gereken miktarlarda peptid ile PAA PBS tamponunda (toplam hacim 6 mL olacak şekilde) çözülmüş sonrasında ve çözeltilerin pH' ları sırasıyla 6,88 ve 3,5 olarak ölçülmüştür. Daha sonra damla damla HCl eklenerek pH 5'e düşürülmüş, çözeltiler 30 dk karıştıktan sonra peptid çözeltisi polimer çözeltisi üzerine eklenmiştir. Bu pH değerinde ortama EDC eklenerek karışımdaki karboksil gruplarının 30 dk aktivasyonu yapılmış, 12 saat karışıma bırakılan örneklerin pH değeri NaOH eklenerek 7'ye yükseltilmiştir. Örnekler oda sıcaklığında, pH=7'de 2 saat karıştırılmıştır. Elde edilen konjugatlar HPLC, Floresans, Viscotek ve Zeta Sizer cihazları ile analiz edilmiştir.

Sentezlenen konjugatlara ait HPLC kromatogramı Şekil 5.22, 5.23, 5.24' de, Floresans spektrumu Şekil 5.25 ve 5.26' da, Viscotek cihazı ile Kırılma indisi detektöründe alınan kromatogram Şekil 5.27' de, UV detektörde alınan kromatogramı Şekil 5.28' de, Işık saçılması detektörü ile alınan kromatogramı Şekil 5.29' da ve Viskozite detektörü ile alınan kromatogramı da Şekil 5.30' da, zeta sizer cihazından alınan boyut analizlerine ait grafikler Şekil 5.31, 5.32 ve 5.33' de verilmiştir.



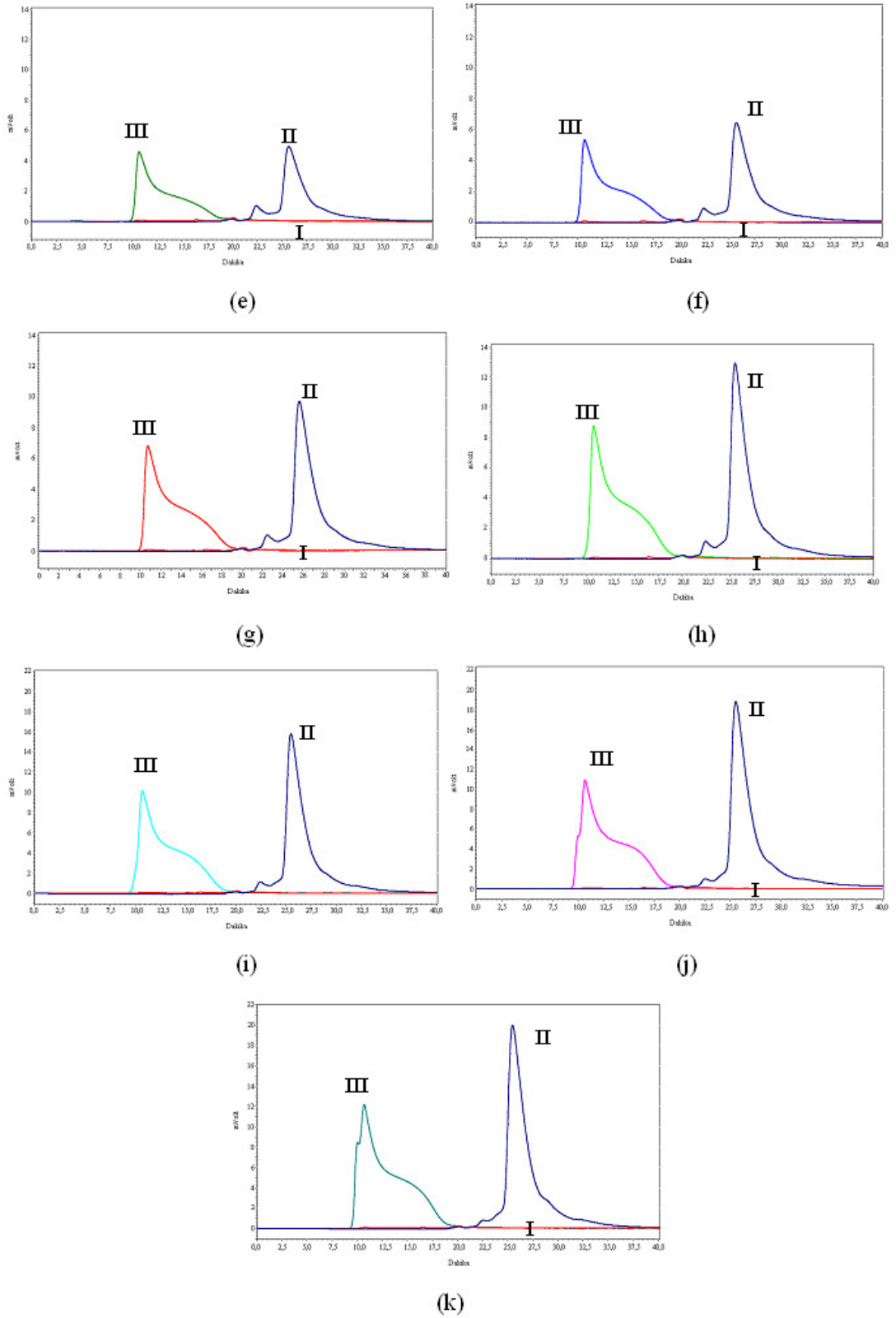
Şekil 5. 22 Artan oranlarda ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=1$, $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=3$, $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=5$, $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=7$, $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=9$, $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=11$, $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=15$, $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=19$, $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=23$, $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=27$, $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=30$) Peptid-PAA konjugatları, peptid ve PAA' e ait HPLC kromatogramları

Sentezlenen konjugatlara, serbest peptide ve poliakrilik asite ait kromatogramlar toplu olarak Şekil 5.22' de görülmektedir. Kromatogramdan da görüldüğü gibi ortamda peptid konsantrasyonu arttıkça peptid-PAA konjugatlarına ait pikler de artış göstermekte ve konjugasyona katılmadan ortamda serbest kalan peptid olmadığı görülmektedir.



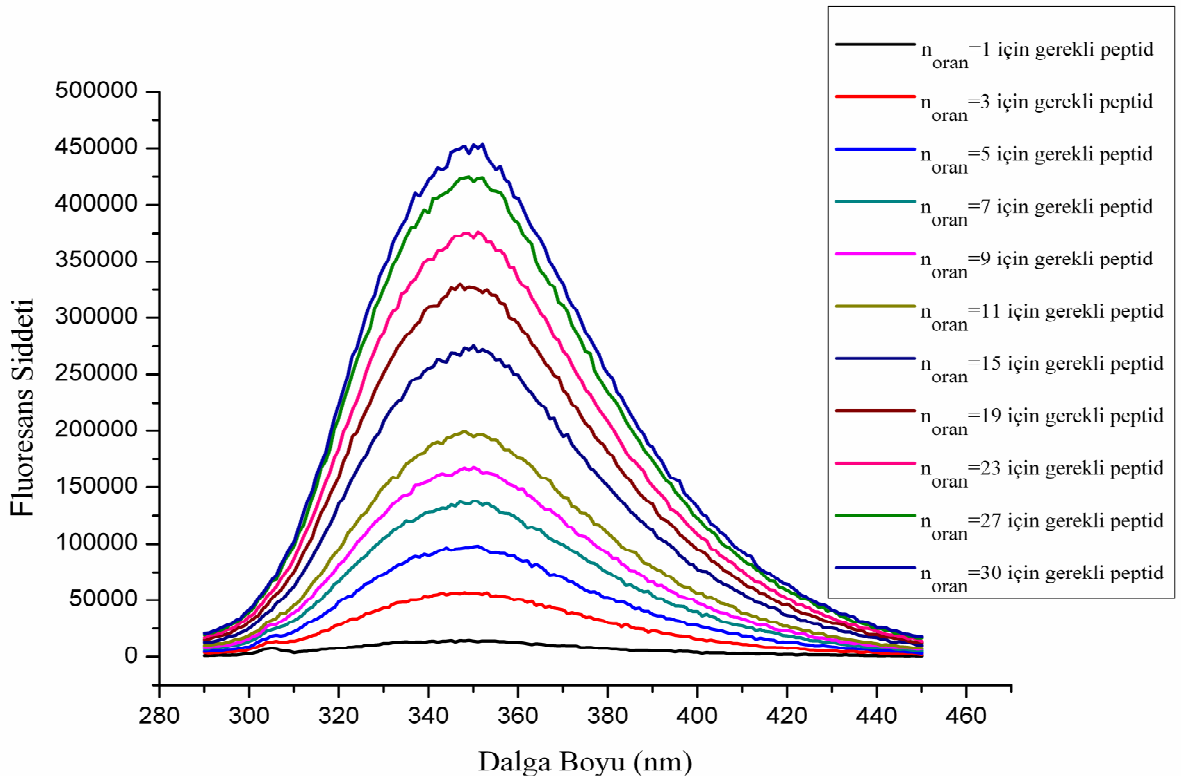
Şekil 5. 23 $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}} = 1$ (a), 3 (b), 5 (c), 7 (d) olan Peptid-PAA konjugatlarına (III), konjugat oluşturulan serbest peptid (II) ve PAA' e (I) ait HPLC kromatogramları

Şekil 5.23 ve 5.24' de her bir peptid-PAA konjugatına (III), konjugasyonda kullanılan peptide (II) ve polimere (I) ait pikler ayrı ayrı verilmektedir. Oluşan konjugatlara ait büyüklüklerin daha net anlaşılabilmesi için, kromatogramlarda UV şiddetini gösteren y değer eksenini ölçeği sabit tutularak konjugatlara ait pikler karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir. $n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}} = 1$ ' den başlanılarak $n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}} = 30$ oranına kadar mol oranı artırılmış fakat peptidi daha fazla kullanmamak için PAA' in peptid ile doyurulduğu bir oran olmamıştır. Sentezlenen $n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}} = 1, 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 23, 27, 30$ konjugasyon oranlarının her biri için ortama eklenen tüm peptidin konjugasyona katıldığı görülmektedir.



Şekil 5. 24 $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}} = 9$ (e), 11 (f), 15 (g), 19 (h), 23 (i), 27 (j), 30 (k) olan Peptid-PAA konjugatlarına (III), konjugat oluşturulan serbest peptid (II) ve PAA'ye (I) ait HPLC kromatogramları

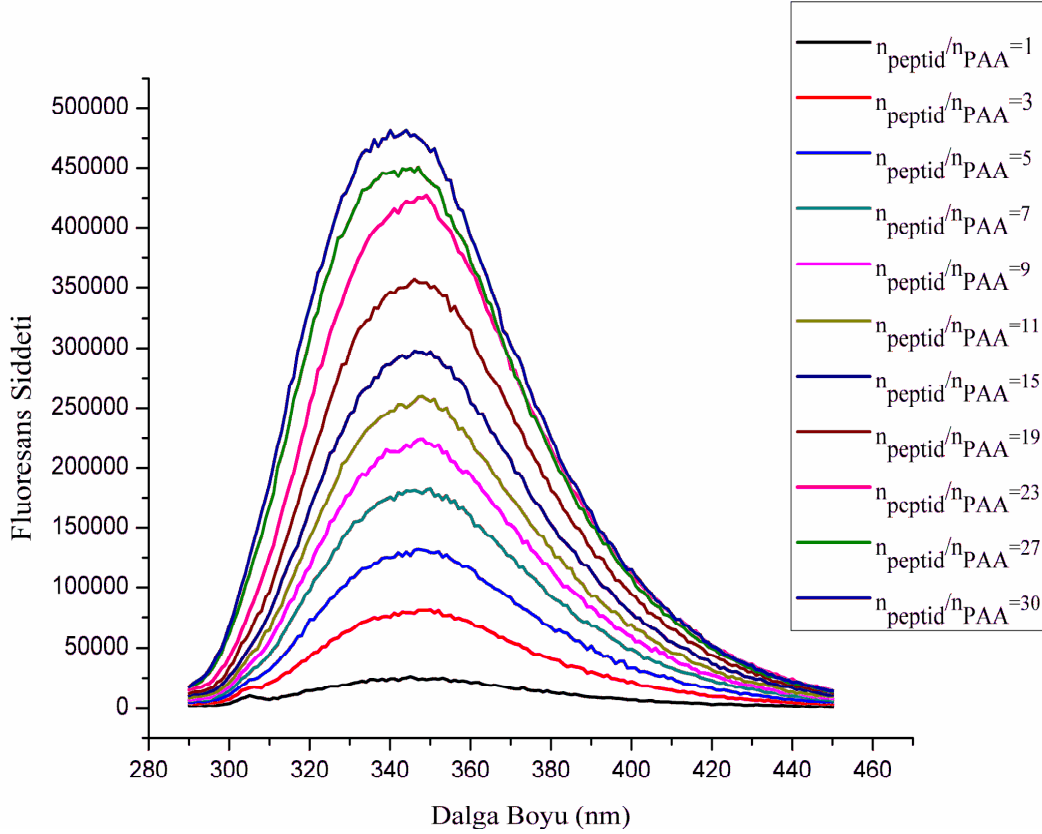
Şekil 5.25’ de $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}} = 1, 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 23, 27, 30$ oranlarında sentezlenen konjugatlarda kullanılan peptidlere ait fluoresans spektrumları verilmektedir. Spektrumlardan da görüldüğü gibi $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}$ oranları için kullanılan peptidler için artan peptid konsantrasyonuna bağlı olarak fluoresans şiddeti artmaktadır fakat tüm peptidler için maksimum dalga boyu $\lambda_{\text{maksimum}} = 350 \text{ nm}$ ’ dir. Buradan da anlaşılacağı gibi $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}} = 30$ olan en yüksek mol oranında dahi peptid içeren çözeltilerdeki peptidlerin kendi içinde hiçbir şekilde agregasyona gitmediği ve aynı şekilde konjugasyona katıldığı söylenebilir.



Şekil 5. 25 Peptid-PAA konjugatlarında kullanılan artan miktarlardaki peptidlere ait Fluoresans Spektrumları

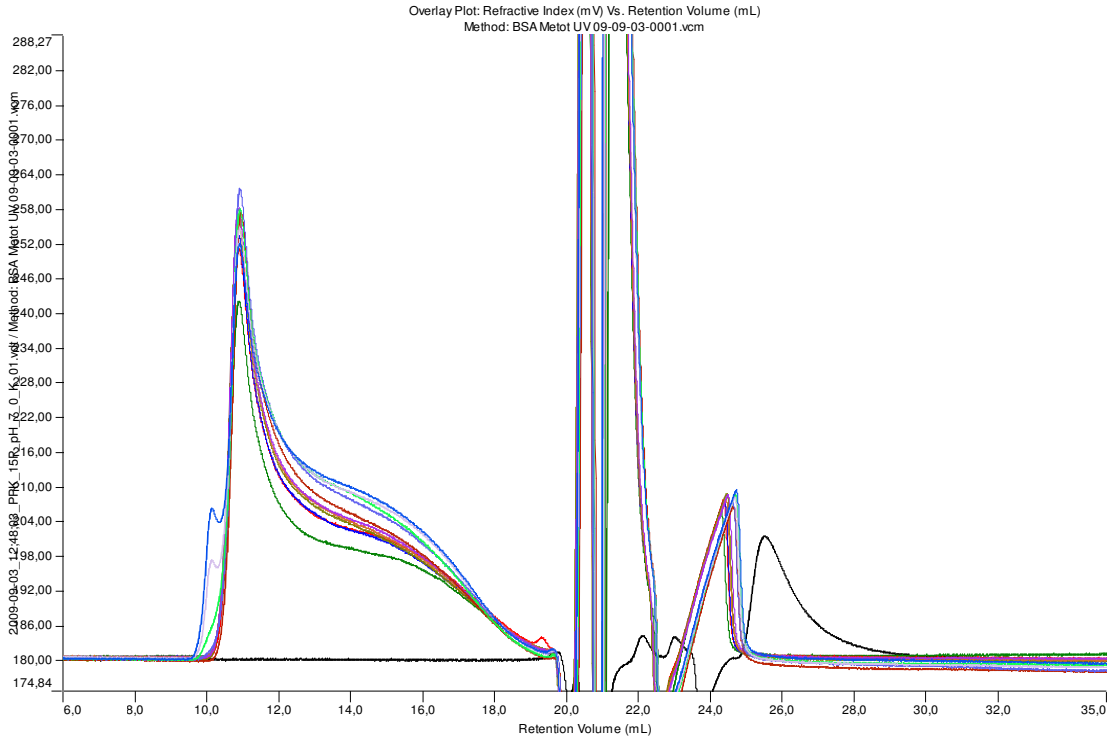
$n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}} = 1, 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 23, 27$ ve 30 oranlarında sentezlenen konjugatlara ait fluoresans spektrumları Şekil 5.26’ da verilmektedir. Şekilde de görüldüğü gibi $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}} = 1, 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 23, 27$ ve 30 oranları için sentezlenen konjugatlara ait spektrumlarda artan peptid/polimer mol oranına bağlı olarak fluoresans şiddetleri artmaktadır. En küçük $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}$ oranından en büyüğüne bakıldığında konjugatların dalga boylarında mavi bölgeye doğru kayma gözlenmektedir. Farklı konjugatlara ait

$\lambda_{\text{maksimum}}$ dalga boyundaki gözlenen kayma konjugasyon sonucu peptidin N- ucunda yer alan Trp'ın sudan uzaklaştığını ve hidrofobik ortama çekildiğini yani PAA molekülleri ile peptid moleküllerinin bağlanması sonucu triptofanil uçlarının daha içeride kaldığını göstermektedir.

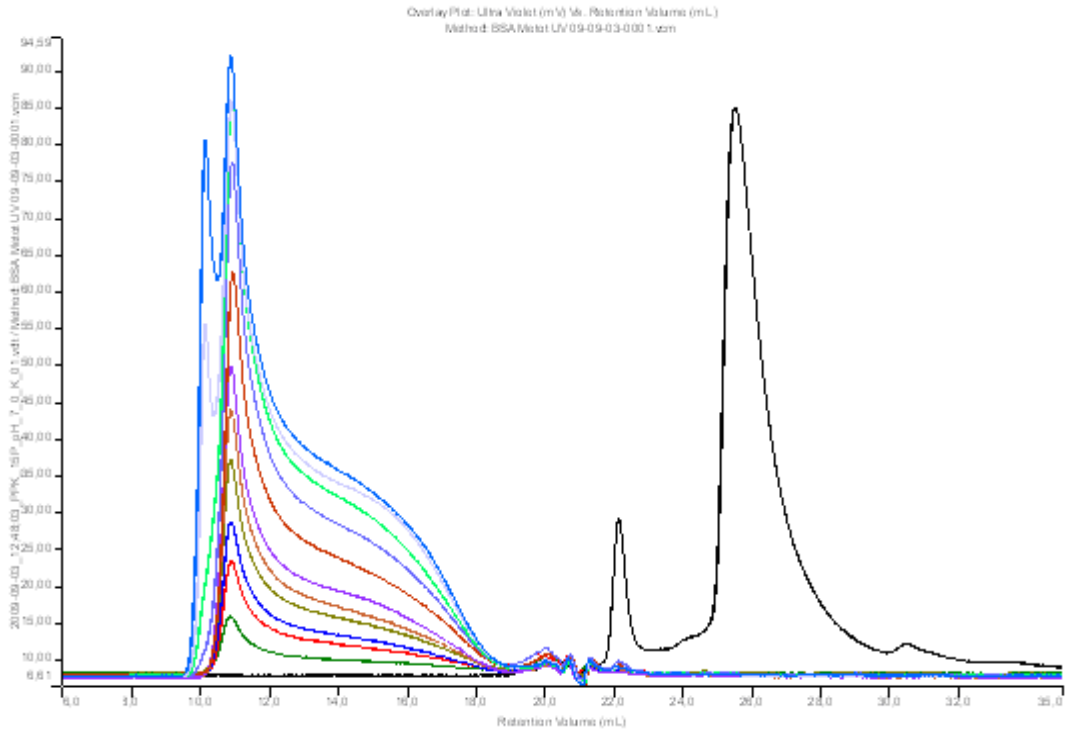


Şekil 5. 26 Artan oranlarda ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}$) Peptid-PAA konjugatlarına ait Fluoresans Spektrumları

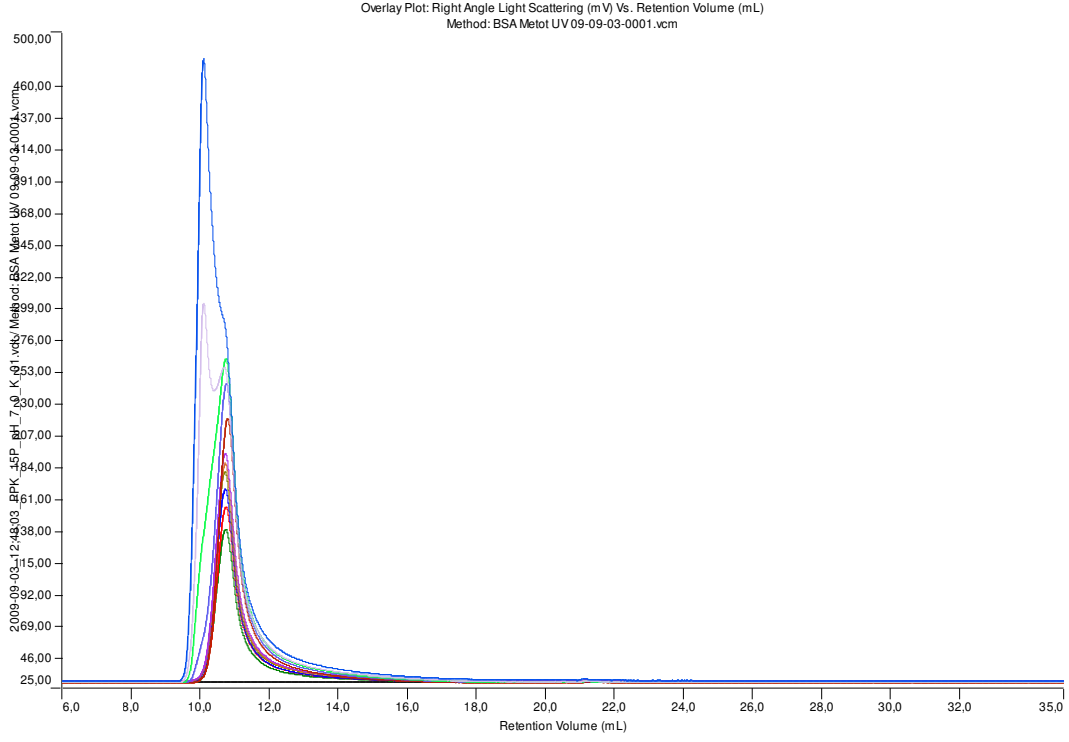
Şekil 5.27, 5.28, 5.29 ve 5.30' da $n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}} = 1, 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 23, 27, 30$ oranlarında sentezlenen konjugatlara ait sırasıyla GPC-kırılma indisi, UV, ışık saçılması ve viskozimetre dedektörleri kromatogramları görülmektedir. $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}$ oranı arttıkça konjugat pikleri de her dedektörde aynı şekilde artış göstermektedir. $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}} = 23$ oranından sonra önceki oranlardan farklı olarak $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}} = 27$ ve 30 oranında konjugatlar karakter değiştirmiştir. Çizelge 5.1' de GPC kromatogramındaki konjugat piklerine ait renkler verilmiştir.



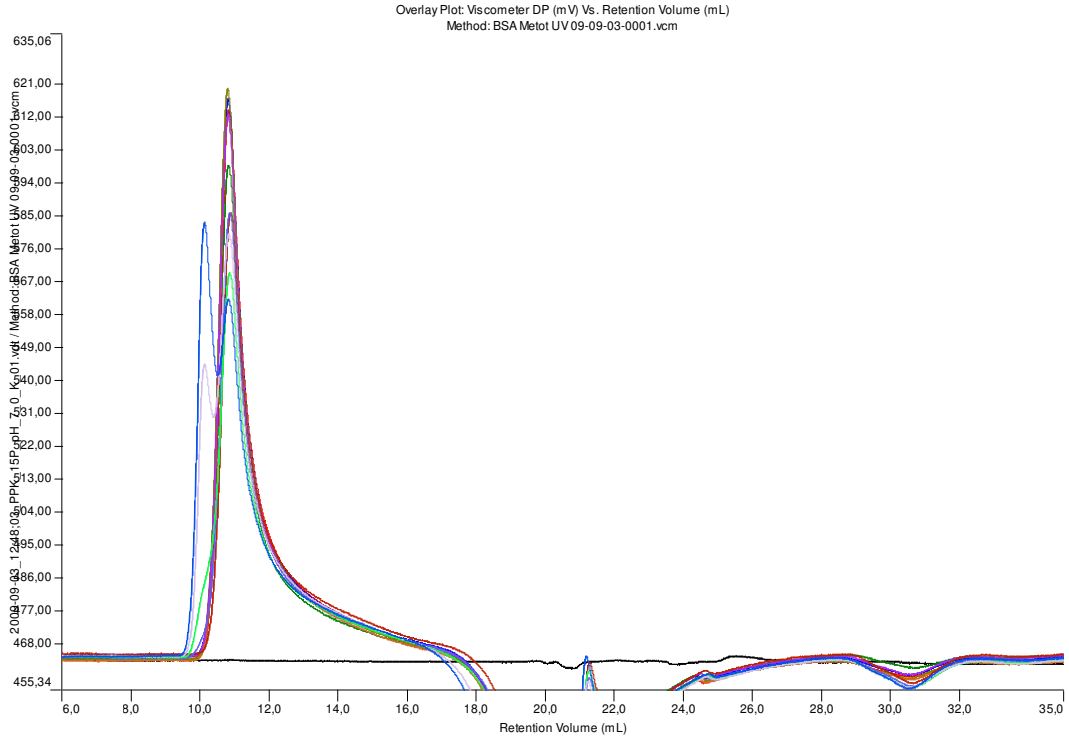
Şekil 5. 27 Artan oranlarda ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}$) Peptid-PAA konjugatlarına ait GPC-Kırılma İndisi dedektörü kromatogramları



Şekil 5. 28 Artan oranlarda ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}$) Peptid-PAA konjugatları, PAA ve peptide ait GPC-UV dedektörü kromatogramları



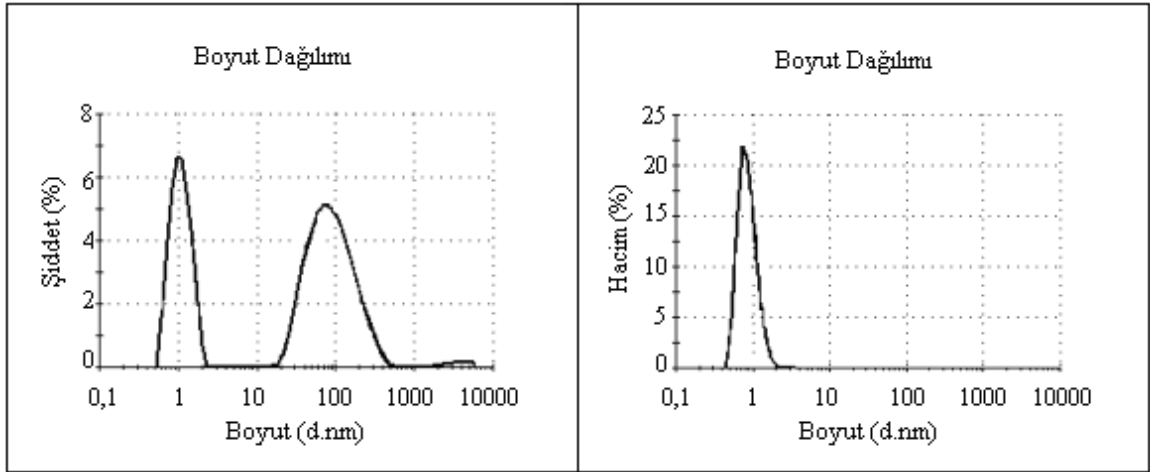
Şekil 5. 29 Artan oranlarda ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}$) Peptid-PAA konjugatları, PAA ve peptide ait GPC-Işık Saçılması dedektörü kromatogramları



Şekil 5. 30 Artan oranlarda ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}$) Peptid-PAA konjugatları, PAA ve peptide ait GPC-Viskozimetre dedektörü kromatogramları

Çizelge 5.1 GPC cihazından alınan peptid-PAA konjugatlarına ait piklerin renkleri

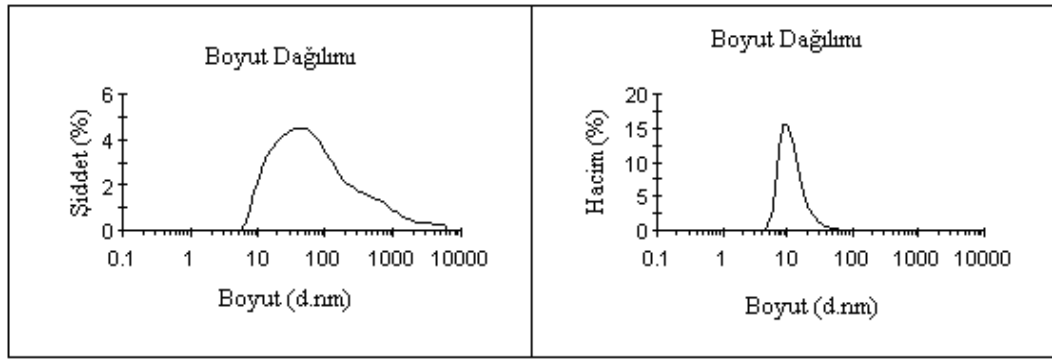
$n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}$	Piklere ait renkler
1	Koyu yeşil
3	Kırmızı
5	Lacivert
7	Zeytin yeşili
9	Turuncu
11	Mor
15	Kahverengi
19	Mavi
23	Fıstık yeşili
27	Eflatun
30	Koyu mavi



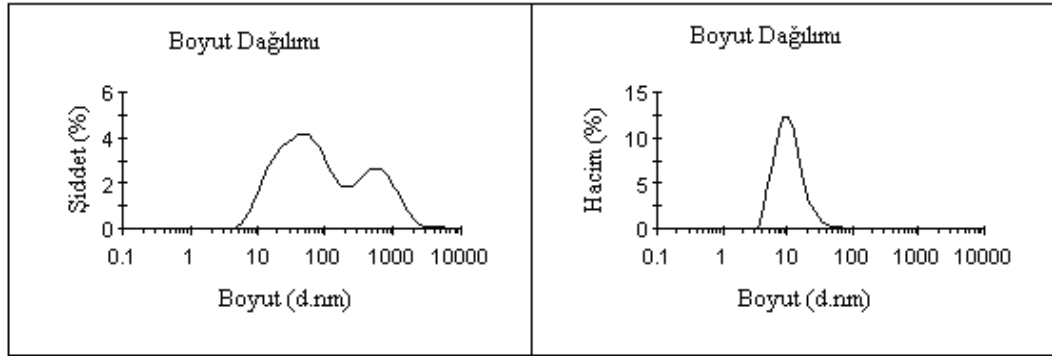
Şekil 5. 31 MAGE-3 121-134 (LLKYRAREPVTKAE) hidrofilik peptid dizisine ait boyut ve zeta potansiyel ölçümü

Şekil 5.31’ de MAGE-3 121-134 (LLKYRAREPVTKAE) hidrofilik peptid dizisinin boyut ve Zeta potansiyel ölçümü sonucu Şiddet-Boyut grafiğinde görülen ilk pik peptidimize aittir. Peptidimizin izoelektrik noktası $pI= 10$ olmasına rağmen $pH=7$ ’ de Zeta potansiyeli negatif çıkmaktadır ve boyutu 2 nm civarındadır. Yanında görülen geniş pik ise belki peptid sentezi esnasında belki de ortamda var olan bir safsızlığın varlığını düşündürmektedir. Hacim-Şiddet grafiği incelendiğinde peptidin yanında bir önceki grafikte görülen safsızlık yer almamaktadır. İlk grafikte safsızlık olarak gördüğümüz geniş pikin hacim-boyut grafiğinden aslında yüzdelik dilim olarak ortamda çok az yer tuttuğu söylenebilir.

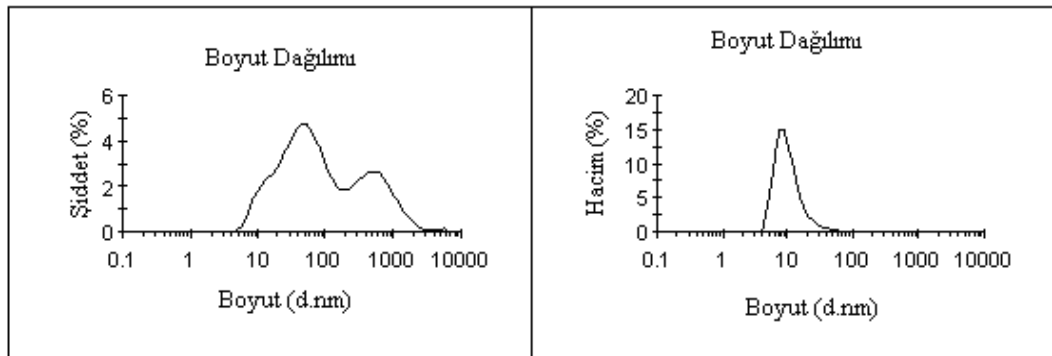
Şekil 5.32 ve 5.33’ de $pH = 7.0$ değerinde polimer-peptid sistemlerinin $n_{pep}/n_{PAA} = 1, 3, 9, 11, 15, 23, 27, 30$ farklı oranlarındaki ışığın saçılma şiddetine karşılık boyut dağılımları ve zeta potansiyel ölçüm sonuçları, konjugat oluşumunun bazı önemli özellikleri hakkında bilgi vermiştir. Konjugat partiküllerin boyut dağılımları, peptid miktarına bağlı olarak değişmektedir. Hiçbir oranda, serbest peptide karşılık gelen 1nm civarında bir pik görülmemektedir. $n_{peptid}/n_{PAA}= 1$ ile başlayan boyut değerleri, serbest PAA’ya göre farklılık göstermektedir. Buna göre diyebiliriz ki, oran arttıkça eklenen tüm peptid, poliyonlarla konjugat oluşturmaktadır.



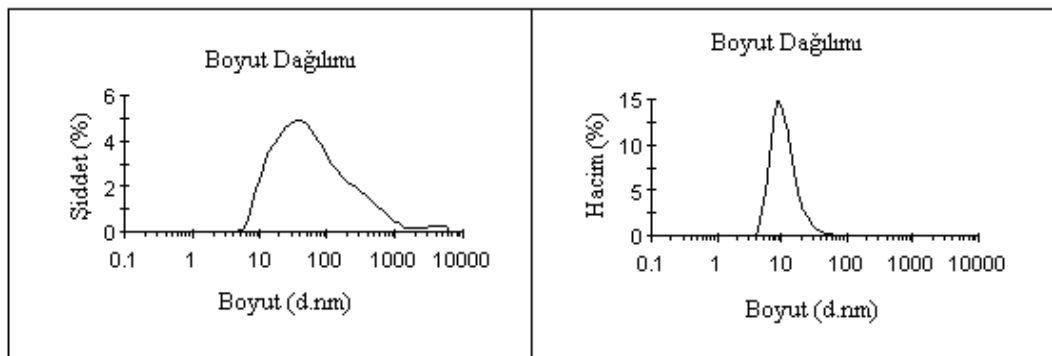
(a)



(b)

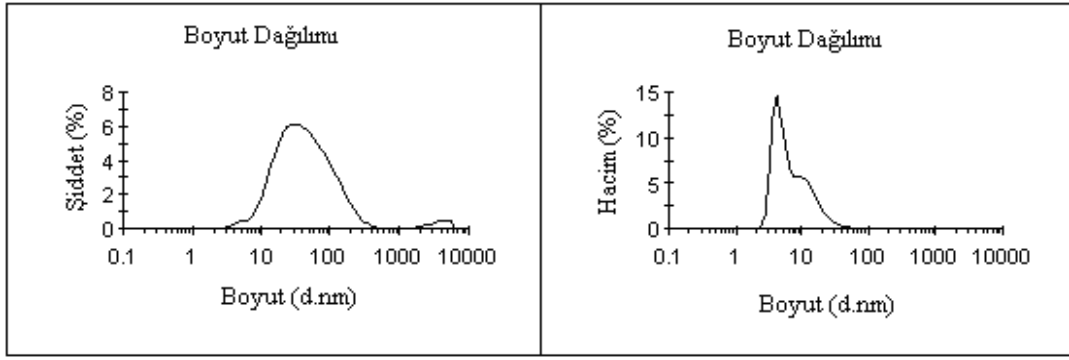


(c)

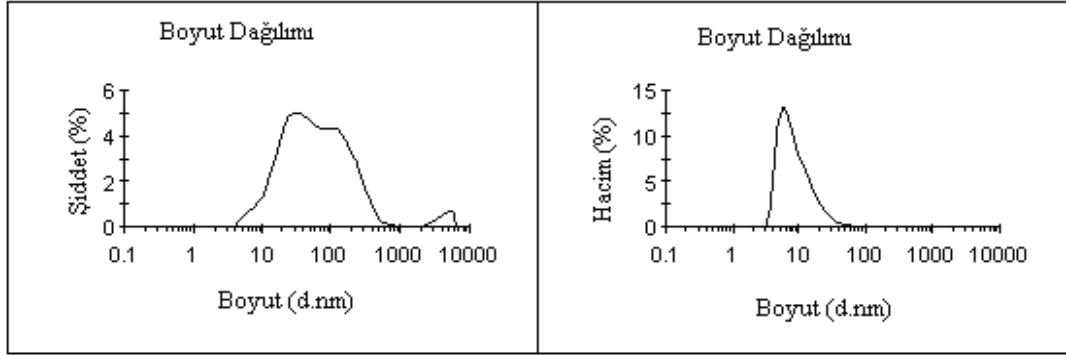


(d)

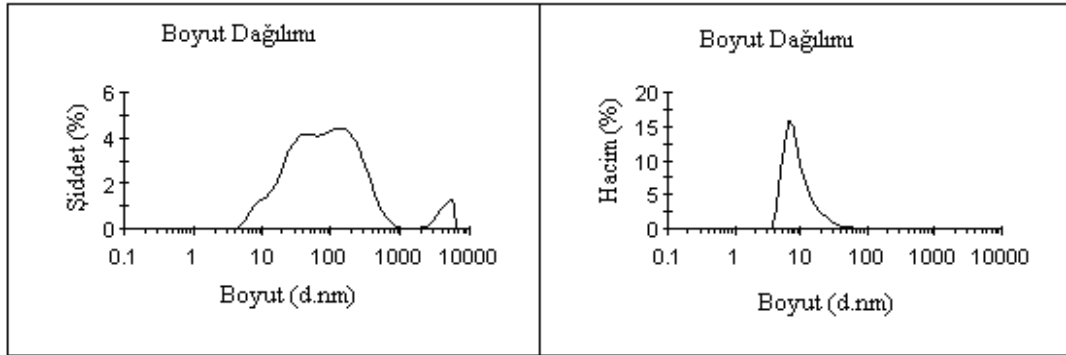
Şekil 5. 32 $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}} = 1, 3, 9$ ve 11 oranlarındaki peptid-PAA konjugatlarına ait boyut dağılımı şiddet ve yoğunluk grafikleri



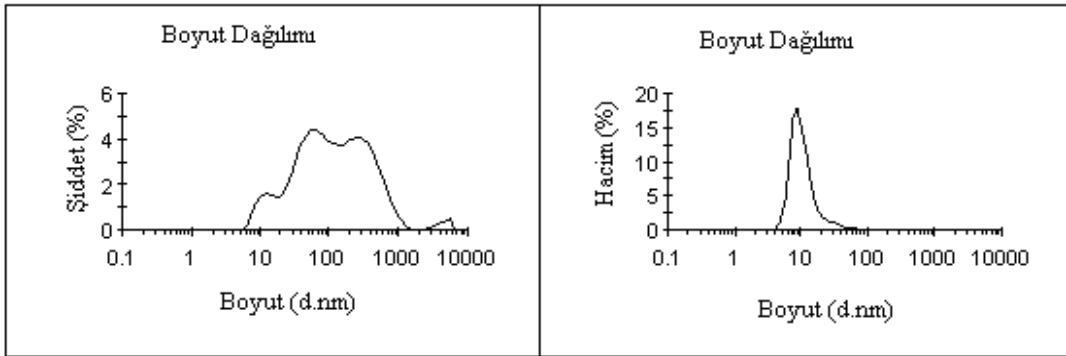
(e)



(f)



(g)

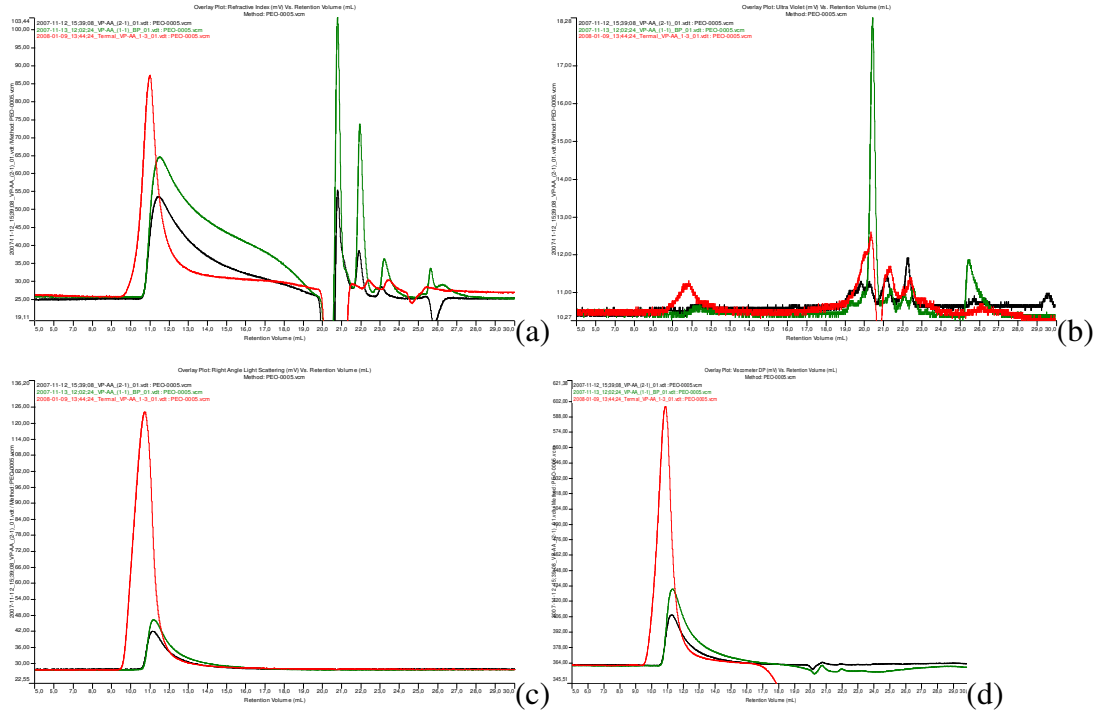


(h)

Şekil 5. 33 $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}} = 15, 23, 27$ ve 30 oranlarındaki peptid-PAA konjugatlarına ait boyut dağılımı şiddet ve yoğunluk grafikleri

5.4 Farklı Yöntemlerle Sentezlenen VP/AA Kopolimerine ait Deney Sonuçları

5.4.1 Klasik (Termal) Yöntemle Sentezlenen VP/AA Kopolimerlerine Ait Deney Sonuçları



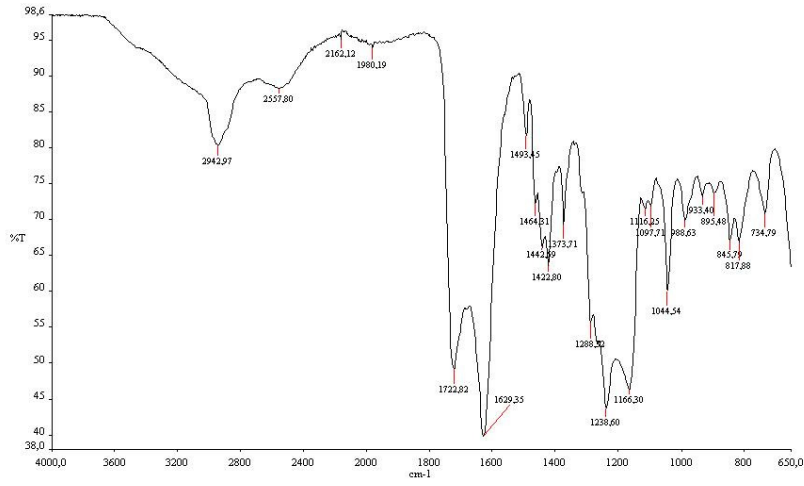
Şekil 5. 34 Klasik (Termal) Yöntemle Sentezlenen VP/AA Kopolimerlerine Ait GPC-Refraktif İndeks (a), UV (b), Işık Saçılması (c) ve Viskozimetre (d) Kromatogramları

Çizelge 5.2' de klasik (termal) yöntem kullanılarak literatürde anlatıldığı gibi sentezlenen, bileşenlerinin VP:AA = 2:1; 1:1 ve 1:3 olan kopolimerlerin molekül ağırlıkları M_n , M_w ve M_z cinsinden verilmektedir. Molekül ağırlığı tayini Viskotek cihazında yapılan analiz sonrası hesaplanmıştır. Şekil 5.34' de GPC-refraktif indeks (a), UV (b) ışık saçılması (c) ve viskozimetre (d) dedektörlerine ait kromatogramlardan görüldüğü üzere termal yöntemle sentezlenen kopolimerden P(VP-co-AA) (2:1) ve P(VP-co-AA) (1:1) birbirine benzer karakterde pik sergilemektedir. P(VP-co-AA) (1:3) ise diğerlerine göre daha farklı bir pik göstermektedir. Sentezlenen kopolimerin ağırlıkları sırasıyla VP:AA = 2:1; 1:1 ve 1:3 $M_w=68.908$, 35.678 ve 573.973 Da olarak bulunmuştur. VP:AA = 1:3 kompozisyonunda sentezlenen kopolimer immünojenik çalışmalar için çok yüksek molekül ağırlığına sahip olduğu için deneylerimizde

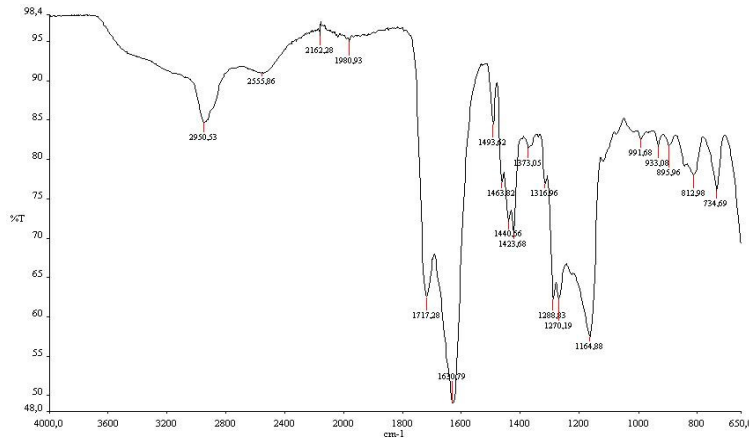
kullanmadık. P(VP-co-AA) (2:1), P(VP-co-AA) (1:1)' e göre daha düşük toksisiteye sahip olduğu için deneylerimizde kullanmak için bileşenlerinin P(VP-co-AA) (2:1) kompozisyonunda olan kopolimer seçildi. Daha sonra viskoteck cihazında polimer kolonu kullanılarak yapılan molekül ağırlığı tayininde bu kopolimerin molekül ağırlığı 120.000 Da olarak bulundu. P(VP-co-AA) (2:1) kopolimeri yapısında yer alan akrilik asit yüzdesine göre diğerlerine göre daha az toksik etkiye sahiptir ve canlı sistemde kalma süresi (prolongation) daha düşük molekül ağırlıklı P(VP-co-AA) (1:1) kopolimerine kıyasla daha uzun olacaktır. Deneylerimizde kullanmak için termal yöntemle sentezlenen bu üç kopolimerden, immünolojik çalışmalarda daha iyi sonuç vereceğini düşündüğümüz P(VP-co-AA) (2:1) kopolimeri seçildi.

Çizelge 5.2 Klasik (Termal) Yöntemle Sentezlenen VP/AA Kopolimerlerine Ait GPC ile Molekül Ağırlığı Tayini

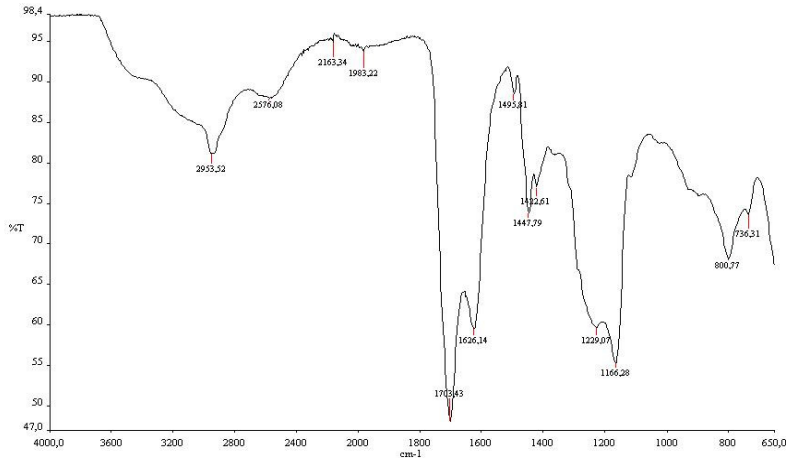
	P(VP-co-AA)		
	2:1	1:1	1:3
Peak RV - (ml)	11,417	11,47	10,953
Mn - (Da)	25.508	14.867	96.014
Mw - (Da)	68.908	35.678	573.978
Mz - (Da)	123.944	65.600	3,114 e ⁶
Mp - (Da)	130.595	75.259	430.200
Mw / Mn	2,701	2,4	5,978
IV - (dl/g)	1,1425	1,7325	3,6493
Rh - (nm)	10,038	9,237	27,256
Mark-Houwink a	0,755	0,825	0,585
Mark-Houwink logK	-3,549	-3,473	-2,646
RI Area (mvml)	97,29	161,72	101,15
RALS Area (mvml)	22,01	31,66	120,29
DP Area (mvml)	83,26	138,71	285,24
Sample Conc (mg/ml)	1	1	1



P(VP-co-AA) 1



P(VP-co-AA) 2



P(VP-co-AA) 3

Şekil 5. 35 Termal yöntemle sentezlenen kompozisyon olarak 3 farklı mol yüzdesine sahip VP/AA kopolimerlerine ait FTIR Spektrumları

Çizelge 5.3 Kopolimer içinde yer alan AA ve VP kompozisyonu

Kopolimer	Kopolimer içindeki AA % mol oranı	Kopolimer içindeki VP % mol oranı
P(VP-co-AA) 1	50	50
P(VP-co-AA) 2	66,6	33,3
P(VP-co-AA) 3	25	75

Polivinilpirolidon (PVP) FTIR Analiz Sonuçları:

1100–1200 cm^{-1} C–N absorpsiyon bandı

2900 cm^{-1} C–H gerilme titreşimleri

1703 cm^{-1} C=O gerilme bandı piki

1436 cm^{-1} pirolidone halkasında bulunan C–C' a ait gerilme bandı [87, 88].

Poliakrilik asit (PAA) FTIR Analiz Sonuçları:

3000–3500 cm^{-1} ; 2500-2700 cm^{-1} O–H bandı

2900 cm^{-1} C–H gerilme titreşimleri

1485, 1396 ve 1700 cm^{-1} COOH [88].

Poli(N-vinilpirolidon-co-akrilik asit) (P(VP-co-AA)) FTIR Analiz Sonuçları:

1340-1470 cm^{-1} zincirdeki –CH₂– grupları

690-900 cm^{-1} aromatik halkadaki C-H ait kuvvetli bant

1700, 1485 cm^{-1} siklik gruplarda bulunan C=O bağı

1690-1760 cm^{-1} karboksilik grubuna ait C=O bağı

1050-1300 cm^{-1} karboksilik asitteki C-O

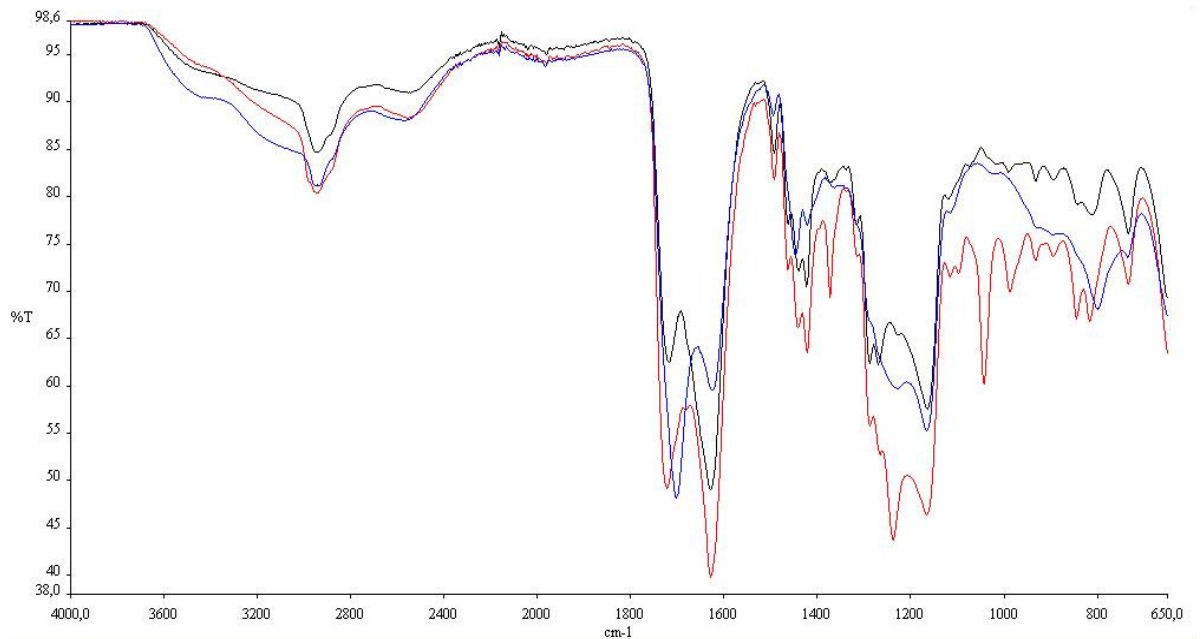
1422, 1442 cm^{-1} pirolidon halkasındaki (C–C) gerilme bandı

1180-1360 cm^{-1} vinil pirolidonda yer alan C–N absorpsiyon bandı

Poly(n-vinilpirolidon-co-akrilik asit) oluşumunu tespit edebilmek için bir spektroskopik karakterizasyon olan FTIR analizi sentezlenen tüm kopolimerler için yapıldı. P(VP-co-AA) kopolimeri içerisinde yer alan her iki bileşene ait bantlar FTIR spektrumunda görülmektedir. Sentezlenen VP/AA kopolimerlerinde yer alan bağ ve grupların kopolimerde olması gereken bant karakteristiğiyle birebir örtüştüğü FTIR analizlerinde

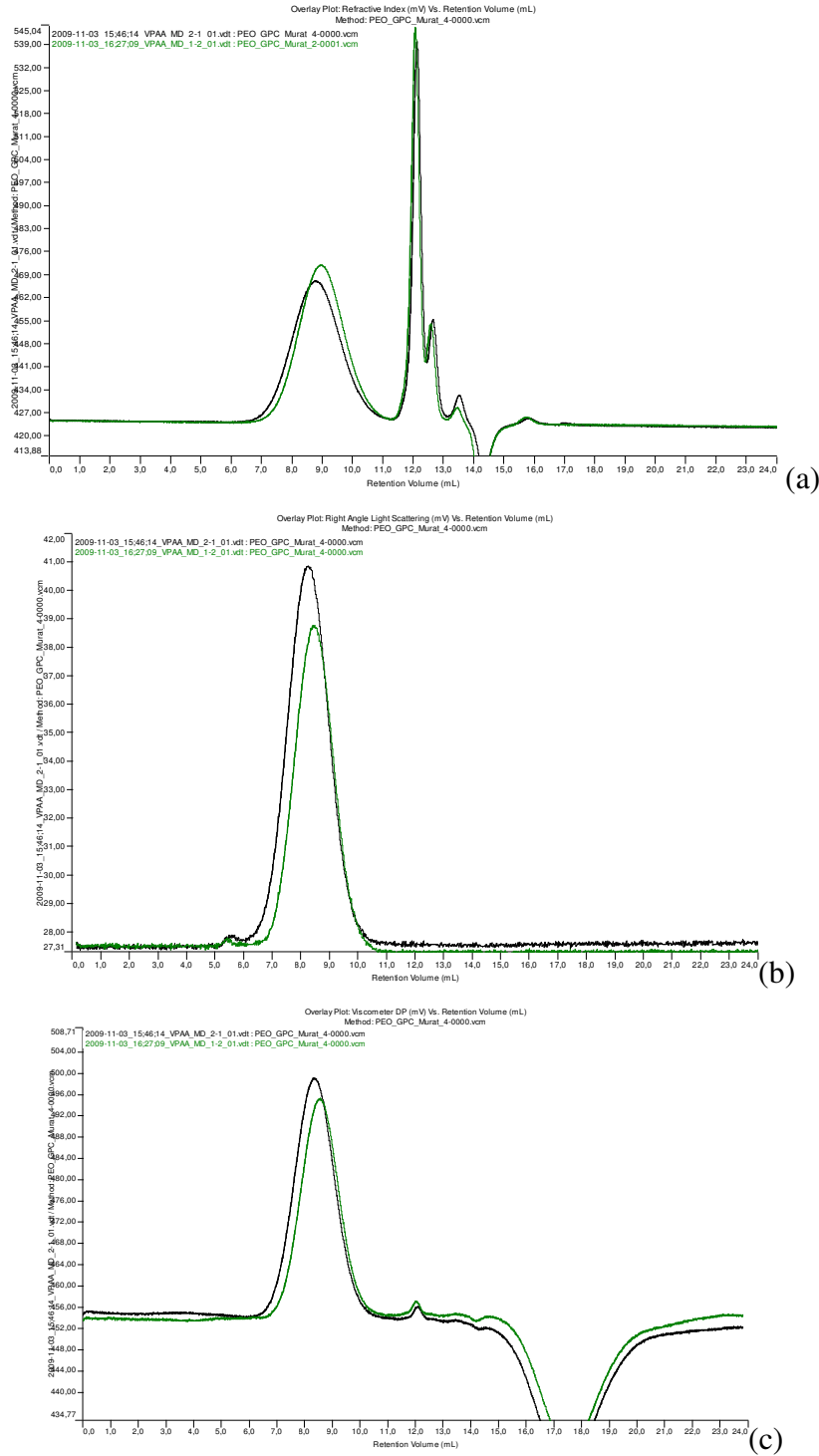
tespit edilerek yukarıda listelenmiştir. Bu sonuçlar AA monomerinin VP monomeri ile kopolimerleşmenin gerçekleştiğini göstermektedir. Şekil 5.35 ve 5.36' da 3 farklı mol oranlarında sentezlenen kopolimerlere ait FTIR spektrumu görülmektedir. 1690-1760 cm^{-1} , 1180-1360 cm^{-1} , 1422 ve 1442 cm^{-1} ' de oluşan pikler kopolimerizasyonun gerçekleştiğini kanıtlayan en önemli piklerdir.

Karboksilik gruplarında yer alan C=O' a ait pikler 1703 cm^{-1} , 1717 cm^{-1} ve 1722 cm^{-1} ' de görülürken, pirlidon halkasında yer alan C-C' a ait pikler 1422 cm^{-1} ve 1442 cm^{-1} ' de görülmektedir. Kopolimer içerisindeki VP yüzdesi arttıkça 1422 ve 1442 cm^{-1} ' de görülen pik de artış göstermektedir.



Şekil 5. 36 Termal yöntemle sentezlenen farklı mol yüzdelere sahip VP/AA (VP:AA=1:1; VP:AA=2:1; VP:AA=1:3) kopolimerlerine ait FTIR Spektrumları Çakıştırma

5.4.2 Mikro Dalga Enerjisi Kullanılarak Sentezlenen VP/AA Kopolimerlerine Ait Deney Sonuçları



Şekil 5. 37 Mikro Dalga enerjisi kullanılarak sentezlenen, bileşenlerinin P(VP-co-AA) (2:1) ve P(VP-co-AA) (1:2) olduğu kopolimerlere ait GPC-Refraktif İndeks (a); Işık Saçılması (b); Viskozimetre (c) dedektörü Kromatogramları

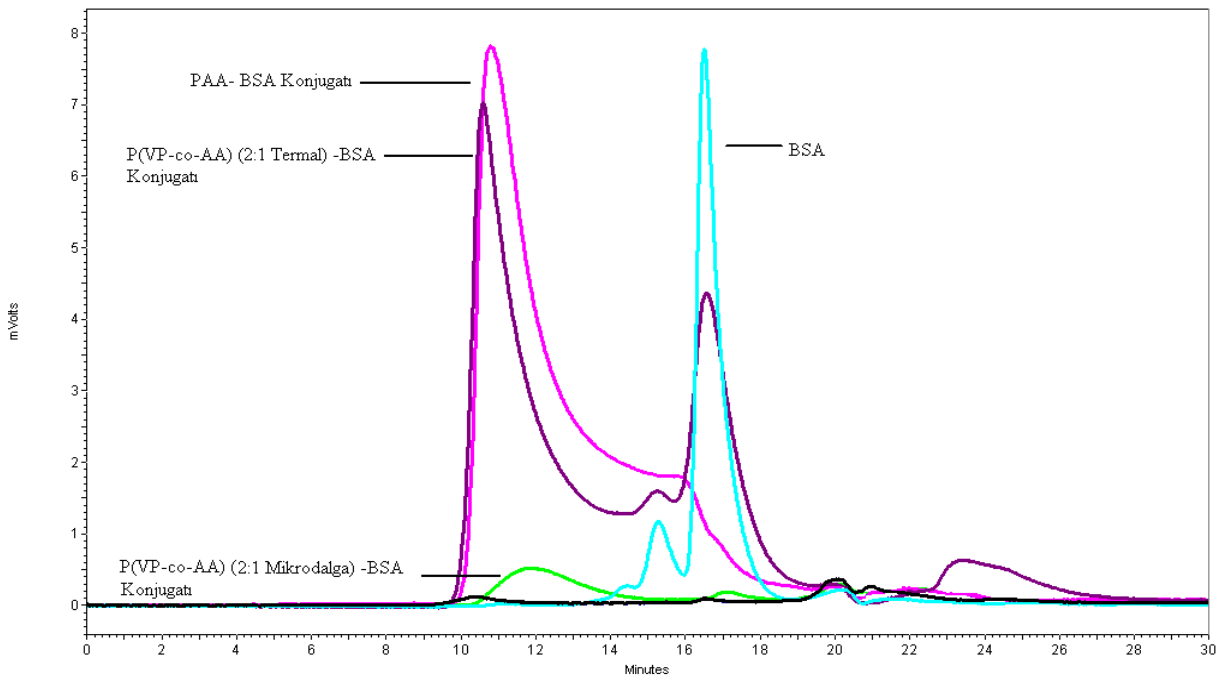
Çizelge 5.4' de mikrodalga enerjisi kullanılarak organik ortamda sentezlenen, bileşenlerinin VP:AA = 2:1 ve 1:2 olan kopolimerlerin molekül ağırlıkları Mn, Mw ve Mz cinsinden verilmektedir. Molekül ağırlığı tayini Viskotek cihazında yapılan analiz sonrası hesaplanmıştır. Şekil 5.37' de GPC-refraktif indeks, ışık saçılması ve viskozimetre dedektörlerine ait kromatogramlardan görüldüğü üzere sentezlenen her iki kopolimer de birbirine benzer karakterde pikler sergilemektedir. Sentezlenen kopolimerin ağırlıkları sırasıyla Mw= 63.019 ve 43.855 Da olarak bulunmuştur. Deneylerimizde kullanmak için bu iki kopolimerden, immünolojik çalışmalarda iyi sonuç vereceğine inandığımız daha yüksek molekül ağırlığa sahip olan kopolimeri seçtik. Çünkü daha yüksek molekül ağırlığına sahip olan P(VP-co-AA) (2:1)' nin canlı sistemde kalma süresi (prolongation) diğerine kıyasla daha uzun olacaktır. Böylelikle polimer üzerine bağlanacak antijenik özellikli molekülün canlı sistemdeki etkinliğini arttıracaktır.

Çizelge 5.4 Mikro Dalga Enerjisi Kullanılarak Sentezlenen VP/AA Kopolimerlerine Ait GPC ile Molekül Ağırlığı Tayini

	P(VP-co-AA) MD-2:1	P(VP-co-AA) MD-1:2
Peak RV - (ml)	8,768	8,925
Mn - (Daltons)	30.260	18.473
Mw - (Daltons)	63.019	43.855
Mz - (Daltons)	105.502	69.594
Mp - (Daltons)	52.029	37.433
Mw / Mn	2,083	2,374
IV - (dl/g)	0,6541	0,5646
Rh - (nm)	8,212	6,931
Mark-Houwink a	0,76	0,78
Mark-Houwink logK	-3,804	-3,846
RI Area - (mvml)	84,61	88,52
RALS Area - (mvml)	23,71	18,01
DP Area - (mvml)	79,23	67,78

PAA, termal yöntemle sentezlenen P(VP-co-AA) (2:1) ve mikrodalga yöntemiyle sentezlenen P(VP-co-AA) (2:1) polimerleri kullanılarak deneme amaçlı olarak BSA molekülü ile konjugasyon yapılmıştır (Şekil 5.38). Kullanılan polimerler birbiri ile kıyaslandığında içlerinde en verimli konjugasyon PAA ile gerçekleştirilen

konjugasyondur. Yüksek toksisiteye sahip PAA' yı kullanma nedenimiz, PAA ile gerçekleştirilen kovalent konjugasyon mekanizmasını ve PAA' nın canlı sistemdeki davranışlarını daha önceki çalışmalardan bilmemizdir. Petrov ve arkadaşları poliakrilikasidin (PAA) immun sistem üzerinde yüksek uyarıcı etkisini göstermiş ancak hazırlanan preparatlar yüksek toksisitesinden dolayı immunolojide geniş kullanım alanı bulamamıştır. Bu nedenle Rafikov ve arkadaşları PAA'in toksisitesini düşürmek için PAA'in N-Vinilpirolidon ile çeşitli oranlarda ve farklı molekül ağırlıklarında kopolimerlerini sentezleyerek bu kopolimerlerin de en az PAA kadar immun sistemde uyarıcı etkisi olduğunu göstermişlerdir [62].

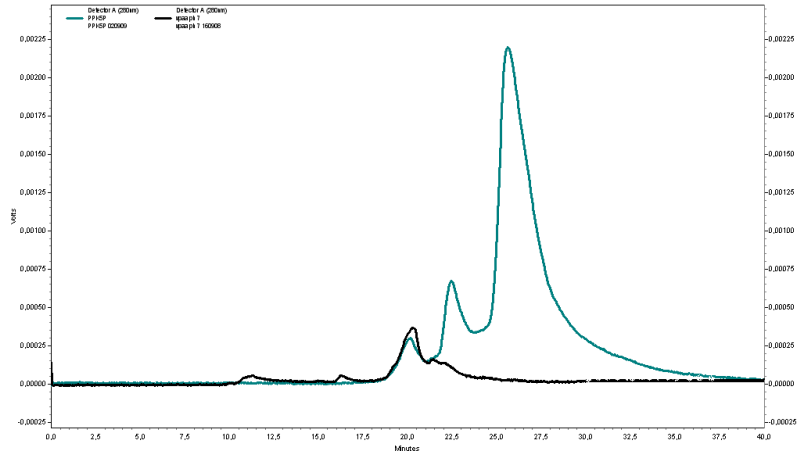


Şekil 5. 38 EDC ile konjugasyon yöntemi kullanılarak farklı polimerler ve BSA ile yapılan konjugatlara ait HPLC Kromatogramı

HPLC kromatogramından da görüldüğü gibi PAA-peptid konjugatı termal yöntemle sentezlenen P(VP-co-AA) ile yapılan konjugata oranla daha yüksek verimle sentezlenmiştir. P(VP-co-AA)(Termal) ile yapılan konjugat ise mikrodalga yöntemiyle sentezlenen P(VP-co-AA)-BSA konjugatına oranla çok daha yüksek verimlilikle sentezlenmiştir. Bu nedenle deneylerimizde mikrodalga yöntemi kullanılarak sentezlenen kopolimerler yerine klasik (termal) yöntemle monomerlerinin kopolimer içinde 2:1 kompozisyonunda olacak şekilde hesaplanarak sentezlenen ($M_w = 120000$ Da) P(VP-co-AA) polimerinin kullanılması tercih edildi.

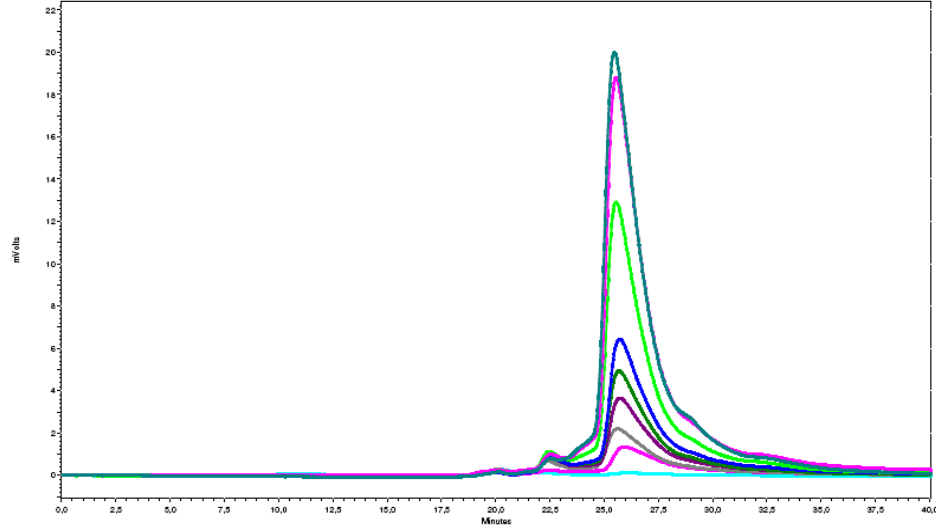
5.5 N-vinil-2-pirolidon-co-akrilik asit Polimeri (P(VP-co-AA)) Kullanarak Hazırlanan Fiziksel Karışım ve Konjugatlara Ait Analiz Sonuçları

Şekil 5.39’ da Mage-3 121-134 dizili peptide ve konjugasyon gerçekleştirilen P(VP-co-AA)’ ya ait HPLC spektrumları görülmektedir. P(VP-co-AA) tek başına, normal şartlarda 10. dakikada çok düşük UV’ ye sahip karakteristik bir pik göstermektedir. Mage-3 121-134 dizili peptid ise 26. dakikada karakteristik bir pik göstermektedir.



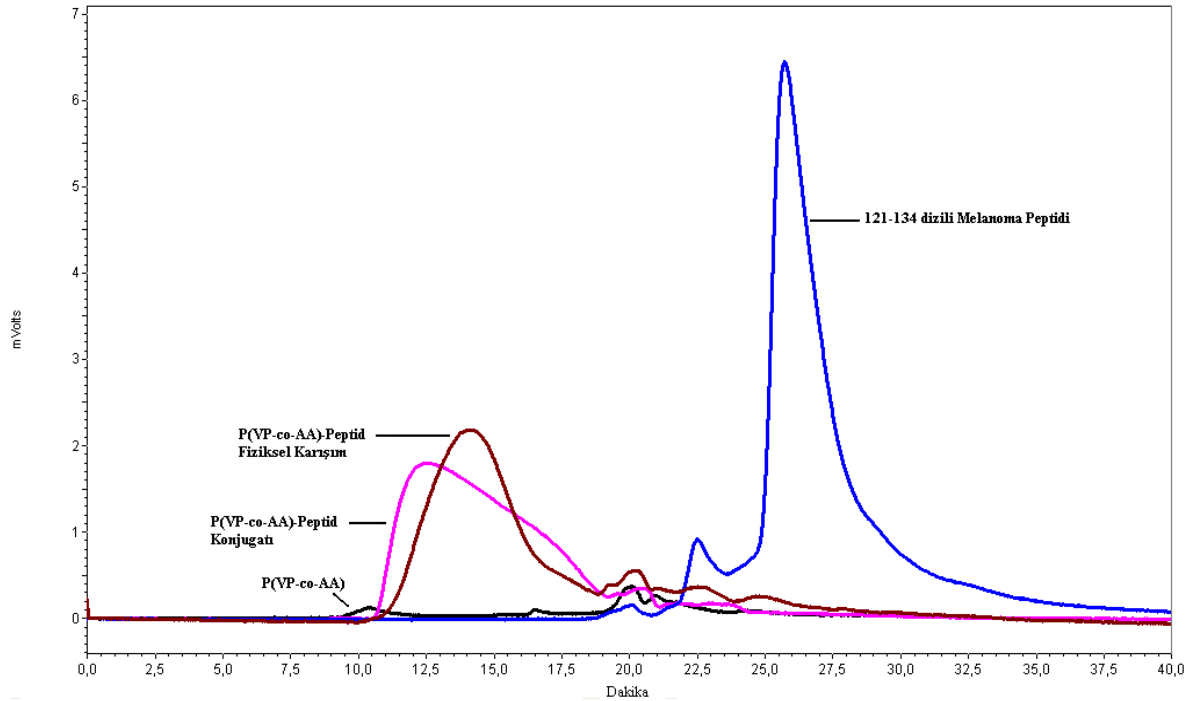
Şekil 5. 39 Melanoma Peptidi ve P(VP-co-AA) ait HPLC Kromatogramı

P(VP-co-AA) ve Mage-3 121-134 peptid dizisi arasında kurulan konjugatlarda kullanılan artan konsantrasyonlardaki peptidlere ait HPLC kromatogramı Şekil 5.40’ da verilmektedir. Peptid konsantrasyonu arttıkça piklerin UV şiddeti artmakta ve sergilediği karakteristik pikte hiçbir değişiklik oluşmamaktadır.



Şekil 5. 40 P(VP-co-AA)- Peptid konjugatlarında kullanılan artan miktarlardaki peptidlere ait HPLC kromatogramları

$n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 11$ oranı için karşılaştırma yapabilmek için P(VP-co-AA)-Peptid fiziksel karışım hazırlanmış ve P(VP-co-AA)-Peptid konjugatı sentezlenmiştir. Fiziksel karışım ve komplekse ait HPLC Spektrumları Şekil 5.41' de verilmiştir.



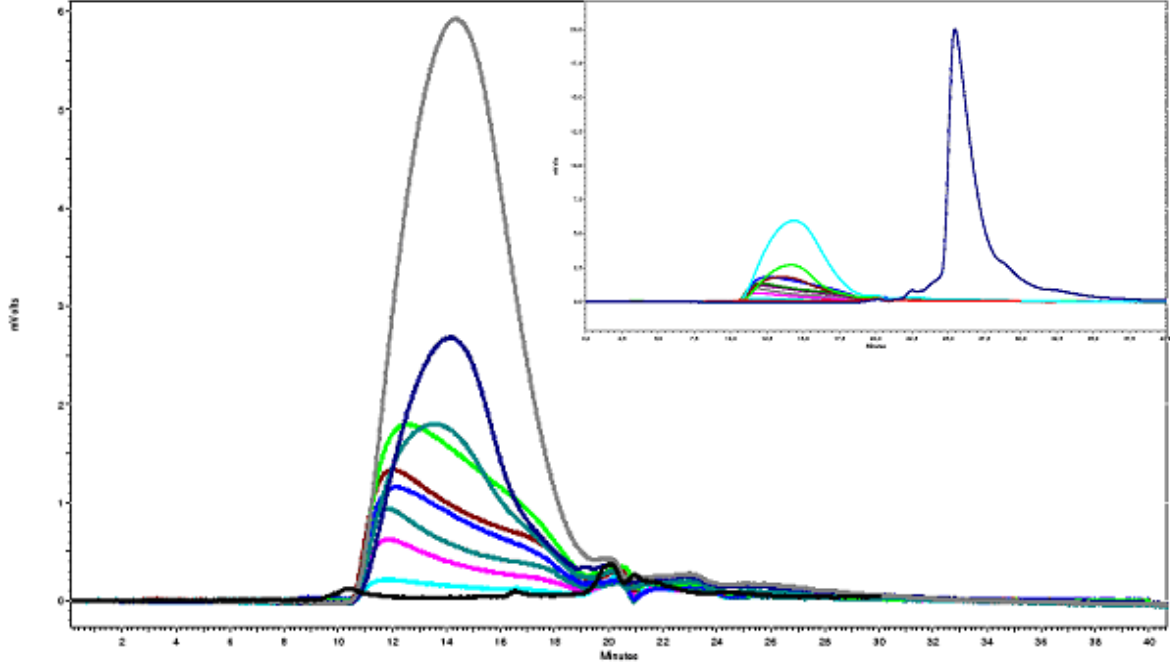
Şekil 5. 41 P(VP-co-AA)-Peptid Fiziksel Karışımı ile P(VP-co-AA)-Peptid Konjugatına ait Karşılaştırmalı HPLC Kromatogramı

Kromatogramdan da görüldüğü gibi elektrostatik etkileşimle meydana gelen P(VP-co-AA)-Peptid kompleksi ile EDC varlığında konjugasyon yoluyla sentezlenen P(VP-co-AA)-Peptid konjugatı farklı pik karakteristiği sergilemektedir.

$n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 1, 3, 5, 7, 9, 11, 19, 27, 30$ oranları için gereken miktarlarda peptid ile P(VP-co-AA) PBS tamponunda (toplam hacim 6 mL olacak şekilde) çözünmüş sonrasında ve çözeltilerin pH' ları sırasıyla 6,88 ve 3,5 olarak ölçülmüştür. Daha sonra damla damla HCl eklenerek pH 5'e düşürülmüş, çözeltiler 30 dk karıştıktan sonra peptid çözeltisi polimer çözeltisi üzerine eklenmiştir. Bu pH değerinde ortama EDC eklenerek karışımdaki karboksil gruplarının bir gece aktivasyonu yapılmış ve ertesi güne kadar örnekler soğuk odada karışıma bırakılmıştır. 12 saat karışımdan sonra örneklerin pH değeri damla damla NaOH eklenerek 7'ye yükseltilmiştir. Analiz öncesinde örnekler oda sıcaklığında, pH=7'de konjugasyon için 2 saat karıştırılmıştır. Elde edilen konjugatlar HPLC, Floresans, Viscotek ve Zeta Sizer cihazları ile analiz edilmiştir.

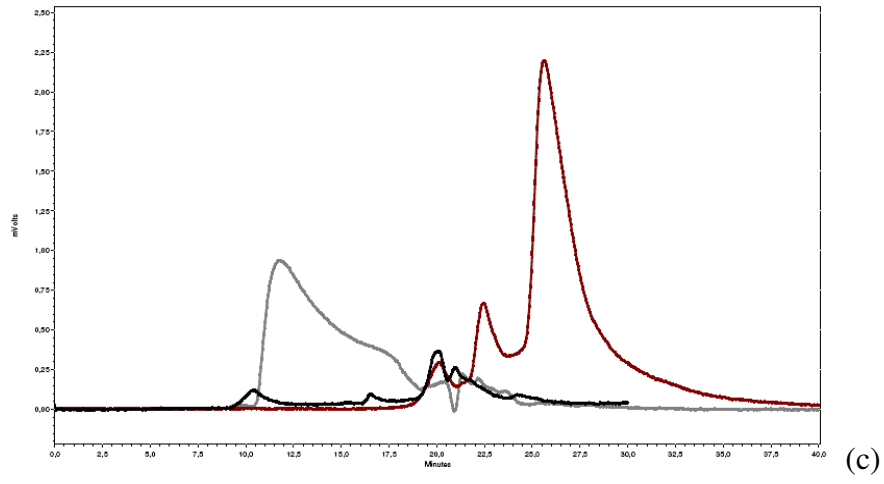
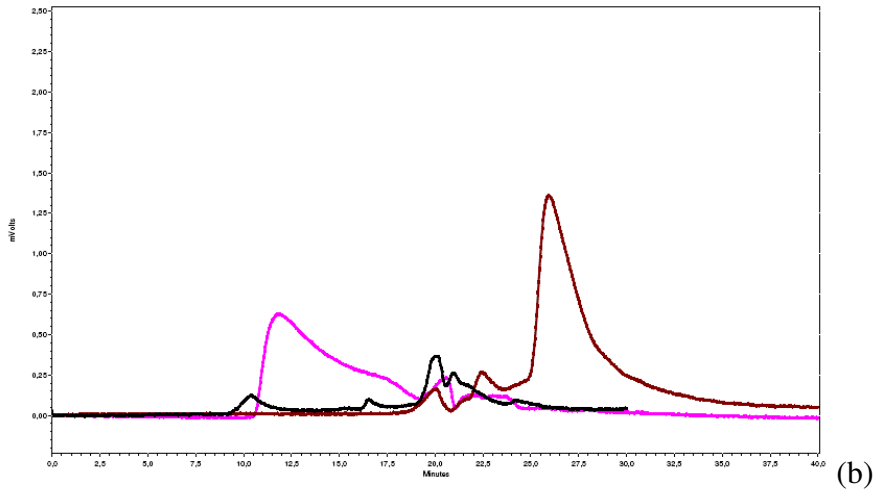
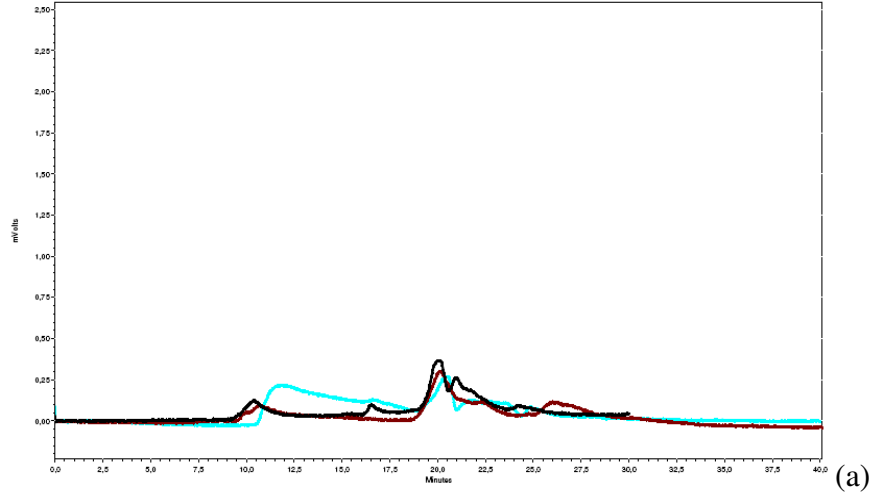
Sentezlenen konjugatlara ait HPLC kromatogramı Şekil 5.42, 5.43, 5.44, 5.45' de, Floresans spektrumu Şekil 5.49' da, zeta sizer cihazından alınan boyut analizlerine ait grafikler Şekil 5.51, 5.52 ve 5.53' de verilmiştir.

P(VP-co-AA)-peptid konjugatlarına, serbest peptide ve P(VP-co-AA)'ye ait kromatogramlar toplu olarak Şekil 5.42' de yakınlştırılmış olarak görülmektedir. Kromatogramdan da görüldüğü gibi $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=11$ oranına kadar ortamda peptid konsantrasyonu arttıkça peptid- P(VP-co-AA) konjugatlarına ait pikler artış göstermekte fakat $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=11$ 'den sonra konjugat karakterinde değişiklik gözlenmektedir. Bu karakter değişikliğini piklerde meydana gelen farklılaşmadan tespit edebiliriz. $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=19$ ' dan sonra ortamda peptid konsantrasyonu arttıkça peptid- P(VP-co-AA) konjugatlarına ait pikler artış göstermekte ve konjugasyona katılmadan ortamda serbest kalan peptid olmadığı Şekil 5.43, 5.44 ve 5.45' de daha da net görülmektedir.

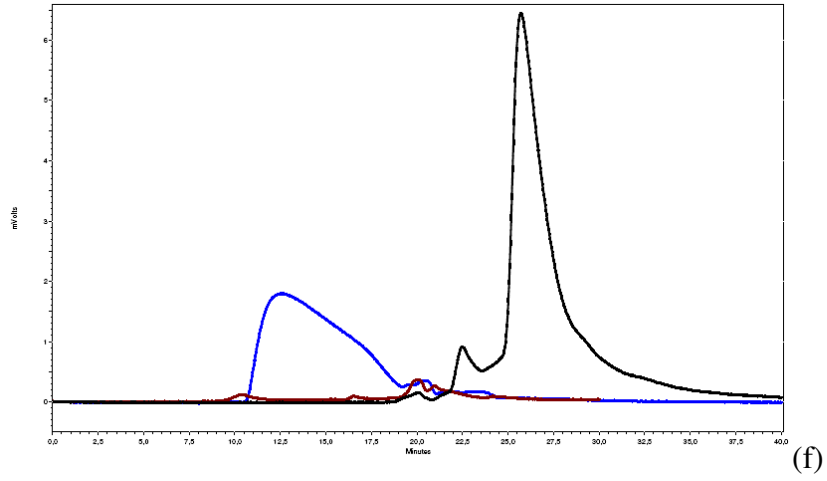
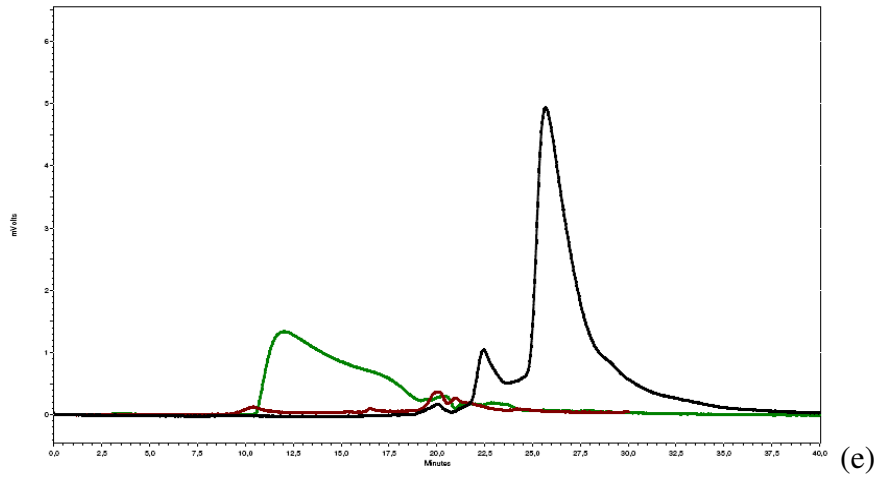
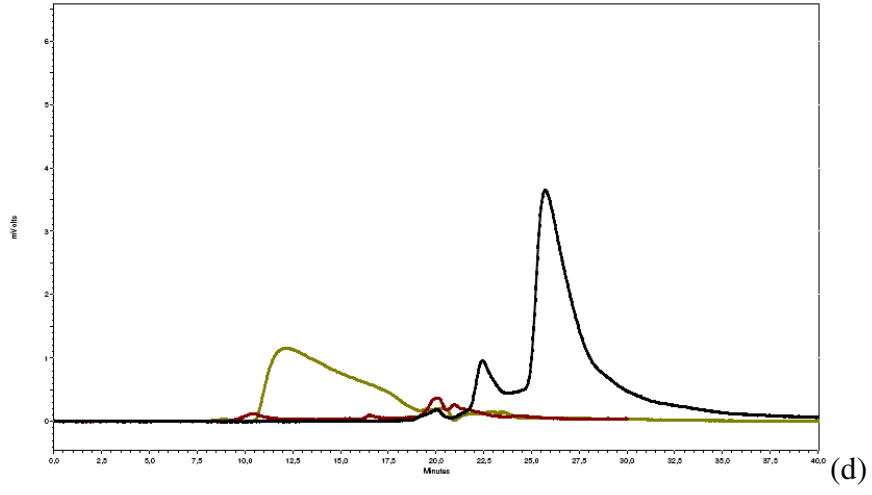


Şekil 5. 42 Artan oranlarda ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=1$, $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=3$, $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=5$, $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=7$, $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=9$, $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=11$, $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=19$, $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=27$, $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}=30$) P(VP-co-AA)-Peptid konjugatlarına ait HPLC kromatogramlarının yakından görünümü.

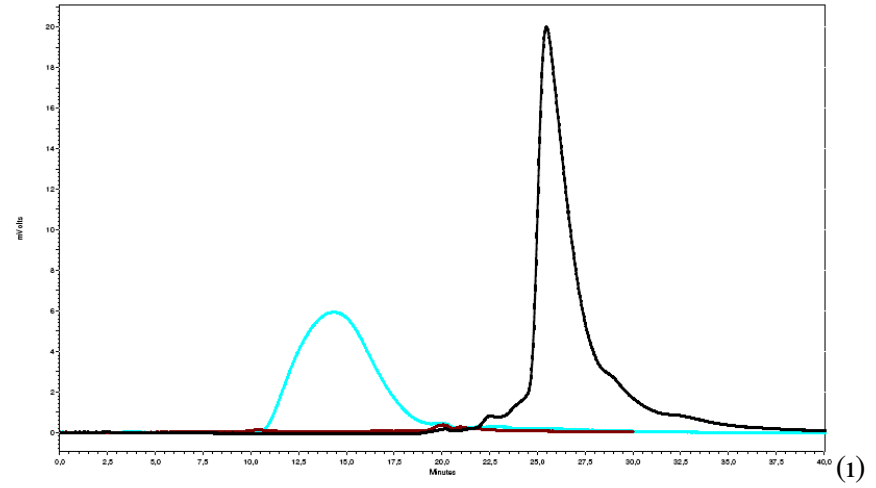
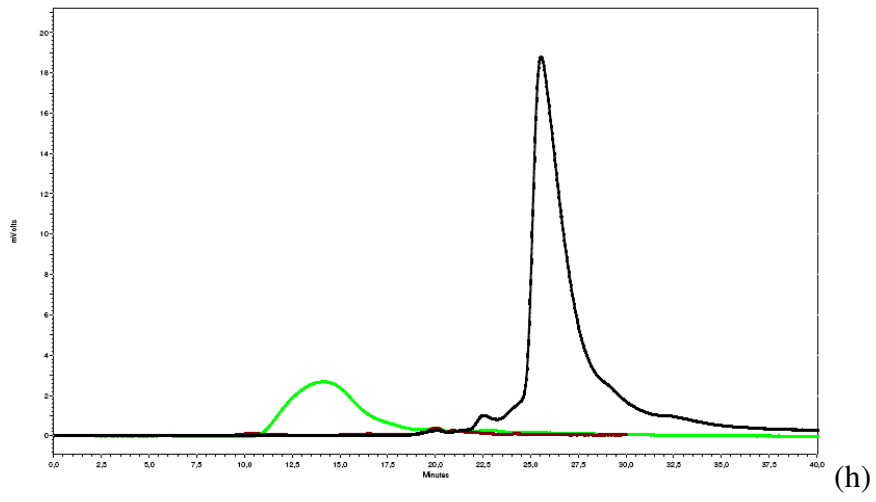
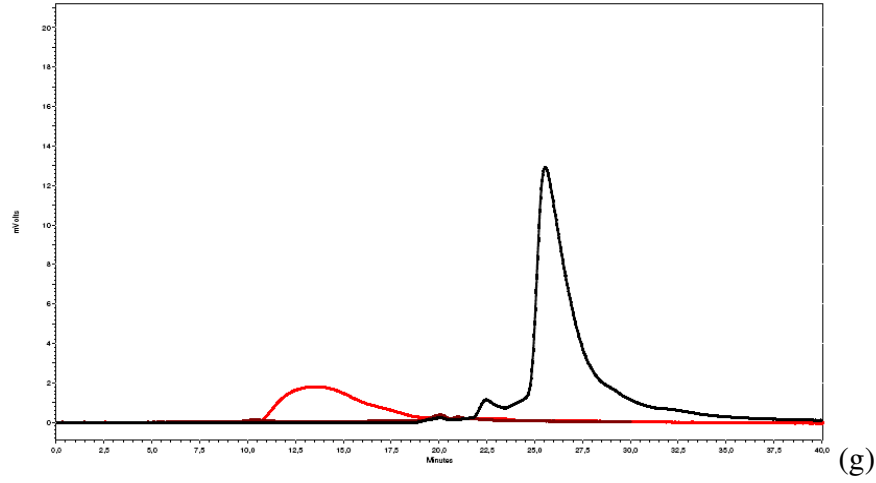
Viscotek cihazının UV dedektöründen alınan sonuçlar HPLC analizlerinden elde edilen kromatogramlarla kısmen örtüşmektedir. Fakat HPLC cihazından alınan sonuçlar kadar net bir şekilde gözlenememiştir. Bunun nedeni tek bir dedektöre sahip olan HPLC cihazının UV dedektörünün, 4 dedektörlü Viskotek cihazının UV dedektöründen daha hassas olmasıdır. Genel olarak bakıldığında PAA ile yapılan konjugatlara nazaran P(VP-co-AA) ile yapılan konjugatların kolonlu sistemde görüntülenmesi daha zor olmuştur. Kopolimerin homopolimere kıyasla daha jelimsi bir yapısı olması ve sentezlenen konjugatların analiz öncesi tek kullanımlık 0,2 μm 'lik filtrelerle yapılan filtrasyon işleminde ya da sistemlerin kolonunda kaldığını düşündürmektedir. Çünkü filtrasyon işlemi uygulanmadan yapılan fluoresans ve zeta ölçümlerinde konjugatların varlığı tespit edilmiştir.



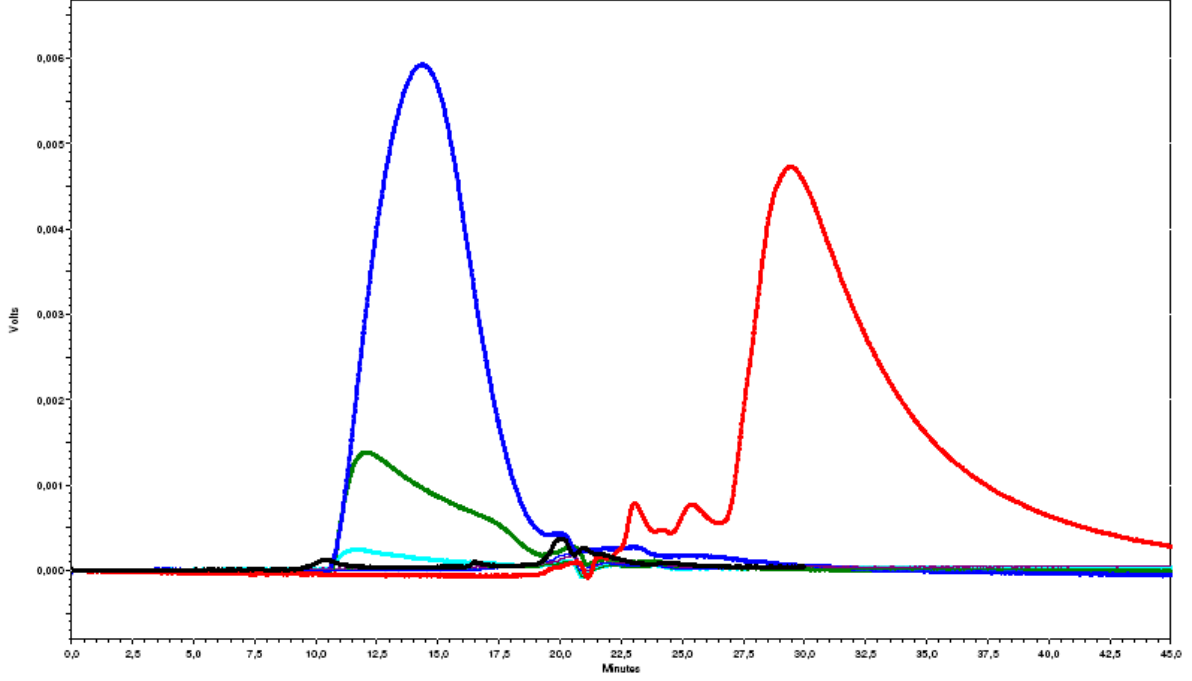
Şekil 5.43 $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 1$ (a), 3(b), 5(c) olan P(VP-co-AA)-Peptid konjugatlarına ait HPLC kromatogramı



Şekil 5. 44 $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 7$ (d), 9 (e), 11 (f) olan P(VP-co-AA)-Peptid konjugatlarına ait HPLC kromatogramı

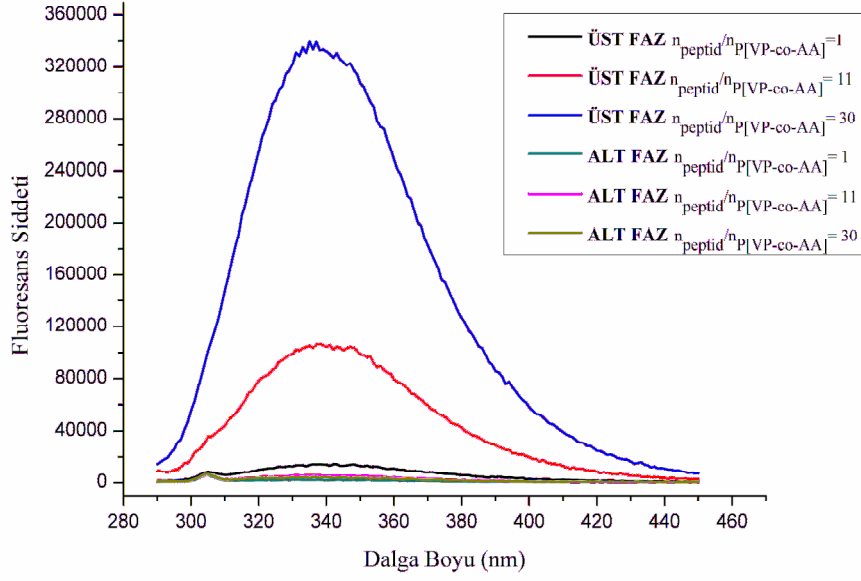


Şekil 5. 45 $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 19$ (g), 27 (h), 30 (i) olan P(VP-co-AA)-Peptid konjugatlarına ait HPLC kromatogramı



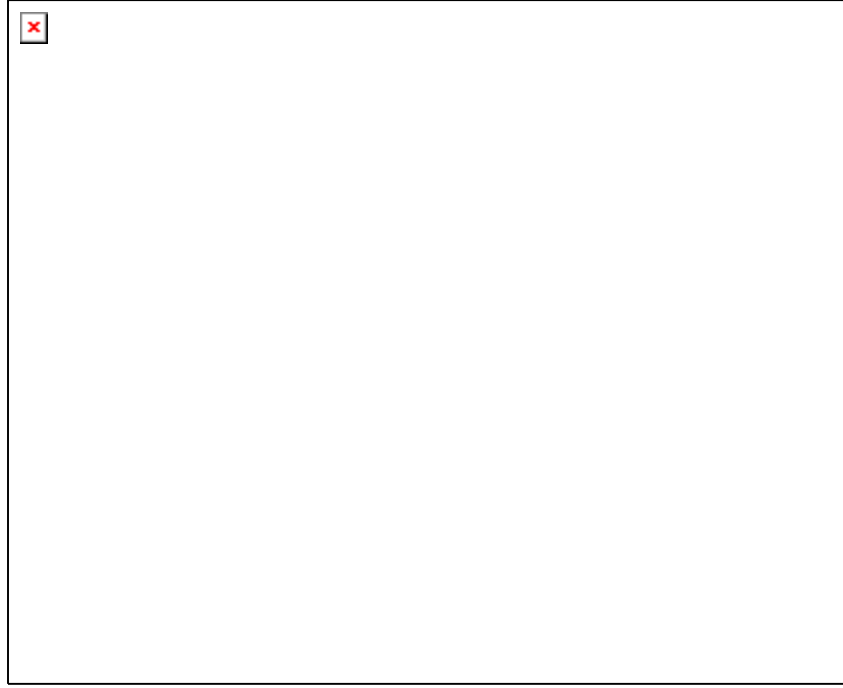
Şekil 5. 46 Membranlı tüp ile santrifüj sonrası, $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 1, 11, 30$ olan P(VP-co-AA)-Peptid konjugatlarına ait alt faz, üst faz, serbest peptid ve P(VP-co-AA) HPLC kromatogramı

Şekil 5.43, 5.44 ve 5.45’ de yer alan HPLC kromatogramlarında her bir P(VP-co-AA)-Peptid konjugatına, o konjugasyonda kullanılan peptide ve kopolimere ait pikler ayrı ayrı verilmektedir. Oluşan konjugatlara ait büyüklüklerin daha net anlaşılabilmesi için, kromatogramlarda UV şiddetini gösteren y değeri eksenini sabit tutularak konjugatlara ait pikler karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir. $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 1$ ’ den başlanılarak $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 30$ oranına kadar mol oranı artırılmış fakat P(VP-co-AA)’nın peptid ile doyurulduğu bir oran olmamıştır. Sentezlenen $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 1, 3, 5, 7, 9, 11, 19, 27, 30$ konjugasyon oranlarının her biri için ortama eklenen tüm peptidin konjugasyona katıldığı görülmektedir. Bunu kanıtlayabilmek için sentezlenen bu örnekler membranlı santrifüj tüplerine konularak santrifüj edilmiş, alt ve üst fazlar tekrar analiz edilmiştir. Şekil 5.46’ de $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 1, 11$ ve 30 oranlarına ait HPLC kromatogramında ve Şekil 5.47’ de Floresans Spektrumunda örneklere ait alt fazlarda hiç peptid kalmadığı kanıtlanmıştır.

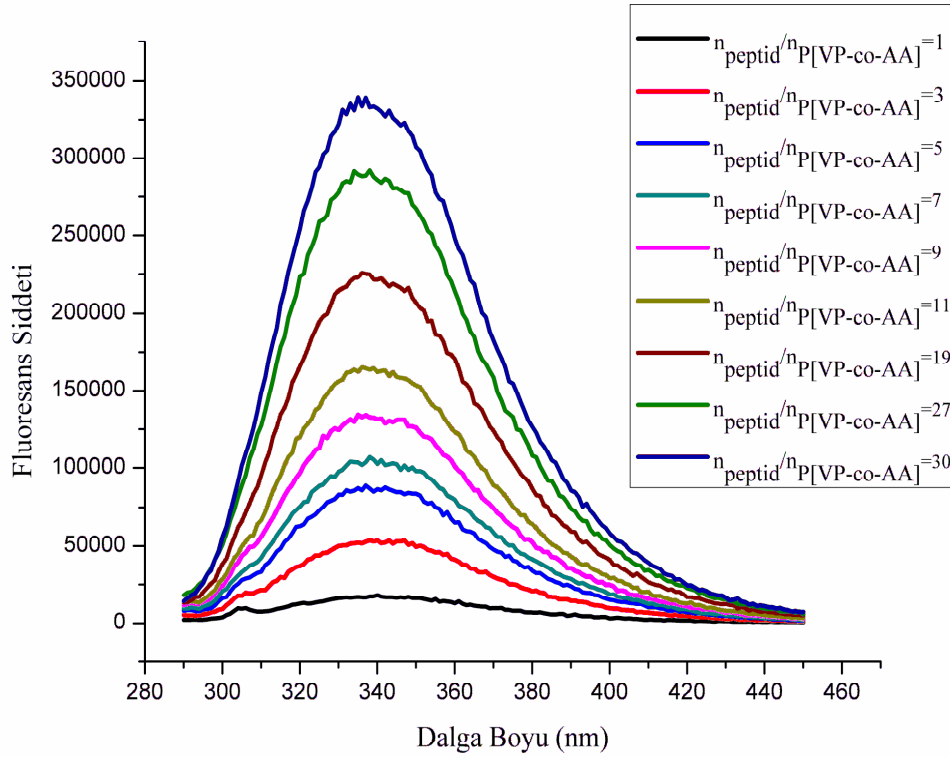


Şekil 5. 47 Membranlı tüp ile santrifüj sonrası, $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P[VP-co-AA]}} = 1, 11, 30$ olan P(VP-co-AA)-Peptid konjugatlarına ait alt faz, üst faz, serbest peptid ve P(VP-co-AA) Floresans Spektrumu

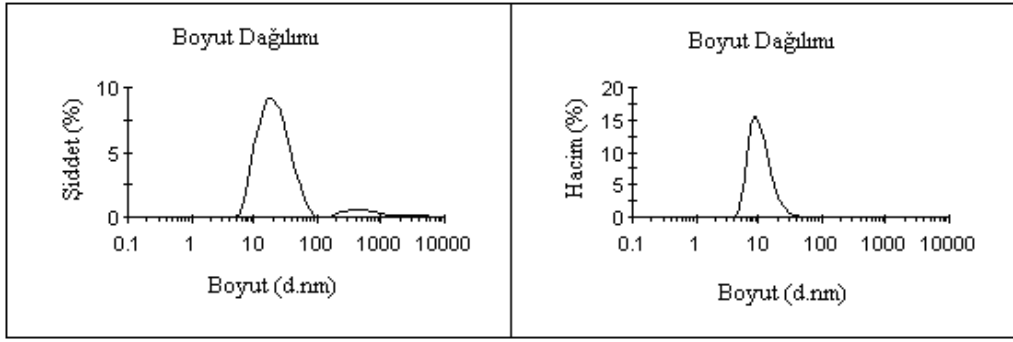
Şekil 5.48' de $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P[VP-co-AA]}} = 1, 3, 5, 7, 9, 11, 19, 27, 30$ oranlarında sentezlenen konjugatlarda kullanılan peptidlere ait floresans spektrumları verilmektedir. Spektrumlardan da görüldüğü gibi $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P[VP-co-AA]}}$ oranları için kullanılan peptidler için artan peptid konsantrasyonuna bağlı olarak floresans şiddeti artmaktadır fakat tüm peptidler için maksimum dalga boyu $\lambda_{\text{maksimum}} = 350 \text{ nm}$ ' dir. $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P[VP-co-AA]}} = 30$ olan en yüksek mol oranında dahil peptid içeren çözeltilerdeki peptidler kendi içinde hiçbir şekilde agregasyona gitmemiş ve aynı şekilde konjugasyona katılmıştır. $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P[VP-co-AA]}} = 1, 3, 5, 7, 9, 11, 19, 27$ ve 30 oranlarında sentezlenen konjugatlara ait floresans spektrumları Şekil 5.49' da verilmektedir. $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P[VP-co-AA]}} = 1, 3, 5, 7, 9, 11, 19, 27$ ve 30 oranları için sentezlenen konjugatlara ait spektrumlarda artan peptid/polimer mol oranına bağlı olarak floresans şiddetleri artmaktadır. $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P[VP-co-AA]}} = 1$ 'den başlanarak artan oranlara bakıldığında konjugatların $\lambda_{\text{maksimum}}$ 'larında gözlenen mavi bölgeye doğru kayma, $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P[VP-co-AA]}} = 19, 27, 30$ oranlarında net bir şekilde gözlenen floresans şiddetindeki azalma, konjugasyon sonucu peptidin N-ucunda yer alan Trp'ın sudan uzaklaştığını ve hidrofobik ortama çekildiğini göstermektedir. Yani P(VP-coAA) molekülleri ile peptid moleküllerinin bağlanması sonucu triptofanil uçlarının daha içeride kalmaktadır.



Şekil 5. 48 P(VP-co-AA)-Peptid konjugatlarında kullanılan artan miktarlardaki peptidlere ait Floresans Spektrumları

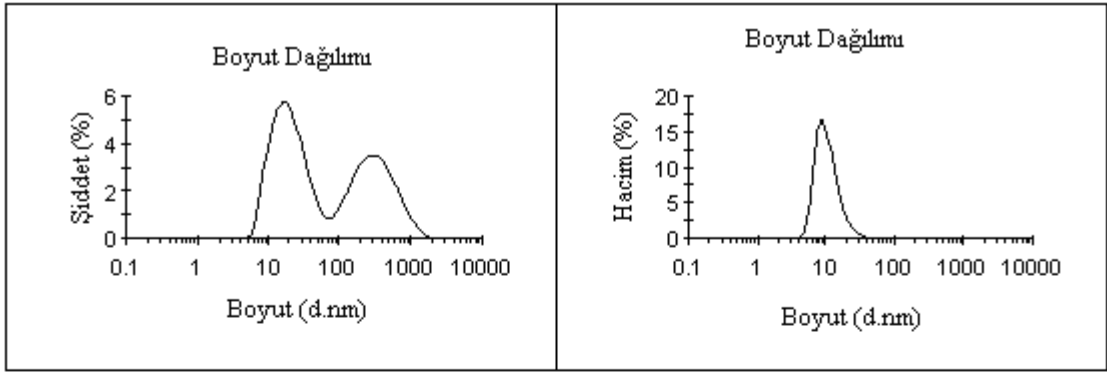


Şekil 5. 49 Artan oranlarda ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{P[VP-co-AA]}}$) P(VP-co-AA)-Peptid konjugatlarına ait Floresans Spektrumları

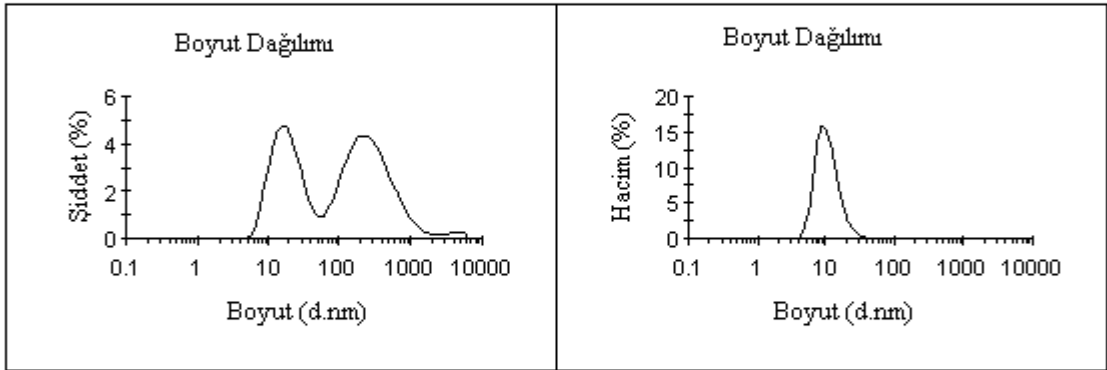


Şekil 5.50 Deneylede Kullanılan VP/AA Kopolimerlerine Ait Zeta Sizer Sonucu

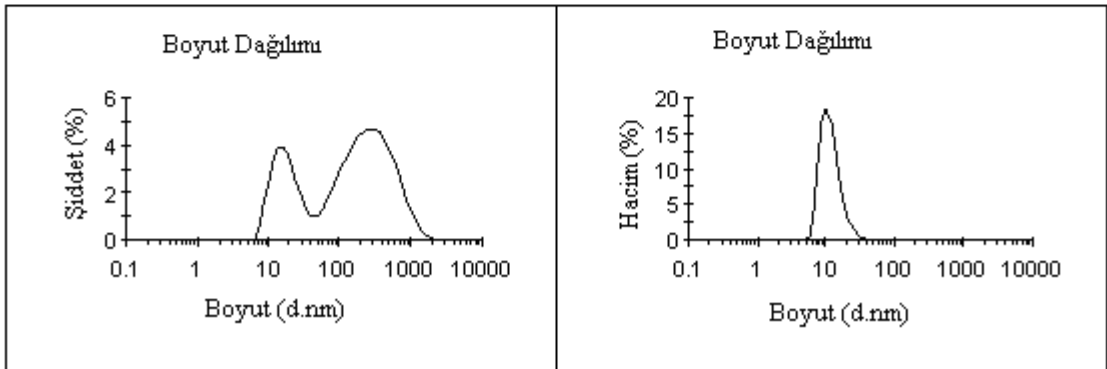
Şekil 5.50, 5.51, 5.52 ve 5.53' de $\text{pH} = 7.0$ değerinde $\text{P}(\text{VP-co-AA})$ ve polimer-peptid sistemlerinin $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P}(\text{VP-co-AA})} = 1, 3, 5, 7, 9, 11, 19, 27, 30$ olmak üzere farklı oranlarındaki ışığın saçılma şiddetine karşılık boyut dağılımları ve Zeta Potansiyel ölçüm sonuçları, konjugat oluşumunun bazı önemli özellikleri hakkında bilgi vermiştir. Konjugat partiküllerin boyut dağılımları, peptid miktarına bağlı olarak değişmektedir. Hiçbir oranda, serbest peptide karşılık gelen 1 nm civarında bir pik görülmemektedir. $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P}(\text{VP-co-AA})} = 1$ ile başlayan boyut değerleri, serbest $\text{P}(\text{VP-co-AA})$ 'ya göre farklılık göstermektedir. Buna göre diyebiliriz ki, oran arttıkça eklenen tüm peptid, kopolimer ile konjugat oluşturmaktadır.



(a)

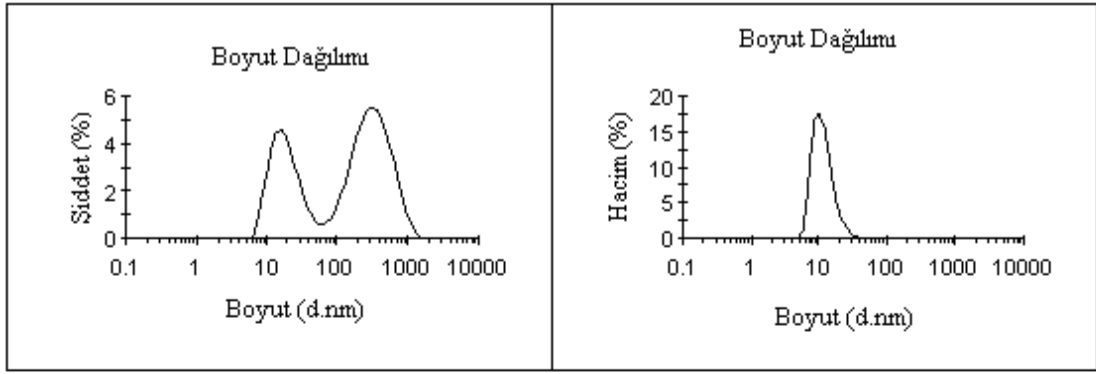


(b)

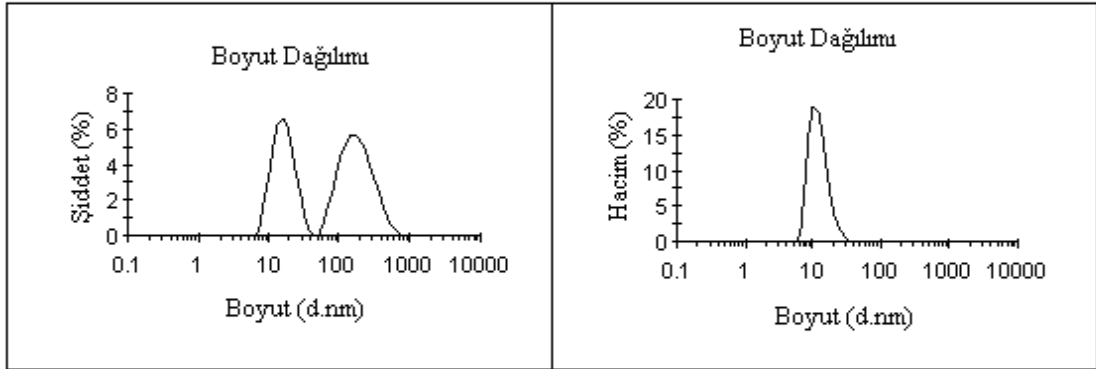


(c)

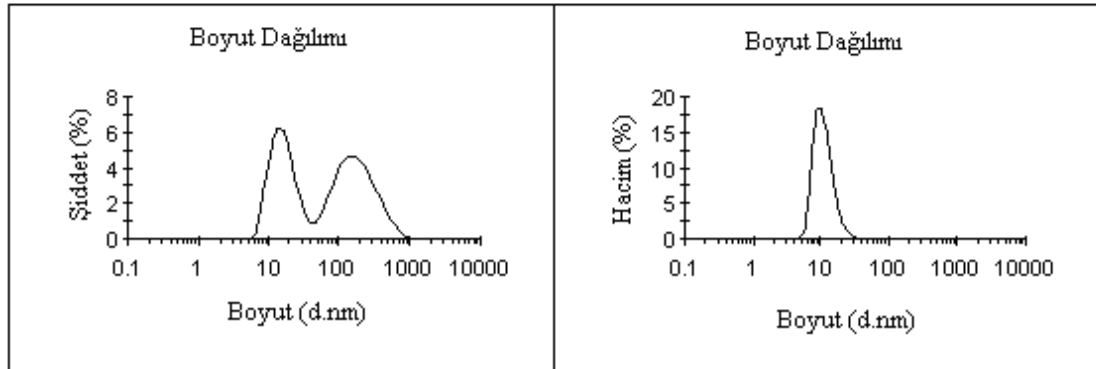
Şekil 5. 51 npeptid/n P(VP-co-AA) = 1, 3 ve 5 oranlarındaki P(VP-co-AA)-Peptid konjugatlarına ait boyut dağılımı şiddet ve yoğunluk grafikleri



(d)

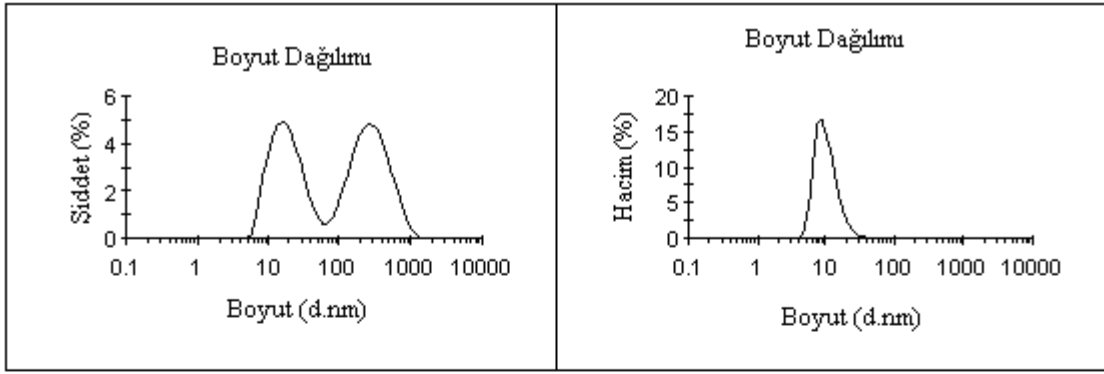


(e)

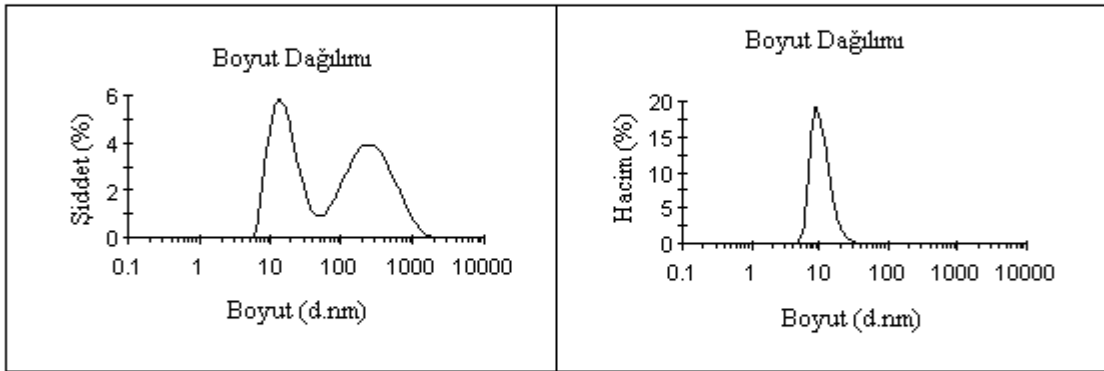


(f)

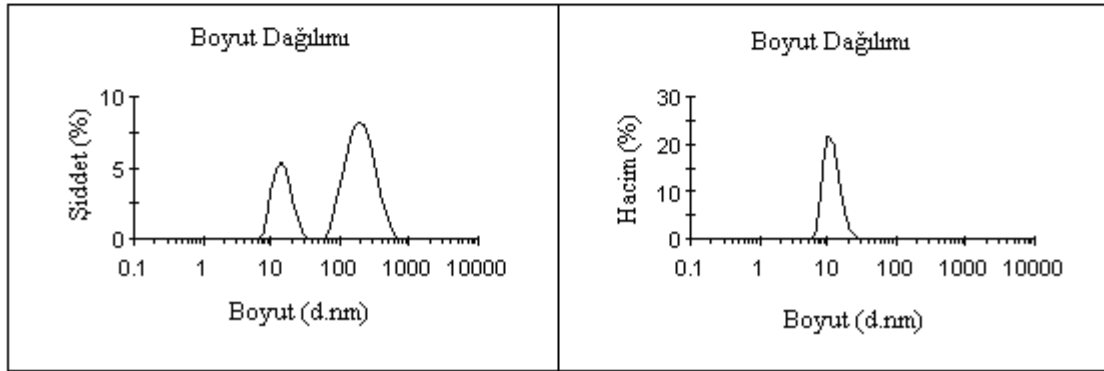
Şekil 5. 52 $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 7, 9$ ve 11 oranlarındaki P(VP-co-AA)-Peptid konjugatlarına ait boyut dağılımı şiddet ve yoğunluk grafikleri



(g)



(h)



(i)

Şekil 5. 53 $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 19, 27$ ve 30 oranlarındaki P(VP-co-AA)-Peptid konjugatlarına ait boyut dağılımı şiddet ve yoğunluk grafikleri

5.6 Hücre Kültür Çalışmaları

5.6.1 Fiziksel Kompleks ve Biyokonjugatlarda kullanılan P(VP-co-AA) Kopolimerinin MCF-7 Kanser Hücre Çoğalması Üzerine olan İn Vitro Etkilerinin İncelenmesi

İlk Mosmann tarafından tanımlanan ve daha sonra Alley ve arkadaşları tarafından geliştirilen 3-(4,5-dimetil triazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromid (MTT) yöntemi hücre canlılığının belirlenmesi için sıkça kullanılan pratik bir yöntemdir [89, 90]. MTT hücrelere aktif olarak absorbe olan ve mitokondriye bağlı bir reaksiyon ile renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenen bir maddedir [89]. Hücrelerin MTT indirgeme özelliği hücre canlılığının ölçütü olarak alınır ve MTT analizi sonucunda elde edilen boya yoğunluğu canlı hücre sayısı ile korelasyon gösterir [91].

5.6.2 MTT Deneyinin Hazırlanması

Her bir kuyucuğa 1×10^4 hücre düşecek şekilde 96 kuyulu kültür kaplarına ekim yapıldı ve 24 saat inkübe edildikten sonra ilaç uygulamasına alındı. Serbest VP/AA kopolimeri 1; 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1; 0,05 mg/ml oranlarında besi ortamına eklendi. İlaç uygulanmış her bir kuyucuktan elde edilen optik yoğunluk 540 nm'de okundu.

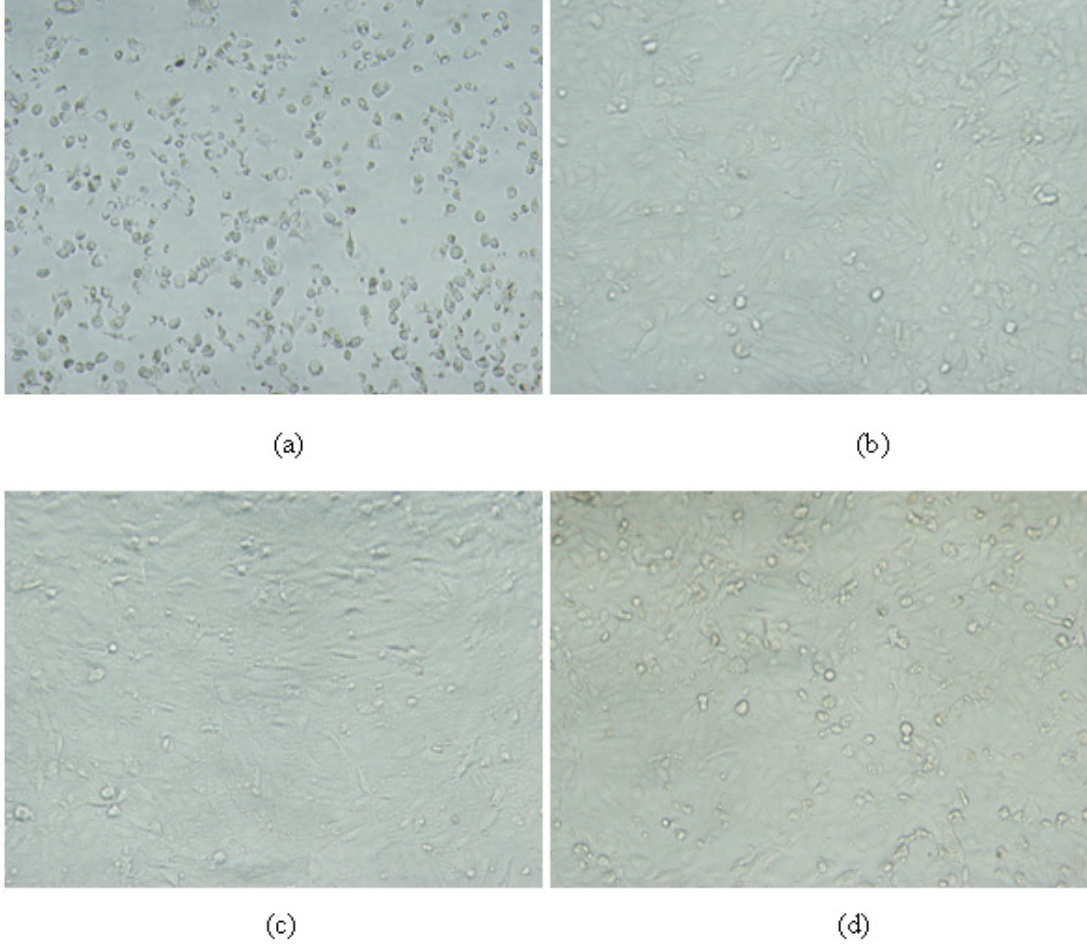
P(VP-co-AA)-Peptid fiziksel kompleks ve biyokonjugatlarında kullanılan VP/AA kopolimerinin hücre çoğalması üzerine olan etkisi *in vitro* olarak değerlendirildi. Bölümümüzün 'Hücre Kültür laboratuvar'ında, bu laboratuvar sorumluları tarafından yapıldı.

5.6.3 Farklı Konsantrasyonlardaki VP/AA Kopolimerin (2:1; Mw 120.000) MCF-7 Hücreleri Üzerinde Etkisi

Bu mikropalak kültür deneyinde ise VP/AA kopolimerinin değişik konsantrasyonlarının (1; 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1; 0,05 mg/ml) MCF 7 hücreleri üzerinde etkisi incelendi.

5.6.3.1 Morfolojik İnceleme

VP/AA kopolimerinin MCF 7 hücrelerine ilave edilmesinden ardından inkübatöre kaldırılan mikrolpaka kuyucuklarındaki hücrelerin durumu 48 saat sonra mikroskopik olarak incelendi.



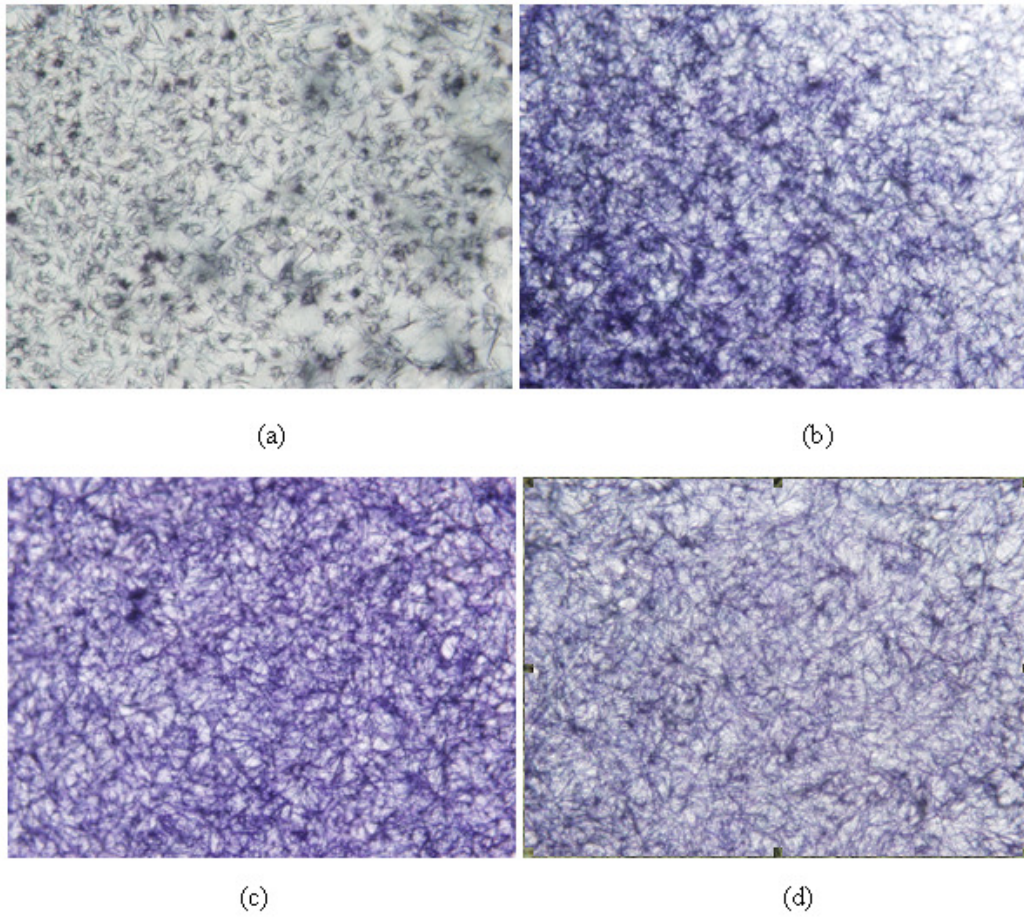
Şekil 5. 54 VP/AA kopolimerinin 48 saatlik inkübasyonu sonucu MCF 7 hücrelerinde oluşturduğu morfolojik değişimlerin mikroskopik incelenmesi (20x); (a) 1 mg/ml (b) 0,5 mg/ml (c) 0,1 mg/ml (d) Kontrol

Yapılan mikrolpaka kültür deneyinde Serbest VP/AA kopolimeri 1; 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1; 0,05 mg/ml konsantrasyonlarının 1 mg/ml olan en yüksek konsantrasyonda hücreler morfolojik olarak değişmiş ve atipik form görülmüştür. 0,9; 0,8 ve 0,7 mg/ml' lik konsantrasyonlarda da atipik morfoloji vardır. Fakat en yüksek konsantrasyona göre daha azdır. 0,6 mg/ml ve bundan aşağıdaki konsantrasyonlarda morfoloji kontrol ile aynı durumdadır.

5.6.4 Farklı Konsantrasyonlardaki VP/AA Kopolimerin (66:33; Mw 120.000) MCF 7 Hücreleri Üzerindeki Toksik Etkisinin MTT Yöntemi Kullanılarak Tayini

5.6.4.1 Morfolojik İnceleme

MTT solüsyonundan tüm kuyucuklara eklendikten 24 sonra hücrelerin MTT ile etkileşmesi sonucu meydana getirdiği değişiklikler ve formazan kristal oluşumu ters mikroskopla incelenerek değerlendirildi. Mikroplaktaki kuyucuklarında formazan kristallerinin oluşturduğu renk değişimi mikropkaya okuyucuda 570 nm dalga boyunda ölçüldü.



Şekil 5. 55 VP/AA kopolimerinin 48 saatlik inkübasyonu sonucu MCF 7 hücrelerinde oluşturduğu formazan kristal oluşumunun mikroskopik incelenmesi (20x); (a) 1 mg/ml (b) 0,5 mg/ml (c) 0,1 mg/ml (d) Kontrol

MTT metodu sonrasında 1 mg/ml serbest VP/AA kopolimeri konsantrasyonu uygulanan kuyularda her alanda 50-100 hücre üzerinde formazan kristal oluşumu gözlenirken (kristal oluşmamış ölü hücre sayısı çok fazla), 0,9; 0,8 ve 0,7 mg/ml' lik konsantrasyonlarda da ölü hücre mevcuttur fakat en yüksek konsantrasyona göre daha azdır. Çünkü en yüksek konsantrasyona kıyasla daha fazla formazan kristali oluşumu gözlenmiştir. 0,6 mg/ml ve bundan aşağıdaki konsantrasyonlarda ise hücrelerin üzerinde oluşan formazan kristalleri kontrol kuyularına benzemektedir.

5.7 Hayvan Deneyleri

İmmünojenik ve aşı özelliği taşıyabilen suda çözünebilen peptid-BSA konjugatları ile peptid-polimer fiziksel kompleks ve biyokonjugatları pH 7’de sentezlenmiştir. Fiziksel kompleks ve biyokonjugat sentezinde P(VP-co-AA) kopolimeri ile Melanoma tümör hücresi üzerinde antijenik özellik taşıyan Mage-3 proteinini 121-134 aminoasit dizili peptid epitopları kullanılmıştır.

5.7.1 Peptid-polimer Fiziksel Komplekslerinin Hazırlanması

Sentetik P(VP-co-AA) ile Melanoma tümör hücresi Mage-3 proteininin sentetik peptid antijenlerini içeren $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}} = 32,25$ oranında fiziksel kompleksleri hazırlandı. Fiziksel kompleks 0.5 mg/0.5 ml ve 1 mg/0,5 ml Mage-3 proteininin 121-134 dizisini içerecek şekilde hazırlandı (Çizelge 5.5). Enjekte edilen örneklerde kullanılan 121-134 sentetik peptid dizisi, –N terminal ucunda triptofan amino asidi içerecek şekilde bölümümüz Peptid Sentez Laboratuvarında yer alan Liberty Peptid Sentez Cihazında (CEM) peptid sentez grubu ortaklığı ile tarafımızca sentezlenmiştir. Hazırlanan fiziksel kompleks 10.000 MW ayırma gücüne sahip poliethersulfon (PES) membranlı tüpte (Sartorius VIVASPIN) +4 °C’de 6000 rpm devirde 6 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpün üst kısmında kalan numune saflaştırma öncesi numune ile karşılaştırmalı olarak HPLC aletinde analizleri yapıldı. Safsızlıklarından arındırılan farelere enjeksiyonları yapılacak olan fiziksel kompleks liyofilizatör aletinde -80 °C’de kurutuldu. Toz haline getirilen fiziksel kompleks numuneleri 0.154 M NaCl çözeltisi içerisinde çözüldü ve farelere enjeksiyon için hazır duruma getirildi.

5.7.2 Peptid-polimer Biyokonjugatlarının Sentezi

P(VP-co-AA) ile 121-134 aminoasit dizili peptid epitopları arasında kovalent bağlanmaları sonucu oluşmaktadır. Konjugatlar 2 farklı yöntemle sentezlenmiştir.

YÖNTEM 1: Suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC) aktivatörü varlığında sentetik P(VP-co-AA) ile Melanoma tümör hücresi Mage-3 proteininin sentetik peptid antijenlerini içeren $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}} = 32,25$ oranında biyokonjugat hazırlandı. Biyokonjugat 1 mg/0,5 ml Mage-3 proteininin 121-134 dizisini içerecek şekilde hazırlandı (Çizelge 5.5). Enjekte edilen örneklerde kullanılan 121-134

sentetik peptid dizisi, –N terminal ucunda triptofan amino asidi içerecek şekilde bölümümüz Peptid Sentez Laboratuvarında yer alan Liberty Peptid Sentez Cihazında (CEM) tarafımızca sentezlenmiştir. Sentezlenen biyokonjugatlar 10.000 MW ayırma gücüne sahip poliethersulfon (PES) membranlı tüpte (Sartorius VIVASPIN) +4 C°de 6000 rpm devirde 6 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpün üst kısmında kalan numune saflaştırma öncesi numune ile karşılaştırmalı olarak HPLC aletinde analizleri yapıldı. Safsızlıklarından arındırılan farelere enjeksiyonları yapılacak olan biyokonjugatlar liyofilizatör aletinde -80 C°de kurutuldu. Toz haline getirilen biyokonjugat numuneleri 0.154 M NaCl çözeltisi içerisinde çözüldü ve farelere enjeksiyon için hazır duruma getirildi.

YÖNTEM 2: Mikrodalga teknolojisi kullanılarak, organik ortamda P(VP-co-AA) polimeri ile Melanoma tümör hücresi Mage-3 proteininin sentetik peptid antijenlerini içeren biyokonjugatlar $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}} = 32,25$ oranında fare başına 1 mg/0.5 ml Mage-3 proteininin 121-134 dizisini içerecek şekilde sentezlendi. Enjekte edilen örneklerde kullanılan 121-134 sentetik peptid dizisi, –N terminal ucunda triptofan amino asidi içerecek şekilde bölümümüz Peptid Sentez Laboratuvarında yer alan Liberty Peptid Sentez Cihazında (CEM) tarafımızca sentezlenmiştir. Sentezlenen biyokonjugatlar 10.000 MW ayırma gücüne sahip poliethersulfon (PES) membranlı tüpte (Sartorius VIVASPIN) +4 C°de 6000 rpm devirde 6 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpün üst kısmında kalan numune saflaştırma öncesi numune ile karşılaştırmalı olarak HPLC aletinde analizleri yapıldı. Santrifüj sonrası tüpün üst kısmında kalan numune saflaştırma öncesi numune ile karşılaştırmalı olarak HPLC aletinde analizleri yapıldı. Safsızlıklarından arındırılan biyokonjugatlar liyofilizatör aletinde -80 C°de kurutuldu. Toz haline getirilen biyokonjugatlar 0.154 M NaCl çözeltisi içerisinde çözüldü ve farelere enjeksiyon için hazır duruma getirildi.

5.7.3 Farelere Enjekte edilen Fiziksel Kompleks ve Biyokonjugatların Hesaplamaları

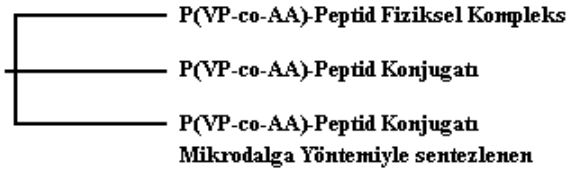
- Bir grup fareye 1 mg Mage-3 121-134 dizili peptid (tam doz) ve 2 mg BSA içeren BSA-Peptid konjugatları enjekte edilmiştir. Fare başına BSA-peptid konjugatı / 0,5 ml olarak enjekte edilmiştir. ($M_{BSA} = 66\ 000\ Da$; $M_{pep} = 1860\ Da$)

$$\frac{n_{pep}}{n_{BSA}} = \frac{c_{pep} \cdot M_{BSA}}{M_{pep} \cdot c_{BSA}} = \frac{\frac{1mg}{0,5ml} \cdot 66000}{1860 \cdot \frac{2mg}{0,5ml}} \Rightarrow \frac{n_{pep}}{n_{BSA}} = 17,74$$

- Üç grup fareye 1 mg Mage-3 121-134 dizili peptid (tam doz) ve 2 mg P(VP-co-AA) kopolimerini içeren Peptid-P(VP-co-AA) fiziksel karışımı ve konjugatları enjekte edilmiştir. Konjugatlar normal yol ve mikro dalga enerjisi kullanılarak 2 farklı yöntemle sentezlenmiştir. Enjeksiyonlar fare başına 0,5 ml' lik çözeltiler halinde gerçekleştirilmiştir. ($M_{P(VP-co-AA)} = 120\ 000\ Da$; $M_{pep} = 1860\ Da$)

TAM DOZ:

1 mg Mage-3 121-134 dizili peptid dizisini içeren 0,5 ml/fare



$$\frac{n_{pep}}{n_{VP/AA}} = \frac{c_{pep} \cdot M_{VP/AA}}{M_{pep} \cdot c_{VP/AA}} = \frac{\frac{1mg}{0,5ml} \cdot 120000}{1860 \cdot \frac{2mg}{0,5ml}} \Rightarrow \frac{n_{pep}}{n_{VP/AA}} = 32,25$$

- Bir başka gruba ise 0,5 mg Mage-3 121-134 dizili peptid (yarım doz) ve 1 mg P(VP-co-AA) kopolimerini içeren Peptid-P(VP-co-AA) fiziksel karışımı enjekte edilmiştir. Enjeksiyonlar fare başına 0,5 ml' lik PBS çözeltileri içinde gerçekleştirilmiştir.

$$\frac{n_{\text{pep}}}{n_{\text{VP/AA}}} = \frac{c_{\text{pep}} \cdot M_{\text{VP/AA}}}{M_{\text{pep}} \cdot c_{\text{VP/AA}}} = \frac{\frac{0,5 \text{ mg}}{0,5 \text{ ml}} \cdot 120000}{1860 \cdot \frac{1 \text{ mg}}{0,5 \text{ ml}}} \Rightarrow \frac{n_{\text{pep}}}{n_{\text{VP/AA}}} = 32,25$$

- Tam doz ve yarım doz enjekte edilen konjugat ve fiziksel kompleksler hep aynı mol oranına denk gelmektedir. Burada önemli olan fare başına verilen yarım doz ve tam doz peptid ile immün sistemde yaratılan etkiyi gözlemlemektir. Bu nedenle bir başka grupta da farklı dozlarda yapılan çoklu enjeksiyonun etkileri gözlenmiştir. Hesaplar diğer gruplar için yukarıda yapılan hesaplarla aynıdır.

ÇOKLU ENJEKSİYON: P(VP-co-AA)-Peptid Fiziksel Kompleks 0,5 ml/fare	1. Enjeksiyon	1 mg Mage-3 121-134 dizili peptid içeren
	2. Enjeksiyon (14. GÜN)	0,5 mg Mage-3 121-134 dizili peptid içeren
	3. Enjeksiyon (49. GÜN)	1 mg Mage-3 121-134 dizili peptid içeren

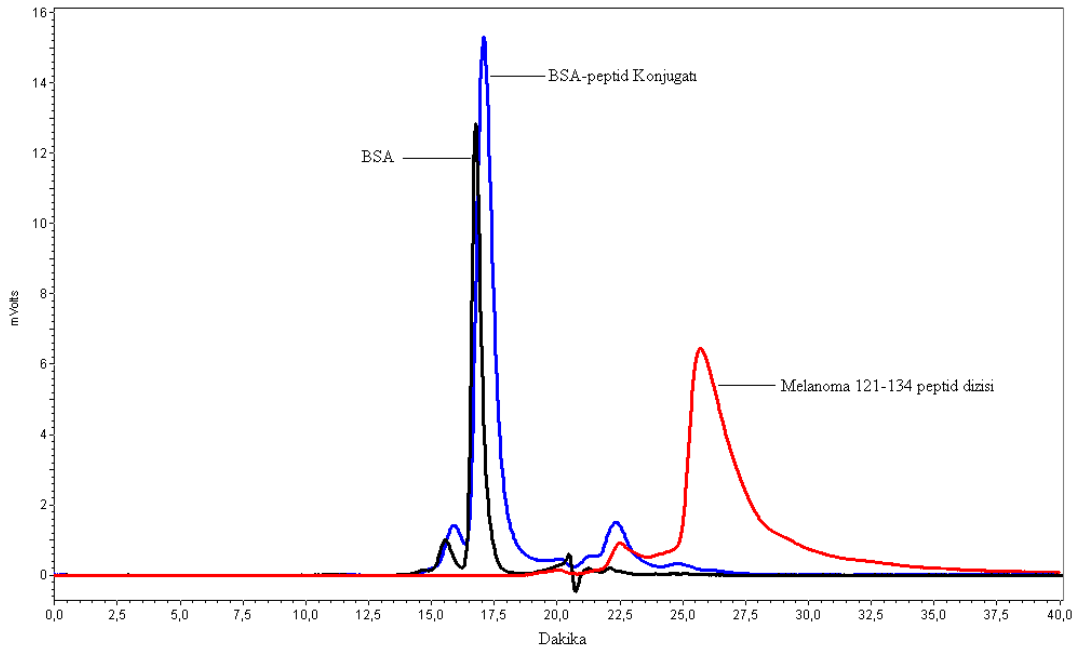
5.7.4 İmmünojenik ve Aşı Özelliği Taşıyabilen Suda Çözünebilen Polimer-Peptid Biyokompleks ve Konjugatlarının Analiz Sonuçları

Suda çözünebilen BSA-peptid konjugatları ile polimer-peptid fiziksel kompleks ve konjugatları pH 7’de sentezlenmiştir.

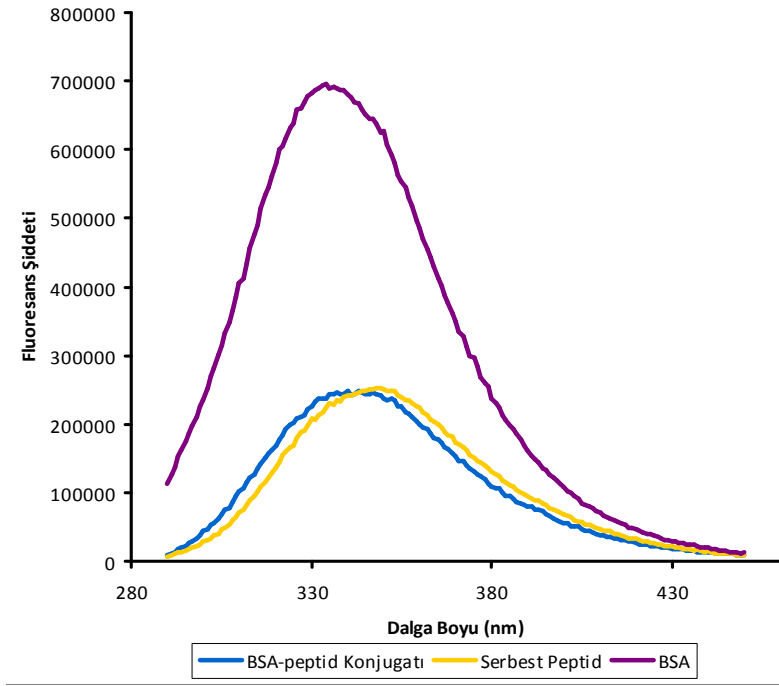
Hazırlanan P(VP-co-AA)-Peptid fiziksel kompleksleri ve EDC aktivatörü varlığında sentezlenen P(VP-co-AA)-Peptid biyokonjugatları $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 32,25$ oranında, fare başına 0.5 mg/0.5 ml ve 1 mg/0,5 ml Mage-3 proteininin 121-134 dizisini içerecek şekilde sentezlendi, sonrasında saflaştırıldı. Saflaştırılan fiziksel karışım ve biyokonjugatlar farelere enjekte edilmeden önce HPLC ve floresans cihazında analizleri yapıldı.

5.7.4.1 Yöntem 1' e göre sentezlenen BSA-peptid konjugatı:

EDC çapraz bağlayıcısı varlığında Bovine Serum Albumin (BSA) ile Mage-3 proteininin sentetik 121-134 peptid dizisini içeren, bileşenlerinin $n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}}=17,74$ oranına sahip BSA-Peptid biyokonjugatı sentezlendi. BSA-Peptid biyokonjugatların HPLC ve Floresans Spektrofotometre cihazları ile yapı karakterizasyonu tayin edildi (Şekil 5.56 ve 5.57). BSA-Peptid biyokonjugatı, immünizasyonları yapılan farelerin serumlarında P(VP-co-AA)-Peptid biyokonjugatına karşı spesifik olarak oluşan antikor miktarının saptanması amacıyla ELISA plakalarının kaplanması için kullanıldı. Ayrıca sentezlenen bu BSA-peptid biyokonjugatının antijenik özelliğini test etmek amacıyla balb/c farelere enjeksiyon yapıldı.



Şekil 5. 56 EDC çapraz bağlayıcısı varlığında sentezlenen BSA-peptid konjugatına ait HPLC Kromatogramı



Şekil 5. 57 EDC çapraz bağlayıcısı varlığında sentezlenen BSA-peptid konjugatına ait Fluoresans Spektrumu

Mustafaev ve arkadaşları tarafından yapılan ve düşük immünolojik özellikteki Betulin (B) molekülünün taşıyıcı protein olan BSA molekülüne % 90 verimle kovalent olarak bağlandığı çalışmada BSA*B konjugatları 1-etil3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorür kullanılarak sentezlenmişler [26].

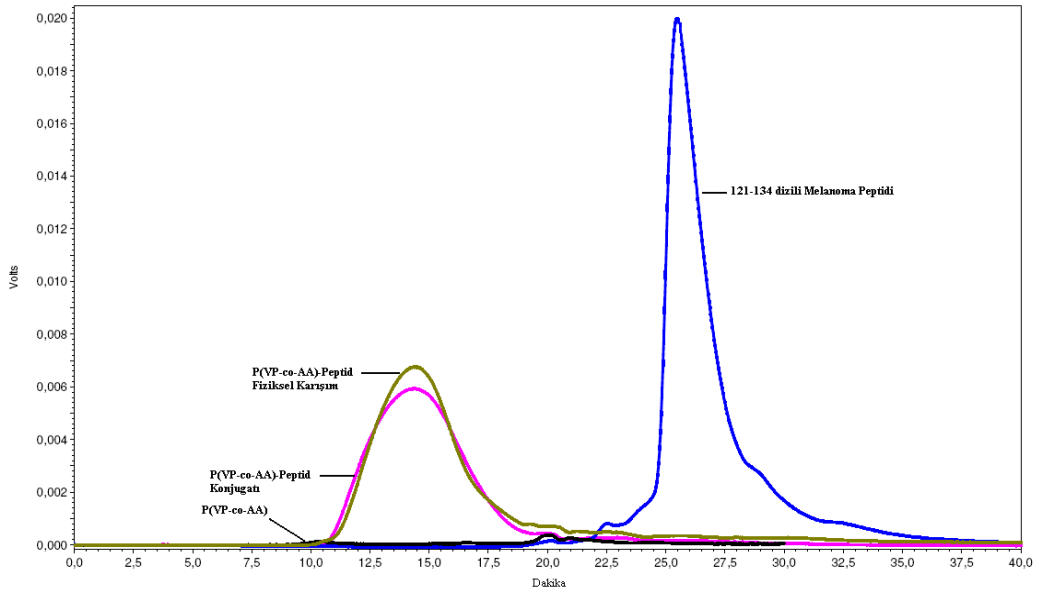
Deen ve arkadaşları [92], düşük orandaki hidroliz özelliğinden dolayı konjugasyon reaktifi olarak 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid (EDC)'i seçtikleri konjugasyon çalışmasında, taşıyıcı protein olarak içlerinde BSA'nın da bulunduğu çeşitli moleküllerin, sentetik peptidler (SP) ile konjugatlarını sentezlenmişler.

$n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}} = 17,74$ oranında BSA-Peptid konjugatı hayvan deneylerinde kullanılmak üzere sentezlenmiştir. EDC varlığında Yöntem 1'e göre sentezlenen konjugata ait HPLC Spektrumları Şekil 5.56' da verilmiştir. HPLC kromatogramında görüldüğü gibi $n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}} = 17,74$ oranında sentezlenen konjugat ile serbest BSA'nın kolonda alıkonma süreleri aynıdır ve her ikisi de benzer karakteristikte piklere sahiptirler. Kromatogramda görülen tek fark, BSA-peptid konjugat pikinin UV şiddeti serbest BSA'nın tek başına verdiği pikin UV şiddetinden daha fazladır. Bunun nedeni de BSA'nın yapısına katılan peptid molekülleridir.

HPLC Kromatogramından elde ettiğimiz sonuçları Floresans Spekturumu (Şekil 5.57) ile karşılaştırdığımızda, sonuçların birbiri ile örtüştüğünü görmekteyiz. Serbest BSA'nın $\lambda_{\text{maksimumu}}$ 336 nm iken BSA-Peptid konjugatının da bu rakama oldukça yakın $\lambda_{\text{max}} = 340$ nm olarak tespit edilmiştir. $n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}} = 17,74$ oranı için konjugatın $\lambda_{\text{maksimumu}}$, $\lambda_{\text{max}} = 350$ nm olan peptide göre daha solda çıktığını yani serbest BSA karakterine daha çok uyduğunu görmekteyiz.

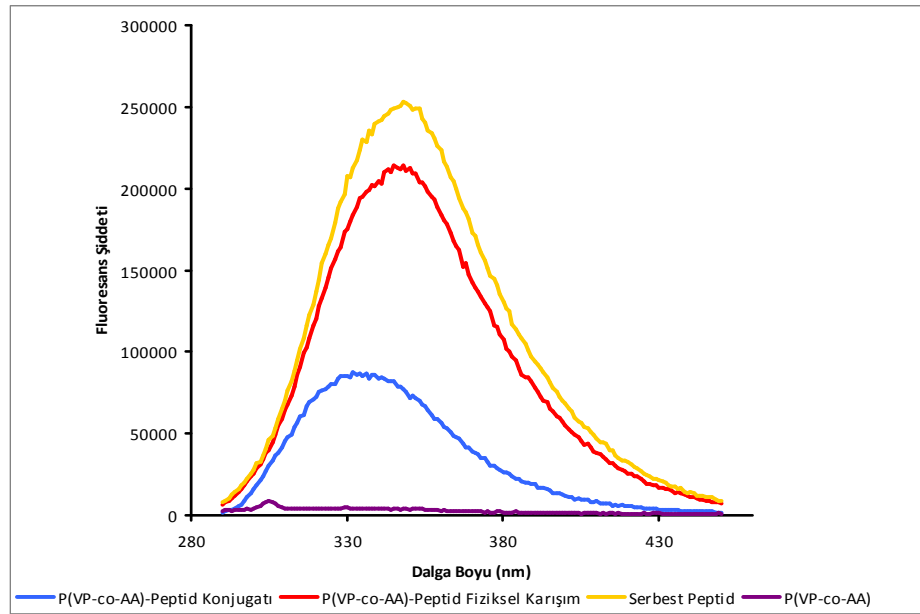
5.7.4.2 P(VP-co-AA)-peptid Kompleksi ile Yöntem 1' e göre sentezlenen P(VP-co-AA)-peptid Konjugatının Karşılaştırmalı Analiz Sonuçları

$n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 32,25$ oranında karşılaştırma yapabilmek için P(VP-co-AA)-Peptid fiziksel karışım hazırlanmış ve P(VP-co-AA)-Peptid konjugatı sentezlenmiştir. Fiziksel karışım ve komplekse ait HPLC Spektrumları Şekil 5.58' de verilmiştir. $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 11$ oranında farklı olarak oluşan Fiziksel kompleks ve konjugat HPLC kromatogramından da görüldüğü gibi çıkış noktaları aynı olmak üzere benzer karakteristikte piklere sahiptirler. Fiziksel karışım sayesinde elektrostatik etkileşimle meydana gelen kompleks konjugata göre daha fazla UV vermektedir. Buradan da anlaşılacağı gibi kolonu eşit zamanlarda terk eden bu iki oluşum birbirine yakın molekül büyüklüğündedir.



Şekil 5. 58 P(VP-co-AA)-Peptid Fiziksel Karışımı ile P(VP-co-AA)-Peptid Konjugatına ait Karşılaştırmalı HPLC Kromatogramı

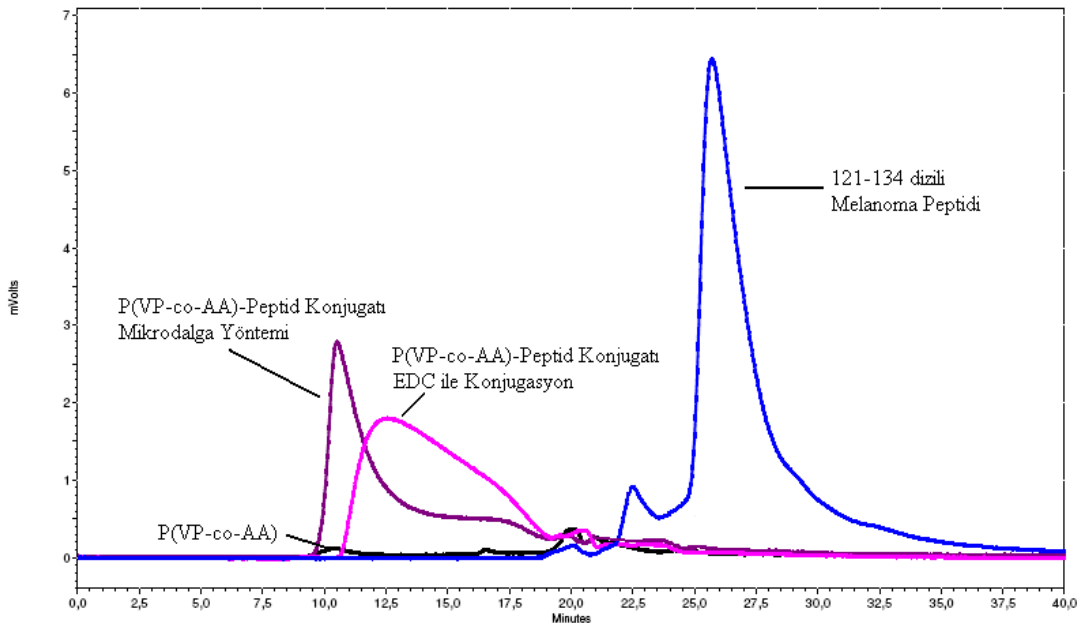
HPLC kromatogramında birbirinden farklı UV veren kompleks ve konjugatın birbirine göre değişik konformasyonel yapıda olduğu gerek immünolojik çalışmalardaki etkisinden, gerekse de floresans analizlerinden açıkça görülmektedir. HPLC Kromatogramından elde ettiğimiz sonuçları Floresans Spekturumu (Şekil 5.59) ile karşılaştırdığımızda, $n_{peptid}/n_{PAA} = 32,25$ oranı için fiziksel karışım ve konjugatın her ikisinin de $\lambda_{maksimumu}$ 350 nm olan peptide göre daha solda çıktığını görmekteyiz. P(VP-co-AA)-Peptid konjugatı P(VP-co-AA)-Peptid kompleksine kıyasla daha solda çıkmaktadır. Fakat $\lambda_{maksimumu}$ 333 olan konjugat, $\lambda_{maksimumu}$ 346 nm olan komplekse göre daha hidrofobik bir yapı oluşturmuştur.



Şekil 5. 59 P(VP-co-AA)-Peptid kompleks ve konjugatına ait Floresans Spekturumu

5.7.4.3 Yöntem 1 ve Yöntem 2' ye göre sentezlenen P(VP-co-AA)-peptid Konjugatlarının Karşılaştırmalı Analiz Sonuçları

Yeni bir metod olan mikrodalga enerjisi kullanılarak organik ortamda sentetik polianyon P(VP-co-AA) Kopolimeri ile Mage-3 proteininin 121-134 dizisini içeren biyokonjugatlar $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}= 32,25$ oranında fare başına 1 mg / 0,5 ml'de Mage-3 proteininin 121-134 dizisini içerecek şekilde sentezlendi ve saflaştırıldı. Saflaştırılan fiziksel karışım ve biyokonjugatlar farelere enjekte edilmeden önce HPLC cihazında kromatografik analizleri (Şekil 5.60) yapıldı.



Şekil 5. 60 Yöntem 1 ve Yöntem 2' ye göre sentezlenen P(VP-co-AA)-peptid konjugatlarına ait HPLC Kromatogramı

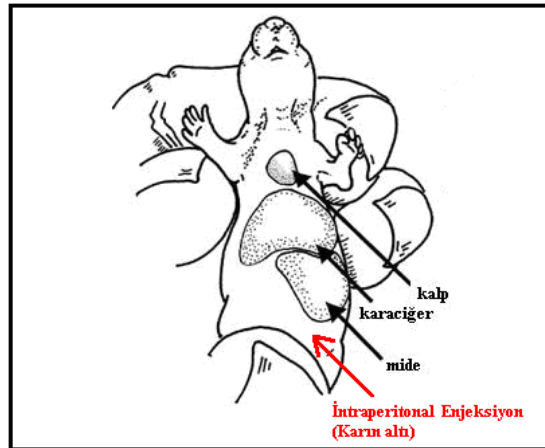
5.8 İmmünojenik ve Aşı Özelliği Taşıyabilen Suda Çözünebilen Polimer-Peptid kompleks ve konjugatların Sentezi Balb/c farelere enjekte edilmesi

Çalışmamızda TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü. Transgen ve Deney Hayvanları laboratuvarında temin edilen 24 adet 8 haftalık 28-32 gr ağırlığında erkek Balb/c türü fare kullanıldı.



Şekil 5. 61 Balb/c fare

Fiziksel kompleks ve EDC çapraz bağlayıcısı varlığında sentezlenen biyokonjugatların (aşı) enjekte edildiği gruptaki deney hayvanları her bir grupta 4 tane olmak üzere 6 gruba ayrıldı (Çizelge 5.5). Mikrodalga yöntemi kullanılarak organik ortamda sentezlenen biyokonjugatların (aşı) enjekte edildiği gruptaki deney hayvanları da 4 tane olmak üzere 1 grup olarak ayrıldı (Çizelge 5.5). Enjeksiyon işlemi, eter anestezisi altında intraperitoneal olarak 0,5 ml örnek enjeksiyonu ile gerçekleştirildi.



Şekil 5. 62 Balb-c fareye karınaltından enjeksiyon

Çizelge 5.5 Fiziksel kompleks ve biyokonjugatların enjekte edildiği balb/c türü fare grupları ve enjekte edilen aşı örneklerinin içeriği

GRUP ADI	ENJEKTE EDİLEN MALZEME İÇERİĞİ	Gruptaki Balb/c Fare Sayısı
GRUP 1	1 mg Mage-3 121-134 dizili peptid dizisini içeren 0,5 ml BSA-Peptid Konjugatı	4
GRUP 2	1 mg Mage-3 121-134 dizili peptid dizisini içeren 0,5 ml P(VP-co-AA)-Peptid Konjugatı	4
GRUP 3	1 mg Mage-3 121-134 dizili peptid dizisini içeren 0,5 ml Mikrodalga Yöntemiyle sentezlenen P(VP-co-AA)-Peptid Konjugatı	4
GRUP 4	0,5 mg Mage-3 121-134 dizili peptid dizisini içeren 0,5 ml P(VP-co-AA)-Peptid Fiziksel Kompleks	4
GRUP 5	<p>Çoklu Enjeksiyon:</p> <p>1. <u>Enjeksiyon</u> :</p> <p>1 mg Mage-3 121-134 dizili peptid dizisini içeren 0,5 ml P(VP-co-AA)-Peptid Fiziksel Kompleks</p> <p>2. <u>Enjeksiyon</u> :</p> <p>0,5 mg Mage-3 121-134 dizili peptid dizisini içeren 0,5 ml P(VP-co-AA)-Peptid Fiziksel Kompleks</p> <p>3. <u>Enjeksiyon</u> :</p> <p>1 mg Mage-3 121-134 dizili peptid dizisini içeren 0,5 ml P(VP-co-AA)-Peptid Fiziksel Kompleks</p>	4
GRUP 6 (KONTROL)	0,5 ml 0,154 M NaCl	4

5.8.1 Fare Serumlarının alınması

Eter anestezisi altında kuyruk ucu kesilerek 7 günde bir 10 hafta boyunca kan alındı. 20 µl sodyum sitrat içeren eppendorflara alınan kan örnekleri 2500 rpm devirde 3 dakika santrifuj edildi. Santrifuj sonrasında üst fazdan 20 µl serum dikkatlice alınarak içerisinde 500 ml 0,5 M PBS (pH 7.2) içeren tüplere konuldu ve vorteksle karıştırıldı. Örnekler kanda antikor miktar tayin işlemi yapılana kadar -20 °C’de saklandı.

5.8.2 Dolaylı yoldan Enzim Bağlı İmmün Assay (ELISA) Yöntemi Kullanılarak Farelerden Alınan Serum Örneklerinde Fiziksel Karışım ve Biyokonjugatlara Karşı Oluşan Antikor Miktar Tayini

Bu test; aşılama işlemi sonrasında enjekte edilen biyokonjugata karşı oluşan konjugata-spesifik antikor miktarını tayini etmek amacıyla kullanıldı [8, 9, 15, 31, 71, 93, 94]. Antikorlar ELISA plaka kuyucuklarına kaplanmış antijenlerle tanımlandı. Özgün antikorları ihtiva eden serum çözeltisi ile antijen kaplı kuyucuklar inkübe edildi ve fare serum çözeltisindeki antikora (türe özgü) karşı geliştirilmiş (anti-fare) ve alkalin fosfataz ile konjuge polyvalent antikora bağlandı. Ortama substrat ilave edilmesi ve substratın enzim tarafından hidroliz edilmesi sonucu oluşan ürün miktarı spektroskopik olarak belirlendi.

Kullanılan Çözeltiler

• Sodyum Sitrat Çözeltisi

0,22 g D-(+) Glukoz ($C_6H_{12}O_6$; Mw=180,16 g/mol) tartılarak 3 ml ultra saf suda çözünür. Daha sonra 0,32 g $Na_3O_4 \cdot 12H_2O$ (Mw=380,12g/mol) tartılarak 3 ml ultra saf suda çözünür. 0,1 g sodyum sitrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 5 H_2O$; Mw=357,16 g/mol) 3 ml ultra saf suda çözünür. Bu üç çözelti birbine eklenir ve son hacim ultra saf su ile 10 ml’ye tamamlanır.

• 0,5 M PBS Tamponu (pH=7,2)

87 g potasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4 ; Mw=174 g/mol) tartılarak 500 ml ultra saf suda çözünür. 68 g potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4 ; Mw=136 g/mol) tartılarak

çözünür. K_2HPO_4 baz çözeltisi üzerine KH_2PO_4 asid çözeltisi eklenerek pH 7,2' ye ayarlanır.

- **Yıkama Tamponu**

0,5 M 20 ml PBS (pH 7,2) den alınır üzerine 980 ml ultra saf su eklenir. 8,4 g sodyum klorür

(NaCl) tartılarak bu karışıma eklenir, karıştırılır ve 1 L 'ye ultra saf su ile tamamlanır.

0,45 µl filtreden geçilerek süzülür. 0,5 ml Tween 20 ($C_{58}H_{114}O_{26}$; Mw=1227,72 g/mol) eklenir.

- **Substrat Tamponu**

0,02 g glisin ($C_2H_5NO_2$; Mw=75,07 g/mol) 50 ml ultra saf su içerisinde çözüldükten sonra pH 10,4' e ayarlanır. Daha sonra 0,02 g çinko klorür ($ZnCl_2$; Mw= 136,29 g/mol) tartılarak 50 ml ultra saf su içerisinde çözünür. 0,04 g magnezyum klorür ($MgCl_2$; Mw=95,3 g/mol) tartılarak 50 ml ultra saf su içerisinde çözünür. Bu üç çözelti karıştırılır ve ultra saf su kullanılarak çözelti hacmi 200 ml olacak şekilde hacim tamamlanır.

- **%0,2 Süt Tozu Çözeltisi**

60 mg süt tozu tartılarak 30 ml 0,5 M PBS (pH 7.2) tamponu içerisinde çözünür.

- **Polivalent İmmünoglobulin, Alkalın fosfataz Çözeltisinin Dilüsyonu**

0,5 M 750 µl PBS (pH 7) çözeltisi üzerine 1 µl Polivalent İmmünoglobulin, Alkalın fosfataz eklenir ve vorteksle karıştırılır.

- **4-nitrofenil Fosfat Substrat Çözeltisinin Hazırlanması**

4-nitrofenil fosfattan ($C_6H_5NO_2.P.2C_4H_9NO_3$; Mw 461.4 g/mol) 2,5 mg alınıp 25 ml substrat tamponunda çözünür ve karanlıkta saklanır.

5.9 ELISA Deneyinin Yapılışı

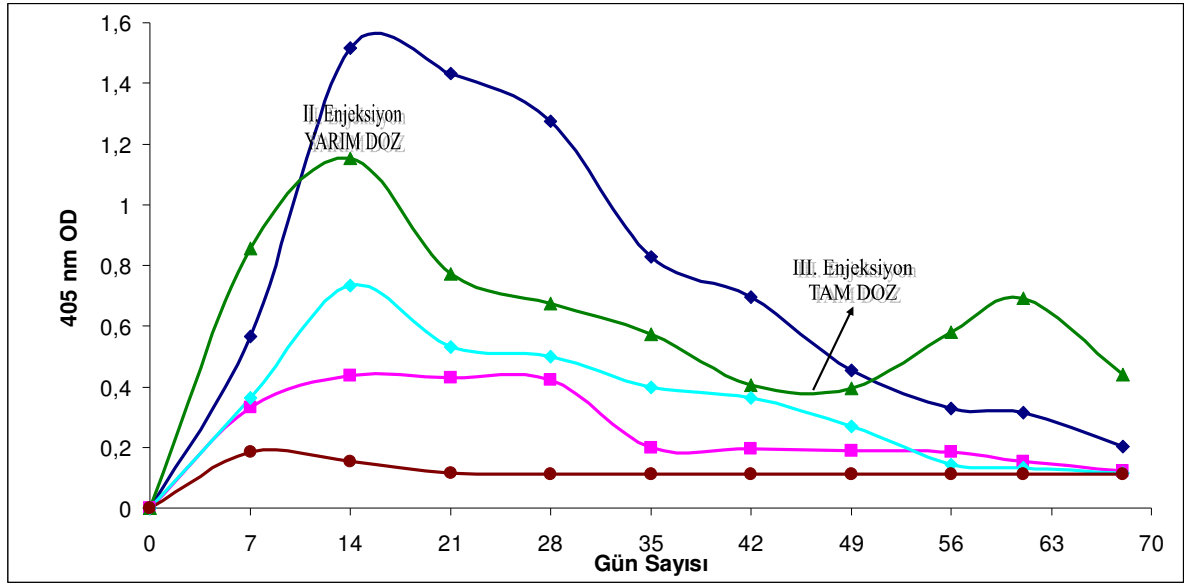
- 96 kuyu içeren ELISA plağı (Greiner) 0,5 µg antijen ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}}=5$ oranında sentezlenen 0.5 mg Melanoma tümör proteininin 121-134 dizisine ait peptid dizisi içeren BSA-Peptid biyokonjugatı) 100 µl kuyulara eklendi. Antijen ile kaplanan ELISA plakaları gece boyu +4 °C’de bekletildi.
- Kuyular 0,05 Tween20 ihtiva eden 0.5 M PBS pH 7 yıkama tamponu ile 2 defa yıkandı.
- ELISA plaklarındaki herbir kuyuya 12 yollu otomatik pipet yardımıyla % 0,2’lik 200 µl süt tozu çözeltisi eklendi.
- ELISA plakası 37 °C sıcaklığında etüvde 1 saat bekledi ve 0,05 Tween20 ihtiva eden PBS yıkama tamponu ile 2 kez yıkandı.
- Farelerden alınan serumlar 1:50 ve 1:100 oranında dilüsyonları yapıldı. Herbir kuyuya 1:50 ve 1:100 oranında dilüsyonları yapılan serum örnekleri 100 µl olarak eklendi. ELISA plakası +4 °C’de 2 saat bekledi.
- ELISA plakası 0,05 Tween20 ihtiva eden PBS yıkama tamponu ile 2 kez yıkandı.
- Antimouse Polivalent İmmünoglobulin, Alkalın fosfataz 1:750 oranında sulandırılarak 100 µl herbir kuyuya eklendi. ELISA plakası 1 saat 37 °C’de etüvde bekletildi.
- ELISA plakası 0,05 Tween20 ihtiva eden PBS yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı.
- % 0.1 Paranitrofenil fostat (PNFP) substrat çözeltisi eklendi. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 45 dakika bekletildikten sonra ELISA plak okuyucu aletinde A405 nm dalga boyunda okundu.

5.10 ELISA Yöntemi ile Fare Serumlarında Antikor Miktar Tayini

Dolaylı yoldan Enzim Bağlı İmmün Assay (ELISA) Yöntemi Kullanılarak Farelerden Alınan Serum Örneklerinde Fiziksel Karışım ve Biyokonjugatlara Karşı Oluşan Antikor Miktarları her bir grup için tayin edilmiştir.

P(VP-co-AA)-peptid fiziksel karışımları ile Yöntem 1’e göre EDC çapraz bağlayıcısı varlığında Peptid-BSA konjugatı ve Peptid-P(VP-co-AA) konjugatları sentezlendi. Bu konjugatlara paralel olarak Yöntem 1’ e göre yapılan konjugat ile karşılaştırmak amaçlı Yöntem 2’ye göre mikrodalga enerjisi kullanılarak organik ortamda Peptid-P(VP-co-AA) konjugatı sentezlendi. Fiziksel karışım ve biyokonjugatlar, $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} =$

32,25 oranında fare başına 0.5 mg/0,5 ml ve 1mg/ml Mage-3 121-34 dizili peptid dizisini içerecek şekilde hazırlandı. Sentezlenen fiziksel kompleks ve biyokonjugatlar saflaştırıldıktan sonra balb/c farelere intraperitoneal olarak enjekte edildi. 70 gün boyunca 7 gün aralıklarla alınan fare serumlarındaki antikor miktarı kontrol grubunun serumu ile karşılaştırıldı (Şekil 5.63).



Şekil 5. 63 (◆) Peptid-P(VP-co-AA) kompleksi (0,5 mg/0,5 ml), (▶) Peptid-P(VP-co-AA) kompleksi (1 mg/0,5 ml), Yöntem 1'e göre EDC çapraz bağlayıcısı varlığında sentezlenen (■) Peptid-BSA konjugatı (1 mg/0,5 ml) ve (■) Peptid-P(VP-co-AA) konjugatı (1 mg/0,5 ml), Yöntem 2'ye göre mikrodalga enerjisi kullanılarak organik ortamda sentezlenen (●) Peptid-P(VP-co-AA) konjugatına (1 mg/0,5 ml) karşı 70 gün boyunca 7 gün aralıklarla alınan fare serumlarında ELISA yöntemiyle tayin edilen antikor miktarlarının karşılaştırılması

5.11 İstatistiksel veri analizi

Çizelge 5.6 Gruplara ait ortalama ve standart sapma değerleri

		Hafta										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
GRUP NO	1	x	0.8720	1.7245	1.6400	1.5123	1.2490	1.0378	0.6895	0.5938	0.5665	0.4540
		n	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		s	0.0394	0.2793	0.2600	0.2017	0.1697	0.0968	0.0233	0.0266	0.0285	0.0403
	2	x	0.6395	0.6398	0.6348	0.6613	0.6145	0.5480	0.4228	0.4585	0.4053	0.3775
		n	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		s	0.0980	0.0461	0.0524	0.0533	0.0688	0.0260	0.0511	0.0571	0.0393	0.0403
	3	x	0.4900	0.3555	0.3320	0.3570	0.5298	0.4555	0.3488	0.3770	0.3660	0.3660
		n	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		s	0.0620	0.0456	0.0186	0.0437	0.0362	0.0330	0.0352	0.0467	0.0544	0.0544
	4	x	0.6703	0.9360	0.7365	0.7385	0.8130	0.7053	0.5038	0.4090	0.3840	0.3625
		n	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		s	0.0423	0.0977	0.0699	0.0926	0.0815	0.0653	0.0159	0.0172	0.0429	0.0465
	5	x	1.1618	1.3520	0.9725	0.9133	0.9893	0.7500	0.6295	0.8458	0.9423	0.6895
		n	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		s	0.1204	0.0906	0.1238	0.1005	0.0901	0.1007	0.0780	0.0974	0.0866	0.0624
	6	x	0.3070	0.2043	0.2075	0.2383	0.4165	0.3430	0.2350	0.2650	0.2515	0.2480
		n	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		s	0.0275	0.0057	0.0128	0.0179	0.0295	0.0183	0.0129	0.0173	0.0086	0.0090

x: ortalama
n: hayvan sayısı
s: standart sapma

5.11.1 F-test istatistiği (ANOVA)

- **Kareler toplamlarının bulunması:**

$$GnKT = \sum x^2 - (\sum x)^2 / \sum n = 5,789$$

- **GAKT:** Gruplararası kareler toplamı

$$GAKT = \sum_{j=1}^k \left[\frac{(\sum x_j)^2}{n_j} \right] - \left[\frac{(\sum x)^2}{n} \right] = 22,073$$

- **GİKT:** Grup içi kareler toplamı

$$GiKT = GnKT - GAKT = 16,284$$

- **Serbestlik Derecelerinin Bulunması:**

- Genel Serbestlik Derecesi: 49

- Gruplar arası Serbestlik Derecesi: GASD = 4

- Grup içi Serbestlik derecesi: GiSD = n – grup sayısı = -1

- **Kareler Ortalamasının Bulunması:**

- Gruplar arası kareler ortalaması:

$$GAKO = GAKT/GASD = 5,518$$

$$GiKO = GiKT/GiSD = 0,361$$

$$F = GAKO/GiKO = 5,518/0,361 = 15,285$$

•**Hipotezler:**

H0: Gruplar arası fark yoktur

H1: Gruplar arasında fark vardır.

Test istatistiği olarak F istatistiği kullanılır.

Yanılma olasılığı (güven düzeyi) $\alpha = 0,05$ seçilmiştir.

Ftablo değeri = 3,29

Hesaplanan ile tablo değeri kıyaslandığında;

$F_{\text{Hesaplanan}} > F_{\text{Tablo}}$ ise H0 red edilir.

Sonuç: Gruplar arasında fark vardır. Gruplar arası anlamlı bir fark bulunduu için bundan sonra gruplar ikişer ikişer karşılaştırılır. Bu karşılaştırmada t testi kullanılır. Bu şekilde karşılaştırılan ortalamalar sıralanır ve önem denetimi yapılır.

5.11.2 İki grubun ortalamalarının karşılaştırılması – ttest

$$t = \frac{x_1 - x_2}{S_{\Delta x}} \quad S_{\Delta x} = \sqrt{\frac{(S_1)^2}{n_1 - 1} + \frac{(S_2)^2}{n_2 - 1}}$$

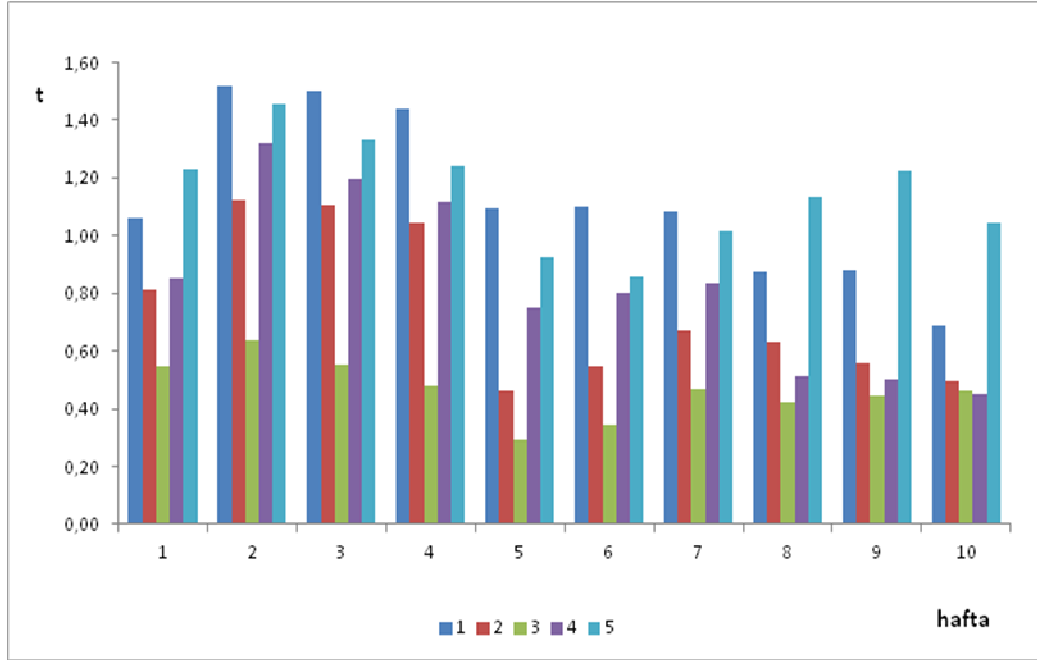
Birbirinden bağımsız iki örneklemin ortalamaları arasındaki farkın hangi yönde olduğu ve bu farkın önemli olup olmadığının test edilmesinde kullanılır.

Bu testte serbestlik derecesi $(n_1 + n_2) - 2$ ' dir.

5 farklı grup için 10 hafta boyunca serbestlik derecesi $4 + 2 = 6$ ' dır.

Çizelge 5.7 Her grubun kontrol grubuna göre t-test ile karşılaştırılması

		HAFTA										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
GRUP NO	1	SA	0.53	1.00	0.95	0.88	0.76	0.63	0.42	0.38	0.36	0.30
		t	1.06	1.52	1.50	1.44	1.10	1.10	1.08	0.88	0.88	0.69
	2	SA	0.41	0.39	0.39	0.41	0.43	0.37	0.28	0.31	0.28	0.26
		t	0.81	1.12	1.11	1.04	0.46	0.55	0.67	0.63	0.56	0.50
	3	SA	0.33	0.24	0.23	0.25	0.39	0.33	0.24	0.27	0.26	0.26
		t	0.55	0.64	0.55	0.48	0.29	0.34	0.47	0.42	0.45	0.46
	4	SA	0.43	0.55	0.44	0.45	0.53	0.45	0.32	0.28	0.27	0.25
		t	0.85	1.32	1.20	1.12	0.75	0.80	0.84	0.51	0.50	0.45
	5	SA	0.69	0.79	0.57	0.54	0.62	0.48	0.39	0.51	0.56	0.42
		t	1.23	1.45	1.33	1.24	0.92	0.85	1.02	1.13	1.23	1.04

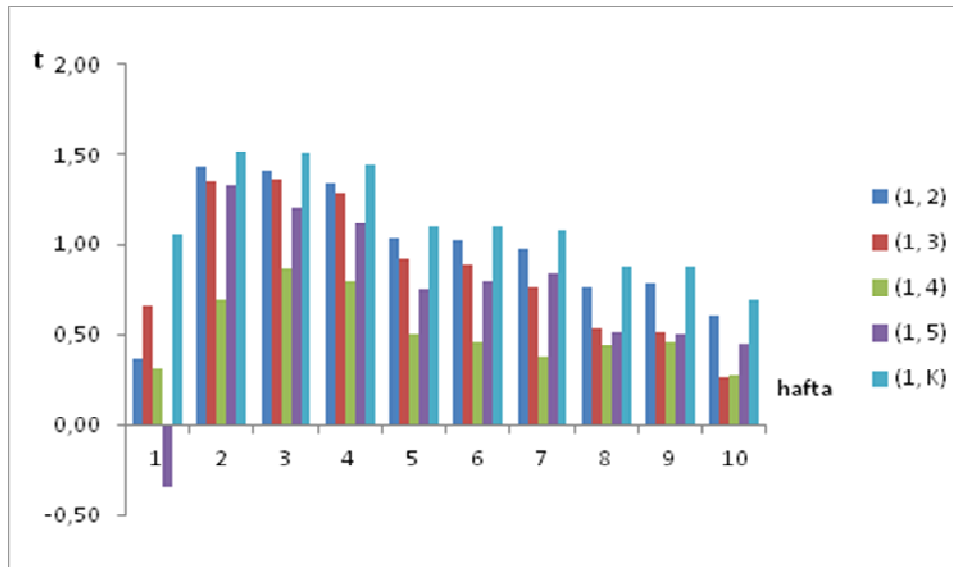


Şekil 5.64 Her grubun 10 hafta için t değerleri grafiği

Sonuç: Tüm deney gruplarının her hafta için hesaplanan t değerleri $p > 0.05$ olduğundan dolayı, bulunan korelasyon önemlidir ve tesadüfi değildir. Tüm gruplar 10 hafta boyunca kontrol grubuna (Grup 6) göre farklılık göstermektedir.

Çizelge 5.8 I. Grubun Diğer Gruplarla ttest ile kıyaslanması

		HAFTA										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
GRUPLARIN BİRBİRİYLE KİYASLANMASI	(1, 2)	SA	0.62	1.06	1.02	0.95	0.80	0.68	0.47	0.43	0.40	0.34
	t	0.37	1.43	1.41	1.34	1.04	1.03	0.97	0.76	0.78	0.60	
	(1, 3)	SA	0.58	1.02	0.97	0.90	0.78	0.65	0.45	0.41	0.39	0.34
	t	0.66	1.35	1.35	1.29	0.92	0.89	0.76	0.53	0.51	0.26	
	(1, 4)	SA	0.63	1.13	1.04	0.97	0.86	0.72	0.49	0.42	0.40	0.34
	t	0.32	0.70	0.87	0.80	0.51	0.46	0.38	0.44	0.46	0.27	
	(1, 5)	SA	0.84	0.55	0.44	0.45	0.53	0.45	0.32	0.28	0.27	0.25
	t	-0.35	1.32	1.20	1.12	0.75	0.80	0.84	0.51	0.50	0.45	
	(1, K)	SA	0.53	1.00	0.95	0.88	0.76	0.63	0.42	0.38	0.36	0.30
	t	1.06	1.52	1.50	1.44	1.10	1.10	1.08	0.88	0.88	0.69	

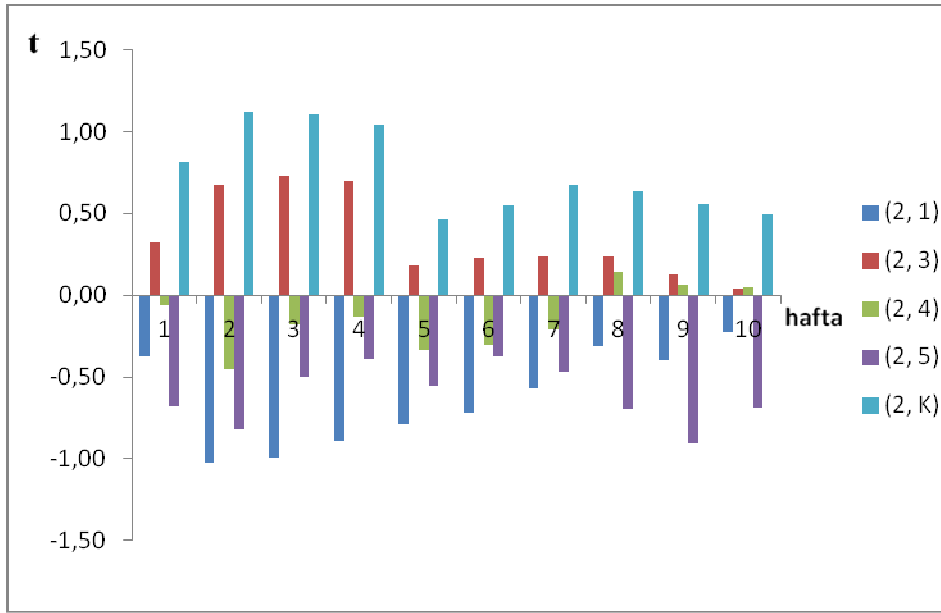


Şekil 5. 65 I. grubun 10 hafta için t değerleri grafiği

Sonuç: I. deney grubunun her hafta için hesaplanan t değerleri diğer gruplarla karşılaştırıldığında $p > 0.05$ olduğundan dolayı, bulunan korelasyon önemlidir. t değerleri kıyaslandığında I. grubun sırası ile kontrol grubu, II., III. ve V. gruplarla yüksek oranda farklılık sergilediği görülmüştür. Bunun yanısıra I grup IV. grup ile 10 hafta boyunca diğer gruplara oranla daha düşük seviyede olan ama yine de önemli bir korelasyon göstermektedir.

Çizelge 5.9 II. Grubun Diğer Gruplarla ttest ile kıyaslanması

		HAFTA										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
GRUPLARIN BİRBİRİYLE KİYASLANMASI	(2, 1)	SA	0.62	1.06	1.02	0.95	0.80	0.68	0.47	0.43	0.40	0.34
		t	-0.37	-1.02	-0.99	-0.89	-0.79	-0.72	-0.57	-0.31	-0.40	-0.22
	(2, 3)	SA	0.47	0.42	0.41	0.43	0.47	0.41	0.32	0.34	0.32	0.30
		t	0.32	0.67	0.73	0.70	0.18	0.22	0.23	0.24	0.12	0.04
	(2, 4)	SA	0.53	0.65	0.56	0.57	0.59	0.52	0.38	0.35	0.32	0.30
		t	-0.06	-0.45	-0.18	-0.13	-0.34	-0.30	-0.21	0.14	0.07	0.05
	(2, 5)	SA	0.77	0.86	0.67	0.65	0.67	0.54	0.44	0.56	0.59	0.45
		t	-0.68	-0.82	-0.50	-0.39	-0.56	-0.38	-0.47	-0.70	-0.91	-0.69
	(2, K)	SA	0.41	0.39	0.39	0.41	0.43	0.37	0.28	0.31	0.28	0.26
		t	0.81	1.12	1.11	1.04	0.46	0.55	0.67	0.63	0.56	0.50

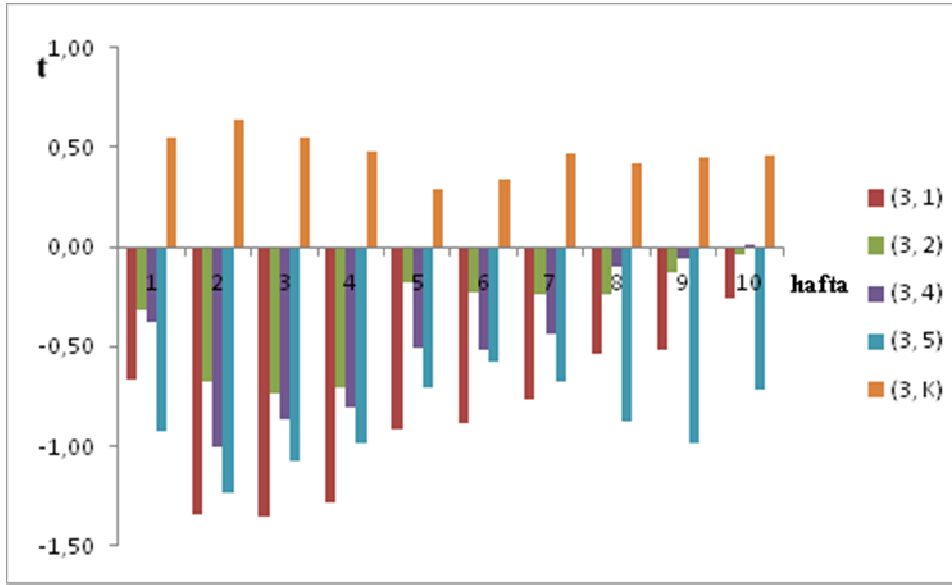


Şekil 5.66 II. grubun 10 hafta için t değerleri grafiği

Sonuç: II. deney grubunun her hafta için hesaplanan t değerleri diğer gruplarla karşılaştırıldığında $p > 0.05$ olduğundan dolayı, bulunan korelasyon önemlidir. t değerleri kıyaslandığında II. grubun 10 hafta boyunca kontrol grubu ve ilk 4 hafta III. grup ile en fazla farklılık sergilediği görülmüştür.

Çizelge 5.10 III. Grubun Diğer Gruplarla ttest ile kıyaslanması

		HAFTA										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
GRUPLARIN BİRBİRİYLE KİYASLANMASI	(3, 1)	SA	0.58	1.02	0.97	0.90	0.78	0.65	0.45	0.41	0.39	0.34
		t	-0.66	-1.35	-1.35	-1.29	-0.92	-0.89	-0.76	-0.53	-0.51	-0.26
	(3, 2)	SA	0.47	0.42	0.41	0.43	0.47	0.41	0.32	0.34	0.32	0.30
		t	-0.32	-0.67	-0.73	-0.70	-0.18	-0.22	-0.23	-0.24	-0.12	-0.04
	(3, 4)	SA	0.48	0.58	0.47	0.47	0.56	0.48	0.35	0.32	0.31	0.30
		t	-0.38	-1.00	-0.87	-0.81	-0.51	-0.52	-0.44	-0.10	-0.06	0.01
	(3, 5)	SA	0.73	0.81	0.59	0.57	0.65	0.51	0.42	0.53	0.58	0.45
		t	-0.92	-1.23	-1.08	-0.98	-0.71	-0.58	-0.68	-0.88	-0.99	-0.72
	(3, K)	SA	0.33	0.24	0.23	0.25	0.39	0.33	0.24	0.27	0.26	0.26
		t	0.55	0.64	0.55	0.48	0.29	0.34	0.47	0.42	0.45	0.46

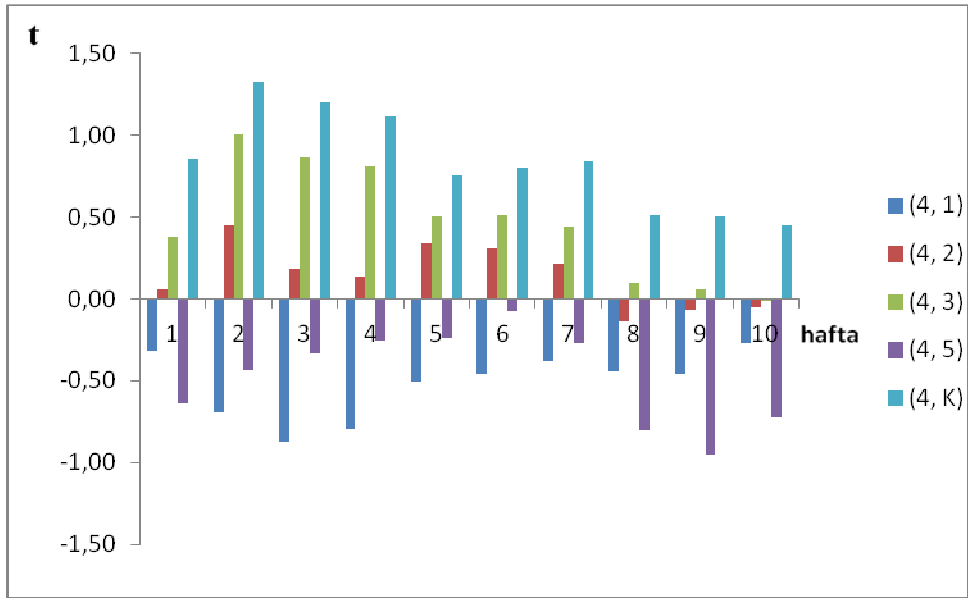


Şekil 5. 67 III. grubun 10 hafta için t değerleri grafiği

Sonuç: III. deney grubunun her hafta için hesaplanan t değerleri diğer gruplarla karşılaştırıldığında $p > 0.05$ olduğundan dolayı, tüm gruplarla arasında bulunan korelasyon önemlidir. t değerleri kıyaslandığında negatif olarak görünmesine rağmen III. grubun I. ve V. gruplarla yüksek, II. ve IV. gruplarla nispeten daha düşük farklılık sergilediği görülmüştür.

Çizelge 5.11 IV. Grubun Diğer Gruplarla ttest ile kıyaslanması

		HAFTA										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
GRUPLARIN BİRBİRİYLE KİYASLANMASI	(4, 1)	SΔ	0.63	1.13	1.04	0.97	0.86	0.72	0.49	0.42	0.40	0.34
		t	-0.32	-0.70	-0.87	-0.80	-0.51	-0.46	-0.38	-0.44	-0.46	-0.27
	(4, 2)	SΔ	0.53	0.65	0.56	0.57	0.59	0.52	0.38	0.35	0.32	0.30
		t	0.06	0.45	0.18	0.13	0.34	0.30	0.21	-0.14	-0.07	-0.05
	(4, 3)	SΔ	0.48	0.58	0.47	0.47	0.56	0.48	0.35	0.32	0.31	0.30
		t	0.38	1.00	0.87	0.81	0.51	0.52	0.44	0.10	0.06	-0.01
	(4, 5)	SΔ	0.77	0.95	0.70	0.68	0.74	0.59	0.47	0.54	0.59	0.45
		t	-0.63	-0.44	-0.34	-0.26	-0.24	-0.08	-0.27	-0.81	-0.95	-0.73
	(4, K)	SΔ	0.43	0.55	0.44	0.45	0.53	0.45	0.32	0.28	0.27	0.25
		t	0.85	1.32	1.20	1.12	0.75	0.80	0.84	0.51	0.50	0.45

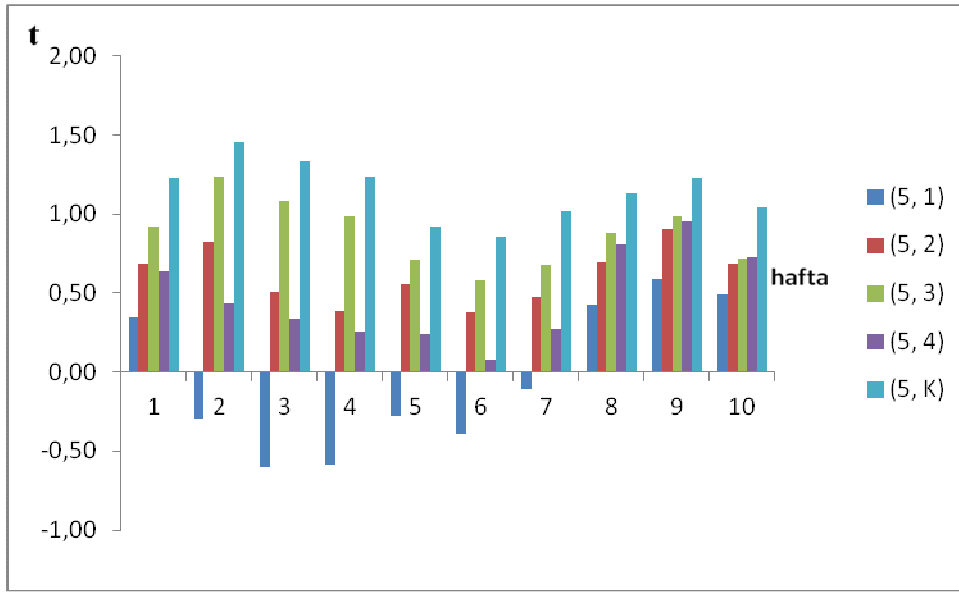


Şekil 5.68 IV. grubun 10 hafta için t değerleri grafiği

Sonuç: IV. deney grubunun her hafta için hesaplanan t değerleri diğer gruplarla karşılaştırıldığında $p > 0.05$ olduğundan dolayı, bulunan korelasyon önemlidir. t değerleri kıyaslandığında IV. grubun kontrol ve III. grup ile yüksek oranda farklılık sergilediği görülmüştür.

Çizelge 5.12 V. Grubun Diğer Gruplarla ttest ile kıyaslanması

		HAFTA										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
GRUPLARIN BİRBİRİYLE KİYASLANMASI	(5, 1)	SA	0.84	1.27	1.10	1.02	0.92	0.74	0.54	0.60	0.63	0.48
		t	0.35	-0.29	-0.61	-0.59	-0.28	-0.39	-0.11	0.42	0.59	0.49
	(5, 2)	SA	0.77	0.86	0.67	0.65	0.67	0.54	0.44	0.56	0.59	0.45
		t	0.68	0.82	0.50	0.39	0.56	0.38	0.47	0.70	0.91	0.69
	(5, 3)	SA	0.73	0.81	0.59	0.57	0.65	0.51	0.42	0.53	0.58	0.45
		t	0.92	1.23	1.08	0.98	0.71	0.58	0.68	0.88	0.99	0.72
	(5, 4)	SA	0.77	0.95	0.70	0.68	0.74	0.59	0.47	0.54	0.59	0.45
		t	0.63	0.44	0.34	0.26	0.24	0.08	0.27	0.81	0.95	0.73
	(5, K)	SA	0.69	0.79	0.57	0.54	0.62	0.48	0.39	0.51	0.56	0.42
		t	1.23	1.45	1.33	1.24	0.92	0.85	1.02	1.13	1.23	1.04



Şekil 5.69 V. grubun 10 hafta için t değerleri grafiği

Sonuç: V. deney grubunun her hafta için hesaplanan t değerleri diğer gruplarla karşılaştırıldığında ait t değerlerinin $p > 0.05$ olduğu görülmüştür. V. grup kontrol grubu ve III. grup ile yüksek, II. ve IV grup ile nispeten daha düşük oranda farklılık sergilemektedir.

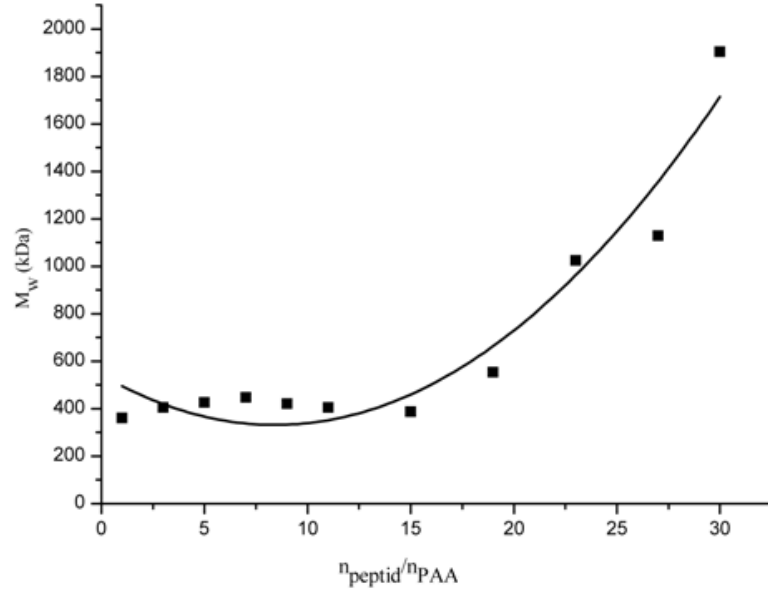
SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1 Anyonik Özellikli Poliakrilik Asit ile Melanoma Tümör Hücrelerine Ait Antijenini İçeren Fiziksel Karışım ve Biyokonjugatların Sentezine Ait Tartışma

Bileşenlerinin farklı mol oranlarında sentezlenen PAA-Peptid konjugatlarının karşılaştırmalı olarak yapıları araştırılarak karakterize edildi. pH 7 değerinde PAA polimerinin negatif yüklü karboksil gruplarının peptid moleküllerindeki amino grupları ile bağlanması ve amid bağı oluşturması sonucunda oluşan konjugatın konjugasyon reaksiyonu incelendi.

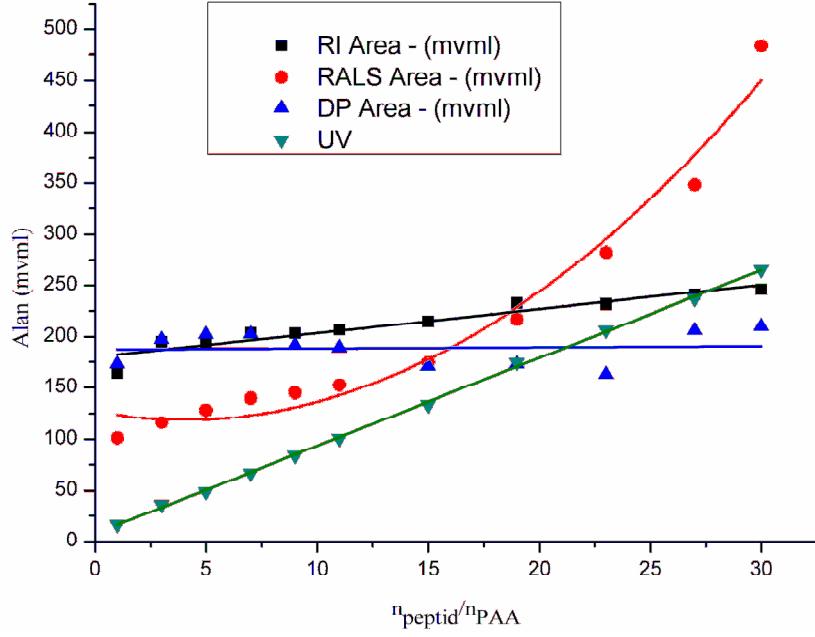
Suda çözünen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC) çapraz bağlayıcısı varlığında sentetik polianyon PAA ile Melanoma tümör hücrelerine ait sentetik peptid antijenlerinin farklı $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}$ oranlarında PAA-peptid fiziksel karışımları hazırlanmış ve konjugatları sentezlenmiştir. Fiziksel karışımda pH 5’de polimer ile peptid molekülleri karıştırılarak fiziksel kompleks oluşumu sağlanmış ve sonrasında pH 7’ ye çekilmiştir. Konjugatların sentezi ise fiziksel karışım oluşum aşamasından yola çıkılarak yapılmıştır. Polimer ve peptid molekülleri pH 5’de birbirleri ile karıştırılarak fiziksel kompleks oluşumu sağlanmış ve sonrasında ortama EDC çapraz bağlayıcısı ilave edilerek karboksil gruplarının aktivasyonu üzerinden konjugat sentezi yapılmıştır. EDC çapraz bağlayıcısı varlığında sentezlenen PAA-Peptid konjugatların konjugasyon reaksiyon verimi kromatografik analizlere dayalı olarak karşılaştırılmıştır.

EDC çapraz bağlayıcısı varlığında PAA polimeri ile Melanoma tümör hücresine ait sentetik peptid antijenlerini içeren ve bu bileşenlerin farklı oranlarında pH 7'de sentezlenmiş konjugatlar kromatografik (Şekil 5.22; 5.23; 5.24; 5.27; 5.28; 5.29; 5.30) ve florimetrik (Şekil 5.25) yöntemlerle incelenmiştir. Şekil 5.28'da PAA-Peptid konjugatlarının; PAA polimer konsantrasyonunun sabit, peptid konsantrasyonunun artan oranlarına bağlı ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}$) Viskotek kırılma indisi ve UV kromatogramlarından elde edilen kromatogramlarda normalde pik görülmeyen alanda peptidin artan konsantrasyonuna bağlı olarak artan bir pik görülmekte (Şekil 5.27; 5.28) ve bu pik de konjugatın sentezlendiğini göstermektedir. Işık saçılması detektörüne ait kromatogramlarda ise PAA-Peptid biyokonjugatlarının alıkonma zamanında (RT) görülen kayma ve pik alanlarında ki büyüme molekül ağırlığı artışıyla doğru orantılıdır.



Şekil 6.1 $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}} = 1, 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 23, 27, 30$ oranlarında sentezlenen peptid-PAA konjugatlarına ait Molekül ağırlığı tayini

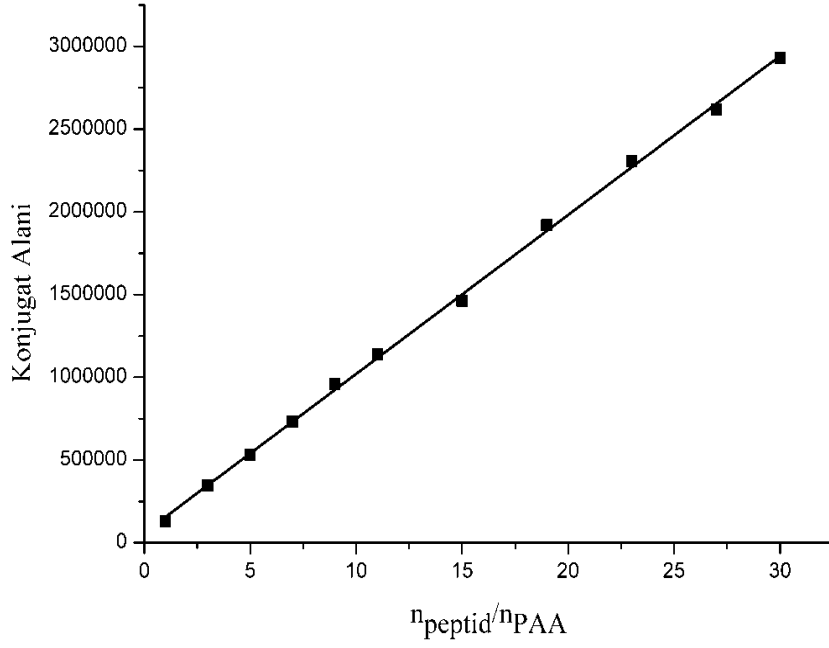
PAA polimer konsantrasyonunun sabit, peptid konsantrasyonunun artan oranlarında sentezlenen PAA-Peptid konjugatlarının Viskotek cihazında hesaplanan molekül ağırlıkları konjugattaki peptid konsantrasyonunun artışı ile polinomal bir artış göstermektedir (Şekil 6.1). Şekil 6.2'de Viskotek cihazının farklı detektörlerinden elde edilen PAA-Peptid konjugatlarına ait pik alanlarının $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}$ oranına bağlı olarak değişimi gösterilmiştir.



Şekil 6. 2 $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}} = 1, 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 23, 27, 30$ oranlarındaki PAA-peptid konjugatlarına ait Viskotek cihazının UV, Işık Saçılması, Refraktif İndeks ve Viskozimetre dedektörlerinden elde edilen piklerin alanları

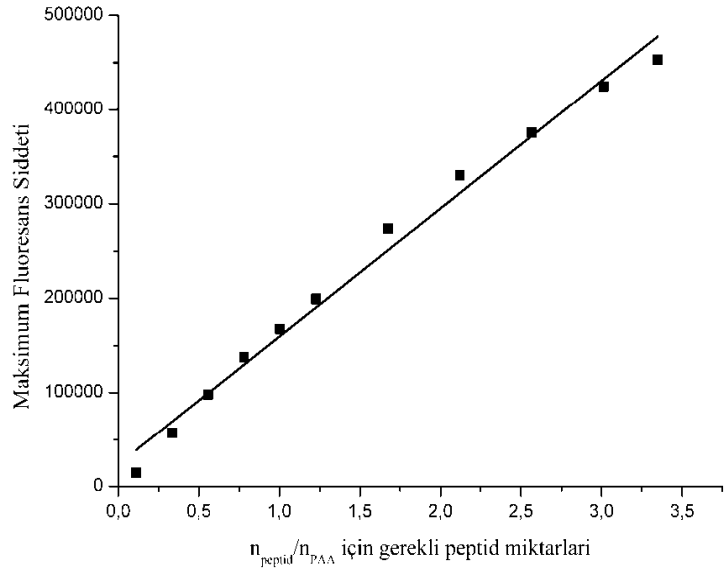
Viskotek cihazının kırılma indisi kromatogramı PAA polimeri ile aynı karakteristik özellikleri taşımaktadır. UV detektöründe elde edilen kromatogramda normalde pik görülmeyen alanda peptidin artan konsantrasyonuna bağlı olarak arttığı görülen pik (Şekil 5.28) konjugatın sentezlendiğini ve orana bağlı olarak konjugat konsantrasyonunun arttığını göstermektedir. Işık saçılması detektörüne ait kromatogramlarda ise $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}} = 27$ ve 30 oranlarında PAA-Peptid biyokonjugatlarının alıkonma zamanı değişmemekte ve pik alanlarında görülen artma molekül ağırlığının arttığını göstermektedir.

Viskotek cihazının UV dedektörünün alan grafiğindeki sonuçlar HPLC analiz sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Şekil 6.3' de HPLC cihazında ölçülen PAA-peptid konjugatlarının pik alanı hesapları görülmektedir. Polimer konsantrasyonunun sabit peptid konsantrasyonunun artan oranlarında sentezlenen konjugatlara ait piklerin alanları peptid konsantrasyonu arttıkça lineer artış göstermektedir. HPLC kromatogramları ile lineer artış gösteren konjugat alanlarından görüldüğü üzere ortamda serbest peptid kalmamış ve tüm peptid polimer zincirine bağlanmıştır.

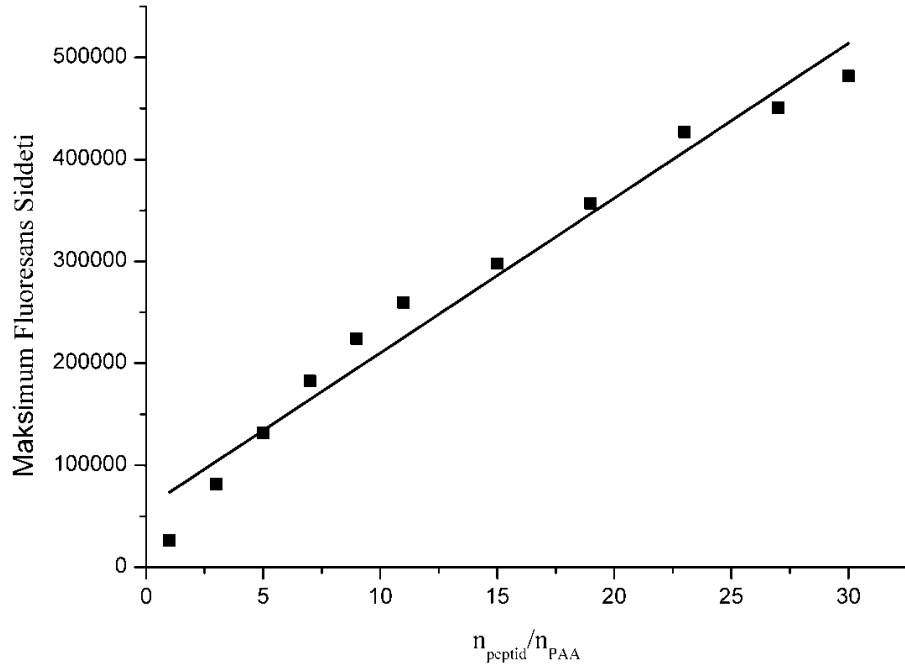


Şekil 6. 3 $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}} = 1, 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 23, 27, 30$ oranlarındaki PAA-peptid konjugatlarına ait HPLC kromatogramından elde edilen piklerin alanları

Şekil 6.4’de polimer konsantrasyonunun sabit, peptid konsantrasyonunun artan oranlarına ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}$) bağlı olarak pH 7’de sentezlenen PAA-Peptid konjugatlarında floresans şiddetinin (I_{max}) peptid konsantrasyonuna bağlılığı verilmiştir (Şekil 6.4 (b)). Triptofan (Trp) amino asidine ait emisyon maksimumu (λ_{maximum}) ve kuantum verimi gibi floresans parametrelerindeki değişiklikler, yapıdaki Trp aminoasidinin konformasyonundaki değişiklikler sonucunda ortaya çıkmaktadır. Sentezlenirken peptidin –N terminal ucuna trp amino asidinin eklenmesi ile peptid molekülüne floresans özellik kazandırılarak PAA-Peptid konjugatlarının yapısal özellikleri hakkında önemli bilgiler edinilmiştir.

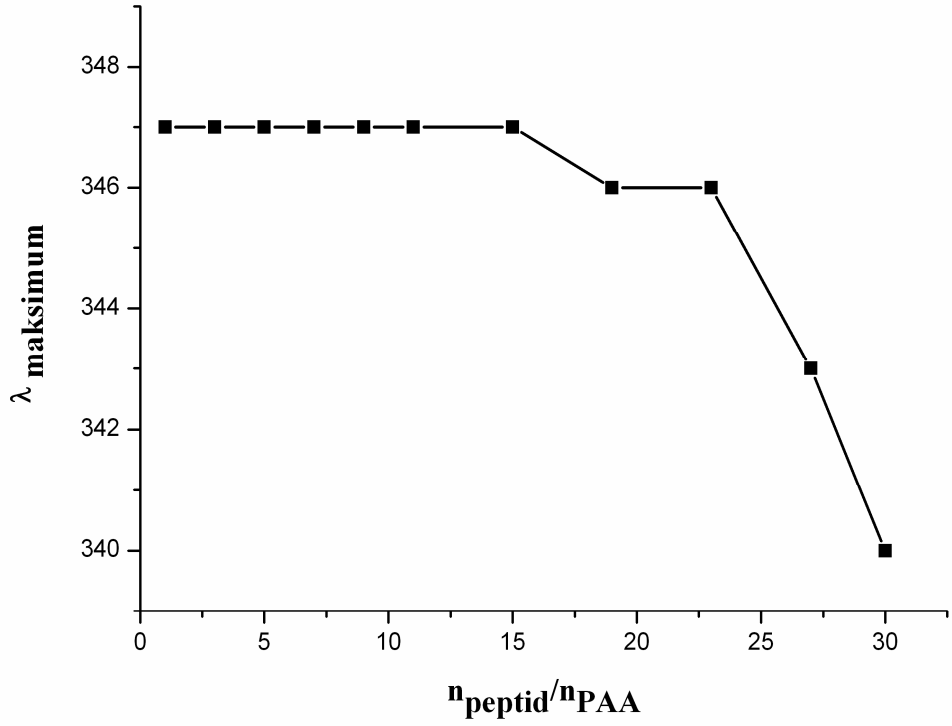


(a)

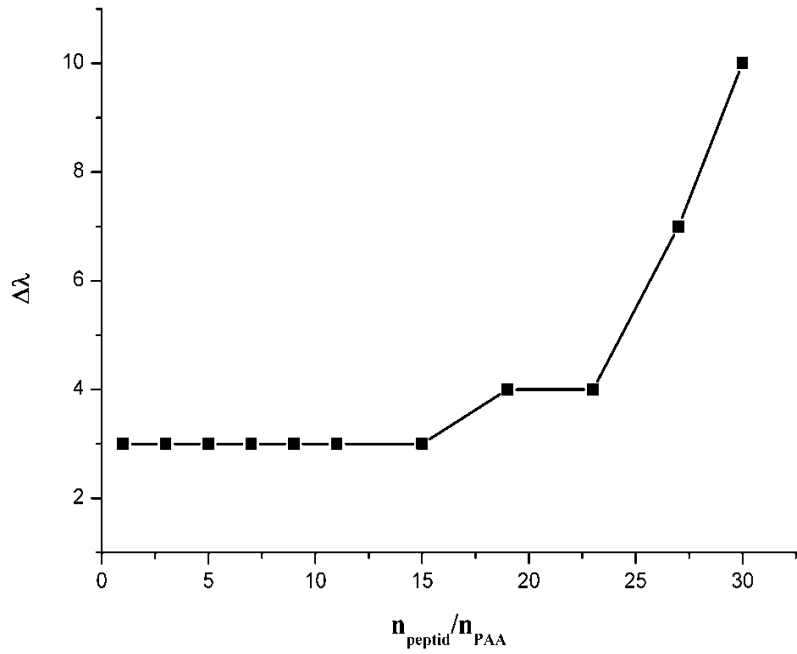


(b)

Şekil 6. 4 Artan oranlarda (n_{peptid}/n_{PAA}) Peptid-PAA konjugatları için kullanılan artan miktarlardaki peptidlere ait maksimum fluoesans şiddetleri (a); artan oranlarda (n_{peptid}/n_{PAA}) Peptid-PAA konjugatlarına ait Maksimum Fluoesans Şiddetleri (b).



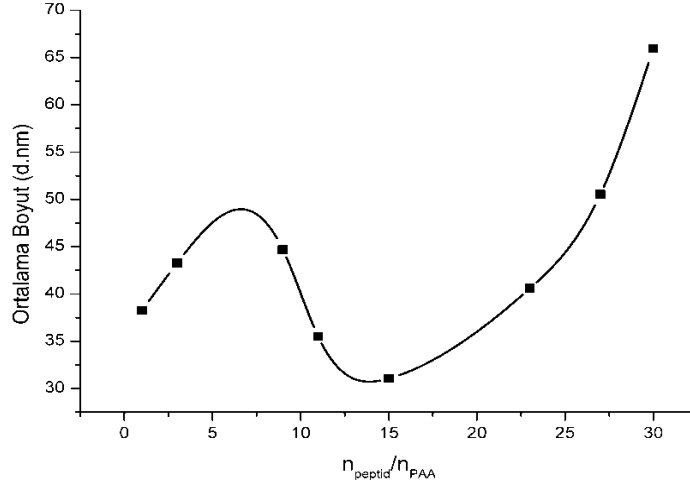
(a)



(b)

Şekil 6. 5 $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}} = 1, 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 23, 27, 30$ oranlarındaki PAA-peptid konjugatlarına ait Floresans Spektrumlarındaki $\lambda_{\text{maksimum}}$ ve $\Delta\lambda$ değerleri

MAGE-3 121-134 peptid dizisi serbest halde iken 350 nm maksimum dalga boyu vermektedir. PAA-Peptid konjugatlarında ise artan peptid oranına bağılı olarak 340 nm dalga boyuna kaymaktadır (Şekil 6.5). PAA-peptid konjugatlarından alınan piklerde mavi bölgeye kaymalar (blue shift) gözlenmiştir. Buradan, PAA polimeri ile peptidin giderek daha sıkı bağlanması sonucunda peptid dizisinde yer alan triptofan aminoasidinin sulu çözeltiliden uzaklaştığı ve polimer ile sarıldığı anlaşılmaktadır.



Şekil 6. 6 Artan $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}}$ oranlarına ait moleküllerin ortalama boyutları (d.nm)

pH = 7.0 değerinde PAA-peptid sistemleri incelendiğinde $n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}} = 1, 3, 9, 11, 15, 23, 27, 30$ farklı oranlarındaki ışığın saçılma şiddetine karşılık boyut dağılımları ve zeta potansiyel ölçüm sonuçları doğrultusunda sentezlenen moleküllerin ortalama boyutlarını gösteren grafik Şekil 6.6'da gösterilmektedir. Zeta Sizer'dan elde edilen sonuçlar incelendiğinde $n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}} = 9$ oranına kadar artış gösteren PAA-peptid konjugat moleküllerinin boyutu $n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}} = 15$ 'e kadar düşmüştür. $n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}} = 15$ 'den $n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}} = 30$ 'a kadar parabolik artış göstermektedir. Konjugat partiküllerin boyut dağılımları, peptid miktarına bağılı olarak değişmektedir. Hiçbir oranda, serbest peptide karşılık gelen 1nm civarında bir pik görülmemektedir. $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}} = 1$ ile başlayan boyut değerleri, serbest PAA'ya göre farklılık göstermektedir. Buna göre diyebiliriz ki, oran arttıkça eklenen tüm peptid, poliyonlarla konjugat oluşturmaktadır.

PAA polimeri ile Melanoma kanseri tümör hücrelerinin MAGE-3 proteininin 121-134 peptid dizisinin, pH 7 değerlerinde fiziksel kompleks ve biyokonjugatı sentezlenmiştir. HPLC kromatogramlarında (Şekil 5.19; 5.22; 5.23 ve 5.24) pH 7'de konjugata göre

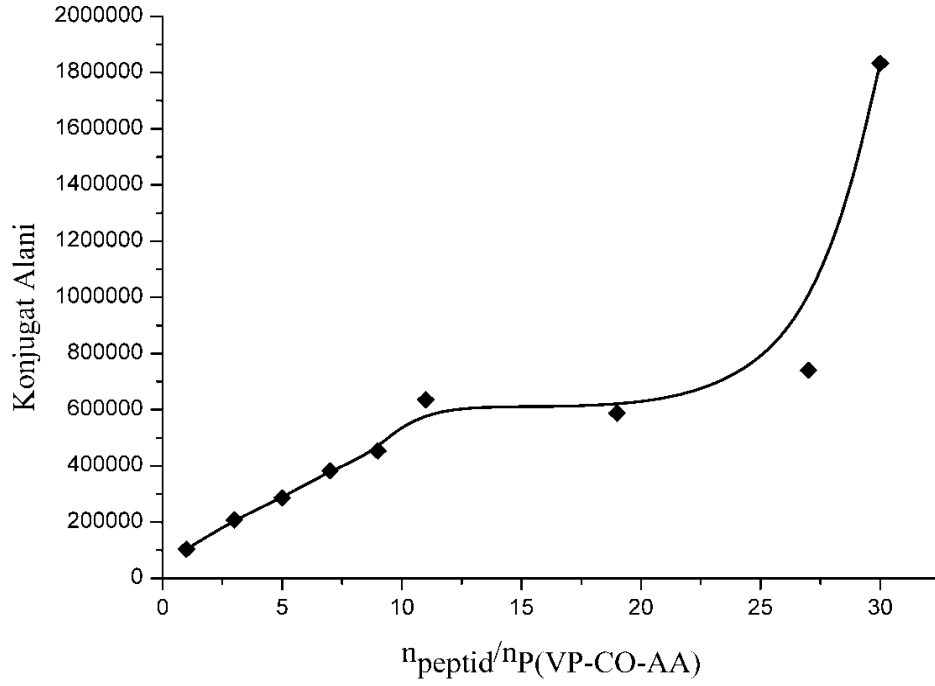
daha farklı bir karakterde fiziksel kompleks oluşumu elde edilmiştir. PAA polimeri pH 7’de karboksil gruplarının iyonlaşmasından dolayı (pH 7’de iyonlaşma yüzdesi %57) negatif yüke sahiptir. 121-134 peptid dizisinin izoelektrik noktası (pI) 10 olduğundan dolayı peptid molekülünün pH 7 değerinde net yükü pozitifdir. pH 7 değerinde pozitif yüke sahip peptid ile negatif yüke sahip PAA polimeri arasında elektrostatik çekme kuvvetleri baskın olmakta ve PAA-peptid kompleksi oluşmakta bu kompleks de HPLC (Şekil 6.19) kromatogramlarında net bir şekilde görülmektedir. Deneylerimizde fiziksel karışım oluşmasına rağmen PAA-peptid konjugatının fiziksel karışıma oranla daha kuvvetli bir yapıda olacağını düşündüğümüz için konjugasyon mekanizmasını inceledik.

6.2 Anyonik Özellikli N-vinil-2-pirolidon/akrilik asit kopolimeri ile Melanoma Tümör Hücrelerine Ait Antijenini İçeren Biyokonjugatların Sentezine Ait Tartışma

PAA polimerine (100.000) oranla daha az sayıda karboksil grubu içeren P(VP-co-AA) (2:1; Mw120 000) polimeri ile Mage 1, 2, 3 ve 6 genleri tarafından sentezlenen melanoma tümör hücresi epitopunun 121-134 peptid dizisini içeren fiziksel karışımları hazırlanmış ve biyokonjugatları sentezlenmiştir. Biyokonjugatlar, EDC çapraz bağlayıcısı varlığında sentezlenerek, yapı ve karakterizasyonu kromatografik (Şekil 5.42, 5.43, 5.44 ve 5.45) ve florimetrik (Şekil 5.49) yöntemlerle incelendi.

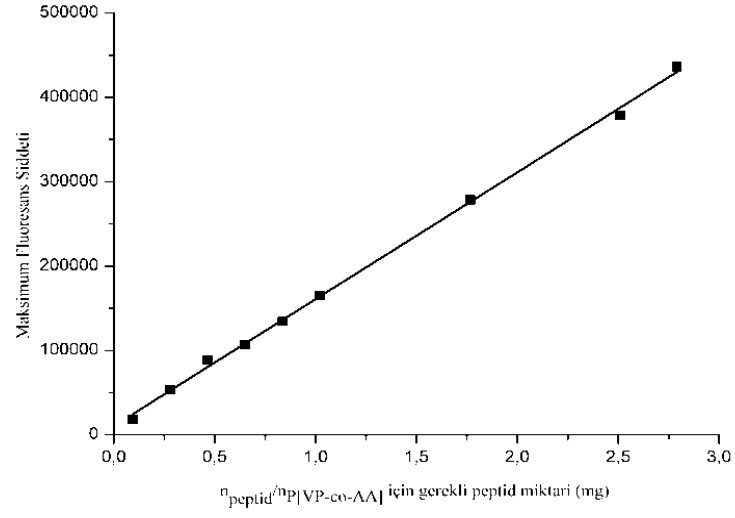
P(VP-co-AA)-Peptid biyokonjugatları;

P(VP-co-AA) kopolimer konsantrasyonunun sabit, peptid konsantrasyonunun artan oranlarında ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 1, 3, 5, 7, 9, 11$) pH 7’de hazırlanan biyokonjugatların viskotek cihazına ait kromatogramları gösterilememektedir. Viskotek cihazı ile P(VP-co-AA) kopolimerine ait konjugatlar için çok net sonuçlar alınamamıştır. PAA konjugatları ile kıyaslayacak olursak, burada tek değişken polimerimizdir. Bunun nedeni, kopolimerin yapısında bulunan pirolidon grupları ve bu gruplardan dolayı da hidrofobik özelliğin oluşması olarak düşünebiliriz.

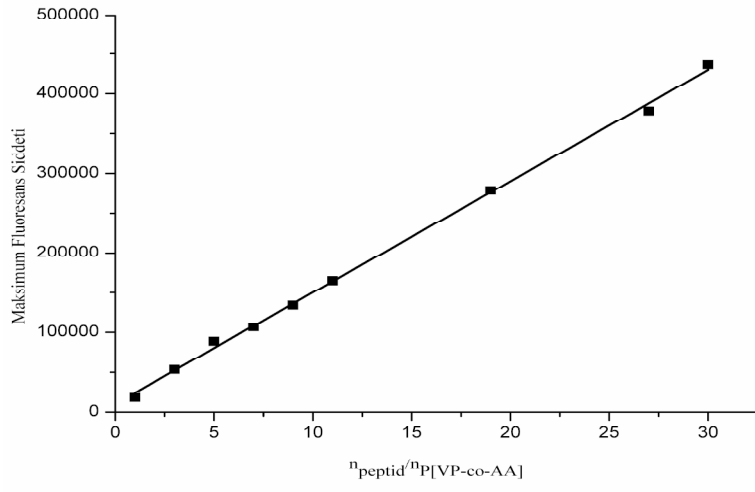


Şekil 6. 7 Artan oranlarda ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}}$ =1, 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 23, 27 ve 30) P(VP-co-AA)-Peptid konjugatlarının HPLC kromatogramlarından elde edilen piklerin alanları

P(VP-co-AA)-Peptid biyokonjugatlarının HPLC analizlerine bakıldığında Viscotek cihazına kıyasla daha görülebilir sonuçlar kaydedilmiştir. Çünkü HPLC cihazının dedektörü, içinde 4 dedektör barından Viskotek cihazına göre daha hassas ölçüm alabilmektedir. HPLC cihazının UV dedektöründen alınan sonuçları inceleyecek olursak (Şekil 5.42) P(VP-co-AA) kopolimerinin çok düşük düzeyde UV verdiği yerde konjugat pik oluşturmaktadır. Artan peptid konsantrasyonuna bağlı olarak oluşan konjugatın piki de $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 11$ oranına kadar lineer bir artış göstermektedir. $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 11$ oranından $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 19$ oranına kadar ortamda serbest peptid kalmamasına karşılık oluşan konjugat pik alanlarında hiçbir değişiklik gözlenmemektedir (Şekil 6.7). $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 19$ oranından sonra ortamda artan peptid konsantrasyonu ile birlikte konjugatlara ait piklerin alanları da artmaktadır.

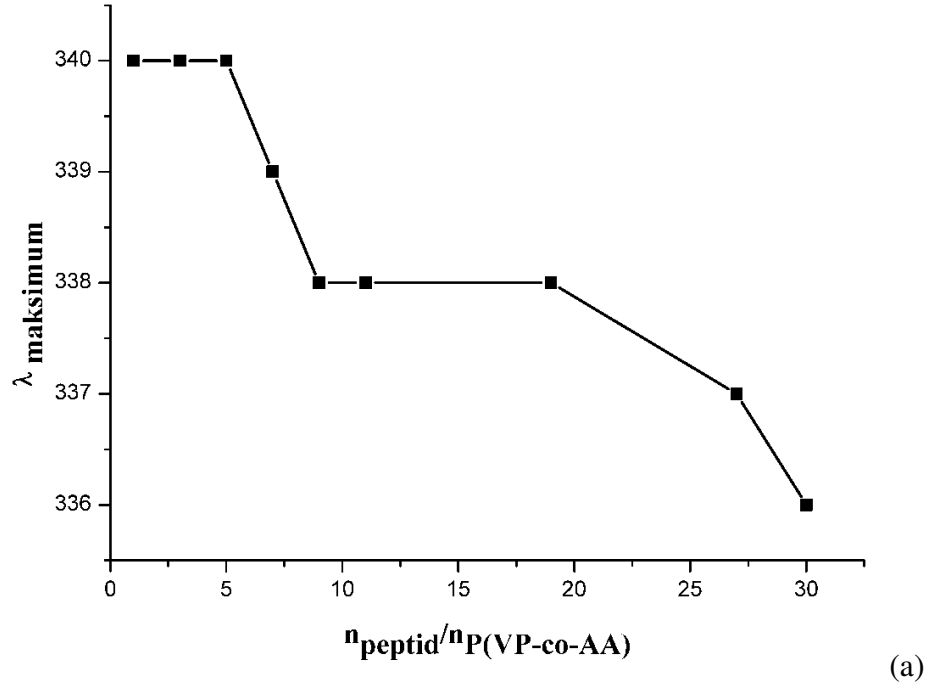


(a)

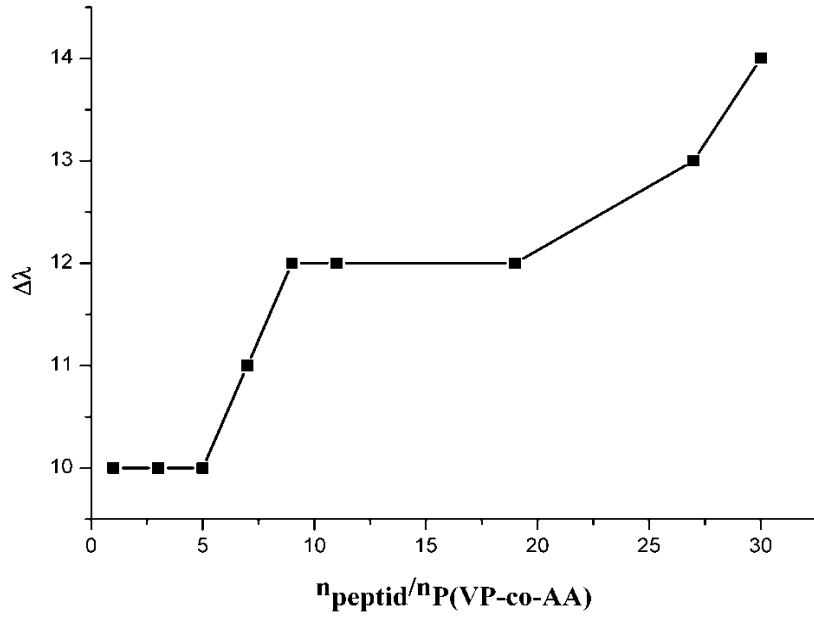


(b)

Şekil 6. 8 Artan oranlarda ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}}$) P(VP-co-AA)-Peptid konjugatları içinde bulunan peptidlerin maksimum floresans şiddetleri (a); artan oranlarda ($n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}}$) P(VP-co-AA)-Peptid konjugatlarına ait maksimum floresans şiddetleri (b).



(a)

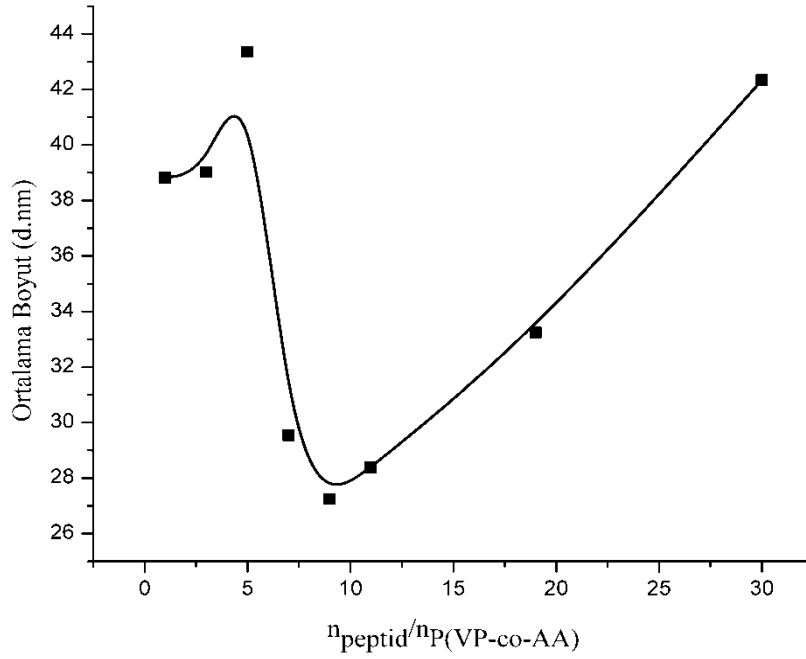


(b)

Şekil 6. 9 Artan $n_{\text{peptid}}/n_{\text{PAA}} = 1, 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19, 23, 27, 30$ oranlarındaki PAA-peptid konjugatlarına ait Floresans Spektrumlarındaki $\lambda_{\text{maksimum}}$ (a) ve $\Delta\lambda$ (b) değerleri

Bu nedenle bu konjugatların analizi için daha hassas bir yöntem olan Floresans cihazında ölçümler alınmıştır (Şekil 5.49). Şekil 6.8' de kopolimer konsantrasyonunun sabit, peptid konsantrasyonunun artan oranlarında sentezlenen P(VP-co-AA)-Peptid biyokonjugatlarının floresans şiddetinin (I_{max}) peptid konsantrasyonuna bağlılığı

verilmiştir. Serbest 121-134 peptid dizisinin 350 nm'deki maksimum dalga boyu, P(VP-co-AA)-Peptid biyokonjugatlarında artan peptid konsantrasyonuna bağlı 336 nm dalga boyuna kaymaktadır (Şekil 6.9-a). Maksimum dalga boyunda gözlenen mavi bölgeye doğru olan kaymalar, biyokonjugat oluşumu sonucu peptidin P(VP-co-AA) zincirleri tarafından sarıldığını ve peptid dizisinde yer alan triptofan amino asidinin sulu ortamdan uzaklaştığını ifade etmektedir (Şekil 6.9-b). PAA polimeri ile oluşturulan konjugatlara kıyasla, P(VP-co-AA) kopolimeri ile oluşturulan konjugatlarda maviye doğru kayma daha fazla olmuştur (Şekil 6.9-a ve 6.9-b). Bunun nedeninin kopolimerimizin homopolimere göre triptofan amino asidini daha fazla sararak sudan uzaklaştırması ve kopolimerimizin homopolimere göre daha hidrofobik özellik göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 6. 10 Artan $n_{\text{peptid}}/n_{\text{VP/AA}}$ oranlarına ait moleküllerin ortalama boyutları (d.nm)

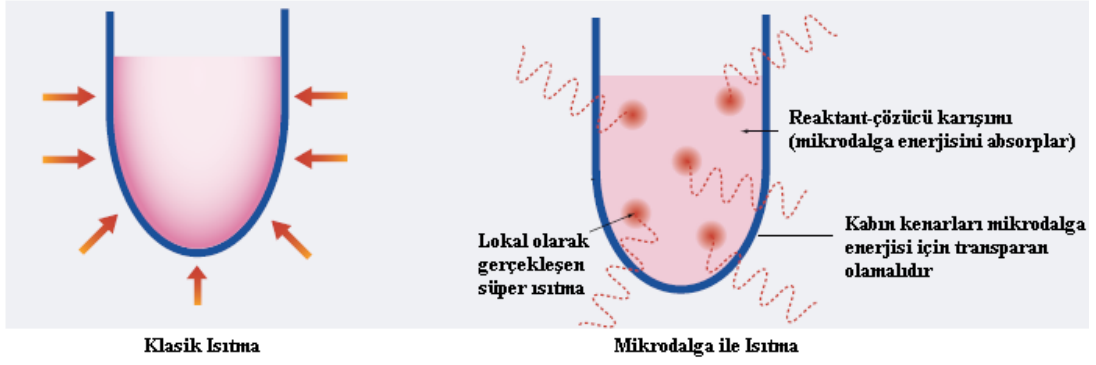
pH = 7.0 değerinde P(VP-co-AA)-peptid sistemleri incelendiğinde $n_{\text{pep}}/n_{\text{PAA}} = 1, 3, 5, 7, 9, 11, 19$ ve 30 oranlarındaki ışığın saçılma şiddetine karşılık boyut dağılımları ve zeta potansiyel ölçüm sonuçları doğrultusunda sentezlenen moleküllerin ortalama boyutlarını gösteren grafik Şekil 6.10' da gösterilmektedir. Zeta Sizer'dan elde edilen sonuçlar incelendiğinde $n_{\text{pep}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 5$ oranına kadar artış gösteren P(VP-co-AA)-

peptid konjugat moleküllerinin boyutu $n_{pep}/n_{PAA} = 9$ 'a kadar düşmüştür. $n_{pep}/n_{P(VP-co-AA)} = 9$ 'dan $n_{pep}/n_{P(VP-co-AA)} = 30$ 'a kadar lineer bir artış göstermektedir. PAA ve P(VP-co-AA) kullanılarak sentezlenen Polimer-peptid konjugatları birbir ile kıyaslandığında PAA-peptid konjugatlarının daha yüksek noran' larına kadar konjugat boyutu artış göstermekte ve sonrasında azalmaktadır. P(VP-co-AA) (2:1) kopolimerine göre yapısında daha fazla karboksil grubu içeren PAA sterik engellemenin daha az olduğu bir sistemde peptidlerin PAA üzerine bağladığını göstermektedir. Yani her iki polimerin konjugatlarının ortalama boyutlarında ki düşüş noktaları incelenecek olursa, PAA konjugatlarının daha yüksek mol oranlarında boyutta azalma olmuş ve bu da o noktalara kadar PAA'nın zincirine daha fazla peptidi bağlayabildiğini göstermektedir. Genel olarak oluşan P(VP-co-AA)-peptid konjugatları incelendiğinde, konjugat partiküllerinin boyut dağılımları peptid miktarına bağlı olarak değişmektedir. Hiçbir oranda, serbest peptide karşılık gelen 1nm civarında bir pik görülmemektedir. $n_{peptid}/n_{P(VP-co-AA)} = 1$ ile başlayan boyut değerleri, serbest PAA'ya göre farklılık göstermektedir. Buna göre diyebiliriz ki, oran arttıkça eklenen tüm peptid, kopolimer ile konjugat oluşturmaktadır. Oluşan bu konjugatlar belirli mol oranlarında daha kompakt bir yapı alarak ortalama boyut değerlerinde inişlere ve çıkışlara neden olmaktadır.

6.2.1 Mikrodalga Teknolojisi Kullanılarak Organik Ortamda Sentezlenen Konjugatlara Ait Tartışma

İlk kez 1986'da R. Gedye ve R. J. Majetich tarafından organik kimyada mikrodalga teknolojisinin kullanılmasıyla yapılan çalışmada, hotplate gibi cihazlarla ısıtılarak gerçekleştirilenlere göre, reaksiyonların çok daha hızlı ilerlediği (örneğin 8 saat sürebilecek bir reaksiyonun dakikalar içinde tamamlandığı) görülmüştür. Mikrodalga yöntemi başlarda çok rağbet görmemesine rağmen, ilerleyen teknolojiyle birlikte her geçen gün daha çok kullanılan bir yöntem haline gelmektedir [69-71].

Mikrodalga yönteminde örnek doğrudan, reaksiyon kabı tarafından değil, mikrodalga ışınları tarafından ısıtılmaktadır. Bu yöntemin önemli iki faydası vardır. Bunlardan birincisi, reaksiyon karışımına daha etkin bir enerji aktarımıdır ikincisi ise reaksiyon kabının ortası ile kenarındaki bileşenlerin eşit miktarda enerjiye maruz kalmalarıdır.

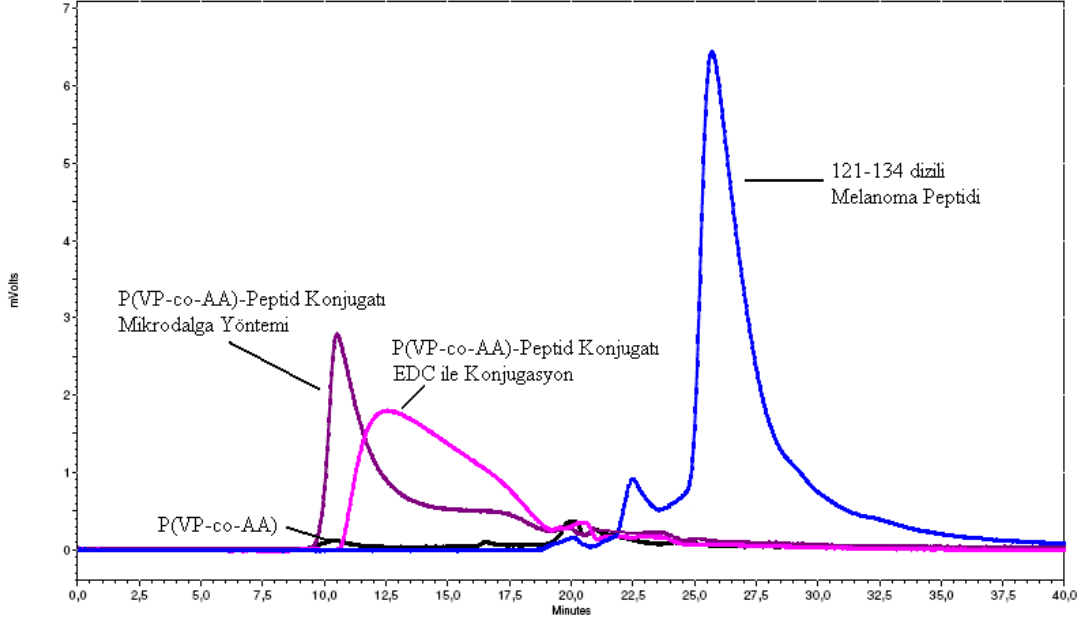


Şekil 6. 11 Mikrodalga Teknolojisi ve Klasik yolla ısıtmanın farkı [95].

Mikrodalgayla enerji transferi her nanosaniyede bir gerçekleşmekte ve bu süre moleküllerin durulması için gerekli süreden daha kısa olmaktadır. Moleküller tamamen durulmadan tekrar tekrar enerjiye maruz kaldıklarından, reaksiyonun gerçekleşmesi için gerekli aktivasyon enerjisini aşabilecek duruma gelmeleri kolaylaşmakta ve reaksiyon çok daha çabuk tamamlanmaktadır [69-72].

Bu nedenle, çalışmalarımızda kullanılan P(VP-co-AA)-Peptid biyokonjugatlarının sentezinde de kullanılabileceği ve biyokonjugasyonun daha çabuk gerçekleşeceği düşünülmüştür.

Karşılaştırma amacı ile bileşenlerinin konsantrasyonları aynı olacak şekilde P(VP-co-AA)-Peptid biyokonjugatları; $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 32,25$ oranında fare başına 1 mg / 0,5 ml'de Mage-3 proteininin 121-134 dizisini içerecek şekilde hem EDC çapraz bağlayıcısı varlığında, hem de mikrodalga teknolojisi kullanılarak organik ortamda sentezlenmiştir. İki farklı metotla sentezlenen P(VP-co-AA)-Peptid biyokonjugatlarına ait HPLC cihazının kromatogramları Şekil 6.12'de gösterilmektedir. Kromatogramdan da görüldüğü gibi farklı yöntemlerle sentezlenen konjugatlar farklı karakterler sergilemektedir. Mikrodalga enerjisi kullanılarak sentezlenen konjugat klasik konjugasyon yöntemiyle sentezlenene göre daha monodispers bir pik sergilemektedir. Klasik yöntemle sentezlenen konjugat ise daha geniş bir pike sahiptir. Birbirleriyle karşılaştırıldıklarında immünolojik sonuçlardan da anlaşılacağı gibi mikrodalga yöntemiyle sentezlenen konjugat antijenik bölgeleri içeride kalacak şekilde daha kompakt bir yapıda sentezlenmiştir.



Şekil 6. 12 Yöntem 1 ve Yöntem 2' ye göre sentezlenen P(VP-co-AA)-peptid konjugatlarına ait HPLC Kromatogramı

6.3 ELISA Yöntemi Kullanılarak Farelerden Alınan Serum Örneklerinde Hazırlanan Fiziksel Karışım ve Biyokonjugatlara Karşı Oluşan Antikor Miktarına Ait Tartışma

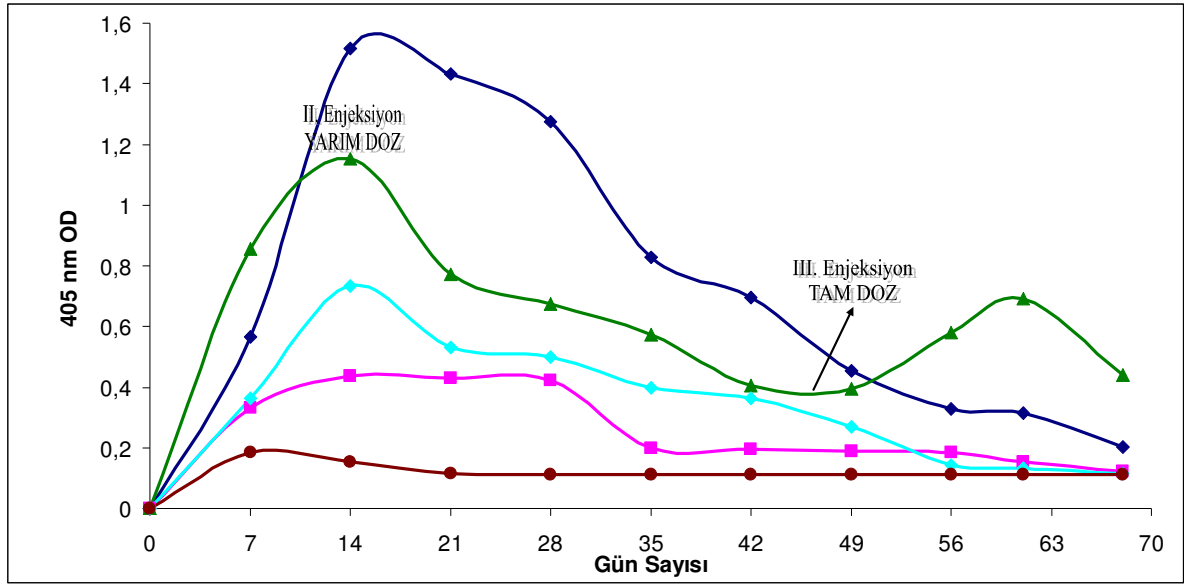
GRUP 1:

BSA-Peptid konjugatının farelere enjeksiyonları birinci deney grubu olarak belirlendi. Yöntem 1'e göre EDC varlığında $n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}} = 17,74$ oranında sentezlenen BSA-peptid konjugatının balb/c farelere enjeksiyonları Çizelge 5.5' de gösterildiği gibi yapılmıştır. Mol oranı $n_{\text{peptid}}/n_{\text{BSA}} = 17,74$ oranında olan BSA-peptid konjugatı 1 mg peptid/fare içerecek şekilde (Grup 1) ve immünizasyonu tek dozda yapılmıştır. Tek dozda yapılan immünizasyonu sonucu kontrole ve diğer tüm gruplara oranla fare serumlarında bu konjugata spesifik olarak çok daha yüksek seviyede antikor oluşumu gözlenmiştir. Antikor miktarı 14. günde maksimuma ulaştıktan sonra azalmaya başlamıştır. Enjeksiyon sonrasında 70. günde dahi kontrole oranla oldukça yüksek BSA-Peptid biyokonjugatına karşı spesifik antikor bulunmaktadır [8, 14, 21, 25, 43, 73].

Dilgimen ve arkadaşları [15]; eşit konsantrasyonda BSA içeren CP-BSA konjugat çözeltilerini (0.01-0.10 g/dl dilüe ve 0.448-2.286 g/dl konsantre) farelere enjekte etmişler. Konsantrasyonu düşük ve yüksek olan CP-BSA konjugatlarına karşı immün cevap oluşumunu incelemişler. Farelere serbest BSA enjekte edilmesi durumunda doza bağlı olarak antikor oluşumu tetiklenmiştir. Konsantrasyonu düşük (0.01-0.10 g/dl) CP-BSA çözeltilerine karşı çok düşük düzeyde antikor oluştuğunu rapor etmişler. Konsantre 0.448-2.286 g/dl CP-BSA çözeltilerine karşı immünizasyon sonrası 7 günde maksimuma ulaşan 50 gün boyunca etkisini sürdüren immünolojik aktivite gözlemişler.

P(VP-co-AA)-Peptid fiziksel karışım ve biyokonjugatlarının farelere enjeksiyonları paralel deney grupları olarak yapıldı. Hazırlanan P(VP-co-AA)-peptid kompleksleri ile yöntem 1'e göre EDC varlığında $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 32,25$ oranında sentezlenen P(VP-co-AA)-peptid biyokonjugatı ve yöntem 2'ye göre Mikrodalga enerjisi kullanılarak organik ortamda $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 32,25$ oranında sentezlenen P(VP-co-AA)-peptid biyokonjugatının balb/c farelere enjeksiyonları Çizelge 5.5' de gösterildiği gibi yapılmıştır.

Şekil 5.62’de intraperitoneal (karıncaltı) enjeksiyonları yapılan ve 7 gün aralıklarla 70 gün boyunca balb/c fare serumlarında P(VP-co-AA)-peptid kompleks ve konjugatlarına karşı spesifik olarak oluşan antikor oluşum kinetiği indirek ELISA yöntemi ile saptanmıştır [8, 9, 15, 22, 31, 71, 93, 94, 96]. Çizelge 5.5’ de özellikleri tanımlanan deney gruplarından 6. gruba 14. ve 49. günlerde II. Ve III. Enjeksiyonları yapılmıştır (Şekil 6.13). Şekil 6.13’de Peptid-P(VP-co-AA) kompleks ve konjugatlarına karşı spesifik olarak oluşan antikor miktarları gösterilmiştir.



Şekil 6. 13 (♦) Peptid-P(VP-co-AA) kompleksi (0,5 mg/0,5 ml), (▲) Peptid-P(VP-co-AA) kompleksi (1 mg/0,5 ml) , Yöntem 1’e göre EDC çapraz bağlayıcısı varlığında sentezlenen (■) Peptid-BSA konjugatı (1 mg/0,5 ml) ve (■) Peptid-P(VP-co-AA) konjugatı (1 mg/0,5 ml), Yöntem 2’ye göre mikrodalga enerjisi kullanılarak organik ortamda sentezlenen (●) Peptid-P(VP-co-AA) konjugatına (1 mg/0,5 ml) karşı 70 gün boyunca 7 gün aralıklarla alınan fare serumlarında ELISA yöntemiyle tayin edilen antikor miktarlarının karşılaştırılması

GRUP 2:

Peptid-P(VP-coAA) konjugatının farelere enjeksiyonları deney grubu 2 olarak belirlendi. Yöntem 1’e göre EDC varlığında $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 32,25$ oranında sentezlenen Peptid-P(VP-coAA) konjugatının balb/c farelere enjeksiyonları Çizelge 5.5’ de gösterildiği gibi yapılmıştır. Mol oranı $n_{\text{peptid}}/ n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 32,25$ oranında olan Peptid-P(VP-coAA) konjugatı 1 mg peptid/fare içerecek şekilde (Grup 2) ve

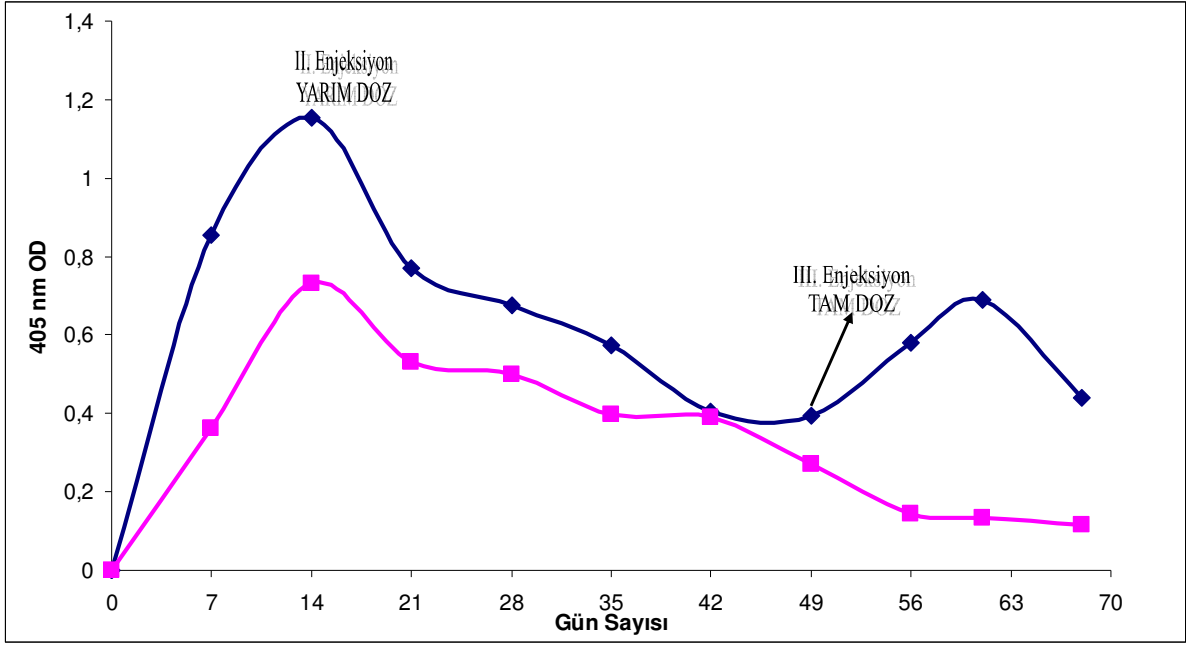
immünizasyonu tek dozda yapılmıştır. Tek dozda yapılan immünizasyonu sonucu kontrole ve diğer tüm gruplara oranla fare serumlarında bu konjugatlara spesifik olarak düşük seviyede antikor oluşumu gözlenmiştir. Antikor miktarı 14. günde maksimuma ulaştıktan sonra 28. güne kadar aynı değerlerde kalmış fakat 28. günden sonra azalmaya başlamıştır.

GRUP 3:

Bir başka Peptid-P(VP-coAA) konjugatının farelere enjeksiyonları deney grubu 3 olarak belirlenmiştir. Yöntem 2'ye göre mikrodalga enerjisi kullanılarak organik ortamda $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 32,25$ oranında sentezlenen Peptid-P(VP-coAA) konjugatının balb/c farelere enjeksiyonları Çizelge 5.5' de gösterildiği gibi yapılmıştır. Mol oranı $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 32,25$ oranında olan Peptid-P(VP-coAA) konjugatı 1 mg peptid/fare içerecek şekilde (Grup 3) ve immünizasyonu tek dozda yapılmıştır. Tek dozda yapılan immünizasyonu sonucu kontrole ve diğer tüm gruplara oranla fare serumlarında bu konjugatlara spesifik olarak çok düşük seviyede antikor oluşumu gözlenmiştir. 70 gün boyunca yapılan ELISA testlerinde antikor oluşumu çok düşük seviyede aynı şekilde seyretmektedir.

GRUP 4 ve GRUP 5:

Konjugatlara paralel olarak fiziksel etkileşim sonucu oluşan Peptid-P(VP-coAA) komplekslerinin farelere enjeksiyonları deney grubu 4 ve 5 olarak belirlendi. $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 32,25$ oranında sentezlenen Peptid-P(VP-coAA) komplekslerinin balb/c farelere enjeksiyonları Çizelge 5.5' de gösterildiği gibi yapılmıştır. Mol oranı $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 32,25$ oranında olan Peptid-P(VP-coAA) kompleksleri fare başına 0,5 mg ve 1 mg peptid içerecek şekilde (Grup 4 ve 5) ve enjeksiyonları yapılmıştır.

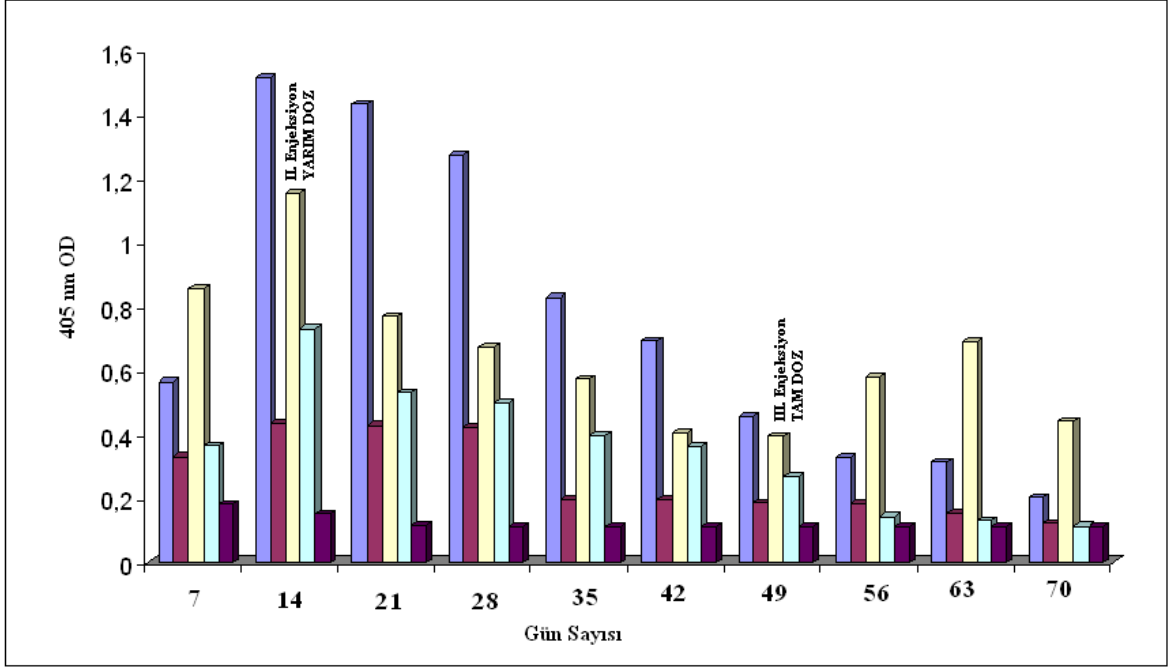


Şekil 6. 14 Peptid-P(VP-co-AA) kompleksi (0,5 mg/0,5 ml), Peptid-P(VP-co-AA) kompleksine(1 mg/0,5 ml) karşı 70 gün boyunca 7 gün aralıklarla alınan fare serumlarında ELISA yöntemiyle tayin edilen antikor miktarlarının karşılaştırılması

Tek dozda Grup 4'e fare başına 0,5 mg (yarım doz) peptid içeren kompleksin immünizasyonu sonucu kontrole ve diğer Peptid-P(VP-coAA) konjugat gruplarına oranla fare serumlarında bu komplekse karşı daha yüksek seviyede antikor oluşumu gözlenmiştir. Antikor miktarı 14. günde maksimuma ulaştıktan sonra azalmaya başlamıştır (Şekil 6.14).

Tek dozda Grup 5'e fare başına 1 mg (tam doz) peptid içeren kompleksin immünizasyonu sonucu diğer tüm gruplara oranla Peptid-BSA konjugat grubundan sonra fare serumlarında bu komplekse karşı en yüksek seviyede antikor oluşumu gözlenmiştir. Tam doz yapılan enjeksiyon sonucu yarım doz olarak yapılan enjeksiyonun iki katı olarak antikor artışı gözlenmiştir. Antikor miktarı 14. günde maksimuma ulaştıktan sonra diğer gruplarda gözlendiği gibi azalacağından 14. günde ikinci bir enjeksiyon yapıldı. II. enjeksiyonda 0,5 mg peptid içeren kompleksin (yarım doz) Grup 5'e immünizasyonu yapılmıştır. Fakat yapılan yarım dozlu enjeksiyonun beklenildiği gibi bir etkisi olmamıştır. Antikor seviyesi 1. grup hariç diğer tüm gruplara göre en yüksek seviyede olmakla birlikte azalmaya başlamıştır. Yarım dozla istenilen sonuç alınamayınca 49. günde üçüncü enjeksiyon yapılmıştır. III. enjeksiyonda 1 mg

peptid içeren kompleksin (tam doz) Grup 5'e immünizasyonu yapılmıştır. III. Enjeksiyon sonrasında antikor miktarında tekrar artış gözlenmiş 63. günde 2. maksimum noktasını yapmış fakat tekrar düşüşe geçmiştir. Enjeksiyon sonrasında 70. günde dahi kontrole oranla oldukça yüksek Peptid-P(VP-co-AA) kompleksine karşı spesifik antikor bulunmaktadır.



Şekil 6. 15 Peptid-P(VP-co-AA) kompleksi (0,5 mg/0,5 ml), **Peptid-P(VP-co-AA) kompleksi (1 mg/0,5 ml)**, Yöntem 1'e göre EDC çapraz bağlayıcısı varlığında sentezlenen **Peptid-BSA konjugatı (1 mg/0,5 ml)** ve **Peptid-P(VP-co-AA) konjugatı (1 mg/0,5 ml)**, Yöntem 2'ye göre mikrodalga enerjisi kullanılarak organik ortamda sentezlenen **Peptid-P(VP-co-AA) konjugatına (1 mg/0,5 ml)** karşı enjeksiyon sonrası (70 gün boyunca) balb/c fare serumlarından elde edilen spesifik antikor düzeyi

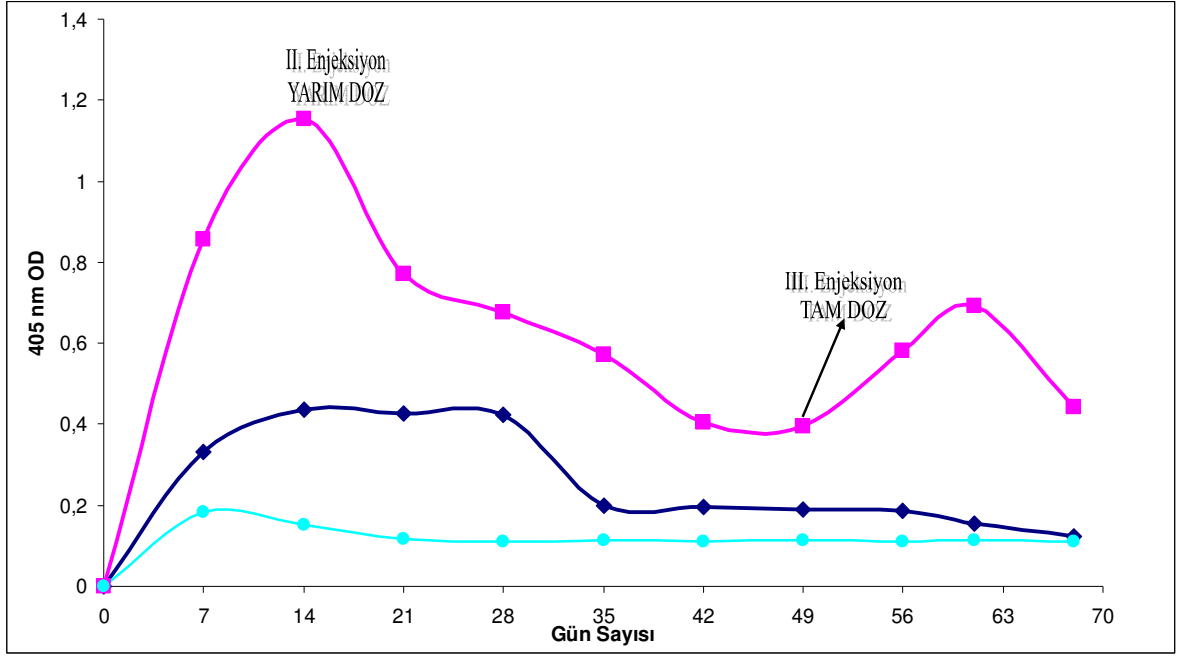
Şekil 6.15'de mol oranı $n_{\text{peptid}} / n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 32,25$ oranında 1 mg peptid/fare içerecek şekilde yöntem 1'e göre sentezlenen P(VP-co-AA)-Peptid biyokonjugatlarının (Grup 2) tek dozda yapılan immünizasyonu sonucu kontrole oranla (Grup6) fare serumlarında bu konjugatlara spesifik olarak daha yüksek seviyede antikor oluşumu gözlenmiştir.

Bileşenlerinin $n_{\text{peptid}} / n_{\text{P(VP-co-AA)}} = 32,25$ oranında 1 mg peptid/fare içerecek şekilde yöntem 2'ye göre sentezlenen P(VP-co-AA)-Peptid biyokonjugatlarının (Grup 3) tek dozda yapılan immünizasyonu sonucu fare serumlarında bu konjugatlara karşı spesifik olarak antikor oluşumu kontrole oranla (Grup6) daha yüksek seviyede gözlenmiştir.

Fakat yöntem 1' e göre sentezlenen P(VP-co-AA)-Peptid biyokonjugatlarına karşı oluşan immün cevap yöntem 2' ye göre sentezlenen P(VP-co-AA)-Peptid biyokonjugatlarından daha fazladır.

Bileşenlerinin $n_{\text{peptid}}/n_{\text{P(VP-co-AA)}}$ farklı oranlarında fare başına 0.5 mg ve 1 mg peptid içerecek şekilde hazırlanan, tekli ve çoklu dozlarda enjeksiyonları yapılan P(VP-co-AA)-peptid fiziksel komplekslerinin (Grup 4 ve Grup 5) immün yanıt oluşumunu yöntem 1 ve 2' ye göre sentezlenen P(VP-co-AA)-peptid biyokonjugatlarına göre daha fazla indüklediği görülmüştür. Bu fiziksel komplekslerin HPLC kromatogramlarında (Şekil 5.41) konjugatlara kıyasla farklı karakteristik özellikte pik göstermesiyle de görülmektedir. Literatür taramalarında; molekül ağırlığı yaklaşık 1500'den az olan sentetik antijenlerden immün yanıt elde etmek için peptid molekülünü bir taşıyıcı moleküle bağlamak gerektiği söylenmektedir [22, 23, 97-100].

Yapılan bir çalışmada 10 amino asid dizisinden oluşan luteizin hormon serbestleştirici hormonunu (LHRH) taşıyıcı bir protein yerine T4 epitopuna 4 farklı konformasyonda çapraz bağlayıcı varlığında kovalent olarak bağlanmış ve 20 nmol LHRH peptid dizisi içerecek şekilde Freund's adjuvant (CFA) ile karıştırılarak balb/c farelere enjekte edilmiştir. 4 hafta sonrasında bilimadamları ikinci bir immünizasyon yapmalarına rağmen, aynı konsantrasyonda enjekte edilen immünojenlerden sadece birine karşı immünolojik yanıt almışlardır .



Şekil 6. 16 Peptid-P(VP-co-AA) kompleksi (1 mg/0,5 ml) , Yöntem 1'e göre EDC çapraz bağlayıcısı varlığında sentezlenen Peptid-P(VP-co-AA) konjugatı (1 mg/0,5 ml), Yöntem 2'ye göre mikrodalga enerjisi kullanılarak organik ortamda sentezlenen Peptid-P(VP-co-AA) konjugatına (1 mg/0,5 ml) karşı 70 gün boyunca 7 gün aralıklarla alınan fare serumlarında ELISA yöntemiyle tayin edilen antikor miktarlarının karşılaştırılması

İmmunolojik çalışmalarımızda; sırasıyla Grup 3 ve 2' den diğer gruplara kıyasla daha düşük immün cevap alınması (Şekil 6.16), yukarıda belirtilen çalışmalarda ki gibi konjugat ve kompleksin konformasyonuna bağlı olabileceğini göstermektedir.

Bir başka açıdan inceleyecek olursak, grup 5'de peptid-P(VP-co-AA) kompleksine karşı oluşan spesifik antikor düzeyinin grup 4'e karşı oluşan antikor düzeyinin iki katı olması, oluşan immün cevabın yukarıda örnek gösterilen çalışmada belirtildiği gibi fiziksel karışım içerisinde bulunan peptid konsantrasyonuna bağlı olabileceğini göstermektedir.

Melanoma tümörünün Mage3 proteininin 121-134 peptid dizisi Merrifield katı-hal kimyasal yöntemi ile sentezlemişler ve karbodiimid varlığında doğrudan iki farklı yapıli kopolimere kovalent konjugasyon yöntemi ile bağlanmıştır. Peptid dizisinin taşıyıcısının immünolojik deneylerde öneminin anlaşılması için birbirine paralel olarak farklı yöntemlerle çeşitli biyokonjugatlar sentez edilmiştir. Peptidler önce negatif yüklü sentetik bir polielektrolit olan poliakrilik asit (PAA) ile kovalent yolla konjuge edildi. Sentezlenen bu konjugatların oluşum mekanizmasının daha iyi bir şekilde

anlaşılabilmesi için peptid ve polielektrolit arasında oluşan elektrostatik etkileşim incelenmiştir. İkinci aşamada ise, antijenik özellik taşıyan peptid molekülü canlı sisteme daha uyumlu ve PAA' ya göre daha az toksik etkiye sahip olan polielektrolitler biyokompleks ve biyokonjugatların oluşumu için denenmiştir. Bu polielektrolitler termal yöntem ve mikrodalga enerjisi kullanılarak sentezlenmiş ve içlerinden canlı sisteme en uyumlu olanı seçilmiştir.

Geliştirilmiş peptid içeren polimerik biyokompleks ve biyokonjugatlar immünojenik özellikleri farelerde araştırılarak kan serumlarında peptide karşı yüksek titreli spesifik antikor oluşumu tespit edilmiştir. Peptid aşularının etkin çalışabilmesi için kompleks ve konjugatların yapısında eşzamanlı olarak tümöre-spesifik T-helper lenfositlerinin aktivasyonu için gerekli olan T-epitoplarının bulunmasının önemli olduğu vurgulanmıştır.

Çalışmamızda, Peptid-BSA konjugatının tez doz intraperitoneal yolla enjeksiyonu sonrasında hızla yükselmeye başlayan ve 14 günde maksimuma ulaştıktan sonra giderek azalan spesifik antikor cevabı gözlenmiştir. 70 gün sonrasında dahil antikor düzeyi sıfıra ulaşmamıştır. BSA ile konjuge edilen T-hücre epitoplarının yüksek immünite gösterdiği bir çok literatürde gösterilmiştir [8, 14, 21, 25, 43, 73].

Melanoma hastalığı peptid dizisinin polielektrolitler ile olan fiziksel karışım ve konjugasyonunda, fiziksel karışım ile elektrostatik etkileşimle meydana gelen Peptid-P(VP-co-AA) kompleksine karşı en yüksek immün cevap oluşmuştur. En yüksek immün yanıt alınan Peptid-P(VP-co-AA) kompleksi yapısında bulunan kopolimerinin sentezlenen biyokonjugatlara oranla daha yüksek immün cevap oluşturmasının nedeni kompleksin konformasyonu ile ilgilidir.

Yöntem 1' e göre EDC varlığında klasik konjugasyon yöntemiyle sentezlenen biyokonjugat ile Yöntem 2' ye göre mikrodalga enerjisi kullanılarak organik ortamda sentezlenen biyokonjugata karşı oluşan immün yanıt karşılaştırılmıştır. Yöntem 1'e göre sentezlenen biyokonjugata karşı oluşan immün cevap daha yüksektir. Bunun nedeni mikrodalga yöntemiyle sentezlenen konjugat yapısının klasik yolla sentezlenen konjugata göre daha kompakt olmasıdır.

Konjugatlarla yapılan karşılaştırmalı analizlerinden de görüldüğü gibi fiziksel karışım ile oluşan kompleksler daha açık bir konformasyonda oluşmaktadır. Böylece, kompleks

içinde yer alan peptid dizileri açıkta kalmakta ve kandaki plazma proteinleri ve hücre yüzeyindeki proteinlerle karşılıklı etkileşimde bulunabilmektedir.

Sonuç olarak, fiziksel karışım ile elektrostatik etkileşim sonucu oluşan kompleksleri, sentezlenen konjugatlar içerisinde immün sistemi en iyi şekilde aktifleyerek spesifik immün cevap oluşturmuştur. Bu tez çalışması, yüksek immun cevabın elde edilmesi ile Melanoma kanserine karşı çeşitli koruyucuların geliştirilmesi (prophylactics) ve tümörlerin teşhisinde kullanılacak spesifik antikorların elde edilmesi yolunda atılmış önemli bir adımdır.

KAYNAKLAR

- [1] Anderson, K.S. ve LaBaer, J., (2005). "The sentinel within: exploiting the immune system for cancer biomarkers", *Journal of Proteome Research*, 4:1123-1133.
- [2] Chen, Q., Jackson, H., Shackleton, M., Parente, P., Hopkins, W., Sturrock, S., MacGregor, D., Maraskovsky, E., Tai, T.Y. ve Dimopoulos, N., (2005). "Characterization of antigen-specific CD8+ T lymphocyte responses in skin and peripheral blood following intradermal peptide vaccination", *Cancer Immunology*, 5, 5-12.
- [3] Davis, I.D., (2000). An overview of cancer immunotherapy, *Immunology and Cell Biol*, 78, 179-195.
- [4] Ge, H.L., Wang, Y., Wang, S.J. ve Zhang, Y., (2006). "Identification of melanoma-specific peptide epitopes by HLA-A2.1-restricted cytotoxic T lymphocytes", *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 38:110-118.
- [5] Jager, E., Gnjjatic, S., Nagata, Y., Stockert, E., Jager, D., Karbach, J., Neumann, A., Rieckenberg, J., Chen, Y.T. ve Ritter, G., (2000). "Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8+ T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+ cancers", *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 12198-12203.
- [6] Smith, C. ve Cerundolo, V., (2001). "Immunotherapy of melanoma", *Immunology*, 104:1-7.
- [7] Nestle, F., (2002). "Vaccines and melanoma", *Clinical and experimental dermatology*, 27:597-601.
- [8] Basalp, A., Bermek, E., Cirakoglu, B., Coka, V., Mustafaev, M.I. ve Sarac, A.S., (1996). "Immune response to 17 beta-estradiol in polyelectrolyte complex: antigen specificity and affinity of hybridoma clones", *Hybridoma*, 15:233-238.
- [9] Basalp, A., Mustafaeva, Z., Mustafaev, M. ve Bermek, E., (2000). "Immune response to 17beta-estradiol involved in polymer gels: antigen specificity and affinity of hybridoma clones", *Hybridoma*, 19:495-499.

- [10] Basalp, A., Mustafaeva, Z. ve Mustafaev, M., (2002). "Immunogenic Cu²⁺-induced biopolymer systems comprising a steroid hormone, protein antigen, and synthetic polyelectrolytes", *Hybrid Hybridomics*, 21:45-51.
- [11] Berezin, I.V., Mustafaev, M. I., Dikov, M. M. ve Egorov, A. M., (1980). "Methods of preparation of stabile enzymes, containing SH- groups", No: 2835139/28- 04/150959.
- [12] Chegel, V., Shirshov, Y., Avilov, S., Demchenko, M. ve Mustafaev, M., (2002). "A novel aldehyde dextran sulfonate matrix for affinity biosensors", *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 50:201-216.
- [13] Chegel, V., Shirshov, Y., Avilov, S., Verevka, S., Demchenko, M. ve Mustafaev, M., (2000). "Oxidized polysaccharides as matrix structures for surface plasmon resonance biosensors", *Functional materials*, 7:703-710
- [14] Abuchowski, A., Van Es, T., Palczuk, N. ve Davis, F., (1977). "Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol", *Journal of Biological Chemistry*, 252:3578-3581.
- [15] Dilgimen, A.S., Mustafaeva, Z., Demchenko, M., Kaneko, T., Osada, Y. ve Mustafaev, M., (2001). "Water-soluble covalent conjugates of bovine serum albumin with anionic poly(N-isopropyl-acrylamide) and their immunogenicity", *Biomaterials*, 22:2383-2392.
- [16] Dincer, B., Mustafaev, M. ve Bayuelken, S., (1997). "High performance liquid chromatography study of water-soluble ternary polyacrylamide metal-protein complexes", *Journal of Applied Polymer Science*, 65:37-40.
- [17] Filenko, A., Demchenko, M., Mustafaeva, Z., Osada, Y. ve Mustafaev, M., (2001). "Fluorescence study of Cu²⁺-induced interaction between albumin and anionic polyelectrolytes", *Biomacromolecules*, 2: 270-277.
- [18] Güney, O., Sarac, A.S. ve Mustafaev, M.I., (1997). "Fluorescence and turbidimetry study of complexation of human serum albumin with polycations", *Journal of bioactive and compatible polymers*, 12: 231-244.
- [19] Kabanov, V.A., Mustafaev, M.I., Nekrasov, A.V., Norimov, A. ve Petrov, R.V., (1984). "Critical nature of the effect of the degree of polyelectrolyte polymerization on immunostimulating properties", *Doklady Akademii Nauk SSSR*, 274: 998-1001.
- [20] Mustafaev, M. ve Norimov, A.S., (1990). "Polymer-metal complexes of protein antigens--new highly effective immunogens", *Biomedical science*, 1: 274-278.
- [21] Mustafaev, M., Osada, Y., Matsukata, M., Basalp, A., Cirakoglu, B. ve Bermek, E., (1996). "New amphiphilic immunogens by poly (N-Isopropylacrylamide)-modified bovine serum albumin", *Polymer Gels and Networks*, 4: 363-372.
- [22] Mustafaev, M.I., (1996). *Biyopolimerler*, (Marmara Araştırma Merkezi).
- [23] Mustafaev, M.I., (1996). "Polyelectrolytes in Immunology: Fundamentals and Perspectives", *Turkish Journal of Chemistry*, 20: 126-138.
- [24] Mustafaev, M. ve Saraç, A., (1996). *Polyelectrolyte complexes (in immunology): The Polymeric Materials. Encyclopedia. Synthesis, Properties*

and Applications, JC Salomone, ed., CRC Press Inc., Boca Raton, FL, 5771-5777.

- [25] Mustafaev, M., Bayülken, S., Ergen, E., Yılmaz Erkol, A. ve Ardagil, N., (2001). "Radiation-induced formation of polyacrylic acid–protein covalent conjugates", *Radiation Physics and Chemistry*, 60: 567-575.
- [26] Mustafaev, M., Mustafaeva, Z., Ergen, E., Uraki, Y. ve Sano, Y., (2002). "Novel betulin-containing polyelectrolyte Conjugates", *Journal of bioactive and compatible polymers*, 17: 251-269.
- [27] Mustafaev, M. ve Mustafaeva, Z., (2002). "Novel polypeptide-comprising biopolymer systems", *Technology and Health Care-Journal of the European Society for Engineering and Medicine*, 10: 217-226.
- [28] Özeroglu, C., Namazova, N., Mustafaev, M. ve Saraç, A., (1996). "The complex formation between polyacrylamide containing glycine end groups and bovine serum albumin in the presence of copper (II) in neutral aqueous media", *Colloid & Polymer Science*, 274: 418-427.
- [29] Özeroğlu, C., Güney, O., Sarac, A.S. ve Mustafaev, M.I., (1996). "The polymerization of acrylamide initiated with CE (IV) and KMNO₄ redox systems in the presence of glycine", *Journal of Applied Polymer Science*, 60: 759-765.
- [30] Petrov, R., Mustafaev, M. ve Norimov, A.S., (1992). "Physico-chemical criteria for the construction of artificial immunomodulators and immunogens on the basis of polyelectrolyte complexes", *Harwood Academic Publish, UK*, 4: 1-113.
- [31] Yücel, F., Çirakoglu, B., Mustafaeva, Z. ve Mustafaev, M., (2001). "Immune Response to Progesterone Immobilized on Cu²⁺-Induced Amphiphilic Polyelectrolyte-Protein Complex: Antigen Specificity and Affinity of Hybridoma Clones", *Hybridoma*, 20: 11-15.
- [32] Hermanson, G.T., (1996). *Bioconjugate techniques*, (Academic Press).
- [33] Sheehan, J., Cruickshank, P. ve Boshart, G., (1961). "Notes-A Convenient Synthesis of Water-Soluble Carbodiimides", *The Journal of Organic Chemistry*, 26: 2525-2528.
- [34] Sheehan, J.C., Preston, J. ve Cruickshank, P.A., (1965). "A rapid synthesis of oligopeptide derivatives without isolation of intermediates", *Journal of the American Chemical Society*, 87: 2492-2493.
- [35] Chu, F.S., Chang, F.C. ve Hinsdill, R.D., (1976). "Production of antibody against ochratoxin A", *Applied and Environmental Microbiology*, 31: 831-835.
- [36] Chu, F.S. ve Ueno, I., (1977). "Production of antibody against aflatoxin B₁", *Applied and Environmental Microbiology*, 33: 1125-1128.
- [37] Wikipedia, <http://tr.wikipedia.org/wiki/Kanser>, 01.09.2009.
- [38] Rajpar, S. ve Marsden, J., (2008). *ABC of skin cancer*, Blackwell Publishing Medicine Books and Journals, London.
- [39] The Skin Cancer Foundation, <http://www.skincancer.org/melanoma/>, 02.09.2009,

- [40] Kaufman, H.L., (2005). The melanoma book: a complete guide to prevention and treatment, Gotham.
- [41] University of Minnesota, Masonic Cancer Center, <http://www.cancer.umn.edu/cancerinfo/NCI/CDR62713.html>, 15.08.2009.
- [42] Özçelik, S. ve Akyol, M., (2007). "Melanoma Epidemiyolojisi", TURKDERM, 41: 1-5.
- [43] International Agency for Research on Cancer, <http://globocan.iarc.fr/>, 15.07.2009.
- [44] Akan, E., (1992). Genel Mikrobiyoloji ve İmmünoloji, Güney Matbaası, Adana.
- [45] Bilgehan, H., (1993). Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi, Barış Yayınları, Fakülteler Kitapevi, İzmir.
- [46] Yufeng, L., Shujuan, L., Kim, M. ve Patrick, H., (2009). "Summary of the primer on tumor immunology and the biological therapy of cancer", Journal of Translational Medicine, 7: 1-5.
- [47] Laino, C., (2009). "Experimental Vaccine Improves Response in Melanoma", Oncology Times, 31, 39-41.
- [48] Martin-Orozco, N., Muranski, P., Chung, Y., Yang, X.O., Yamazaki, T., Lu, S., Hwu, P., Restifo, N.P., Overwijk, W.W. ve Dong, C., (2009). "T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity", Immunity, 31: 787-798.
- [49] Mustafae, M., (2004). Functionally Biopolymer Systems. Sigma Journal of Engineering and Natural Science, 4: 1-201.
- [50] Barrat, J.L. ve Joanny, F., (1996). "Theory of polyelectrolyte solutions", Advances in Chemical Physics, 94: 1-66.
- [51] Morawetz, H., (1966). "Polymerization in the solid state", Wiley Online Library, 12: 79-88.
- [52] Odian, G., (1991). Principles of Polymerization. Third edition, Wiley and Sons, New York.
- [53] Sato, H., Maeda, M. ve Nakajima, A., (1979). "Mechanochemistry and permeability of polyelectrolyte complex membranes composed of poly (vinyl alcohol) derivatives", Journal of Applied Polymer Science, 23: 1759-1767.
- [54] Zevin, A. ve Eltsefon, B., (1976). "Sbornik: Khimiya i tekhnologiya vysokomolekulyarnykh soyedinenii", Chemistry and Technology of High-Molecular Compounds, 10, 96.
- [55] Coleman, J. ve Edelhoch, H., (1956). "Macromolecular interactions: proteins and nucleic acids", Archives of biochemistry and biophysics, 63: 382-393.
- [56] Mori, H. ve Müller, A.H.E., (2003). "New polymeric architectures with (meth) acrylic acid segments", Progress in Polymer Science, 28: 1403-1439.
- [57] Hilgers, L.A., Nicolas, I., Lejeune, G., Dewil, E., Strebelle, M. ve Boon, B., (1998). "Alkyl-esters of polyacrylic acid as vaccine adjuvants", Vaccine, 16: 1575-1581.

- [58] De Clercq, E. ve De Somer, P., (1968). "Protective effect of interferon and polyacrylic acid in newborn mice infected with a lethal dose of vesicular stomatitis virus", *Life Sciences*, 7: 925-933.
- [59] Coppi, G., Iannuccelli, V., Bernabei, M. ve Cameroni, R., (2002). "Alginate microparticles for enzyme peroral administration", *International Journal of Pharmaceutics*, 242: 263-266.
- [60] Greaves, J.L. ve Wilson, C.G., (1993). "Treatment of diseases of the eye with mucoadhesive delivery systems", *Advanced drug delivery reviews*, 11: 349-383.
- [61] Klauser, R.J., Schmer, G., Chandler, W.L. ve Müller, W., (1990). "Consumption of complement and activation of human neutrophils by an artificial immune complex: Polyacrylic acid-IgG-polymer", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1052: 408-415.
- [62] Deliloglu, İ., Akdeste, M.M., Akdetse, Z.M., Aynagöz, G., Unver, G., Unal, N. ve Celik, N., (2002). "Preparation of synthetic peptide FMDV vaccine with newly developed antigen-polymer conjugates be used as immunogen and vaccine in veterinary medicine", In *FAO, UN2002*, 41: 349-357.
- [63] Aslam, M. ve Dent, A., (1998). *Bioconjugation: protein coupling techniques for the biomedical sciences*, Macmillan Reference Ltd., London.
- [64] Chase, J.W., Merrill, B.M. ve Williams, K.R., (1983). "F sex factor encodes a single-stranded DNA binding protein (SSB) with extensive sequence homology to *Escherichia coli* SSB", *proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 80: 5480-5484.
- [65] Yamada, H., Imoto, T., Fujita, K., Okazaki, K. ve Motomura, M., (1981). "Selective modification of aspartic acid-101 in lysozyme by carbodiimide reaction", *Biochemistry*, 20: 4836-4842.
- [66] Williams, A. ve Ibrahim, I.T., (1981). "A new mechanism involving cyclic tautomers for the reaction with nucleophiles of the water-soluble peptide coupling reagent 1-ethyl-3-(3'-(dimethylamino) propyl) carbodiimide (EDC)", *Journal of the American Chemical Society*, 103: 7090-7095.
- [67] Kosarev, E. ve Muranov, K., (2003). "Chromatography + RECOVERY= superresolution chromatography", *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 502: 764-767.
- [68] Belgeler, http://www.pb.izm.fhg.de/epc/060_equipment/020_chromatography/020_sec/index.html, 18.05.2009.
- [69] Belgeler, http://www.fiu.edu/~sabucedo/sec_chromatography.jpg, 18.05.2009.
- [70] Manual, Z.N.S.U., (2003). Malvern Instruments Ltd. ,Worcestershire.
- [71] Engvall, E., (1980). "Enzyme immunoassay ELISA and EMIT", *Methods Enzymol*, 70: 419-439.
- [72] Elektronik kitap kaynakları, <http://www.ekitapyayin.com/id/053/birincibolum.htm>, 15.12.2010.

- [73] Coligan, J., Kruisbeek, A., Margulies, D., Shevach, E. ve Strober, W., (1997). Antibody detection and preparation. Current protocols in immunology, John Wiley & Sons Inc, New York.
- [74] Altanlar, N. ve Akin, A., (1998). "Application of Elisa and Hai test for the detection of mumps virus antibodies", Acta Pharmaceutica Turcica, 40: 141-144.
- [75] National Veterinary Services Laboratuvarları, www.microvet.arizona.edu/.../ToolBox/elisa.html, 11.12.2010,
- [76] Uelzmann, H., (1958). "Copolymers of acrylic acid and N-vinylpyrrolidone-2", Journal of Polymer Science, 33: 377-379.
- [77] Aguilar, M.I., (2004). "HPLC of peptides and proteins: basic theory and methodology", Methods in Molecular Biology, 251: 3-8.
- [78] Murray, J.K. ve Gellman, S.H., (2005). "Application of microwave irradiation to the synthesis of 14-helical β -peptides", Organic letters, 7: 1517-1520.
- [79] Astbury Center for Structural Molecular Biology, <http://www.astbury.leeds.ac.uk/facil/jifweb/>, 10.06.2009.
- [80] Hayes, B.L., (2002). Microwave synthesis: chemistry at the speed of light, Volume 1, CEM publishing Matthews, N.C.
- [81] Index of Protocols, <http://www.nestgrp.com/protocols/trng/lec30img/>, 10.06.2009.
- [82] Chen, Y.T., Gure, A.O., Tsang, S., Stockert, E., Jager, E., Knuth, A. ve Old, L.J., (1998). "Identification of multiple cancer/testis antigens by allogeneic antibody screening of a melanoma cell line library", Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America, 95: 6919-6923.
- [83] Gnjatic, S., Atanackovic, D., Jager, E., Matsuo, M., Selvakumar, A., Altorki, N.K., Maki, R.G., Dupont, B., Ritter, G., Chen, Y.T., et al., (2003). "Survey of naturally occurring CD4+ T cell responses against NY-ESO-1 in cancer patients: correlation with antibody responses", Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America, 100: 8862-8867.
- [84] Gnjatic, S., Jager, E., Chen, W., Altorki, N.K., Matsuo, M., Lee, S.Y., Chen, Q., Nagata, Y., Atanackovic, D. ve Chen, Y.T., (2002). "CD8(+) T cell responses against a dominant cryptic HLA-A2 epitope after NY-ESO-1 peptide immunization of cancer patients", Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America, 99: 11813-11818.
- [85] Chaux, P., Luiten, R., Demotte, N., Vantomme, V., Stroobant, V., Traversari, C., Russo, V., Schultz, E., Cornelis, G.R. ve Boon, T., (1999). "Identification of five MAGE-A1 epitopes recognized by cytolytic T lymphocytes obtained by in vitro stimulation with dendritic cells transduced with MAGE-A1", Journal of Immunology, 163: 2928-2936.
- [86] Schuler-Thurner, B., Schultz, E.S., Berger, T.G., Weinlich, G., Ebner, S., Woerl, P., Bender, A., Feuerstein, B., Fritsch, P.O. ve Romani, N., (2002). "Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma

- patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells”, *The Journal of experimental medicine*, 195: 1279-1288.
- [87] Chadha, R., Kapoor, V. ve Kumar, A., (2006). "Analytical techniques used to characterize drug-polyvinylpyrrolidone systems in solid and liquid states-An overview”, *Journal of Scientific And Industrial Research*, 65: 459-469.
- [88] Solpan, D., Kolge, Z. ve Torun, M., (2005). "Preparation and characterization of poly(N-vinylpyrrolidone-co-methacrylic acid) hydrogels”, *Journal of Macromolecular Science*, 42: 705-721.
- [89] Alley, M.C., Scudiero, D.A., Monks, A., Hursey, M.L., Czerwinski, M.J., Fine, D.L., Abbott, B.J., Mayo, J.G., Shoemaker, R.H. ve Boyd, M.R., (1988). "Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay”, *Cancer Research*, 48: 589-601.
- [90] Mosmann, T., (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays”, *Journal of immunological methods*, 65: 55-63.
- [91] Abe, K. ve Matsuki, N., (2000). "Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT”, *Neuroscience Research*, 38: 325-329.
- [92] Deen, C., Claassen, E., Gerritse, K., Zegers, N.D. ve Boersma, W.J., (1990). "A novel carbodiimide coupling method for synthetic peptides. Enhanced anti-peptide antibody responses”, *Journal of Immunological Methods*, 129: 119-125.
- [93] Sauer, M., Foulkes, J., Worsfold, A. ve Morris, B., (1986). "Use of progesterone 11-glucuronide—alkaline phosphatase conjugate in a sensitive microtitre-plate enzymeimmunoassay of progesterone in milk and its application to pregnancy testing in dairy cattle”, *Journal of Reproduction and Fertility*, 76: 375-391.
- [94] Yücel, F. ve Cirakoglu, B., (1999). "Production of Monoclonal Antibodies specific for Progesterone”, *Turkish Journal of Biology*, 23: 393-399.
- [95] Collins, M.J., Jr., (2010). "Future trends in microwave synthesis”, *Future Medicinal Chemistry*, 2: 151-155.
- [96] Engvall, E., (1980). "Pregnancy-specific beta 1-glycoprotein (SP1). Purification and partial characterization”, *Oncodevelopmental Biology and Medicine Journal*, 1: 113-122.
- [97] Van Driel, W., Rensing, M., Kenter, G., Brandt, R., Krul, E., Van Rossum, A., Schuurin, E., Offringa, R., Bauknecht, T. ve Tamm-Hermelink, A., (1999). "Vaccination with HPV16 peptides of patients with advanced cervical carcinoma: clinical evaluation of a phase I-II trial”, *European Journal of Cancer*, 35: 946-952.
- [98] Kabanov, V.A., (2004). "From synthetic polyelectrolytes to polymer-subunit vaccines”, *Pure and applied chemistry*, 76: 1659-1678.
- [99] Pinilla-Ibarz, J., Cathcart, K., Korontsvit, T., Soignet, S., Bocchia, M., Caggiano, J., Lai, L., Jimenez, J., Kolitz, J. ve Scheinberg, D., (2000). "Vaccination of patients with chronic myelogenous leukemia with bcr-abl

oncogene breakpoint fusion peptides generates specific immune responses”,
Blood, 95: 1781-1787.

- [100] Altman, A. ve Zanetti M., (1991). "Synthetic vaccines. In Encyclopedia of human biology", Academic Press, San Diego, California.

ETİK KURUL TUTANAĞI

	<p>T.C İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU</p>	
Sayı: 111		27.08.2008
Sn. Doç. Dr. Muhammet Bektaş İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi		
Karar No: 86 Başvuru Tarihi: 08.07.2008		
Sorumluluğunu üstlendiğiniz "Melanoma Hastalığına Karşı Virus İçermeyen Yapay Aşı Prototiplerinin Geliştirilmesi" isimli proje Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul İlkelerine uygun bulunmuştur.		
 Prof. Dr. Mehmet KAYA İ. Ü. HADYEK Başkanı	 Prof. Dr. Müjdat UYSAL Üye	 Prof. Dr. Nuriye AKEV Üye
 Prof. Dr. Gülderem ŞAHİN Üye	 Doç. Dr. Alper YILMAZ Üye (Çiğdemli)	 Doç. Dr. Mehmet Yalınk Üye
 Uzm. Vet. Hek. Fatma TEKELİ Üye	 Avukat Safiye ALTUN Üye	 Mak. Müh. Seyfettin AVCI Üye
<p>İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Vakıf Güreba Caddesi 34280 Şehremini-İSTANBUL TEL : (0 212) 414 20 00/33375 E mail : deneyhyv@istanbul.edu.tr</p>		

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Kadriye KIZILBEY
Doğum Tarihi ve Yeri : 03.12.1978
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : katici@yildiz.edu.tr; kadriyekizilbey@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Biyokimya	Yıldız Teknik Üniversitesi	2004
Lisans	Kimya	Yıldız Teknik Üniversitesi	2001
Lise	Fen Bilimleri	Ortadoğu Koleji	1996

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2003-	Yıldız Teknik Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

YAYINLARI

- **Uluslararası SCI Kapsamındaki Dergilerdeki Makaleler**
 1. Mansuroglu B, Kizilbey K, Derman S, Mustafaeva Z, “Protein-Polielektrolit Kompleks ve Konjugatlarının Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Yöntemi ile İncelenmesi”, Turkish Journal of Biochemistry, 36: 21-28, 2011.

- **Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler**
 1. Kızılbey K., Mansuroglu B., Derman S., Mustafaeva Akdetse Z. “Conjugation of BSA Protein and VP/AA Copolymers”, International Journal of Natural and Engineering Sciences 3(2):36-40, 2009
 2. Mansuroglu B., Derman S., Kızılbey K., Mustafaeva Akdetse Z. “Investigation of Protein and Polymer as a Carrier on Immune System”, International Journal of Natural and Engineering Sciences 3(2):32-35, 2009

- **Bildiri (Uluslararası)**
 1. K. Kızılbey, G. Yüce, G. Dörter, İ. Güçlü, D. Dalcı, S. Bayülken, M. Mustafaev; “Effect of Radiation on the Human Lymphocyte cells in the presence of synthetic polyanions”, XII. International Biomedical Science and Technology Symposium- İzmir, 20-23 Eylül 2005. (Sözlü sunum).
 2. G. Yüce, K. Kızılbey, G. Dörter, İ. Güçlü, D. Dalcı, S. Bayülken, M. Mustafaev; “Effect of Radiation on the Lymphocyte Cells in Blood in the Presence of Synthetic Polyanions” Biyomühendislik; Problemler ve Perspektifler Çalıştayı 20–23 Ekim 2004, İstanbul. (Poster sunum).
 3. Derman S., Kizilbey K., Akdeste Z., “HPLC and UV Study of Water Soluble and Insoluble Complexes of Human Serum Albumin with Copolymer of VP/AA”, 34th FEBS Congress, 4-9 July 2009, Prague, Czech Republic.
 4. Derman S., Kizilbey K., Mansuroglu B., Akdeste Z., “Spectroscopic investigation of Protein-Anionic Polyelectrolyte Complexes and Conjugates”, 34th FEBS Congress, 4-9 July 2009, Prague, Czech Republic.
 5. Derman S., Kizilbey K., Akdeste Z., “Covalent Conjugation of β -Estradiol with Polymers by using Thionyl Chloride Methods”, 34th FEBS Congress, 4-9 July 2009, Prague, Czech Republic.

6. Kizilbey K., Derman S., Mustafaeva Akdeste Z., “Progesterone-Containing Polyelectrolyte Complexes”, 34th FEBS Congress, 4-9 July 2009, Prague, Czech Republic.
7. Kizilbey K., Derman S., Mansuroglu B., Mustafaeva Akdeste Z., “HPLC Investigations of Bovine Serum Albumin-VP/AA Copolymer Complexes and Conjugates”, 34th FEBS Congress, 4-9 July 2009, Prague, Czech Republic.
8. Mansuroglu B., Derman S., Kizilbey K., Akdeste Z., “Adjuvant Properties of Polyelectrolytes”, 34th FEBS Congress, 4-9 July 2009, Prague, Czech Republic.
9. S.Canim, K.Kizilbey, Z.Akdeste, Poly-2-Hydroxyethylmethacrilate Polymeric Gels Synthesis with Different Structured Hydroxyapatite, 34th FEBS Congress, 4-9 July 2009, Prague, Czech Republic.
10. Derman S., Kizilbey K., Akdeste Z., “Synthesis and Characterization of β -Estradiol-Polyelectrolyte Conjugates”, EPF’09 European Polymer Congress, 12-17 July 2009, Graz, Avusturya.
11. Derman S., Kizilbey K., Mustafaeva Akdeste Z., “Synthesis and Characterization of Acrylic acid-N-Vinyl-2-Pyrrolidone Copolymers via Traditional Methods”, EPF’09 European Polymer Congress, 12-17 July 2009, Graz, Avusturya.
12. Derman S., Kizilbey K., Akdeste Z., “Investigation of Water Soluble and Insoluble Complexes of Human Serum Albumin with Copolymer of VP/AA”, EPF’09 European Polymer Congress, 12-17 July 2009, Graz, Avusturya.
13. Kizilbey K., Derman S., Akdeste Z., “Investigation of Water Soluble and Insoluble Complexes of Bovine Serum Albumin with VP/AA Copolymer ”, EPF’09 European Polymer Congress, 12-17 July 2009, Graz, Avusturya.
14. Kizilbey K., Derman S., Mustafaeva Akdeste Z., “Ternary Polyelectrolyte Complexes Containing Progesterone”, EPF’09 European Polymer Congress, 12-17 July 2009, Graz, Avusturya.
15. Kizilbey K., Derman S., Saricay Y., Mustafaeva Akdeste Z., “Synthesis of N-Vinyl-2-pyrrolidone/acrylic acid (VP/AA) Copolymers by Using Microwave Method”, EPF’09 European Polymer Congress, 12-17 July 2009, Graz, Avusturya
16. S.Canim, K.Kizilbey, Z.Akdeste, The Synthesis and Modification of Poly-2-Hydroxyethylmethacrilate Polymeric Gels with Different Structured

Hydroxyapatite, EPF'09 European Polymer Congress, 12-17 July 2009, Graz, Avusturya

17. Mansuroglu B., Derman SA., Battal YB., Kizilbey K., Mustafaeva Z., “The fluorescence study of covalent conjugation of peptide epitopes of foot-and-mouth disease virus (FMDV) with anionic polyelectrolytes and bovine serum albumin”, 33rd FEBS Congress, Atina, Yunanistan, 28 Haziran-3 Temmuz, 2008.
18. Kizilbey K., Mustafaeva Z., “Interactions between Polyacrylic acid and Peptide Epitope of Melanoma Cancer” 16th International Biomedical Science & Technology Symposium, BIOMED 2010, 29 September-2 October 2010, İstanbul, Türkiye.
19. Kizilbey K., Derman S., Mustafaeva Z., “Chromatographic Investigation of P(VP-co-AA)-Melanoma Peptide Conjugates” 16th International Biomedical Science & Technology Symposium, BIOMED 2010, 29 September-2 October 2010, İstanbul, Türkiye.
20. Kizilbey K., Mansuroğlu B., Mustafaeva Z., “Water-Soluble Polymeric Bioconjugates and Complexes of Melanoma Cancer Peptide Epitope and Their Immunogenicity” 16th International Biomedical Science & Technology Symposium, BIOMED 2010, 29 September-2 October 2010, İstanbul, Türkiye.

- **Bildiri (Ulusal)**

1. K. Kızılbey, G. Yüce, G. Dörter, S. Bayülken, M. Mustafaev “Anyonik Polielektrolitler Varlığında Radyasyonun Lenfosit Hücler Üzerine Etkilerinin İncelenmesi” XIX. Ulusal Kimya Kongresi, , 30 Eylül - 04 Ekim 2005, Kuşadası. (poster sunum).
2. Kadriye Atıcı, Deniz Dalcı, İnci Güçlü, Güneş Dörter , Günay Yüce , Seval Bayülken, M. Köksal, M. Mustafaev, “Sentetik Polianyonlar Üzerine Radyobiyojik Çalışmalar”, XVII. Ulusal Kimya Kongresi, 5 - 9 Temmuz 2004, Kars. (poster sunum).
3. Günay Yüce, Güneş Dörter, İnci Güçlü, Deniz Dalcı, Kadriye Atıcı, Seval Bayülken, M. Köksal, M. Mustafaev, “PAA-Cu²⁺ Komplekslerinin Radyoprotektif Özelliklerinin Sitogenetik Yöntemlerle İncelenmesi” , XVII. Ulusal Kimya Kongresi, 5 - 9 Temmuz 2004, Kars. (poster sunum).

4. Derman S., Kızılbey K., Mansuroğlu B., Budama Battal Y., Mustafaeva Akdetse Z., “BSA Proteini ile VP/AA Kopolimer Konjugatlarının Bağlanma Oranlarının Saptanması” IV. Ulusal Biyomühendislik Kongresi, 15-18 Ekim 2008, İzmir
5. Kızılbey K., Mansuroğlu B., Derman S., Budama Battal Y., Akdetse Z. “BSA Proteininin VP/AA Kopolimeri ile Konjugasyonu” IV. Ulusal Biyomühendislik Kongresi, 15-18 Ekim 2008, İzmir
6. Mansuroğlu B., Derman S., Kızılbey K., Mustafaeva Akdetse Z. “Protein ve Polimerlerin İmmün Sistem Üzerinde Etkisinin İncelenmesi” IV. Ulusal Biyomühendislik Kongresi, 15-18 Ekim 2008, İzmir
7. Kızılbey K., Mansuroğlu B., Derman S., Budama Battal Y., Mustafaeva Akdetse Z., “Sığır Serum Albuminin Vinilpirolidon/Akrilik Asit Kopolimeri ile Konjugasyon Mekanizmasının İncelenmesi” XXII. Ulusal Kimya Kongresi, 06-10 Ekim 2008, Kıbrıs.
8. Kızılbey K., Derman S., Özdemir Z. Ö., Sarıçay Y., Mustafaeva Akdetse Z., “Vinilpirolidon/Akrilik Asit Kopolimerinin Klasik Yöntemle ve Mikrodalga Destekli Sentezi” XXII. Ulusal Kimya Kongresi, 06-10 Ekim 2008, Kıbrıs.
9. Derman S., Kızılbey K., Budama Battal Y., Sarıçay Y., Dalgakıran E., Akdetse Z., “Spektroskopik ve Kromatografik Yöntemlerle Polianyon-Protein Komplekslerinin İncelenmesi” XXII. Ulusal Kimya Kongresi, 06-10 Ekim 2008, Kıbrıs.
10. Derman Acar S., Kızılbey K., Budama Battal Y., Sarıçay Y., Dalgakıran E., Akdetse Z., “Polistrien Sodyum Sülfonat-Bovine Serum Albumin Komplekslerinin Spektroskopik ve Kromatografik Yöntemlerle İncelenmesi”, 2. Ulusal Polimer Bilim ve Teknolojisi Kongresi ve Sergisi, 30 Nisan-2 Mayıs 2008, Şanlıurfa.
11. Derman Acar S., Kızılbey K., Budama Battal Y., Akdetse Z. “Suda Çözünür Polisakkarit-Protein Komplekslerinin Oluşturulması ve Karakterizasyonu”, 2. Ulusal Polimer Bilim ve Teknolojisi Kongresi ve Sergisi, 30 Nisan-2 Mayıs 2008, Şanlıurfa.
12. Özdemir Z. Ö., Kızılbey K., Acar S., Sarıçay Y., Akdetse Z. “Vinilpirilidon/Akrilik Asit Kopolimerinin Mikrodalga Destekli Sentezi”, 2. Ulusal Polimer Bilim ve Teknolojisi Kongresi ve Sergisi, 30 Nisan-2 Mayıs 2008, Şanlıurfa.

13. Sarıçay Y., Acar S., Özkan Ö., Kızılbey K., Budama Battal Y., Akdeste Z., Mustafaev M., “Nano Yapılı BSA-Dekstran Sülfat Komplekslerinin Oluşturulması ve Karakterizasyonu” 21. Ulusal Kimya Kongresi, 23-27 Ağustos 2007, Malatya.
14. Kızılbey K., Mustafaeva Akdeste Z., “Melanoma Kanseri Tümör Proteini Peptid Epitopu İle Poliakrilik Asit Konjugasyon Mekanizmasının İncelenmesi” Kromatografi 2010 Kongresi, 16-19 Haziran 2010, Erzurum
15. Derman S., Özkan Ö., Kızılbey K., Mansuroğlu B., Mustafaeva Z. “BSA-Dekstran Sülfat Komplekslerinin Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi Sistemi İle İncelenmesi” Kromatografi 2010 Kongresi, 16-19 Haziran 2010, Erzurum
16. Mansuroğlu B., Kızılbey K., Derman S., Mustafaeva Z. “Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi ile Sığır Serum Albumin-Vinil Pirolidon/Akrilik Asit Kopolimerinin Kompleks ve Konjugatlarının İncelenmesi” Kromatografi 2010 Kongresi, 16-19 Haziran 2010, Erzurum

- **Projeler**

1. Streptozotocin (STZ) ile diyabet oluşturulan sıçanlarda kimyasal olarak modifiye edilmiş Süperoksit Dismutazın (SOD) antioksidatif özelliklerinin incelenmesi ve geliştirilmesi, Y.T.Ü. Araştırma Fonu GEP Projesi, 2010-07-04-GEP01
2. Melanoma Hastalığını Oluşturan Sentetik Peptidlerin Poliakrilikasit ve Kopolimerleri ile Konjugasyonu, Y.T.Ü. Araştırma Fonu DOP Projesi, 29-07-04-DOP01
3. “Fonksiyonel Biyopolimer Sistemler”, DPT Projesi, Proje No: 23-DPT-01-02-01, 2003-2006.
4. “Fonksiyonel Polimer –Peptid Konjugatları”, Y.T.Ü. Araştırma Fonu Projesi, 2003-2005.
5. “Aşı Uygulama Amaçlı Polimer-Peptid Konjugatlarının Geliştirilmesi” DPT Projesi, Proje No: 23-DPT-07-04-02, 2004-2007.
6. “Diş restorasyon malzemelerinin Üretilmesi ” DPT, 2004-2006
7. “Biyomedikal Malzemeler ve Yapay Dokular”, Şemsiye Proje, Proje No: 25-DPT-07-04-01, 2004-

8. “Alfa Amilaz ve Horseradish Peroxidase Enzimlerinin Polisakkarid Konjugatları”, Y.T.Ü. Araştırma Fonu Projesi, 23-01-02-04, 2003-2006.
9. “Mucor Miehei Rennetin Kimyasal Modifikasyonu”, Y.T.Ü. Araştırma Fonu Projesi, 21-01-02-03, 2001-2004.