



T.C.

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTİNEOPLASTİK İLAÇ İÇEREN MALEİK ANHİDRİT
KOPOLİMER KONJUGATLARININ
ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİ,
İLAÇ SALIM DAVRANIŞLARI VE MEME KANSERİ
HÜCRE SERİLERİ ÜZERİNE ANTİTÜMÖR
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

TUTKU TUNÇ

DOKTORA TEZİ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SİVAS

2013

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTİNEOPLASTİK İLAÇ İÇEREN MALEİK ANHİDRİT
KOPOLİMER KONJUGATLARININ
ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİ,
İLAÇ SALIM DAVRANIŞLARI VE MEME KANSERİ
HÜCRE SERİLERİ ÜZERİNE ANTİTÜMÖR
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

TUTKU TUNÇ

DOKTORA TEZİ

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ZEYNEP SÜMER

SİVAS

2013

Bu alışma Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan Prof. Dr. Ömer POYRAZ _____

Üye Prof. Dr. Semra ÖZÇELİK _____

Üye Prof. Dr. Zahir BAKICI _____

Üye Prof. Dr. Fulya İLHAN _____

Üye (Danışman) Prof. Dr. Zeynep SÜMER _____

ONAY

Bu tez çalışması, / / 2013 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ömer POYRAZ

SAğLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 24.09.2008 tarihli ve 007 sayılı toplantısında kabul edilen Fen ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

Sağlık için...

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vii
TEŞEKKÜR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kanser.....	4
2.1.1. Meme Kanseri.....	5
2.1.2. Kanser Tedavisi ve Yeni Yaklaşımlar.....	5
2.2. Polimerler ve Tıp Alanında Kullanımları.....	6
2.2.1. Polimerlerin Tarihi Gelişimi.....	7
2.2.2. Polimerlerle İlgili Genel Kavramlar.....	10
2.2.3. Polimerleşme Tepkimeleri.....	10
2.2.3.1. Kondenzasyon (Basamak) Polimerleşmesi.....	10
2.2.3.2. Zincir (Katılma) Polimerleşmesi.....	11
2.2.3.3. Serbest Radikal Polimerleşmesi.....	12
2.2.3.4. İyonik ve Koordinasyon Kompleks Polimerleşmesi... ..	12
2.2.4. Maleik Anhidrit Monomeri ve Maleik Anhidrit Kopolimerlerinin Özellikleri.....	12
2.2.4.1. Maleik Anhidrit Kopolimerlerinin Katılma Tepkimeleri.....	13
2.2.4.2. Polianhidritlerin Kontrollü İlaç Salım Sistemlerinde Kullanılması.....	14
2.2.4.3. Kimyasal Modifikasyonun Önemi.....	14
2.2.4.4. Suda Çözünbilme, Hidroliz ve Biyolojik Aktivite... ..	15
2.2.4.5. Fizyolojik Sıvılarda Salım Davranışı.....	16
2.4. Polimerlerin Biyolojik Aktiviteleri.....	17
2.4.1 Antimikrobiyal Maddeler.....	17
2.4.2 Antimikrobiyal Maddelerin Sınıflandırılması.....	20
2.4.3. Kullanılan Mikroorganizmalar ve Özellikleri.....	22
2.4.4. Antibiyotik Duyarlılık Testleri.....	24
2.4.4.1. Disk Difüzyon Yöntemi.....	26
2.5. Antineoplastik İlaç Etken Maddeleri.....	27
2.5.1. Metotreksat (Amethopterin / Methotrexate / MTX).....	27
2.5.2. Gemsitabin (Gemcitabine).....	28
2.5.4. Siterabin (Cyterabine / Sitozin β-D-Arabinofuranosid Hidroklorür).....	30
2.6. Hücre Kültürü.....	31
2.6.1. Hücre Kültür Modelleri.....	31
2.6.2. Hücre Kültür Çalışmalarının Uygulama Alanları.....	33
2.6.3. Hücre Kültürleri Üzerinde Toksikite Araştırmaları.....	33

2.6.4. MCF-7 Hücre Serisi.....	34
2.6.5. L929 Hücre Serisi.....	35
2.7. Sitotoksosite Testleri.....	35
2.7.1. MTT Testi.....	37
2.7.2. XTT Testi.....	38
2.7.3. WST-1 Testi	41
2.8. Membran Bütünlüğü Testleri.....	41
2.8.1. Eksklüzyon/Flouresan Boyaları.....	41
2.8.2. Tripan Mavisı Boyası Canlılık Testi.....	42
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	44
3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler, Aletler ve Cihazlar.....	44
3.1.1. Kullanılan Aletler ve Cihazlar.....	44
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	45
3.2. Kopolimerlerin Sentezlenmesi.....	47
3.2.1. MAVA Kopolimerinin Sentezlenmesi.....	47
3.3. Kopolimerlerin Yapısal Karakterizasyonu.....	48
3.3. Kopolimerlerin Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması.....	48
3.3.1. Kullanılan Mikroorganizmalar ve Özellikleri.....	48
3.3.2. Biyolojik (Antimikrobiyal) Aktivite Tayini / Disk Difüzyon Testi.....	49
3.4. Kopolimer-İlaç Çiftlerinin Sentezlenmesi.....	50
3.4.1. MAVA Kopolimeri ve Amethopterin (Methotrexate) Çifti....	50
3.4.2. MAVA Kopolimeri ve Gemcitabine Çifti.....	50
3.4.3. MAVA Kopolimeri ve Cytarabine Çifti.....	51
3.5. Kopolimer-İlaç Çiftlerinin Fizyolojik Sıvıda Salım Davranışları.....	52
3.6. Hücre Kültürü.....	52
3.6.1. Hücrelerin Açılması, Çoğaltılması ve Pasajlanması.....	52
3.6.2. Hücrelerin Dondurulması.....	53
3.6.3. Hücrelerin Sayılması / Canlılığının Tespit Edilmesi.....	54
3.7. İlaç ve Kopolimer-İlaç Çiftlerinin IC ₅₀ Dozunun Belirlenmesi.....	55
3.8. Sitotoksosite Testleri.....	55
3.8.1. Antitümör Aktivite Testleri / MCF-7 Meme Kanseri Hücreleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi.....	56
3.8.1.1. MTT Testinin Uygulanması.....	57
3.8.2. Toksik Aktivite Testleri / L929 Fibroblast Hücreleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi.....	58
3.8.2.2. XTT Testinin Uygulanması.....	58
3.9. İstatistiksel Analizler.....	59
4. BULGULAR	60
4.1. Kopolimerlerin Yapısal Karakterizasyonu.....	60
4.1.1. Kopolimerlerin FTIR analizi.....	60
4.1.2. Kopolimerlerin ¹ H NMR Analizi.....	61
4.1.3. Kopolimerlerin Çözünürlüğü ve Fiziksel Özellikleri.....	62
4.1.4. Kopolimerlerin Tepkimeleri.....	62
4.2. Kopolimerlerin Antimikrobiyal Aktivitesi.....	63
4.2.1. MAVA Kopolimerinin Antimikrobiyal Aktivitesi.....	63
4.2.2. MAST Kopolimerinin Antimikrobiyal Aktivitesi.....	65
4.2.3. MAMMA Kopolimerinin Antimikrobiyal Aktivitesi.....	68

4.3. Kopolimer-İlaç Çiftlerinin Yapısal Karakterizasyonu.....	70
4.3.1. Kopolimer-İlaç Çiftlerinin FTIR Analizi.....	70
4.3.1.1. MAVA Kopolimeri-Ametopiterin (MTX) Çiftinin FTIR Spektrumu.....	70
4.3.1.2. MAVA Kopolimeri-Gemsitabin (GEM) Çiftinin FTIR Spektrumu.....	72
4.3.1.3. MAVA Kopolimeri-Siterabin (CYT) Çiftinin FTIR Spektrumu.....	73
4.3.2. Kopolimer-İlaç Çiftlerinin ¹ HNMR Analizi.....	74
4.3.2.1. MAVA Kopolimeri-Ametopiterin (MTX) Çiftinin ¹ HNMR Spektrumu.....	74
4.3.2.2. MAVA Kopolimeri-Gemsitabin (GEM) Çiftinin ¹ HNMR Spektrumu.....	75
4.3.2.3. MAVA Kopolimeri-Siterabin (CYT) Çiftinin ¹ HNMR Spektrumu.....	77
4.3.3. Kopolimer-İlaç Çiftlerinin Suda Çözünürlüğü ve Fiziksel Özellikleri.....	79
4.4. Kopolimer-İlaç Çiftlerinin Fizyolojik Sıvıda Salım Davranışları.....	80
4.5. İlaç ve Kopolimer-İlaç Çiftlerinin MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hatları Üzerine Antitümör Etkisinin Araştırılması.....	82
4.5.1. MTT Yöntemi.....	83
4.5.1.1. Ametopiterin (MTX) ve MAVA-Ametopiterin (MTX) Çiftinin MCF-7 Meme Kanseri Hücreleri Üzerine Antitümör Aktivitesi.....	85
4.5.1.2. Gemsitabin (GEM) ve MAVA-Gemsitabin (GEM) Çiftinin MCF-7 Meme Kanseri Hücreleri Üzerine Antitümör Aktivitesi.....	89
4.5.1.3. Siterabin (CYT) ve MAVA- Siterabin (CYT) Çiftinin MCF-7 Meme Kanseri Hücreleri Üzerine Antitümör Aktivitesi.....	93
4.6. Kopolimer-İlaç Çiftlerinin L929 Fibroblast Hücre Hatları Üzerine Sitotoksik Etkisinin Araştırılması.....	98
4.6.1. XTT Yöntemi.....	99
4.6.1.1. Ametopiterin (MTX) ve MAVA-Ametopiterin (MTX) Çiftinin L929 Fibroblast Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisi.....	101
4.6.1.2. Gemsitabin (GEM) ve MAVA-Gemsitabin (GEM) Çiftinin L929 Fibroblast Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisi.....	105
4.6.1.3. Siterabin (CYT) ve MAVA- Siterabin (CYT) Çiftinin L929 Fibroblast Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisi.....	109
5. TARTIŞMA.....	114
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	121
KAYNAKLAR.....	125
ÖZGEÇMİŞ.....	137

ÖZET

ANTİNEOPLASTİK İLAÇ İÇEREN MALEİK ANHİDRİT KOPOLİMER
KONJUGATLARININ ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİ, İLAÇ SALIM
DAVRANIŞLARI VE MEME KANSERİ HÜCRE SERİLERİ ÜZERİNE
ANTİTÜMÖR AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Tutku TUNÇ

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Zeynep SÜMER

2013, 154 sayfa

Bu çalışma kapsamında, ilk aşamada maleik anhidrit içeren kopolimerlerin sentezlenmesi, yapısal karakterizasyonu, antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması ve kopolimerlerin antineoplastik ajanlar ile türevlendirilmesi, sonraki aşamada ise sentezlenen kopolimer-ilaç konjugatlarının (çiftlerinin) MCF-7 meme kanseri hücre serileri üzerine antitümör aktivitelerinin incelenmesi ve L929 fare fibroblast hücre serileri üzerine toksik etkilerinin (sitotoksitelerinin) araştırılması amaçlandı.

Kopolimerlerin ve kopolimer-ilaç çiftlerinin yapısal karakterizasyonu Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektroskopisi (FTIR) ve Proton Nükleer Magnetik Rezonans Spektroskopisi (¹HNMR) ile yapıldı. Ayrıca bu çiftlerin sudaki çözünürlükleri incelendi. Kopolimerlerin antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri *S. aureus*, *E. faecalis*, *Meticillin-Resistant Staphylococcus aureus*; *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* mikroorganizmaları üzerinde Disk difüzyon yöntemi kullanılarak araştırıldı. Kopolimer-ilaç çiftlerinin yapay vücut sıvısı olarak kabul edilen PBS (Phosphate Buffer Saline) tamponundaki davranışları 1, 24 ve 48. saatlerde vücut sıcaklığı olan 37 °C’de incelendi. Kopolimer-ilaç çiftlerinin MCF-7 hücreleri üzerindeki antitümör aktiviteleri, saf antineoplastik ajanların gösterdiği antitümör aktiviteleri ile karşılaştırmalı olarak MTT testi ile, L929 hücreleri

üzerindeki toksik etkileri ise yine karşılaştırmalı olarak XTT testi ile belirlendi. Sonuçlar Mann-Whitney U Testi ile istatistiksel olarak analiz edildi.

Sentezlenen, yapısal karakterizasyonları belirlenen ve sudaki çözünürlükleri araştırılan kopolimer-ilaç çiftlerinden üç tanesinin amitleşme mekanizması ile oldukça başarılı bir tepkime ile birbirlerine bağlandıkları, suda iyi çözündükleri ve PBS'deki davranışlarının da oldukça iyi olduğu belirlendi. Kopolimerlerin herhangi bir antibakteriyel ve antifungal etkisinin olmadığı disk difüzyon yöntemi ile tespit edildi. Sentezlenen çiftlerden MAVA-Ametopiterin ve MAVA-Gemsitabin çiftlerinin, MCF-7 hücreleri üzerinde antitümör aktivitelerinin, içerdikleri saf ilaca göre anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Her üç çiftin de L929 hücreleri üzerindeki toksik etkisinin içindeki saf ilaca göre anlamlı derecede düşük olduğu bulundu ($p < 0,05$).

Sonuç olarak; sentezlenen kopolimer-ilaç çiftlerinin konjugasyon tepkimelerinin başarılı olması sonucu, içerdikleri kopolimerlerden farklı olarak biyolojik uyum gösterdikleri, suda oldukça iyi çözündükleri ve PBS tamponundaki davranışlarının da uyumlu olduğu belirlendi. İlaç etken maddelerinin mevcut antitümör aktivitesinin kopolimer-ilaç çiftlerinin oluşturulmasıyla arttığı ve aynı zamanda toksik etkisinin de içerdiği saf ilaca göre azaldığı tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: kopolimer-ilaç çifti, antimikrobiyal aktivite, antitümör aktivite, sitotoksosite.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF ANTITUMOR ACTIVITIES ON BREAST CANCER
CELL LINES, DRUG RELEASE BEHAVIORS AND ANTIMICROBIAL
ACTIVITY OF THE COPOLYMER-DRUG CONJUGATES CONTAINING
MALEIC ANHYDRIDE ANTINEOPLASTIC AGENTS

by

Tutku TUNÇ

Department of Microbiology

Ph. D. Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Zeynep SÜMER

2013, 154 pages

In this study, at the first stage; synthesizing the copolymers containing maleic anhydride, investigating their structural characterizations and the antimicrobial activity, and deriving the copolymers with antineoplastic agents were aimed. In the second stage; analysing the antitumor activity of the synthesized copolymer-drug conjugates on MCF-7 breast cancer cell lines and investigating their toxic effects (cytotoxicity) on the L929 mouse fibroblast cell lines were aimed.

Structural characterizations of the copolymers and copolymer-drug conjugates were performed by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (^1H NMR). Their solubility in water were also examined. Antibacterial and antifungal activities of the copolymers on the microorganisms *S. aureus*, *E. faecalis*, *Meticillin-Resistant Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* strains were evaluated using the Disc Diffusion method. The behaviors of copolymer-drug conjugates in PBS (Phosphate Buffer Saline), which is accepted as artificial body fluid, were investigated at 1st, 24th and 48th hours at 37°C, body temperature. Antitumor activities of copolymer-drug conjugates on MCF-7 cells were determined by MTT assay via comparing with antitumor activities of the pure antineoplastic drugs.

Also toxic effects of copolymer-drug conjugates on L929 cells were determined by XTT Assay via comparing with the pure antineoplastic agents. The results were analyzed statistically with the Mann-Whitney U Test.

Three of the copolymer-drug conjugates which are synthesized, whose structural characterizations are determined and solubility in water are examined are determined to have been bound with a quite successful reaction via amidation mechanism; to be well solved in water; and to have quite good release behaviour in PBS. It is determined by Disc Diffusion Method that the copolymers have no antibacterial and antifungal effects. Except for MAVA-Cytarabine conjugate, antitumor activity of MAVA-Amethopterin and MAVA-Gemcitabine conjugates on MCF-7 cells were found to be significantly higher than the pure drugs they include ($p < 0,05$). Toxic effects of all three conjugates on L929 cell lines were found to be significantly lower than the pure drugs they include ($p < 0,05$).

As a result of the study; since the conjugation reactions of the copolymer-drug conjugates have been successful, it is determined that unlike contained copolymers, they have biocompatibility; that their solubility in water is quite good and that they show compatible behaviours in PBS buffer solution. Existing antitumor activities of the active ingredients of the drugs have increased with the formation of copolymer-drug conjugates and at the same time the toxic effects of them were decreased compared to the pure drug they include.

Keywords: copolymer-drug conjugates, antimicrobial activity, antitumor activity, cytotoxicity.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın belirlenmesi, uygulanması ve sonuçlandırılması aşamalarında değerli katkılarından dolayı ve her alanda bana yol gösteren saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Zeynep SÜMER' e teşekkür eder ve derin minnetimi sunarım.

Çalışmanın her aşamasında emeğini, desteğini, yardımlarını esirgemeyen ve önemli katkılarda bulunan arkadaşım Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Gülderen KARAKUŞ' a teşekkür ederim.

Her konuda bana destek olan sevgili Tez İzleme Komitesi üyelerim Prof. Dr. Ömer POYRAZ ve Prof. Dr. Semra ÖZÇELİK'e, doktora eğitimimde emeği geçen Prof. Dr. Zahir BAKICI ve Prof. Dr. Yasemin ÖZTOP hocalarıma saygılarımı sunarım. Ayrıca çalışmamın istatistik bölümündeki değerli katkılarından dolayı Prof. Dr. Haldun SÜMER'e teşekkür ederim.

MCF-7 hücrelerinin temini konusunda İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ayhan Bilir'e, hücre kültürü çalışmalarımda desteği olan Yrd. Doç. Dr. Ahmet ALTUN ve Biyokimya doktora öğrencisi Aykut ÖZGÜR' e, antineoplastik ilaçlarımızla ilgili sıkıntılarımızda yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Saadettin KILIÇKAP'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın CÜTFAM'da gerçekleştirilen bölümünde yardımlarını ve manevi desteklerini esirgemeyen Dr. Meral YILMAZ, Dr. Nevin TUZCU ve söylenerek de olsa isteklerimi yerine getiren bölümümüz teknisyeni Ahmet ACAR'a, varlıkları ve her daim destekleriyle yanımda olan bölüm arkadaşlarım Dr. Mehmet ATAŞ ve Tuğçe GEDİK'e teşekkürlerimi sunarım.

Bu zor ama zevkli süreçte ve hayatımın her döneminde benimle olan, maddi, manevi desteklerini esirgemeyen sevgili annem ve babama en derin minnettarlığımı sunarım.

“Bu çalışma, Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) tarafından T - 458 proje numarası ile desteklenmiştir”.

Verdikleri destekten dolayı Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) birimine teşekkür ederim.

SEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Polimer-ilaç, polimer-protein ve polimer-DNA konjugat sistemleri.....	12
Şekil 2.2. Radikalik başlatıcılar olan BPO ve AIBN'nin parçalanma tepkimesinden oluşan radikaller.....	13
Şekil 2.3. Maleik anhidrit (MA) monomerinin kimyasal yapısı.....	14
Şekil 2.4. Maleik anhidrit-stiren (MAST) kopolimerinin benzoik asitlerle esterleşme ve amidleşme tepkimesi.....	17
Şekil 2.5. Antimikrobiyal maddelerin etkili oldukları yere göre sınıflandırılması.....	20
Şekil 2.6. MTX'ın kimyasal yapısı.....	28
Şekil 2.7. Gempitabin'in kimyasal yapısı.....	29
Şekil 2.8. Siterabin molekülünün kimyasal yapısı.....	30
Şekil 2.9. Sitotoksikite testlerinin hücre üzerine etkileri.....	37
Şekil 2.10. MTT ve XTT' nin formazana dönüşümü.....	39
Şekil 2.11. MTT ve XTT metotları.....	40
Şekil 2.12. Eksklüzyon boya prensibi.....	42
Şekil 2.13. Hemositometre.....	43
Şekil 3.1. Solüsyonların 96'lık plakta dağılımı.....	57
Şekil 4.1. Maleik anhidrit-vinil asetat kopolimerinin FTIR spektrumu...	60
Şekil 4.2. Maleik anhidrit-vinil asetat kopolimerinin ¹ H-NMR spektrumu.	61
Şekil 4.3. MAVA'nın <i>Staphylococcus aureus</i> 'a antibakteriyel etkisi.....	63
Şekil 4.4. MAVA'nın <i>Escherichia coli</i> 'ye antibakteriyel etkisi	64
Şekil 4.5. MAVA'nın <i>Meticillin-Resistant Staphylococcus aureus</i> 'a antibakteriyel etkisi.....	64
Şekil 4.6. MAVA'nın <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'ya antibakteriyel etkisi	64
Şekil 4.7. MAVA'nın <i>Enterococcus faecalis</i> 'e antibakteriyel etkisi.....	65
Şekil 4.8. MAVA'nın <i>Candida albicans</i> 'a antifungal etkisi.....	65
Şekil 4.9. MAST'ın <i>Staphylococcus aureus</i> 'a antibakteriyel etkisi.....	66
Şekil 4.10. MAST'ın <i>Escherichia coli</i> 'ye antibakteriyel etkisi.....	66
Şekil 4.11. MAST'ın <i>Meticillin-Resistant Staphylococcus aureus</i> 'a antibakteriyel etkisi.....	66
Şekil 4.12. MAST'ın <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'ya antibakteriyel etkisi	67
Şekil 4.13. MAST'ın <i>Enterococcus faecalis</i> 'e antibakteriyel etkisi.....	67
Şekil 4.14. MAST'ın <i>Candida albicans</i> 'a antifungal etkisi.....	67
Şekil 4.15. MAMMA'nın <i>Staphylococcus aureus</i> 'a antibakteriyel etkisi.	68
Şekil 4.16. MAMMA'nın <i>Escherichia coli</i> 'ye antibakteriyel etkisi.....	68
Şekil 4.17. MAMMA'nın <i>Meticillin-Resistant Staphylococcus aureus</i> 'a antibakteriyel etkisi.....	68
Şekil 4.18. MAMMA'nın <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'ya antibakteriyel etkisi.....	69
Şekil 4.19. MAMMA'nın <i>Enterococcus faecalis</i> 'e antibakteriyel etkisi...	69
Şekil 4.20. MAMMA'nın <i>Candida albicans</i> 'a antifungal etkisi.....	69
Şekil 4.21. MAVA Kopolimeri-Ametopiterin (MTX) Çiftinin FTIR Spektrumu.....	71
Şekil 4.22. MAVA Kopolimeri-Gempitabin Çiftinin FTIR Spektrumu....	72

Şekil 4.23. MAVA Kopolimeri-Siterabin Çiftinin FTIR Spektrumu.....	73
Şekil 4.24. MAVA Kopolimeri-Ametopiterin Çiftinin ¹ H-NMR spektrumu.....	75
Şekil 4.25. MAVA Kopolimeri-Gemsitabin Çiftinin ¹ H-NMR spektrumu.....	76
Şekil 4.26. MAVA Kopolimeri-Siterabin Çiftinin ¹ H-NMR spektrumu.....	78
Şekil 4.27. (a)MAVA-MTX, (b)MAVA-GEM, (c)MAVA-CYT, 1. saat görünüm.....	80
Şekil 4.28. MAVA-MTX, MAVA-GEM, MAVA-CYT, 1. saat görünüm.	80
Şekil 4.29. (a)MAVA-MTX, (b)MAVA-GEM, (c)MAVA-CYT, 24. saat görünüm.....	81
Şekil 4.30. (a)MAVA-MTX, (b)MAVA-GEM, (c)MAVA-CYT, 48. saat görünüm.....	81
Şekil 4.31. MCF-7 hücrelerinin 24 saat inkübasyon sonrası morfolojik görüntüsü (20x).....	82
Şekil 4.32. MCF-7 hücrelerinin MAVA-MTX kopolimer-ilaç çiftinin 62,5 µg/ml konsantrasyonu eklendikten sonra 24 saatlik inkübasyon sonucu morfolojik görüntüsü (20x).....	83
Şekil 4.33. MCF-7 hücrelerinde formazan kristallerinin oluşumu – pozitif kontrol (48 saat inkübasyon sonrası, MTT eklendikten sonra) (20x).....	84
Şekil 4.34. MCF-7 hücrelerinde formazan kristallerinin oluşumu – negatif kontrol (48 saat inkübasyon sonrası, MTT eklendikten sonra) (20x).....	84
Şekil 4.35. MTX'in farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerini öldürme yüzdesi.....	86
Şekil 4.36. MAVA-MTX'in farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerini öldürme yüzdesi.....	87
Şekil 4.37. MTX ve MAVA-MTX'in farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerini öldürme yüzdesi.....	88
Şekil 4.38. MTX ve MAVA-MTX'in farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerini öldürme yüzdesi (2).....	88
Şekil 4.39. GEM'in farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerini öldürme yüzdesi.....	90
Şekil 4.40. MAVA-GEM'in farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerini öldürme yüzdesi.....	91
Şekil 4.41. GEM ve MAVA-GEM'in farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerini öldürme yüzdesi.....	92
Şekil 4.42. GEM ve MAVA-GEM'in farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerini öldürme yüzdesi (2).....	92
Şekil 4.43. CYT'nin farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerini öldürme yüzdesi.....	94
Şekil 4.44. MAVA-CYT'nin farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerini öldürme yüzdesi.....	95
Şekil 4.45. CYT ve MAVA-CYT'nin farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerini öldürme yüzdesi.....	96
Şekil 4.46. CYT ve MAVA-CYT'nin farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerini öldürme yüzdesi (2).....	96

Şekil 4.47. İlaçların farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerine inhibisyon yüzdelerinin karşılaştırılması.....	97
Şekil 4.48. Kopolimer-ilaçların farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerine inhibisyon yüzdelerinin karşılaştırılması.....	97
Şekil 4.49. L-929 hücrelerinin 24 saat inkübasyon sonrası morfolojik görüntüsü (XTT eklenmeden önce) (40x).....	98
Şekil 4.50. L-929 hücrelerinin 24 saat inkübasyon sonrası morfolojik görüntüsü (XTT eklenmeden önce) (20x).....	99
Şekil 4.51. MAV A-Ametopiterin'in 15,62 µg/ml konsantrasyonunda L-929 hücreleri üzerindeki etkisi (20x).....	100
Şekil 4.52. DMSO eklenmiş (negatif kontrol) L929 hücreleri görüntüsü (10x).....	100
Şekil 4.53. MTX' in farklı konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine canlılık yüzdesi.....	102
Şekil 4.54. MAV A-MTX' in farklı konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine canlılık yüzdesi.....	103
Şekil 4.55. MTX ve MAV A-MTX' in farklı konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine canlılık yüzdesi.....	104
Şekil 4.56. MTX ve MAV A-MTX' in farklı konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine canlılık yüzdesi (2).....	104
Şekil 4.57. GEM' in farklı konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine canlılık yüzdesi.....	106
Şekil 4.58. MAV A-GEM' in farklı konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine canlılık yüzdesi.....	107
Şekil 4.59. GEM ve MAV A-GEM' in farklı konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine canlılık yüzdesi.....	108
Şekil 4.60. GEM ve MAV A-GEM' in farklı konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine canlılık yüzdesi (2).....	108
Şekil 4.61. CYT' nin farklı konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine canlılık yüzdesi.....	110
Şekil 4.62. MAV A-CYT' nin farklı konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine canlılık yüzdesi.....	111
Şekil 4.63. CYT ve MAV A-CYT' nin farklı konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine canlılık yüzdesi.....	112
Şekil 4.64. CYT ve MAV A-CYT' nin farklı konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine canlılık yüzdesi (2).....	112
Şekil 4.65. İlaçların farklı konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine canlılık yüzdelerinin karşılaştırılması.....	113
Şekil 4.66. Kopolimer-ilaçların farklı konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine canlılık yüzdelerinin karşılaştırılması.....	113

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 Kemoterapötiklerin etki mekanizmalarına göre gruplandırılması ve bazı örnekler.....	19
Çizelge 2.2. Antimikrobiyal aktivite deneylerinde kullanılan mikroorganizmalar ve kaynakları.....	22
Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal maddelerin adı, kısaltılmış gösterimi ve kapalı kimyasal yapısı.....	45
Çizelge 3.2. Kullanılan kimyasal maddelerin adı ve markaları.....	46
Çizelge 3.3. Antimikrobiyal aktivite deneylerinde kullanılan mikroorganizmalar ve kaynakları.....	48
Çizelge 4.6. Ametopiterin (Metotreksat) 'in çeşitli konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerine Optik Dansite değerleri ve % İnhibisyon oranları.....	85
Çizelge 4.7. MAVA- Ametopiterin (Metotreksat) 'in çeşitli konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerine Optik Dansite değerleri ve % İnhibisyon oranları.....	86
Çizelge 4.8. Gemsitabin 'in çeşitli konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerine Optik Dansite değerleri ve % İnhibisyon oranları.....	89
Çizelge 4.9. MAVA-Gemsitabin ' in çeşitli konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerine Optik Dansite değerleri ve % İnhibisyon oranları.....	90
Çizelge 4.10. Siterabin ' in çeşitli konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerine Optik Dansite değerleri ve % İnhibisyon oranları.....	93
Çizelge 4.11. MAVA-Siterabin ' in çeşitli konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerine Optik Dansite değerleri ve % İnhibisyon oranları.....	94
Çizelge 4.12. Ametopiterin (Metotreksat) 'in çeşitli konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine Optik Dansite değerleri ve % Canlılık oranları.....	101
Çizelge 4.13. MAVA- Ametopiterin (Metotreksat) 'in çeşitli konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine Optik Dansite değerleri ve % Canlılık oranları.....	102
Çizelge 4.14. Gemsitabin 'in çeşitli konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine Optik Dansite değerleri ve % Canlılık oranları.....	105
Çizelge 4.15. MAVA-Gemsitabin 'in çeşitli konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine Optik Dansite değerleri ve % Canlılık oranları.....	106
Çizelge 4.16. Siterabin ' in çeşitli konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine Optik Dansite değerleri ve % Canlılık oranları.....	109
Çizelge 4.17. MAVA-Siterabin ' in çeşitli konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine Optik Dansite değerleri ve % Canlılık oranları.....	110

KISALTMALAR DİZİNİ

WHO	World Health Organization
FDA	Food and Drug Administration
MCF-7	Michigan Cancer Foundation – 7 (Meme kanseri hücre hattı)
L929	L suşu 929. klon (Fare fibroblast hücre hattı)
MA	Maleik anhidrit
VA	Vinil asetat
AFE	Alil fenil eter
ST	Stiren
MMA	Metil metakrilat
MAVA	Maleik anhidrit-vinil asetat kopolimeri
MAST	Maleik anhidrit-stiren kopolimeri
MAMMA	Malerik anhidrit-metil metakrilat kopolimeri
MAAFE	Maleik anhidrit-alil fenil eter kopolimeri
MTX	Metotreksat (Ametopterin)
GEM	Gemsitabin
CYT	Siterabin (Sitozin β -D-Arabinofuranosid)
MAVA-MTX	MAVA-Metotreksat(Ametopiterin) kopolimer-ilaç çifti
MAVA-CYT	MAVA-Siterabin kopolimer-ilaç çifti
MAVA-GEM	MAVA-Gemsitabin kopolimer-ilaç çifti
DMSO	Dimetilsulfoksit
AIBN	Azobisizobutironitril
FTIR	Fourier Transform Infrared
¹ HNMR	Proton Nükleer Magnetik Rezonans
MTT	3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromid
XTT	Sodyum 3'-[1-[(fenilamino)-karbonil]-3, 4-tetrazolyum]-bis (4-methoksi-6-nitro)benzen-sulfonikasit hidrat)

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tüm ölüm nedenlerine bakıldığında, kanser hastalıkları, hem erkeklerde hem de kadınlarda 2. sırayı almaktadır [1,2]. 2008 yılında WHO (World Health Organization)' nin yaptırdığı bir araştırmaya göre dünyada ve Türkiye' de kadınlarda en çok görülen kanser türü ise "Meme Kanseri"'dir. Ayrıca, her iki cinsiyet göz önüne alınırsa meme kanseri, akciğer kanserinden sonra ikinci sırayı almaktadır [2,3].

Meme kanserinin tedavisinde cerrahi müdahale ve ilaç tedavisi aynı oranda önem taşımakta, hatta cerrahi müdahale sonrası kemoterapi (antikanser/antineoplastik ilaç tedavisi), hastalığın tekrarlamasını büyük oranda engellemektedir [2,4].

Kanser tedavilerinde kullanılan kemoterapi ilaçları; hücre içine doğrudan diffüz eder ancak hücre içinde spesifik bir bölgede toplanmazlar. Buna ek olarak, eğer bu ilaçlar intravenöz olarak vücuda verilirse sistemik olarak tüm dokulara yayılırlar. İşte bu kararsız dağılımın bir sonucu olarak, gözle görülür yan etkiler ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla birçok kemoterapi ilacının klinik olarak kullanımı, toksik yan etkileri yüzünden düşük terapötik indekse sahip olmaları nedeniyle sınırlanmıştır [5,6]. Bu nedenle ilaçların vücutta gitmeleri gereken yerlerde lokalize olmalarını sağlamak ve yan etkilerini azaltmak amacıyla çeşitli öneriler geliştirilmektedir [7].

Antikanser tedavileri alanında son 30 yıl içerisinde, bu antikanser ajanlarının terapötik etkilerini artırmak amacıyla 2 farklı strateji ortaya atılmıştır.

Birinci yaklaşım; özellikle tümörün ilerlemesi ile ilgili moleküler yöntem ve aşamaları değiştirecek ajanlar tasarlamak ve geliştirmekle ilgilidir. Bu yaklaşımın başarısı; imatinib, trastuzumab ve gefitinib gibi, moleküler olarak aktif hedeflemede rol alan yeni nesil ajanların başarılı girişimleri ile kanıtlanmıştır.

İkinci yaklaşımda ise; kemoterapötik ajanlara kovalent olarak bağlanabilen, suda çözünebilir polimer fikri, 1970'lerin ortalarında Ringsdorf tarafından ortaya atılmıştır. Bu modele göre; polimerik taşıyıcıya bağlı ilacın farmokinetiğinin değiştirilmesi amaçlanır. Bunun yanı sıra hedef fonksiyonel grup, aynı polimerik taşıyıcıya tanıtılırsa, aktif hedeflemenin gerçekleşmesi de mümkün olabilecektir [7].

Son yıllarda ikinci yaklaşımda sözü edilen, kanser tanı ve tedavi yöntemlerinin iyileştirilmesi için geleneksel ilaçlara alternatif olarak polimer-ilaç çiftleri geliştirilmektedir. Burada dikkat çeken nokta, polimerik ilaçların üstün fizikokimyasal özelliklerinden dolayı, klasik küçük moleküllü ilaçlarda bulunmayan tedavi edici özelliklere sahip olmalarıdır. Diğer bir deyişle biyoaktif polimerler olarak da bilinen bu makromoleküllerin ilaç etken maddeleri ile etkileştirilerek geliştirilmesiyle oldukça fazla avantaja sahip, ilaç salım sistemleri (İSS) için kullanışlı moleküller elde edilmiştir [8].

Bu tip sentezlerde; sentetik bir polimer örneğine antineoplastik bir ilaç etken maddesi kimyasal konjugasyonla bağlanarak, ilacın kontrollü olarak tümör hücrelerine verilebileceği ve etkisinin istenen yönde artırılması yanında istenmeyen yan etkilerinin de azaltılabileceği amaçlanmaktadır [9].

Başlangıçta yenilikçi polimer temelli ilaçlara karşı konulmuştur ancak bilimsel meraklar, endüstriyel gelişmeler sonucu düzenleyici birimlerin onayları da alınarak bazı gereksinimler için polimer uygulamaları çalışılmıştır. Klinikte düşük maliyet ile verimli ilaç ve tanı sistemleri şeklinde güvenli olarak uygulanması amaçlanmıştır. Klinik amaçlı nanoteknoloji olarak adlandırılan ve popüler alanda odak noktası olan polimer tedavisi, bu alanda büyük bir gelişime neden olmuştur [10].

Polimer-ilaç konjugatları, kemoterapötik ajanların moleküler seviyede çözünürlüklerini, geçirgenliklerini ve kararlılıklarını artırmak amacıyla kullanılan başlıca ilaç modifikasyonlarıdır. Bu şekilde uygulanan stratejilerde amaç; kimyasal olarak orijinal bileşenden farklı, ancak benzer ya da daha iyi biyolojik etkileri olan modifiye ilaç sistemleri geliştirmektir [11].

Son yıllarda uygulamaları giderek yaygınlaşan kontrollü ilaç salınım sistemleri, ilaçların istenilen hız ve periyotlarla, hedeflenen doku veya organa vermek suretiyle, etkin bir tedavi yöntemi oluşturmaktadırlar. Kısa zamanda bu yeni ilaç salınım sistemleri, kardiyoloji, oftalmoloji, endokrinoloji, onkoloji ve immunoloji olmak üzere tıbbın her dalında etkin olarak kullanılmaya başlandı [12,13].

Çalışmamızda kullanılan Maleik Anhidrit (MA), fonksiyonel özelliği nedeniyle oldukça fazla tepkime verme yeteneğine sahip olmasının yanı sıra, polifonksiyonel maddeler ile de etkileşerek çok sayıda fonksiyonel özelliğe sahip yeni makromoleküllerin sentezlenmesini sağlayan bir monomerdur [14,15].

MA halkalı bir yapıya sahiptir, bu halkanın kimyasal maddelerle etkileşerek açılması farklı özelliklere sahip maddelerin sentezlenmesine yol açar ki, bu da kullanım amacına göre çok farklı özelliklere sahip yeni birçok maddenin sentezlenmesine imkan tanır [16].

MA monomerini içeren bazı kopolimerlerin RNH_2 ve ROH benzeri moleküllerle etkileşerek türevlendirilmesi ve bu türevlerin suda çözünür özellikte olması ilaç salınım sistemlerinin etki mekanizması açısından oldukça önemlidir. MA içeren (Divinyl ether-maleic anhydride) kopolimeri oldukça fazla biyolojik aktivite gösterir: Anti-tümör, anti-viral, anti-bakteriyel, anti-fungal, anti-koagulant aktiviteler ve anti-inflammatory ajan bunlardan bazılarıdır. Ayrıca bazı MA kopolimerlerinin de kendi başlarına antitümör etki gösterdiği bilinmektedir [17].

Meme kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılan ve polimer-ilaç konjugatları ile ilgili çalışmalarda sıkça karşımıza çıkan; Doxorubicin ve Gemcitabine ilaçlarının kısa yarılanma ömrüne sahip olmaları ve dokulardaki toksik etkilerinin fazla olması klinik uygulamalarını sınırlandırmaktadır. Amethopterin, Cytarabine, Melfalan, Hydroxyurea gibi meme kanseri tedavisine spesifik olmayan genel kullanım kemoterapi ilaçlarının da yan etkilerinin fazla olması nedeniyle kopolimerlere bağlanarak toksisitelerini düşürmek hedeflenmektedir [11].

Bu tez çalışmasında; antineoplastik özellik gösteren ilaç etken maddeleri ile fonksiyonel özellikleri nedeniyle birçok farklı biyolojik aktivite gösteren kopolimerler etkileştirilerek, suda çözünebilen yeni polimer-ilaç konjugatları elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu polimer-ilaç çiftlerinin yapısal karakterizasyonu yapıldıktan sonra biyolojik aktivitelerine (Antibakteriyel, Antifungal) bakılması, vücut sıvısı olarak kabul edilen PBS (fosfat tampon çözeltisi)'deki salım davranışları ile normal hücreler üzerinde toksik etkilerinin incelenmesi ve antitümör aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve çoğalmasıyla meydana gelen bir hastalık olup, çağımızda başlıca ölüm nedenlerinden biridir. Gelişmiş ülkelerdeki tüm ölüm nedenleri içinde, kardiyovasküler hastalıklardan sonra en çok ölüme neden olan hastalık kanserdir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO); 2007 yılında 7.9 milyon olan global kanser ölümlerinin, 2030 yılında % 45 artarak 11.5 milyona yükseleceğini bildirmektedir. Dünya Sağlık Örgütü tarafından yapılan başka bir araştırmada önümüzdeki her yıl 10 milyon yeni kanser vakasının görüleceği ve 6 milyondan fazla ölümün bu nedenle gerçekleşeceği rapor edilmiştir [18].

Kanser çeşitleri arasında en sık rastlanılan tür akciğer kanseridir. Bu hastalığı sırasıyla; meme, kolon, karaciğer, prostat, serviks ve mide kanserleri izlemektedir.

Her iki cinsiyet göz önüne alınırsa meme kanseri, akciğer kanserinden sonra ikinci sırayı almaktadır [1,2].

Kanser, kontrolsüz biçimde bölünen hücrelerin birikerek tümör adı verilen yapıları oluşturması şeklinde gözlemlenebilir hale gelmektedir. Tümörler dokulardaki davranışlarına göre üç ayrı sınıfa ayrılmaktadırlar. İyi huylu tümörler herhangi bir dokuda oluşabilmekte ve dokuda basınç stresi yaratmakta, ancak yayılım göstermemektedirler. *In situ* (tek bir yerde bulunan) tümörler genelde epitel dokuda görülmektedirler. Kanseri hücresi morfolojisine sahip olmakla birlikte dokularda yayılım göstermemektedirler. Habis karakterli tümörler ise diğer dokulara yayılabilmekte ve organizmanın yaşamı için tehlike yaratmaktadırlar [19].

Kanseri hücrelerin başlıca özellikleri, artmış bir proliferasyon, düzenleyici proteinlerin kaybolmuş olması, genomik bir değişkenlik ve ölümsüzlüktür [20,21].

2.1.1. Meme Kanseri

Meme kanseri, kadınlar arasında en sık rastlanan kanser tipidir ve kanser ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır. Her 15 kadından biri meme kanserine yakalanır. Meme kanseri ABD’ de kadınlarda ölüm nedenleri arasında bütün hastalıklar içinde beşinci sırayı alır; 40-44 yaş arasındaki kadınlar için ise en öldürücü hastalıktır [2,3]. 2007 yılı verilerine göre, Amerika’ da 178,480 yeni olgu bulunduğu ve bunlardan 40.460’ ının meme kanserinden hayatını kaybettiği tahmin edilmektedir [22]. Türkiye’de 2002-2005 yılları arasında kadınlarda en sık rastlanan kanser nedeni “Meme Kanseri” olarak tespit edilmiştir [23].

2.1.2. Kanser Tedavisi ve Yeni Yaklaşımlar

Kanser tedavisinde; tümörün organizmada bulunduğu dokuya, hastanın fizyolojik durumuna ve tümörün karakterine bağlı olarak geniş bir yelpazede çeşitli tedaviler uygulanmaktadır. Bu tedaviler arasında kemoterapi, radyoterapi, gen terapisi, immünoterapi ve monoklonal antikor terapileri kullanılmaktadır.

Günümüzde kanser tedavisinde en yaygın kullanılan tedavi yöntemleri kemoterapi ve radyoterapidir. Radyoterapide iyonize radyasyon, habis tümör hücrelerini hasara uğratarak öldürmek için kullanılmaktadır. Radyoterapi tümör tedavisinde lokal bir yaklaşımdır ve doğrudan tümör kitlesi hedeflenerek gerçekleştirilmektedir. İyonize radyasyon, hücrelerin DNA’larını doğrudan ya da serbest radikal oluşumu ile dolaylı yoldan hasara uğratmakta ve hücrenin ölümüne sebep olmaktadır [24].

Habis karakterli tümör tedavisinde kemoterapi; sitotoksik ilaçlar kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Kemoterapi radyoterapinin aksine genel bir yaklaşımdır ve kullanılan ilaçlar tüm vücut hücrelerini etkilemektedir. Kemoterapide amaç kanserli hücreleri elimine etmek ve bunu gerçekleştirirken normal hücrelere verilecek hasarı en düşük seviyede tutmaktır. Kemoterapide kullanılan ilaçlar etki mekanizmalarına göre; alkalize edici ajanlar, mitotik inhibitörler, hormonal ajanlar, antimetabolitler, misellanöz ajanlar ve karsinolitik antibiyotikler olarak sınıflandırılmaktadırlar [25].

Kanser tedavisinde radyoterapi ve kemoterapinin kombine uygulanması tedavi etkinliğini arttırmaktadır. Ancak etki mekanizması halen tam olarak

aydınlatılmamıştır. Kombine tedavide amaç, radyoterapi ile tümörlerin lokal olarak yok edilmesi ve kemoterapi ile de metastatik hücrelerin yok edilmesidir.

Bu uygulama ayrıca tümörlerde radyasyon duyarlılığının artmasına sebep olmaktadır. Kemoterapinin ve radyoterapinin farklı hücresel yapı ve fonksiyonları etkileyerek birbirlerini tamamlayıcı nitelikte olmalarının sebebinin, ortaya çıkan radyoduyarlılık olabileceği bildirilmiştir [26].

Günümüzde her üç kişiden biri kanser olmakta, her dört erkekten biri ve her beş kadından biri kanser nedeni ile ölmektedir. Bu durum kanser tedavisiyle ilgili araştırmalara büyük önem kazandırmıştır.

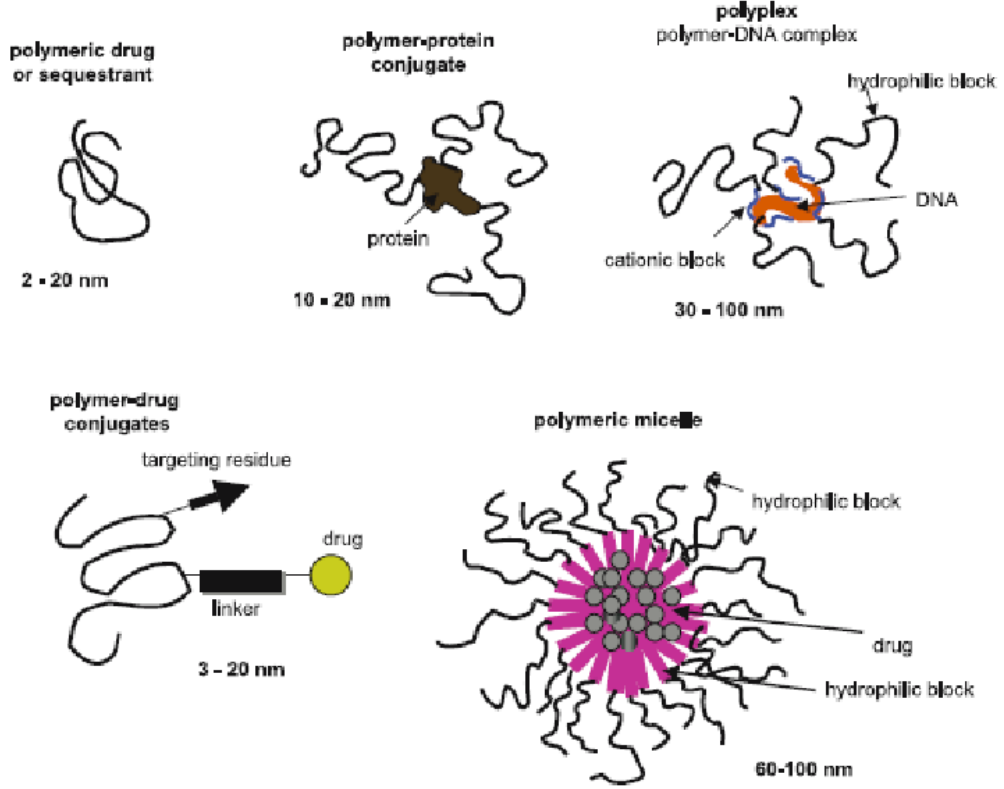
2.2. Polimerler ve Tıp Alanında Kullanımları

Polimerler ya da polimerik malzemeler; elektronik alet parçaları, yapıştırıcılar, levha ve plakalar, kalıplanmış malzemeler, fren balataları, yapı malzemeleri, hava ve deniz taşıt parçaları, dekoratif malzemeler, boyalar, cam-lif takviyeli parçalar, lifler, lastikler, paketleme malzemeleri, misina, dikiş ipliği, çeşitli aletler, elastomerler, izolasyon malzemeleri, köpükler, yer döşemeleri, yüzey kaplamaları, kapsülleme malzemeleri, kap ve kutular, oyuncaklar, mutfak eşyaları, boru ve tüpler, kablo kılıfları, steril edilebilir tıbbi malzemeler, yağmurluklar, tekstil ve kağıt endüstrisi gibi günlük yaşamımızın bir çok alanında üstün özellikleri nedeniyle önemli bir rol almaktadırlar ve kullanım alanları da gün geçtikçe artmaktadır [27].

Son yıllarda ise biyotıp alanındaki araştırmalarda da polimerler oldukça kullanışlı hale gelmiştir. Son 30 yılda yapılan biyotıp alanındaki gelişmelere polimerlerin, ilaç salım sistemlerinde ve denetimli salım sistemlerinde kullanımları önemli katkıda bulunmuştur. Eşsiz fizikokimyasal ve fonksiyonel özellikleri nedeniyle kopolimerlerin, biyolojik ortamlarda farklı biyolojik aktiviteler gösterdikleri bilinmektedir [17].

Polimerler fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre suda çözünebilir özellikte olabileceği gibi, çözünmeyebilir özellik de gösterebilir. Suda çözünmeyen polimerlerin suda oldukça az çözünen ilaçlarla oluşturdukları polimerler genellikle suda oldukça iyi çözünmektedir. Bu özellik düşük mol kütleli ilacın, hedefe (doku, hücre v.b.) olan özgünlüğünü artırarak daha kullanışlı ve faydalı olmasını pozitif yönde etkilemiştir [28]. Ringsdorf'un sunduğu orijinal çalışmada, bölge hedefli polimerik ilaçlar, çeşitli hastalıklara karşı terapötik

ajanlar olan fonksiyonel polimerlerin rollerini aydınlatmıştır. Bu polimer ilaç-konjugat sistemleri küçük molekülü ilaçların ve terapötik ajanların hedefli dağıtımını sağlamıştır (Şekil 2.1) [29].



Şekil 2.1 Polimer-ilaç, polimer-protein ve polimer-DNA konjugat sistemleri [10].

2.2.1. Polimerlerin Tarihi Gelişimi

Polimerlerin tıpta kullanımı yeni değildir. Hiç kuşkusuz, doğal polimerler, doğal ilaç bileşenleri olarak bin yıldan fazla süredir kullanılmaktadır. Modern farmakoloji spesifik doğal ürünleri ilaç olarak belirlemede çok daha dikkatlidir ve onların mekanizmalarının moleküler seviyesini kesin olarak anlamaya başlamıştır. Enjekte edilebilir ilaç dağıtım sistemlerinin makromoleküler ilaçlar veya bileşenleri olarak sentetik, suda çözünebilir polimer fikri ile yakın bir tarihte polimer biliminin kendi kendine ortaya çıkışı sürpriz olmamaktadır [30,31].

Hermann Staudinger ve arkadaşları, 1920’de polimer biliminin doğuşunda büyük çabalar sarf etmişlerdir. 1953 yılında Staudinger, ilk polimer Nobel ödülünü “Makromoleküler Kimyanın Keşfedilen Alanları” ile almıştır. Tesadüfi olarak aynı yıl Watson ve Crick, DNA’nın yapısını anlatan makalelerini

çıkartmışlardır. Yaklaşık o zamanlarda suda çözünür sentetik polimerler sağlık alanında parenteral ilaç verilmesi için yardımcı olmuştur [10].

İkinci dünya savaşı boyunca polivinil prolidon gibi sentetik polimerik plazma açıcılara geniş oranda uyum sağlanmıştır. İlk polimer ilaç konjugatı olarak yan zincirlerinde enzimatik yıkılan veya parçalanmayan ilaçların tutturulduğu meskaline-N-vinilpirolidin konjugatları ortaya çıkmıştır. Böylece biyolojik olarak aktif polimerik ilaçlar popülerite kazanmaya başlamıştır [32].

İlk olarak 1960'larda divinil eter-maleik anhidrit kopolimeri anti-kanser ilacı olarak klinikte test edilmiştir. Erken klinik deneylerde, ağır toksisite nedeniyle başarısız olmuştur ve damar içine verildiğinde, polimerin molekül ağırlığında değişimleri ile ilişkili tehlikeli yan etkileri görülmüştür. 1970'lerde ortaya çıkan polimerik ilaçlar, polimer-protein ve polimer-ilac konjugatları, çalışmalara öncü olmuştur. 1970 ve 1980'lerdeki ilk polimerik ilaç adayları için çalışmalar klinik testlerde son bulan girişimlerdir. Polimerik ilaçlar için yapılan bazı önemli çabaların sonucu olarak, ilk denemelerinde klinik sorunların çözümü ile rutin klinik kullanıma dönüşüm sağlanabilir. Klinik öncesi toksikolojik protokollerin belirlenmesi, güvenliği bir ölçüde sağlayabilir ancak klinik deneylere ve klinik protokollerin optimizasyonuna da ihtiyaç vardır [10].

1990'larda polietilenin rutin klinikte kullanımı, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır. Akut immün yetmezlik sendromunun tedavisi için PEG-adenozin, akut lenfoblastik lösemi tedavisi için PEG-L-asparaginaz kullanılmıştır. Aynı zamanda Japonya'da, Maeda ve arkadaşları tarafından, 1-sitren-ko-maleik anhidritin anti-kanser proteini olan neokarzinstatin ile konjugatı (SMANCS) geliştirilip, primer karaciğer kanserli hastalarda başarılı bir şekilde kullanılmış ve hastalığın tedavisi için kullanımı onaylanmıştır [33]. Hidrofobik bir protein ve polimerin konjugasyonu ile görüntüleme sistemleri için kullanılan faz kontrast ajan olan Lipiodol'in polimer yoluyla dağıtımına izin verilmiştir. Bu formülasyon hepatik arter yoluyla lokal olarak uygulanmıştır. Polimer konjugatlarını içeren makromoleküllerin uzun süreli sirkülasyonu ve polimer kaplı lipozomların EPR etkisi (gelişmiş geçirgenlik ve tutulma etkisi) ile damardan enjeksiyondan sonra anti-tümör ilaçların tümör dokularda pasif olarak birikmesi artık daha iyi bilinen özelliklerdir. Bu konjugatlardaki polimerler sentetik olup L-alanin, L-lizin, L-glutamik asit ve L-tirozinin rastgele olarak kopolimer sentezini içerir [34]. Ek olarak edinilmiş bağışık yetersizliği hastalığı

(AIDS) hastalarına, vajinal anti-HIV virüsü ve dekstrin-2-sülfat ilk dendrimer temelli ilaçlar periton içersine verilmiştir [35].

İlk sentetik polimer ile anti-kanserojen ilaç konjugatının klinik testleri 1994 yılında başlamıştır. N-(2-hidroksipropil) metakrilamid (HPMA) kopolimeri doksorubisin ile konjuge edilmiştir [28]. O zamandan bu yana beşten fazla HPMA kopolimer konjugatı klinikte uygulanmış olup anti-anjiyogenik ilk konjugat şu an *in vivo* test aşamasındadır [36]. Anti-kanser ilaç taşıyıcı polimerlerden poli(glutamik asit), PEG ve polisakkaritler şu an klinik olarak denenmektedir ve bu sınıftaki ilk polimer çok yakında kullanılmaya başlanacaktır.

Anti-kanser ilaçların hedefli dağıtımı için alternatif bir yaklaşım, anti-kanser ilaçların kopolimer miseller içerisine kovalent bağlanması veya kolayca hapsedilmesi ile hazırlanan konjugatların kullanımınıdır. Erken klinik testlerle bu tip 3 sistem geliştirilmiştir [10].

1980'lerin sonlarına doğru, hastalıkların moleküler temellerine odaklanmasıyla gen terapi umutları da hız kazanmıştır. Gen terapi için viral vektörler kullanılmaktayken, hala polimerik, non-viral vektörler alternatif olma yolundadır. Polimer temelli vektörlerin çeşitliliği nedeniyle gen dağıtım sistemi olarak kullanılması tasarlanmıştır [9]. İlk polimerik viral vektör ürünlerinin piyasaya çıkmış olmasına rağmen bu alanda yapılacak daha çok şey vardır.

Paul Ehrlich'in kemoterapi için ilk sentetik küçük molekülü önermesinden bu yana henüz yüzyıllık bir zamanın geçtiği unutulmamalıdır. İlk biyoteknoloji ve polimer temelli ürünlere giriş yaklaşık 20 yıl öncesidir. Yine de şu anda farmakolojik endüstrinin esas işi, düşük molekül ağırlıklı ve özellikle hastalar için oral alıma uygun olabilecek özellikteki öncül ilaçlardır. Makromoleküler ilaçlar, proteinler, polimer ilaçlar ve genler gibi oral olarak alınamayan ilaçların, kimyasal kompleksliliği ve pratikteki kullanım zorlukları 20. Yüzyılın sonuna kadar ilaç endüstrisinde aday olarak geliştirilmelerinde sorun teşkil etmiştir. Ancak FDA'nın birçok makromoleküler ilacı ve ilaç dağıtım sistemlerini küçük moleküllerden daha fazla onayladığı gözlenmiştir.

Şu ana kadarki sürede on veya yirmi yıl öncesindeki bilgiler olgunlaşmış ve çok disiplinli alanlarda polimer kimyası çalışmalarının artışı ile ikinci nesil polimer ilaçların geliştirilme ve dizaynına yönelim olmuştur. Polimer sentezleri yenilikçi birçok materyale yönelmiş olsa da yeni materyallerin biyolojik ve fizikokimyasal karakterizasyonu için dikkatli olunması gerekmektedir [10].

Klinik kullanım için biyoyumlu sentetik polimerlerin vücuda verilmiş rotalarında, dozlarında ve verilmiş sıklıklarında zararlı olmamalarının belirlenmesi oldukça önemli ve gerekli bir parametredir. Suda çözünür polimerlerin genel sitotoksitesite, hematoksitesite ve immunojenlik (hücresele ve humoral) gibi özellikleri çalışılmaktadır. Klinik çalışmalardan önce, ilaç taşıyıcısı olarak sentezlenen polimerlerin ciddi toksikoloji testlerinin yapılması da gerekmektedir [10].

2.2.2. Polimerlerle İlgili Genel Kavramlar

Genel yapıları göz önüne alındığında, polimerler, çok sayıda aynı veya farklı monomerlerin ya da grupların kovalent bağlarla birbirine bağlanmasıyla oluşturdukları yüksek mol kütleli oldukça büyük bileşiklerin genel adıdır. Polimerik yapıları oluşturmak üzere bir araya gelen en küçük yapısal molekül birimlerine ise monomer denir, monomerlerin aynı ya da farklı olmasına göre polimerler aşağıdaki gibi sınıflandırılmaktadır [27] :

- 1) **Homopolimer:** Polimer zincirinde tek tip monomer biriminin yinelenmesiyle oluşan yapıların genel adıdır.
- 2) **Kopolimerler:** Polimer zincirinde farklı tip monomer birimleri kullanılarak meydana gelen yapıdır.
- 3) **Terpolimerler:** Kopolimer zincirlerinde kimyasal yapıları birbirinden farklı üç monomer birimi kullanıldığında meydana gelen yapılardır.

İki farklı monomerden oluşan kopolimerler, monomer birimlerinin zincir boyunca diziliş biçimine göre de rastgele, ardışık, blok ve aşırı kopolimer olmak üzere de 4'e ayrılmaktadır.

Polimerlerin moleküler yapıları ister homopolimer isterse kopolimer olsun, zincir biçimlerine göre ise; doğrusal, dallanmış ya da çapraz bağlı olabilirler [27].

2.2.3. Polimerleşme Tepkimeleri

Kimyasal mekanizmaları göz önünde bulundurulduğunda, polimerler, sentezlenme yöntemine göre kondenzasyon (basamak) ve zincir (katılma) polimerleşmesi olmak üzere iki yöntem adı altında incelenebilmektedir [27].

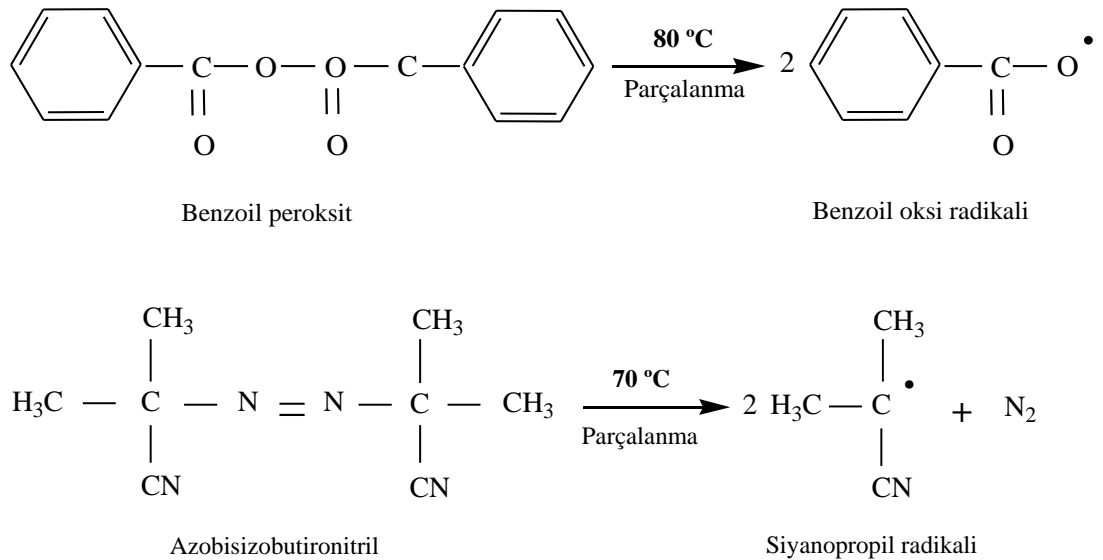
2.2.3.1. Kondenzasyon (Basamak) Polimerleşmesi

Hidroksil ($-OH$), karboksil ($-COOH$) ve amin ($-NH_2$) gibi fonksiyonel grupları bulunan iki farklı ya da benzer yapıdaki molekülün bir araya gelmesiyle

aralarından su (H₂O), hidroklorik asit (HCl) ve amonyak (NH₃) gibi küçük bir kimyasal molekülün ayrılmasına kondenzasyon tepkimeleri denir. Genellikle bu tepkimelerden poliamitler ve poliesterler elde edilmektedir.

2.2.3.2. Zincir (Katılma) Polimerleşmesi

Monomer birimlerinin büyümekte olan polimer zincirlerine tek tek ve hızlı bir şekilde katılmasıyla meydana gelen ikinci bir polimerleşme yöntemidir. Radikalik başlatıcılar kullanılarak meydana gelen serbest radikal polimerleşmesi ise, radikaller üzerinden yürütülen zincir (katılma) polimerleşmesidir. Radikaller, çiftleşmemiş elektron çifti içeren kimyasal yapılar için kullanılan genel bir isimdir. Zincir büyümesi hızlı bir şekilde meydana geldiğinden, polimerleşme ortamında polimerleşmenin her aşamasında, sadece yüksek mol kütleli polimer ve tepkimeye girmemiş monomer bulunmaktadır. Bu tip bir polimerleşmeyi başlatma; peroksit türü olan benzoil peroksit (BPO) ve azo türü olan azobisisobutironitril (AIBN) gibi bazı organik yapıların ısı etkisiyle bozunmasından elde edilen serbest radikallerin başlatıcı olarak kullanılmasıyla gerçekleşmektedir. Aşağıda gösterildiği gibi farklı bozunma ya da parçalanma sıcaklıklarına sahip BPO ve AIBN başlatıcılarından parçalanma tepkimesiyle oluşan serbest radikallerin ve radikalik türlerin kimyasal yapıları yer almaktadır [27].



Şekil 2.2. Radikalik başlatıcılar olan BPO ve AIBN'nin parçalanma tepkimesinden oluşan radikaller.

2.2.3.3. Serbest Radikal Polimerleşmesi

Serbest radikaller, polimerleşmeyi başlatmak üzere, kimyasal maddeler kullanılarak ya da bazı fiziksel etkenlerden yararlanılarak üretilmektedir. Radikalik polimerleşmenin başlatılmasında kullanılan kimyasal maddeler ve fiziksel etkenler; organik peroksit veya hidroperoksitler için ısı etkisi, azo bileşikleri için ışık ve UV-ışınları, redoks başlatıcılar için yüksek enerjili ışınlar ve organometalik bileşikler için ise elektrokimyasal yöntem şeklinde sıralanabilmektedir [27]. Serbest radikal polimerleşmesi başlama, büyüme ve sonlanma olmak üzere temel olarak üç adımda meydana gelmektedir.

2.2.3.4. İyonik ve Koordinasyon Kompleks Polimerleşmesi

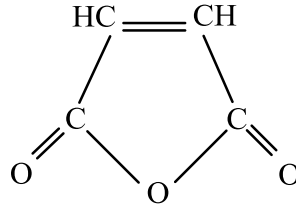
1. İyonik katılma polimerleşmesi: Zincir polimerleşmesinin, serbest radikaller üzerinden olduğu kadar anyon ve katyon gibi pozitif ya da negatif iyonlar üzerinden de yürüebildiği polimerleşme türüne iyonik katılma polimerleşmesi adı verilmektedir. Burada monomerler, zincir uçlarındaki iyonik aktif merkezlere radikalik polimerleşmedekine benzer şekilde katılarak polimer zincirini büyütürler. Eğer aktif merkez negatif yüklü ise anyonik katılma polimerleşmesi, pozitif yüklü ise katyonik katılma polimerleşmesi meydana gelmektedir [27].

2. Koordinasyon kompleks polimerleşmesi: Zincir polimerleşmesinin serbest radikaller yerine koordinasyon kompleks yapıcı maddeler üzerinden yürüebildiği polimerleşme türüdür. Genellikle Ziegler-Natta katalizörleri gibi uygun katalizörler kullanılmaktadır.

2.2.4. Maleik Anhidrit Monomeri ve Maleik Anhidrit Kopolimerlerinin Özellikleri

Radikalik başlatıcılar yardımıyla, radikalik kopolimerleşmeye elverişli iki farklı monomerin bulunduğu ortamın iyonlaştırıcı ışınlarla ışınlanması, elektroliz edilmesi veya ortama radikalik başlatıcıların katılmasıyla kopolimerler elde edilebilmektedir [27]. Bu çalışmada, maleik anhidrit (MA) monomeri vinil monomerleri olarak da bilinen stiren (ST), vinil asetat (VA), metil metakrilat (MMA) ve allil fenil eter (AFE) monomerleri seçilerek, serbest radikal polimerleşme tepkimesiyle farklı kopolimerler sentezlenmiştir.

Kimyasal yapısı nedeniyle oldukça fonksiyonel özelliğe sahip olmasına rağmen maleik anhidrit (MA) çoğu monomerin aksine, normal koşullarda homopolimerleşmeyen, yani kendi kendine kopolimer oluşturamayan, bilinen en iyi elektron alıcı (electron acceptor) monomerdur [37]. Kapalı formülü $C_4H_2O_3$ olan maleik anhidrit (MA) monomeri, suda çözünmeyen ancak eter, aseton ve kloroform gibi organik çözücülerde oldukça iyi çözünebilen organik bir moleküldür. Oldukça doğal ve kullanışlı bir bileşik olan MA; elma asidinin kuru damıtılmasından elde edilmiştir. Daha sonra MA, sirke asidinin klor anhidritinden ve elma asitinden elde edilmiştir. 1900'li yıllarda ise, benzolün katalitik oksitleşmesinden MA elde edilebilmiştir [12].



Şekil 2.3. Maleik anhidrit (MA) monomerinin kimyasal yapısı.

MA monomeri, dikarboksilik yapıda olan anhidritlerin sahip olduğu tüm özelliklerini taşımaktadır. MA'daki her iki karbonil (C=O) grubunda yer alan çift bağlar nedeniyle olefinlerin verdiği tüm tepkimeleri verebilme yeteneğine sahiptir. Karbonil gruplarında bulunan çift bağlar nedeniyle MA, dienofil (iki tane konjuge çift bağ içeren yapıdır) özellik kazanmaktadır. Dienofil özellik nedeniyle MA kopolimerleri; hidroliz tepkimeleri, tuz oluşumu, esterleşme, amidleşme, amidik asit oluşumu ve imitleşme gibi oldukça fazla farklı tip tepkime verebilmektedir [15].

2.2.4.1. Maleik Anhidrit Kopolimerlerinin Katılma Tepkimeleri

Maleik anhidrit monomerinden kaynaklanan oldukça fonksiyonel özellikte olan anhidrit halkasının verdiği katılma tepkimesiyle elde edilen MA-kopolimerleri, çok sayıda tepkime verebilme yeteneğine sahiptirler. Bu tepkimeler; yeniden esterleşme, kopolimerleşme ve kondenzasyon gibi anhidrit zincirleri ile büyüyen tepkimeler ve iki farklı monomere ait fonksiyonel grupların anhidrit halkası ile verdikleri tepkimeler olmak üzere iki gruba ayrılır. Her iki durumda gerçekleşen

tepkimelerde zincir uzunluğunu değiştirmez [12]. MA kopolimerlerinin *in-vitro* ve *in-vivo* alışmalarla birçok biyolojik aktivite gösterdikleri saptanmıştır [17]. Bunlardan maleik anhidrit-stiren (MAST) kopolimeri ile ilgili birçok çalışma literatürde göze çarpmaktadır.

2.2.4.2. Polianhidritlerin İlaç Salım Sistemlerinde Kullanılması

Sentezlenen fonksiyonel polimerlerin çoğunluğu polianyonik özellikte olduğundan bu tip buyuk moleküller "polianyonik polimerler" olarak da bilinmektedir. Bir polimer zincirinde yüklü grupların tumu negatif ise, bu polimer polianyon özellikli bir polimerdir. Polimer zincirlerinin polianyon dışında ve çoğunlukta olan kısmı hidrofobik özellik taşımaktadır. Polimer zincirinin, özellikle fonksiyonel kısmında, moleküler yapısında meydana getirilen kimyasal modifikasyonlar ile hidrofilik kısım artırılarak biyolojik aktivite artışında önemli rol oynamaktadır. Özellikle bu tez çalışması kapsamında antikanser aktivitesi olan ilaç etken maddeleri yardımı ile polianyonik karakterin yani karboksilat anyonunun artırılması ve bununla beraber asidik özelliğin çoğaltılmasıyla suda ozunebilen yeni kopolimer-ilaç çiftinin biyolojik aktivitesinin artacağı beklenmektedir. Polimer-İlaç ikilisinin suda ozunebilmesini sağlamak, polianyonik karakterle polimerin su ile hidrojen bağı yapabilme kapasitesini artırarak gerçekleştirilmektedir. Son yıllarda polianhidritlerin ilaç salım sistemlerindeki uygulamaları artmakla birlikte oldukça yaygın hale gelmiştir [38].

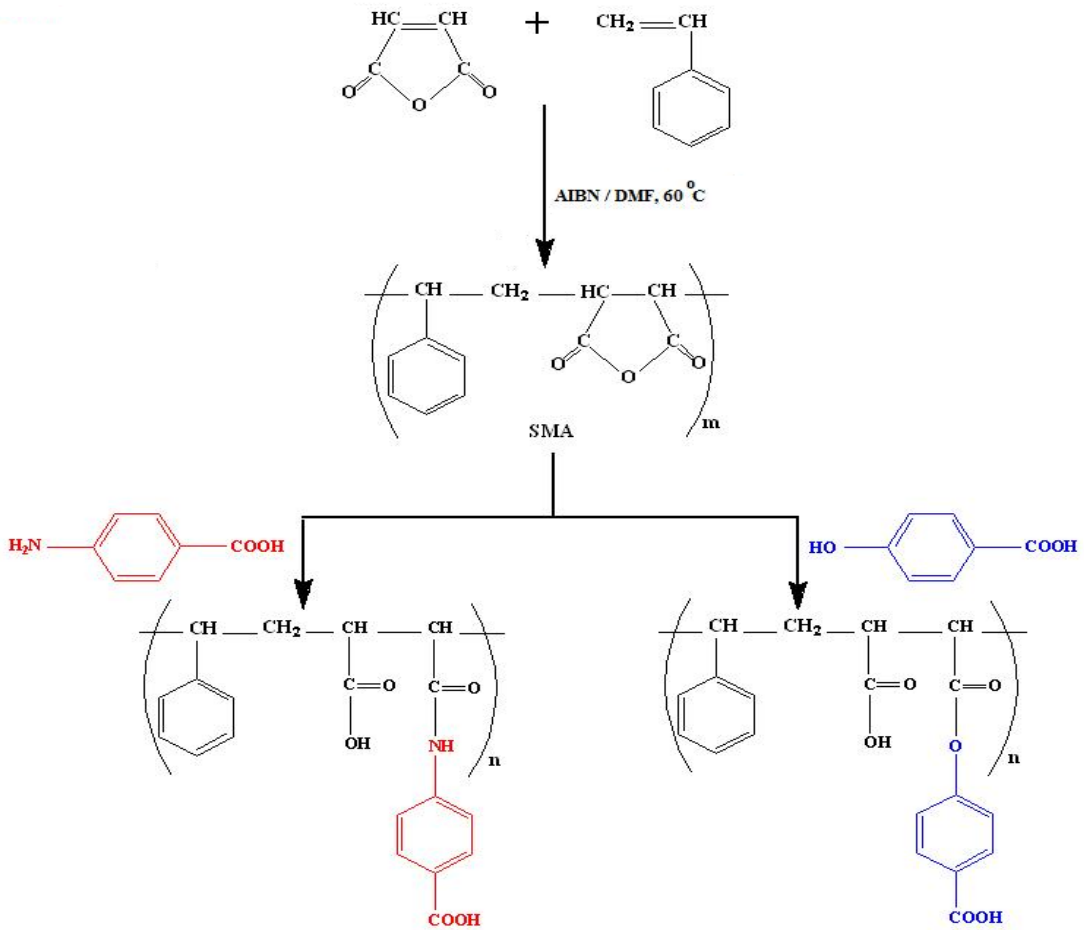
Suda ozunebilir özellikte olan maleik anhidrit içeren kopolimerler, polianyonlar olarak kullanılmaktadır ve fonksiyonel türevleri yüksek biyolojik ve fizyolojik aktiviteye sahiptir [39]. Polianhidritler, biyoyumluluk ve biyobozunabilirlik açısından, ilaç salım sistemleri için en uygun biyobozunabilir polimerlerdir. Polianhidritler, genellikle, nadiren suda ozunebilen iki karboksil (-COOH) grubu içeren monomerlerin birbirleriyle anhidrit bağlarıyla bağlanmasıyla meydana gelmektedir.

2.2.4.3. Kimyasal Modifikasyonun önemi

Radikalik başlatıcılar ile serbest radikal zincir polimerleşme tepkimeleriyle sentezlenen maleik anhidrit içeren polimerler, anhidrit halkasının aktifliği nedeni ile fonksiyonel özelliktedirler. Bu yüksek reaktivite, yeni bileşiklerin sentezlenmesine yol açmaktadır [14]. Söz konusu moleküllerin suda ozunebilme

ve buna paralel olarak da biyolojik aktivite gösterebilme yeteneği, polimer zincirinde meydana gelen hidrofilik (suyu seven ve çeken yüzey) karakterin artması sonucudur [39]. Genellikle polimer zincirinde bulunan anhidrit halkasının, etkileşime girdiği kimyasal maddeler tarafından açılması türevlendirme ya da kimyasal modifikasyon olarak ya da halka açılması tepkimeleri olarak bilinmektedir. Anhidrit halkası genellikle sodyum hidroksit (NaOH), potasyum hidroksit (KOH), ya da amonyum hidroksit (NH₄OH) gibi bazik karakterli moleküller ile modifikasyon tepkimesi ile hidroliz edilmektedir. Türevlendirme ya da kimyasal modifikasyondan sonra karboksilik asit ve ester (etken madde ROH gibi alkol yapısında ise) ya da amid (etken madde RNH₂ gibi amin yapısında ise) içerikli yeni bir yapı elde edilmektedir [16].

Önceki yıllarda yapılan bir çalışmada; maleik anhidrit-stiren (MAST) kopolimerinin benzoik asitler ile esterleşme ve amidleşme tepkimelerinin her ikisini de verebildiği belirtilmiştir [17].



Şekil 2.4. Maleik anhidrit-stiren (MAST) kopolimerinin benzoik asitlerle esterleşme ve amidleşme tepkimesi.

2.2.4.4. Suda Çözünebilme, Hidroliz ve Biyolojik Aktivite

Maleik anhidrit kopolimerlerinin olası hidroliz mekanizması, biyolojik süreçlerde, karboksil asit ve türevlerinin sulu ortamlarda gösterdikleri davranışlar açısından oldukça önemlidir. Moleküler yapıda kuvvetli hidrojen-bağı yapabilen kısımların ve anhidrit birimlerinin tamamen hidrolizi, polimerin suda oldukça iyi çözünebilmesini sağlar. MA' in hidrolizinden elde edilen maleik asit kopolimerleri polianyonik polimerler olarak da bilinirler. Fonksiyonel özellikteki makro-molekülün yan zincirinde içerdiği sıralı hidrojen-bağı yapmış karboksil (-COOH) gruplarının miktarına bağlı olarak, bu polimerin gösterdiği antitümör etkinin de arttığı bilinmektedir [39].

Sentezlenen polimer-ilaç konjugatları için sıkça karşılaşılan en büyük problem sudaki çözünürlüktür. Çünkü hidrofobik (suyu sevmeyen, iten) özellikte olan polimerik makromolekülün modifikasyonu ile hidrofiliklik (suyu seven, çeken) artmaktadır. Polimerin mol kütlesi arttığında, genellikle çözünürlüğü azalmaktadır. Öte yandan polimer-ilaç konjugatlarının hidrofilik karakteri arttıkça buna bağlı olarak suda çözünürlüğü de artmaktadır [28]. Suda oldukça iyi çözünebilen polianyonik özellikli olan bu fonksiyonel türevler antibakteriyel, antitümör, antifungal ve antimikrobiyal etki gibi biyolojik ve fizyolojik aktiviteler göstermektedir [17].

2.2.4.5. Fizyolojik Sıvılarda Salım Davranışı

Kopolimer-ilaç çiftlerindeki ilaç etken maddelerinin salım davranışı üre, D-glikoz ve tuzlu su gibi fizyolojik sıvılarda ve sentetik ürede incelenmektedir. Bir başka fizyolojik sıvı olan ve çalışmalarda sıklıkla kullanılan PBS (Phosphate Buffered Saline) tampon çözeltisinde bulunan tuzlar, salım ortamındaki osmotik basıncı azaltır ve ilaç salımını kontrol ederler [18].

Canlı sistemlerde devam ettirilen çalışmalarda PBS'in kullanılmasının asıl amacı, içeriğindeki toplam iyon derişiminin ökaryotik bir hücre stoplazmasının toplam iyon derişimine eşit kabul edilmesidir (PBS=145mM). Bu dengenin sağlanması biyokimyasal reaksiyonlar için oldukça önemlidir. Bu çalışmada kullanılan PBS tampon çözeltisinin içeriği; 137 mM NaCl, 2 mM KCl ve 10 mM fosfat tamponu (pH=7,4 ± 0,1) şeklindedir. [18].

2.4. Polimerlerin Biyolojik Aktiviteleri

Polimerlerin yapısal karakterizasyonu yapıldıktan sonra, çeşitli biyolojik aktiviteleri de araştırılmaktadır [17].

2.4.1 Antimikrobiyal Maddeler

Bir antimikrobiyal maddede olması gereken başlıca özellik selektif toksisitedir. Selektif toksisite (seçici toksisite) kavramı ilk kez Paul Ehrlich tarafından ortaya atılmıştır. Kemoterapide kullanılan antimikrobiyal madde düşük konsantrasyonlarda bile etkili olmalı ya da çok az toksik olmalıdır. Böyle bir etkinin ortaya çıkabilmesi için; antimikrobiyal maddenin hedef olarak memeli hücrelerinden çok, mikroorganizma hücrelerini seçmesi gereklidir.

Bakteriler prokaryot hücrelerdir, memeli hücreleri ise ökaryottur. Prokaryot hücrede var olan, ancak ökaryot hücrede bulunmayan bir molekülü hedefleyen antimikrobiyal maddeler (örn; penisilinler, sefalosporinler, sülfonamidler) yüksek derecede seçici toksisiteye sahiptir. Oysa ökaryot hücre yapısı gösteren ve dolayısı ile yapısal olarak memeli hücrelerine benzeyen mantar ve protozoonlara etkili antimikrobiyal maddeler için seçici toksisiteden söz etmek hatalı olur. Virüslere etkili ilaçların seçici toksisitesinden de hiç söz edilemez. Virüsler konak hücreye entegre olduklarından, konağa zarar vermeden virüsü etkilemek olanaksızdır. Bu nedenle viral enfeksiyonların çoğunluğu antimikrobiyal maddelerle tedavi edilemez. Viral enfeksiyonlar vücudun doğal savunma mekanizmaları ile sonlandırılırlar [40].

Çok küçük konsantrasyonlarda bile patojen mikroorganizmalar üzerine zarar verici etkileri (parazitotrop etki) büyük, buna karşılık konak organizma üzerindeki etkileri (organotrop etki) çok küçük olan ya da hiç bulunmayan; tedavi amacı ile kullanılan kimyasal maddelere “kemoterapötikler” adı verilmektedir. Seçici toksik etki dediğimiz bu özellik kemoterapötiklerle antiseptik maddeler arasındaki başlıca ayrıcalıktır. Mikroorganizmalar soliter canlı hücrelerdir. Organizmanın yapısını da canlı hücreler oluşturur. Hücrelerin de mikroorganizmalar gibi seçici geçirgen zarları, benzer yapıda stoplazmaları ve metabolizmalarını sağlayan mikroplarınkine benzer enzimleri vardır. Bu durumda bir kemoterapötik maddenin patojen mikroorganizmayla, konak organizma arasında seçici toksik etki göstermesi zorluğu ortaya çıkar [41].

Kemoterapiyi diğer tedavilerden ayıran en önemli özelliklerden birisi, tedavide hastalığa yol açan etkenin yani mikroorganizmaların doğrudan yok edilmesinin hedeflenmesidir. Diğer birçok hastalığın etiolojisinde çok çeşitli faktörlerin rol oynaması nedeniyle, tedavide tek hedefe yönelik strateji geliştirme zorluğuna karşın enfeksiyon hastalıklarında, her ne kadar bireysel ve çevresel faktörlerin rolü olsa da esas olarak hastalığa yol açan mikroorganizmanın kemoterapötiklerle yok edilmesi büyük ölçüde başarı sağlamaktadır. Oldukça etkin olan bu tedavi yaklaşımı, bilinçsiz kullanım halinde direnç gelişmesi nedeniyle tedavide başarısızlığa neden olabilmektedir. Bu nedenle kemoterapötiklerin belirli kurallar dahilinde, bilinçli olarak kullanılması önem kazanmaktadır.

Kemoterapide ana ilke; konakçıda, hiç veya çok az toksik etki yapan bir kimyasal madde ile hastalık etkeni organizma üzerinde, yeteri kadar toksik veya letal etki oluşturmaktır. Kemoterapötik ilaçlar, vücutta kimyasal maddelerin seçici etkisi için tipik birer örnektirler. Bu seçici etki, patojen mikroorganizma hücresi ile insan veya genel olarak memeli hücresi arasında, yapı ve biyokimyasal mekanizmalar bakımından var olan farklar sayesinde mümkün olmaktadır. Seçicilik derecesi, çeşitli terapötik ilaç gruplarında değişiklik gösterir. Penisilinler en çok seçicilik gösteren ilaçlardır. Güçlü bakterisidal etki gösterdikleri halde, memeli hücresi üzerindeki yalın toksik etkileri çok zayıftır. Buna karşılık, stoplazma membranına veya çekirdekte DNA / m-RNA sentezine ya da m-RNA'nın ribozomlardaki çevirisine etki yapmak suretiyle antibakteriyal etki gösteren bazı kemoterapötik ilaçların seçiciliği düşüktür; genellikle bakteri yanında memeli hücresi üzerine de toksik etki yaparlar. Bu konuya penisilinlerin etki mekanizması örnek olarak verilebilir.

Bakterilerde; memeli hücrelerinde de bulunan lipit tabiatındaki hücre stoplazma membranına ilave olarak, bir de onun dış tarafında hücre duvarı denilen daha sağlam bir tabaka vardır. Bu duvar sayesinde bakteri sitoplazmasının osmotik basıncı, ortaminkine göre çok yüksek değere ulaştığı zaman bile, tümlüğünü ve şeklini koruyabilir. Penisilinler, hücre duvarının esasını oluşturan uzun polimer molekül zincirlerinin yan dallarla birbirine kenetlenmelerini engeller; böylece hücre duvarının oluşması önlenmiş olur ve sonuçta bakterinin ölümüne yol açar. Memeli hücresinde böyle bir yapı bulunmadığından onun üzerine penisilinlerin belirgin bir toksik etkisi yoktur [41].

Antimikrobiyal tedavinin temelinde yatan en önemli kavram seçici toksisite, yani konağı harap etmeden mikroorganizmaların inhibe edilmesidir. Seçici toksisite mikroorganizmalar ile insan hücreleri arasında yapı ve metabolizma farklarının ortaya çıkarılması ile elde edilir. Örneğin penisilinler ve sefalosporinler peptidoglikan sentezini önlemeleri nedeniyle bakteri üremesini inhibe edip, insan hücrelerinin üremesini etkilemediklerinden etkin antibakteriyal ajanlardır [42].

Kemoterapötiklerin etki mekanizmalarını Çizelge 1.2.'de görüleceği üzere beş grupta toplayabiliriz.

Çizelge 2.1. Kemoterapötiklerin etki mekanizmalarına göre gruplandırılması ve bazı örnekler [43].

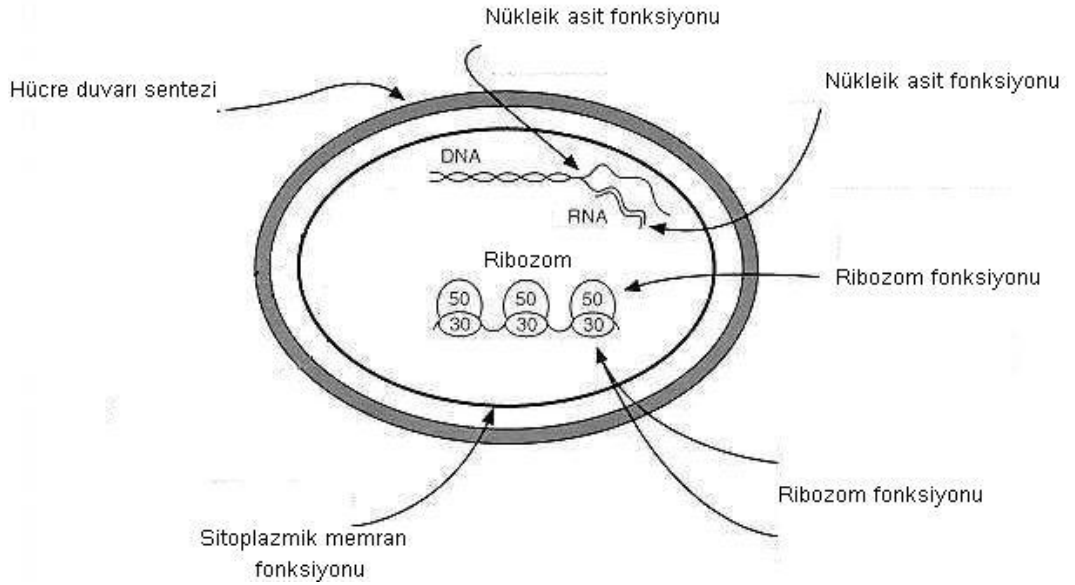
<i>Etki Mekanizması</i>	<i>İlaçlar</i>
<p>Hücre Duvar Sentezinin İnhibisyonu</p> <p>Peptidoglikanın çapraz bağlanmasının (transpeptidasyon) inhibisyonu</p> <p>Diğer peptidoglikan sentezbasamakları inhibisyonu</p>	<p>Penisilinler, Sefalosporinler, İmipenem, Aztreonam,</p> <p>Vankomisin, Basitrasin, Sikloserin</p>
<p>Protein Sentezinin İnhibisyonu</p> <p>50S ribozomal altbirim üzerine etki</p> <p>30S ribozomal altbirim üzerine etki</p>	<p>Kloramfenikol, Eritromisin, Klindamisin</p> <p>Tetrasiklinler ve Aminoglikozidler</p>
<p>Nükleik Asit Sentezinin İnhibisyonu</p> <p>Nükleotid sentezinin inhibisyonu</p> <p>DNA sentezinin inhibisyonu</p> <p>mRNA sentezinin inhibisyonu</p>	<p>Sülfonamidler, Trimethoprim</p> <p>Kinolonlar</p> <p>Rifampin</p>
<p>Hücre Zar İşlevinin Değiştirilmesi</p> <p>Antibakteriyal aktivite</p> <p>Antifungal aktivite</p>	<p>Polimiksin ve Gramisidin</p> <p>Amfoterisin B, Nistatin, Ketokonazol, Flukonazol ve diğer triazololler</p>

2.4.2 Antimikrobiyal Maddelerin Sınıflandırılması

Antimikrobiyal maddelerin sınıflandırılmasında, genellikle onların hücrede aktivite gösterdikleri bölge esas alınır. Böyle bir sınıflandırma hangi antimikrobiyal maddenin hangi mantar ve bakteri türüne etkili olabileceği hakkında kesin bir bilgi sağlayamaz. Ancak antimikrobiyal aktivitenin moleküler temelini daha iyi anlaşılmasına yardımcı olur. Bakteriler enfeksiyon odağında ve insan vücudu yüzeyinde yeterli sayıya ulaşabilmek için devamlı olarak büyüyüp bölünerek çoğalırlar. Büyümeleri ve bölünmeleri için birçok biyomolekülü sentez etmeleri gerekir. Antimikrobiyal maddeler, bakterilerin büyüme ve bölünme aşamasında özel hedefler üzerinde etkili olurlar [40].

Etkili oldukları yerlere göre,

1. Hücre duvarı sentezini inhibe edenler,
2. Stoplazmik membranı inhibe edenler,
3. Nükleik asit sentez ve fonksiyonlarını inhibe edenler,
4. Ribozom fonksiyonunu inhibe edenler, olmak üzere dört grupta incelenir.



Şekil 2.5. Antimikrobiyal maddelerin etkili oldukları yere göre sınıflandırılması [40].

1) Hücre Duvarı Sentezini İnhibe Edenler : Duvar antibiyotiklerinin etkili oldukları bölge peptidoglikan bölgesidir. Bu tabaka bakterilerin yaşamı için gerekli olup, bu tabakanın kaybı veya hasarı durumunda bakteri duvar rijiditesi bozulur ve bakteri ölür. Peptidoglikan sentezi üç evrede gerçekleşir. İlk evrede stoplazmada düşük molekül ağırlıklı moleküllerin sentezi olur. Birçok antimikrobiyal madde hücre duvarı sentezini bu erken safhada etkiler. İkinci evre, membrana bağlı enzimler tarafından kataliz edilir. Önceden üretilen düşük molekül ağırlıklı maddelerin stoplazmik membranda bir lipit taşıyıcıya transferi sağlanır. Bu lipit taşıyıcı alt birimlerin membrandan dış yüzeye geçişini sağlar. Bazı antimikrobiyal maddeler bu taşıyıcı molekülü etkileyerek düşük molekül ağırlıklı moleküllerin geçişine engel olurlar. Hücre duvarı sentezinde üçüncü evre, alt birim polimerizasyonu ve yeni oluşan peptidoglikanların hücre duvarına transpeptidasyon reaksiyonu ile yapışma olayıdır. Bu son evre bazı antimikrobiyal maddeler tarafından inhibe edilir [40].

2) Sitoplazmik Membranı İnhibe Edenler : Stoplazmik membran su, iyon ve besleyicilerin difüzyonu için bir bariyer olup geçiş sistemi gibi görev yapar. Bazı antimikrobiyal maddeler membran organizasyonunu bozarak etkili olurlar. Membran permeabilitesini bozarak nükleik asitlerin ve katyonların hücre dışına çıkmasına ve hücre ölümüne neden olurlar [40].

3) Nükleik Asit Sentez ve Fonksiyonlarını İnhibe Edenler : Bakterilerde nükleik asit fonksiyonu üç şekilde bozulabilir.

1. DNA'nın çift sarmal yapısının bozulması
2. DNA replikasyonunda rol alan DNA polimerase ve transkripsiyonda rol alan RNA polimerase enzimlerinin görevlerinde bozukluklar oluşması
3. Nükleik asit yerine girmeleri sonucunda DNA yapısında ve fonksiyonlarında bozukluklar oluşması [40].

4) Ribozom Fonksiyonunu İnhibe Edenler : Bakteriyal ribozomlar 50S ve 30S alt birimlerini taşırlar. Birçok antimikrobiyal madde ribozomun bir veya iki alt birimini etkileyerek bozabilir [40].

2.4.3. Kullanılan Mikroorganizmalar ve Özellikleri

Biyolojik aktivite testlerinde kullanılan mikroorganizmalar Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi)' ndan temin edilmiştir.

Çizelge 2.2. Antimikrobiyal aktivite deneylerinde kullanılan mikroorganizmalar ve kaynakları

	Mikroorganizma	Suş Numarası
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
2	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
4	<i>Meticillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>	ATCC 43300
5	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
6	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231

Staphylococcus aureus: *Staphylococcus aureus* mikroskopik olarak incelendiğinde çift, kısa zincirli ve üzüm gibi salkım halinde gözlenen gram-pozitif bir bakteridir. Sporsuz, hareketsiz ve kapsülsüzdür. Optimal olarak 37° C'de ve pH 7.4'de ürerler. *Staphylococcus aureus*'un neden olduğu hastalıklar; abseler, kan çıbanı (carbuncle), blefarit (göz kapağı iltihabı), hordeolum (arpacık), farenjit, menenjit, sinüzit, ve besin zehirlenmesidir. Tedavisinde yüksek dozda penisilinler ve ofloksazin kullanılmaktadır [44].

Escherichia coli: *Escherichia coli*, çomak şeklinde, 1-2 µm uzunluğunda ve 0,1-0,5 µm çapında olan gram negatif bir bakteridir. Sporsuz, hareketli ve aerobik bir bakteridir. *Escherichia coli* normal bağırsak florasında bulunur ve burada diğer flora bakterileri ve organizma ile bir denge halinde kaldığı sürece hastalık yapmaz. Bu denge bozulduğu anda ortaya çıkabilecek enfeksiyonlar; sistit, piyelit, pyelonefrit, apandisit, peritonit, septisemi, endokardit, yaşlılarda ve çocuklarda epidemik diyaredir. *Escherichia coli* basilinin oluşturduğu hastalıklarda Ampisilin, Kloramfenikol, Tetrasiklinler, Polimiksinler, Sülfonamidler, Aminoglikozitler ve Ofloksazinlerden yararlanılmaktadır [44].

Pseudomonas aeruginosa: *Enterobacteriaceae* familyasından olan *Pseudomonas aeruginosa*; aerob, hareketli, sporsuz, kapsülsüz çomakçılardır (Resim 3.7) [30]. Gram-negatif olan bu bakteriler, besiyerlerinde kolaylıkla optimal 30-37° C’de ve hafif alkali ortamda kolayca ürerler. Isıya dayanıksızdırlar. Doğada yaygın olarak sulara, toprakta, insan ve memeli hayvanların bağırsağında bulunabilen *Pseudomonas aeruginosa*’nın neden olduğu hastalıklar; sepsis, sistit, piyelit, pyelonefrit, menejit, konjunktivit, keratit, blefarit, panoftalmi, bronisit, bronkopnömoni, asteomiyelit, psedomembranoz kolittir. Tedavide en çok Gentamicin (özellikle idrar yolları enfeksiyonları), Karbenisilin, Azlosilin, Mezlosilin, Imipenem, Tikarsilin, Piperasilin, Tobramisin ve Polimiksin’dir [44].

Meticillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA): *Staphylococcus aureus*, normal insan florasında yer alan gram pozitif bir bakteridir. MRSA ise adından da kolayca anlaşılacağı gibi *Staphylococcus aureus*’un bir suşudur. Metisilin; stafilokoklara etkili, ancak ısı ve benzeri fiziksel etkenlere oldukça duyarlı bir antibiyotiktir. Örneğin antibiyotik duyarlılık testi sırasında test ortamında 2 °C’lik bir ısı değişimi olması, test sonuçlarının yanlış değerlendirilmesine (duyarlı ↔ dirençli gibi) sebep olabilmektedir. Bu nedenle, mikrobiyoloji laboratuvarlarında metisilin yerine, aynı amacı karşılayan daha stabil bir antibiyotik olan Oksasilin kullanılmaktadır. Uygun laboratuvar koşullarında test edildiğinde oksasilin direnci; bir *Staphylococcus aureus* suşunun metisilin dirençli (MRSA) olduğunu gösterir [44].

Enterococcus faecalis: Kok şeklinde, katalaz negatif, gram pozitif tekli, ikili ya da kısa zincirli hareketsiz, fakültatif anaerob bir bakteridir. En iyi ürediği ısı 35° C’dir. Doğada yaygın olarak bulunur. Bazı yapısal karakterleri sayesinde zorlu çevre koşullarında üreyebilirler. Gastrintestinal sistemin doğal flora üyelerinden biridir. Hastane enfeksiyonlarında sıklıkla izole edilir. Yaşlılarda, altta yatan hastalığı olanlarda ve bağışık yetmezliği olan hastalarda enfeksiyonlara neden olurlar. Son yıllarda vankomisine dirençli çok sayıda suş bildirilmiştir. Buna rağmen tedavide halen en çok kullanılan antibiyotik vankomisindir [44].

Candida albicans: *C. albicans*, bir maya mantarı türüdür. Bağışıklığı baskılanmış hastalarda (AIDS, kanser kemoterapisi, organ ve kemik iliği transferi durumlarında) sistematik ve fırsatçı mantar enfeksiyonlarının başlıca nedenleri arasındadır. *Candida albicans* insan ağızı ve sindirim sistemi içinde yaşayan pek çok canlı organizmadan biridir. Bağışıklık sistemi zayıflarsa veya mantarların çoğalmasını sağlayan şartlar oluşursa *C.albicans* istilacı, küf gibi ipliksi biçimine dönüşür. Tedavide en çok Amfoterisin B, Ketokonazol ve Flukonazol kullanılmaktadır [44].

2.4.4. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Antibiyotik duyarlılık deneyini uygulamak için ilk yöntem Fleming tarafından 1929 yılında geliştirilmiştir. Bu yöntemde Fleming, bir petri kutusunda katı besiyerini, ortadan kenara çok daha yakın bir yerden, dik olarak kesmiş ve bir şerit halinde dışarı almıştır. Açılan bu boşluğa küf özütü (Penisilin gibi) içeren besiyerini yerleştirmiş, daha sonra bu boşluğa dik bir açıda paralel olarak değişik bakteri kültürlerini (*Staphylococcus*, *E. coli*, *Streptococcus*, *Pneumococcus* ve başkaları gibi) yayma yöntemiyle ekmiştir. İnokulasyondan sonra kültürlerin üreme ve inhibisyon zonlarını gözleyerek kültürlerin duyarlılığını değerlendirmiştir [45].

İkinci Dünya Savaşı sırasında birçok değişik antibiyotik bulunmuş ve değişik mikroorganizmalara karşı duyarlılık modelleri saptanmıştır; yeni antibiyotikler medikal uygulamada “olağan üstü” ilaçlar olarak kabul edilmiştir. Ancak dirençli bakteriyel suşların ortaya çıkmasıyla yeni önlemlere gerek duyulmuş ve bakterilerin *in-vitro* kemoterapötik maddelere karşı olan dirençlerini tayin için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. 1940’lı yıllarda birçok antibiyotığın ortaya çıkmasıyla; tüp dilüsyon yöntemleri yetersiz kalmış ve uygulamada pratik bulunmamıştır [45].

Foster ve Woodruff, duyarlılık testlerinin uygulamasında ilk kez antibiyotik emdirilmiş süzgeç kâğıtlarının kullanılmasını önermişlerdir. Araştırmacılar, duyarlılığı test edilecek organizma ile önceden inokule edilen petri kutusundaki besiyeri üzerine bir antibiyotik emdirilmiş şeridi yerleştirerek duyarlılık testini yapmışlardır. Vincent, antibiyotik solüsyonun kâğıt disklerde kurutulduktan sonra kullanılabileceğini ve böylece taze stok solüsyonlara her zaman gereksinme duyulmayacağını göstermiştir. 1960’lı yıllara dek mikroorganizmaların ilaç

duyarlılık, özellikle de antibiyotik duyarlılık testleri için birçok yöntem (difüzyon ve titrasyon yöntemleri) veya bu yöntemlerin değişik birçok modifikasyonu bildirilmiştir. Her yöntemin bazı avantajları ve kullanım sınırlılığı gibi dezavantajları vardır. Sonuçların en yüksek düzeyde verimlilikle yorumlanabilmesi için yöntemin tüm özelliklerinin iyi kavranılması ve yöntemlerin sürekli yenilenebilir sonuçlar vermesi gereği göz önünde tutulduğunda, bir standardizasyonun saptanmasına gerek duyulmuştur. İlk kez 1970'li yıllarda Dünya Sağlık Örgütü (WHO) önderliğinde, Anderson ve Bauer-Kirby'nin yöntemlerindeki standart aşamalar dikkate alınmak suretiyle, Uluslararası İşbirliği Çalışma Kurulunca bir standardizasyona gidilmiştir [45,46].

Günümüzde kullanılan antibiyotik duyarlılık testleri;

- Difüzyon Yöntemleri
- Kirby-Bauer Yöntemi
- Epsilometer Testi
- Titrasyon Yöntemleri
- Agar Dilüsyon Testi
- Makrodilüsyon Broth Testi
- Mikrodilüsyon Broth Testi

Enfeksiyonların çoğunda tedavi yönünden erken sonuç almak amacıyla yapılan duyarlılık testi olan agar disk difüzyon yöntemi; yeterli, yol gösterici bir tekniktir. Ancak toksik olabilecek bir antibiyotik ile uzun süre tedavi edilen bir hasta için çok daha doğru ve güvenilir bir saptamaya gerek duyulabilir. MİK (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) değerlerini tayin etmek için birçok yöntem bildirilmiştir. Agar difüzyonla inhibisyon bölgeleri ölçülebilir ya da antibiyotik dilüsyonları içeren sıvı veya katı besiyerlerinde test organizması titre edilir [45].

Çalışmamızda; kolay ve pratik oluşunun yanı sıra sonuçlarının daha doğru, güvenilir ve hassas olması gibi özellikleri nedeniyle Disk Difüzyon yöntemi uygulanmıştır.

2.4.4.1. Disk Difüzyon Yöntemi

Rutin laboratuvarlarda antibiyotik duyarlılığının saptanmasında en sık olarak kullanılan yöntem disk difüzyon testleridir. Ucuz ve uygulaması basit olan bu yöntem Kirby-Bauer tarafından geliştirilmiştir ve bu isimlerle de anılmaktadır. Bu test, kağıt disklere emdirilen antibiyotiğin, duyarlılığı araştırılan organizmanın inoküle edildiği besiyerine difüze olması temeline dayanmaktadır. Bu amaçla; belli miktarlarda antimikrobiyal emdirilmiş kağıt diskler, test edilecek olan mikroorganizmaların yoğun bir şekilde inoküle edildiği katı besiyerlerine yerleştirilir. Diskler bir süre sonra çözünüp agara doğru difüze olurken, inoküle edilen mikroorganizma da çoğalmaya başlar. Belirli bir inkübasyon süresinden sonra ilacın inhibitör konsantrasyonlarının sağlandığı diskin çevresinde üreme görülmez. Mikroorganizma ilaca ne kadar duyarlı ise, diskin etrafında oluşan inhibisyon zonu o kadar geniş olacaktır. İnhibisyon zonunun çapı mm şeklinde ölçülerek, standart zon tablolarına göre değerlendirmeler yapılır ve mikroorganizmanın kullanılan antimikrobik ajanlara karşı duyarlılık durumu belirlenir.

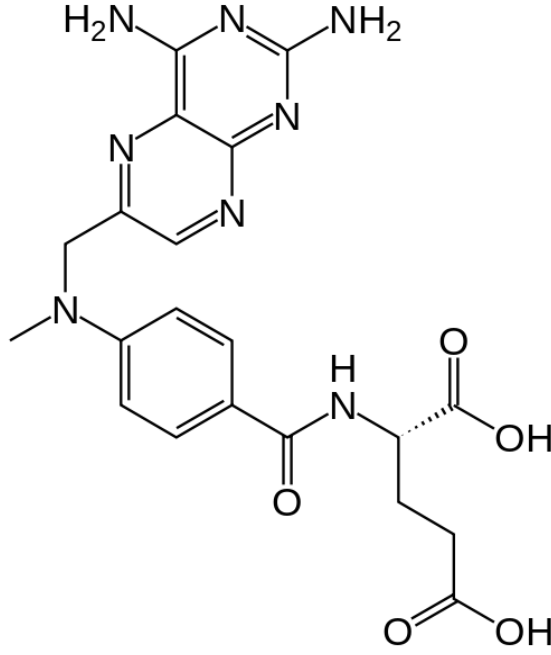
Bu yöntemde, incelenecek olan mikroorganizma trypticase soy buyyonda 2 saat süreyle 37°C'de inkübe edilir. Bulanıklık oluştuktan sonra McFarland 0.5 (10^8 mikroorganizma / ml)'e göre ayarlanarak standart bir bulanıklık oluşturulur (McFarland standartları, bir sıvı besiyerinde bulunan bakteri sayısını belirlemek amacıyla geliştirilmiştir. McFarland'ın baryum klorür ve sülfirik asit kullanarak geliştirdiği standart bulanıklık tüpleri, sıvı bir besiyerine ekilen bakterinin miktarına eşdeğer bulanıklık derecelerini içerir). Bu süspansiyondan steril bir eküvyon yardımıyla alınan örnek Mueller-Hinton agar yüzeyine inoküle edilir. Takiben antimikrobiyal olduğu düşünülen maddeler ile antibiyotikleri içeren diskler steril bir pens yardımıyla agar yüzeyine yerleştirilir. Bu işlem yapılırken, oluşacak zonların birbiri üzerine gelmemesi için diskler arasında 22 mm, petri kenarından ise 14 mm uzaklık olmasına dikkat edilmelidir. Daha sonra besiyerleri 18-24 saat süreyle 35°C'de inkübe edilir ve oluşan inhibisyon zonları ölçülür [47,48].

2.5. Antineoplastik İlaç Etken Maddeleri

2.5.1. Metotreksat (Ametopterin / Methotrexate / MTX)

Ametopiterin, diğer adıyla Metotreksat (MTX); kanser tedavisi amacıyla, tek başına ya da diğer ajanlarla birlikte kullanılabilen, immün baskılayıcı özellikte, antimetabolit grubunda yer alan antineoplastik bir ilaçtır. İlk olarak 1948 yılında çocuklarda akut lösemi tedavisinde kullanılmıştır [49]. Özellikle meme, boyun, mide, özofagus, akciğer, lenf ve mesane kanserlerinin tedavisinde etkilidir. Aynı zamanda MTX'in düşük doz uygulamaları, psoriasis ve romatoid artrit gibi otoimmün hastalıkların bazılarında tedavi amacıyla kullanılmaktadır [50]. Antimetabolit ve antifolat ilaç özelliği taşıyan MTX ilaç etken maddesi, Ametopiterin hidroklorür formunda bulunur. Bu ilaç kemoterapide tek başına kullanıldığı gibi diğer ilaçlarla kombine olarak da kullanılmaktadır. Lösemi, lenfoma, osteosarkom, mesane, akciğer gibi birçok kanser türünde tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Kapalı kimyasal formülü $C_{20}H_{22}N_8O_5$ olup molekül kütlesi ise $454.44 \text{ g mol}^{-1}$ dir. Sarı renkli olan etken madde; suda çözünmezken, NaOH (minimum miktarda 0.1 N NaOH'te çözünmeli ve ardından nötral tampon ya da salin çözeltisinde dilüe edilmelidir) çözeltisinde çözünebilmektedir. Uygun saklama koşulları bu maddenin yapısının bozulmaması açısından çok önemlidir. Bu nedenle madde, özel olarak $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ sıcaklıkta ve ağız sıkıca kapalı hava geçirilmeyen kaplarda saklanmalıdır [51].

MTX, dihidrofolate redüktaz enzimini etkileyen bir folik asit analogudur. Kısaca; dihidrofolate'in tetrahidrofolate'e dönüşümünü bloke ederek DNA ve RNA komponentleri sentezinin bozulmasına yol açar [52,53]. Ayrıca timidilat sentilaz enzimini inhibe ederek, deoksitimidilat üretilmesini önler. İlaç nedeniyle oluşan DNA sentezinin inhibisyonu ve proliferasyon, normal hücreleri de etkileyerek akut gastrointestinal toksisite gibi yan etkilere neden olur [54]. MTX oral olarak kullanıldığında ise, yarılanma ömrünün kısa olması nedeniyle diyare ve ülseratif stomatitise neden olabilir. Bu tip istenmeyen yan etkilerin önlenmesi ve/veya azaltılması amacıyla ilaca taşıyıcı moleküller bağlanmaktadır [55,56].



Şekil 2.6. MTX'in kimyasal yapısı [57].

2.5.2. Gempitabin (Gemcitabine)

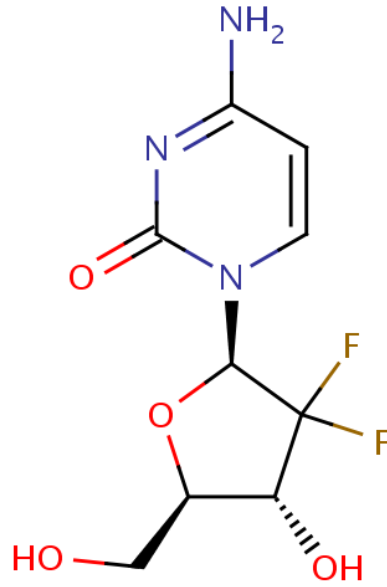
Gempitabin (2,2-difluorodeoksisitidin, GemzarR) deoksisitidin analogu nukleozid yapıda bir antimetabolittir. GemzarR ismiyle piyasaya sürülmüştür ve 200 mg gempitabine eşdeğer gempitabin hidroklorür içerir. Gempitabin Hidroklorür formunda bulunan ilaç, kemoterapide kullanılan bir nukleozid analogudur. Bu ilaç aynı zamanda pankreas, meme, akciğer ve mesane kanseri gibi birçok kanser türünde de kullanılmaktadır. Kapalı kimyasal formülü $C_9H_{11}F_2N_3O_4$ olup molekül kütlesi ise $263.198 \text{ g mol}^{-1}$ ' dir. Uygun saklama koşulları bu maddenin yapısının bozulmaması açısından çok önemlidir. Bu nedenle, 30°C ' nin altındaki oda sıcaklığında ve sıkıca kapalı, hava geçirmeyen kaplarda nemden ve ışıktan koruyarak saklanmalıdır.

Nukleozid analogları örneğin arabinozil sitozin akut myeloid lösemisinin indüksiyon tedavisinde ana elemanı temsil eder ve gempitabin de arabinozil sitozinde (Ara-C) yapılmış bir moleküler modifikasyonla solid tümörlerde de aktif hale geçirilmiş, yeni bir antineoplastik ajandır.

Gempitabin (dFdC: 2,2-difluorodeoksisitidin) deoksisitidin analogu pirimidin antimetabolitidir. Gempitabin, hücre içerisinde nukleozid kinazlar tarafından, aktif difosfat (dFdCDP: 2,2-difluorodeoksisitidin di fosfat) ve trifosfat

(dFdCTP: 2,2- difluorodeoksisitidin trifosfat) nükleozidlere metabolize olur. Gemcitabin sitotoksik etkisini, dFdCDP'nin iki etkisiyle DNA sentezini inhibe ederek gösterir. Önce dFdCDP'nin, DNA sentezinde kullanılan deoksinükleozid trifosfatların oluşmasıyla sonuçlanan reaksiyonlardan tek katalizör olarak sorumlu bulunan *ribonükleotid 6 redüktaz*'ı inhibe eder. Bu enzimin dFdCDP tarafından inhibisyonu, genelde deoksinükleozid ve özellikle de dCTP konsantrasyonlarının azalmasına neden olur [58].

Gemcitabin DNA yapısına direkt olarak da konjuge olur. Hücre içerisindeki dCTP konsantrasyonunun azalması, dFdCTP'nin DNA yapısına daha da fazla girmesine neden olur. DNA polimeraz epsilon temelde, gemcitabini uzaklaştırabilme ve uzamakta olan DNA bantlarını onarabilme yeteneğine sahip değildir. Gemcitabin DNA yapısına girdikten sonra, büyümekte olan DNA bantlarına sadece tek bir nükleotid eklenir. Bu eklenmeyle DNA sentezinin daha fazla ilerlemesi tamamen durdurulur (maskeli zincir terminasyonu). Ardından gemcitabin, DNA'nın yapısına girdikten sonra apoptoz olarak bilinen programlanmış hücre ölümü sürecini başlatır [59].

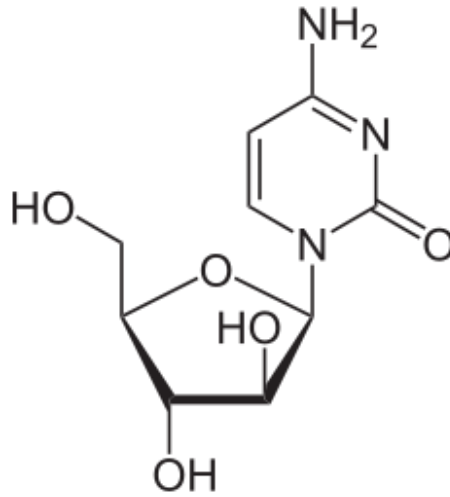


Şekil 2.7. Gemcitabin'in kimyasal yapısı [60].

2.5.4. Siterabin (Cyterabine / Sitozin β -D-Arabinofuranosid Hidroklorür)

Siterabin molekülü, sitozin β -D-arabinofuranosid hidroklorür kristali olarak da bilinir. Bu ilaç lösemnin tedavisinde oldukça etkili bir antimetabolittir. Antitümör etkili siterabin, akut non-lenfoblastik/lenfoblastik lösemi, kronik miyelositik lösemide, blast krizi, menengial lösemnin tedavisi ile profilaksisi ve difüz histiositik lenfomalarda etkilidir. Bu molekül, kokusuz beyaza yakın renkte olup kristal bir tozdur. Suda oldukça serbestçe çözünür; alkolde hafifçe veya çok az çözünür; kloroformda ise çok az çözünür. Kapalı kimyasal formülü $C_9H_{13}N_3O_5$ olup molekül kütlesi ise $243,2 \text{ g mol}^{-1}$ dir.

Uygun saklama koşulları maddenin sağlıklı bir şekilde saklanması açısından oldukça önemlidir. Siterabin $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ' nin altındaki oda sıcaklığında ve ağzı sıkıca kapalı olarak saklanmalıdır. Ayrıca ışıktan da korunmalıdır [58].



Şekil 2.8. Siterabin molekülünün kimyasal yapısı [58].

2.6. Hücre Kültürü

Hücre kültürü; hücrelerin bir doku veya organdan izole edilerek *in vitro* koşullarda üretilmesi ve bu üretilen hücrelerin devamlılığının sağlanmasıdır. Ökaryot veya prokaryot hücreler *in vitro* olarak geliştirilebilir ve çoğaltılabilirler. Günümüzde hücre kültürleri üzerinde yapılan araştırmalar, konu ile ilgili çalışmalar arasında önemli bir yer tutmaktadır. Kanseri türleri gibi çeşitli patolojik durumlarda bir maddenin etkileri ve işlevlerini belirlemek amacıyla, *in vitro* hücre kültürü üzerinde araştırmalar yapılarak *in vivo* ortamda uygulanabilecek sonuçlara ulaşılabilir. Hücreler çoğaltılarak fazla miktarda elde edilebilir, karakterizasyonu yapılabilir, uygun besiyerinde üretilerek fiziksel ayırım yapılabilir ve belirli bir hücre grubu dondurularak saklanabilir.

Hücre kültürü çalışmalarının geçmişi yüz yılı aşkın bir süreyi kapsamaktadır. İlk olarak 1885'te Roux, embriyonik tavuk hücrelerinin vücut dışında tuz çözeltisi içerisinde canlılıklarını sürdürebildiklerini göstermiştir. Carrel 1913'te, hücrelerin aseptik koşullarda düzenli olarak beslenmeleri halinde kültür ortamında uzun süreler boyunca çoğalabildiklerini göstermiştir. 1952'de Gey ve arkadaşları bir insan servikal karsinomasından türeyen hücrelerin devamlı serilerini elde etmişlerdir. Dünya genelinde süregelen çalışmaların devamında 1986'da Martin, Evans ve arkadaşları, fareden pluripotent embriyonik kök hücrelerini izole ederek kültürünü yapmışlar ve 1998'de Thomson, Gearhart ve arkadaşları insan embriyonik kök hücrelerini izole etmeyi başarmışlardır [61].

2.6.1 Hücre Kültür Modelleri

Hücre kültürleri genel olarak primer, diploid ve devamlı hücre kültürleri şeklinde sınıflandırılırlar.

Primer hücre kültürleri; organizmadan alınan organ ve dokulardan mekanik, enzimatik veya primer eksplant yöntemleri ile hazırlanarak ilk üretilen hücre kültürüdür. İçerisinde besiyeri bulunan kültür kaplarında yüzeye yapışan canlı hücreler büyür ve çoğalmaya başlar. Hücreler çoğalarak buldukları yüzeyi kaplar ve birbirlerine dokunduklarında kontak inhibisyon ile çoğalmalarını durdurur. Böylece tek tabakalı hücre kültürü elde edilir. Bu hücre kültürlerine örnek olarak EMF (Embriyonik Mouse Fibroblast) hücre kültürü, Tavşan ve maymun böbrek hücresi, primer aortik, göbek kordonu endotel hücreleri, primer hepatosit ve primer düz kas hücreleri verilebilir [62,63,64].

Diploid (Sekonder) hücre kültürleri; primer hücre kültürlerinin subkültürü ile elde edilir. Histolojik olarak tek bir hücre tipinden oluşur ve az sayıda pasajı yapılabilir. Sonrasında bölünme yeteneklerini kaybederler. Diploid hücre kültüründeki hücrelerin yaklaşık %75'i orijinal olarak elde edilen normal hücre türü ile aynı karyotipe sahiptir. MRC-5 fetal akciğer fibroblast ve WI-38 insan akciğer fibroblast kültürleri diploid hücre kültürlerine örnek verilebilir [62].

Devamlı hücre kültürleri; kanser hücreleri gibi anormal ya da transformasyona uğramış ve sınırsız çoğalabilen hücre serileridir. Bunlar *in vitro* olarak, hücrenin spontan veya kimyasal ajanlarla transformasyonu sonucu veya tümörden izole edilmiş hücrelerden yapılırlar. Bir hücre kültürünün devamlı sayılabilmesi için en az 50 subkültürünün yapılmış olması gerekir. Genellikle bu hücreler *in vitro* kültür boyunca geçirdikleri mutasyonlar nedeni ile morfolojik ve biyokimyasal özellikleri bakımından orijinal hücrelerden farklılık gösterir. Ayrıca çoğunlukla kromozom sayıları bakımından aneuploidlerdir [62,64,65].

Çoğu omurgalı hücreler, kültürde sınırlı sayıda bölündükten sonra hücre ölümü denilen bir sürece girerek bölünmeyi durdururlar. Örneğin, insan fibroblastları kültürde sadece 25–40 kez kadar bölünürler. Bu olay telomerlerin kısalmasına bağlıdır. İnsan somatik hücreleri, telomeraz enziminin yapımını durdurdukları için telomerler kıalmakta ve hücrelerin yaşamı da sınırlı olmaktadır. Bu hücrelere, telomeraz enziminin katalitik alt birimini kodlayan bir genin katılması ile hücrelerin sonsuz çoğalmaları sağlanabilir ve böylece ölümsüz hücre serileri olarak kullanılabilirler.

Bununla birlikte, bazı insan hücreleri bu işlem gerçekleşse de ölümsüzlük özelliklerini kazanamazlar. Telomerlerinin uzun olarak kalmasına karşın yine de kültürde bölünmelerini durdururlar. Çünkü kültür ortamının koşulları hücre döngüsünün kontrol noktasını uyarmakta ve böylece de hücre döngüsü durmaktadır. Bu kontrol mekanizmasının inaktive edilmesi için tümör yapıcı virüslerden türetilen kanser başlatıcı onkogenler kullanılmaktadır.

Kanser hücrelerinden izole edilen veya tümör indükleyici bir virüs ya da kimyasal madde kullanılarak normal hücrelerin transformasyonu ile elde edilen hücre serileri normal hücrelerden farklı özellikler taşırlar. Örneğin, kanser hücre serileri bir yüzeye tutunmadan çoğalabilir ve kültür kabında çok yüksek bir yoğunluğa ulaşabilir [66].

2.6.2. Hücre Kültür Çalışmalarının Uygulama Alanları

Hücre kültürü teknolojileri, tıp ve endüstride birçok alanda uygulanabilmektedir [67]. Klinik çalışmalarda, hayvan deneyleri ile birlikte yapılan ön çalışmalar ve sitotoksikolojik testler önemli bir kısmı oluşturmaktadır [68]. Virolojide aşı üretimi, hücre virüs etkileşimlerinin incelenmesi, tanı ve tedavinin geliştirilmesinde; moleküler biyoloji ve genetikte gen ekspresyonu, gen haritalanması, gen fonksiyonları ve kanser araştırmalarında hücre kültüründen yararlanılmaktadır [69].

2.6.3. Hücre Kültürleri Üzerinde Toksikite Araştırmaları

Hücre kültürü çalışmaları günümüzde çok yaygın kullanım alanları bulmaktadır. Bunlardan bazıları şöyle sıralanabilir;

- Kanser araştırmalarında (in vitro toksikoloji)
- Sitogenetik, biyokimyasal, moleküler biyolojik çalışmalarda,
- Çeşitli hastalıkların tanı ve araştırılmasında,
- Doku ve deri mühendisliğinde,
- Aşı üretimi, kök hücre çalışmalarında,
- Tüp bebek ve kısırlık tedavilerinde,
- Farmasötik proteinlerin üretiminde,
- Hormon üretiminde,
- Bitki ve hayvan ıslahı ve geliştirilmesi çalışmalarında [70].

Hücre kültürlerinin toksisite araştırmalarında çeşitli avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır.

Hücre kültürlerinde toksisite araştırmalarının avantajları;

- π Tür farklılığını ortadan kaldırır,
- π Kimyasal maddelerin muhtemel toksik etki yapacağı düşünülen deri, karaciğer gibi spesifik doku hücreleri üzerinde araştırma yapılmasını sağlar,
- π Toksikite mekanizmalarının hücreler üzerinde aydınlatılmasına imkân verir,
- π Deneyde kullanılan hayvanların acı çekmesi veya ölmesi söz konusu değildir.

Hücre kültürlerinin toksisite araştırmalarındaki dezavantajları:

- π Tekli sistemdir. Multifaktöriyel ilaç metabolizması için uygun değildir,
- π Teknolojik alt yapı, maliyet ve deneyim gerektirir,
- π *In vitro* ortamda hücrelerin yaşam siklusu kısadır,
- π Enzim stabilitesi kısıtlıdır,
- π Kültür ortamının penetrasyon kabiliyeti kısıtlıdır,
- π Ko-faktörlere gereksinim duyar.

Günümüzde 2300'den fazla insan ve hayvan hücre kültür modeli mevcuttur. Hücre kültürleri ticari olarak firmalardan sağlanabileceği gibi, araştırmacıların kendi özel hücre kültürlerini gönüllülerden veya cerrahi operasyonlardan çıkacak doku örneklerinden yararlanarak oluştırmaları da mümkündür [71].

2.6.4. MCF-7 Hücre Serisi

MCF-7 meme kanseri hücre serisi olup 5 yıllık bir sürede iki göğsü alınan 69 yaşında Kafkasyalı bir kadından izole edilmiştir. İlk alınan göğsün dokusu iyi huylu olup ikinci göğüsten alınan malign adenokarsinomadır. 3 yıllık bir periyotta radyoterapi ve hormon tedavisi uygulanmıştır. Göğüs duvarından nodüllerin kaldırılmasından sonra plevral sızıntı tespit edilmiştir. MCF-7 hücre serisi 1970'de bu plevral sızıntıdan elde edilmiştir [72]. **MCF-7** ismini, bu sızıntıdan elde edilen hücrelerin tespit edildiği yer olan **Michigan Cancer Foundation** isimli enstitüden 1973 yılında almıştır. [73]

MCF-7 ile ilgili bilgiler MCF-7 hücrelerinin farklı kaynaklarından ve orijinal MCF-7 hücre serisinin özelliklerinden elde edilmiştir. MCF-7 hücreleri koloniler şeklinde gelişmeye yönelirler. %5 FBS ile pasajı yapılabilir. MCF-7 hücre serisi yumuşak agarda gelişebilir. Hücreler kollajen fibroblast matrikse penetre olabilir [74]. Bazı çalışmalarda MCF-7 hücre serisinin *in vitro* ortamda düşük invaziv etkisi olduğu belirtilmiştir. *In vivo* ortamda nude farede MCF-7 hücrelerinin tümöre dönüşme yeteneği vardır ancak fare 17-b estradiol ile muamele edildiğinde daha iyi gelişme sağlanabilir. MCF-7 hücrelerinin tümör oluştırma dozunun 5×10^6 hücre olduğu iddia edilmiştir. Bazı yayınlarda ise MCF-7 hücre serisinin nude farede metastaz yapmadığı iddia edilirken başka bir yayında MCF-7 hücre serisi kendiliğinden ve deneysel metastaz göstermiştir [75].

2.6.5. L929 Hücre Serisi

L929 1940 yılında W.R. Earle tarafından oluşturulan esas L serisinin alt klonudur. L serisi 100 günlük C3H/An erkek farenin bağ dokusunun normal subkutanöz bölgeden ve yağ dokusundan elde edilmiştir. Kültürü genelde %10 Fetal Bovine Serum (FBS) içeren 2mM L-glutaminli DMEM besiyerinde yapılır [76,77].

2.7. Sitotoksosite Testleri

Canlı hücre sayısının ve hücre proliferasyonunun doğru ve hızlı tespiti hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalarda deneysel aşamada önemlidir. Hücre canlılığı, bir örnekteki canlı hücrelerin sayısı olarak tanımlanabilmektedir. Canlı hücre sayısını belirlemede en çok tercih edilen yöntem, hemositometredir. Hücre proliferasyonu ise; bir kültürde bölünen hücrelerin sayısının ölçülmesi olarak tanımlanmaktadır. Hücre proliferasyon yöntemleri genellikle hücre biyolojisinde büyüme faktörlerini ve ortam bileşenlerini çalışmak için, sitotoksik ajanları ve hücre aktivasyonunu görüntülemek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Güvenilir, duyarlı, nicel yöntemlere olan ihtiyaç, metotların gelişimine liderlik edecek geniş sayıda örneğin analizinde yol gösterici olacaktır.

Genel olarak Sitotoksosite Testleri şu şekilde sıralanabilir:

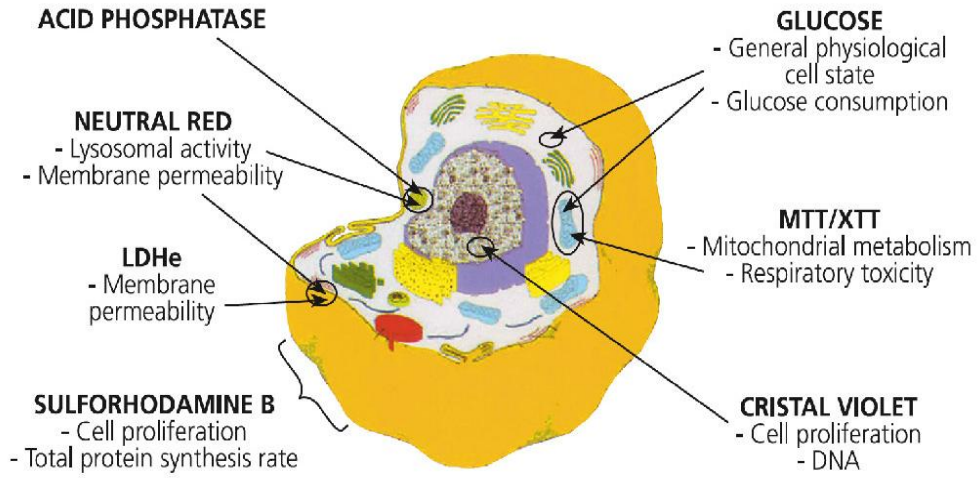
- Agar Difüzyon Testi
- Agarose Overlay Testi
- LDH Testi (laktat dehidrogenaz)
- MTS Testi (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)
- MTT Testi (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
- XTT Testi (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide)
- WST-1 Testi (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium)
- Trypan Blue Testi
- Neutral Red Testi
- Canlı hücrelerde DNA' yı işaretlemek için radyoaktif timidin kullanılması
- Canlı hücrelerde DNA' yı işaretlemek için BrdU kullanılması

Bu testlerin bazılarında radyoaktif materyallerin kullanılması, bazılarında sadece kalitatif ölçümlerin yapılması ya da bir kısmında kompleks tekniklerin uygulanması gibi çok sayıda dezavantajları bulunmaktadır. Son yıllarda, sitotoksiste ölçmek için kullanılan metotlar, plazma membranı permeabilitesindeki değişimler üzerine kurulmuştur. Bu yöntemlerde, hücreler irreversibl olarak hasara uğratılır. Fakat plazma membranı hasar görmeden kalır. Bundan dolayı bu metotlar, hücrel hasarın tespitinde önemli bir yer oluşturmaktadır. Ölü hücreler, çeşitli tetrazolyum tuzlarını metabolize etme yeteneğine sahip değildirler.

Hücrel hasar oluşması, hücrelerin metabolik hücre fonksiyonunu ve büyümesini sürdürmek için gereken enerjiyi sağlama ve canlılığını sürdürme kapasitelerinin kaybı ile sonuçlanmaktadır. Metabolik aktivite testleri bu esasa dayanarak ortaya çıkarılmış yöntemlerdir ve genellikle mitokondrial aktiviteyi ölçerler. Bu yöntemlerde hücreler birer kolorimetrik substrat olan XTT, MTT ve WST-1 gibi tetrazolyum tuzları ile inkübe edilmektedir. Tetrazolyum tuzlarından, hücre proliferasyonu ve sitotoksiste tetkikleri, enzim tetkikleri, histokimyasal prosedürler ve bakteriyolojik değerlendirme gibi geniş bir yelpazede yararlanılmaktadır. Tüm yöntemlerde tetrazolyum tuzları, metabolik olarak, formazan olarak isimlendirilen yüksek renkli son ürünlere indirgenmektedir. Bu tuzların biyolojik olarak indirgenmesinin doğası henüz tam olarak anlaşılammakla birlikte uzun yıllardır histokimyasal değerlendirmelerde başvurulan primer yöntemlerdir. Bu testlerden MTT, 1950'li yıllarda tanıtılmış ve canlı hücrelerin tetrazolyum tuzlarını indirgeyerek renkli formazan bileşiğine dönüştürme esasına dayandırılmıştır. Bu biyokimyasal prosedür hücre ölümünden kısa bir süre sonra inaktif hale geçen aktif mitokondri enzimlerinin aktivitesi ile gerçekleştirilmektedir. Kolorimetrik bir ölçüm yöntemi olan XTT ilk olarak P.A. Scudiero tarafından 1988 yılında tanımlanmıştır [78].

MTT yöntemi ile suda çözünmeyen bir formazan bileşiği oluşurken XTT kullanımı ile suda çözünen bir boya meydana getirilmiştir. Bu sayede XTT, proliferasyon ölçme yöntemini büyük ölçüde kolaylaştırmış ve çeşitli nedenlerle hücre ölümüne ve varyasyonlara neden olan radyoaktif izotoplar kullanılmaksızın hücre canlılığını belirlemede ve hücre sayımında mükemmel bir çözüm olmuştur. WST-1 yönteminin de en büyük avantajı XTT gibi suda çözünen formazan ürünü kullanılması ve bu sayede prosedürü zorlaştıran yıkama ve tripsinize etme gibi

aşamaları gerektirmeden, çalışmanın veri analizlerinin aynı mikropate'de yapılabilmesidir [79,80].



Şekil 2.9. Sitotoksiste testlerinin hücre üzerine etkileri [81].

2.7.1. MTT Testi

MTT testi indirekt olarak hücre büyümesi ve/veya hücre ölümünü değerlendirmeyi amaçlayan, hücre kültürü esasına dayanan bir ilaç duyarlılığı testidir [82]. Bu yöntemde trofik faktörler, büyüme inhibitörleri, apoptoz inhibitörleri tarafından değişikliğe uğratılan hücrelerin proliferatif aktiviteleri MTT kiti kullanılarak sayılabilmektedir [83]. Hücre canlılığını ve üremesini ölçen bu yöntemin, diğer sitotoksik test yöntemlerine göre daha hassas ve tekrarlanabilir olması, uygulamasının kolay, hızlı ve sayılabilir olması avantaj olarak belirtilmiştir. Ayrıca, hücre proliferasyonunun belirlenmesinde membran bütünlüğünün ve nükleotid etkileşiminin değerlendirildiği BrdU ve 3H-timidin gibi yöntemlerin aksine, fazla sayıda materyalin inceleneceği çalışmalarda, tehlikeli kimyasallara temasın engellendiği hızlı ve çok yönlü bir yöntem olarak tercih edilmektedir [83].

İlk olarak Mosmann tarafından tanımlanan, daha sonra Alley ve arkadaşları tarafından geliştirilen 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5- difeniltetrazolium bromid (MTT) yöntemi hücre canlılığının belirlenmesi için çok sık kullanılan pratik bir yöntemdir [82,84]. MTT yöntemi ile bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak saptanabilmektedir. Arjan ve arkadaşları, MTT test yönteminin sitotoksitenin belirlenmesinde kullanışlı,

hassas ve hızlı bir metot olduğunu, ayrıca radyoaktif izotop kullanmaya gerek kalmadığını belirtmişlerdir [85]. Wilson ve arkadaşları, MTT'den üreyen formazonun yoğunluğunun direkt olarak yaşayan hücrelerin sayısı ile bağlantılı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bu yöntemi, kanserli hastaların tedavisinde kullanılan ilaçlar üzerinde denemişler ve elde ettikleri klinik sonuçların, MTT sonuçlarıyla paralel olduğunu belirtmişlerdir [86].

Bu yöntem sağlam hücrelerde mitokondrinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu reaksiyon frajil bir mitokondriyal enzim olan süksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağlıdır.

MTT, hücrelere aktif olarak absorbe olan ve mitokondriye bağlı bir reaksiyon ile renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenen bir maddedir. [84] Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Hücrelerin MTT indirgeme özelliği hücre canlılığının ölçütü olarak alınır ve MTT analizi sonucunda elde edilen boya yoğunluğu canlı hücre sayısı ile korelasyon gösterir [87]. Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır.

Proliferasyondaki değişikliklerin ölçüldüğü bu test de aktif olarak proliferen hücrelerde MTT dönüşümündeki artış ELİSA Reader cihazı ile sayılabilmektedir. Elde edilen verilerin materyalle muamele edilmemiş negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması ile hücrelerdeki proliferatif aktivitedeki kısmi artış belirlenir. Aksi durumda ise hücrelerin apoptoza uğraması MTT indirgenmesinde azalmaya neden olarak hücre canlılığındaki azalmayı yansıtır. Bu yöntem genellikle hücre proliferasyonunun tespitinde, sitotoksisite analizlerinde ve apoptozisin görüntülenmesinde kullanılmaktadır [83,88,87].

2.7.2. XTT Testi

Tetrazolyum tuzları prensibine dayanan bir diğer kolorimetrik metot olan XTT (sodyum 3'-[1-[(fenilamino)-karbonil]-3, 4-tetrazolyum]-bis (4-methoksi-6-nitro)benzen-sulfonikası hidrat), 1988 yılında P.A. Scudiero tarafından ilk kez tanımlanmıştır. XTT metotunun kullanımı, proliferasyon ölçümü prosedürünü geniş ölçüde kolaylaştırmıştır. Bununla birlikte, hücrelerin kantifikasyonu için ve radyoaktif izotoplar kullanmadan canlılıklarının tespitinde kusursuz bir çözümdür.

Bu kit, hücre proliferasyonunun çeşitli büyüme faktörleri ve besin bileşenleri ile ilişkili olarak ölçümü prensibine dayanmaktadır. XTT, hücrelerden ⁵¹Cr salınımı temeline dayanan sitotoksik testlerin yerini almaktadır. Bu kiti kullanmanın avantajları şöyle sıralanabilir:

Kolay uygulanabilir olması: Ek ajanlara veya hücre yıkama prosedürlerine ihtiyaç yoktur.

Hız: Çok kuyucuklu plateler ve okuma için bir ELISA okuyucuya ihtiyaç vardır.

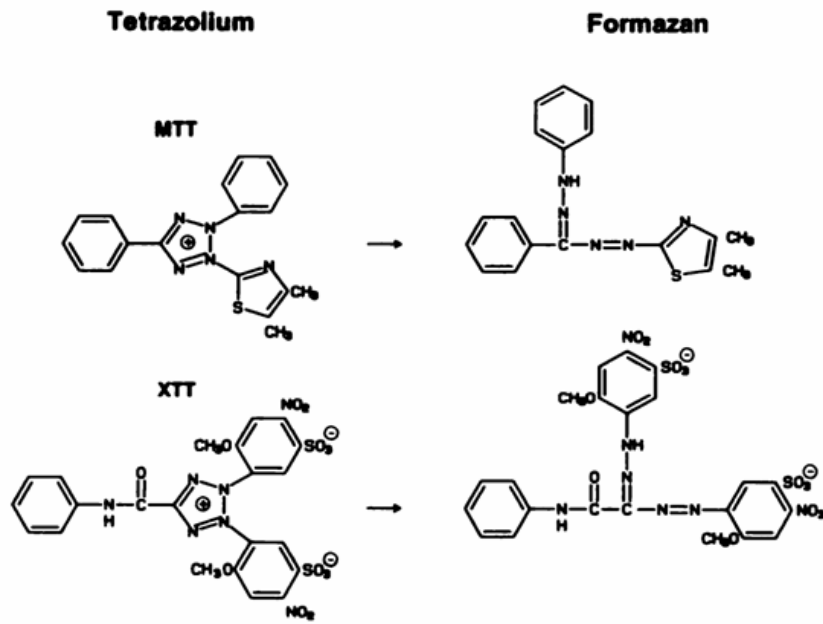
Duyarlılık: Düşük hücre konsantrasyonlarında bile ölçüm yapılabilmektedir.

Doğruluk: Her kuyucuktaki boya absorbansı, hücre sayısı ile orantılıdır.

Güvenilirlik: Radyoaktif izotoplara ihtiyaç duyulmamaktadır.

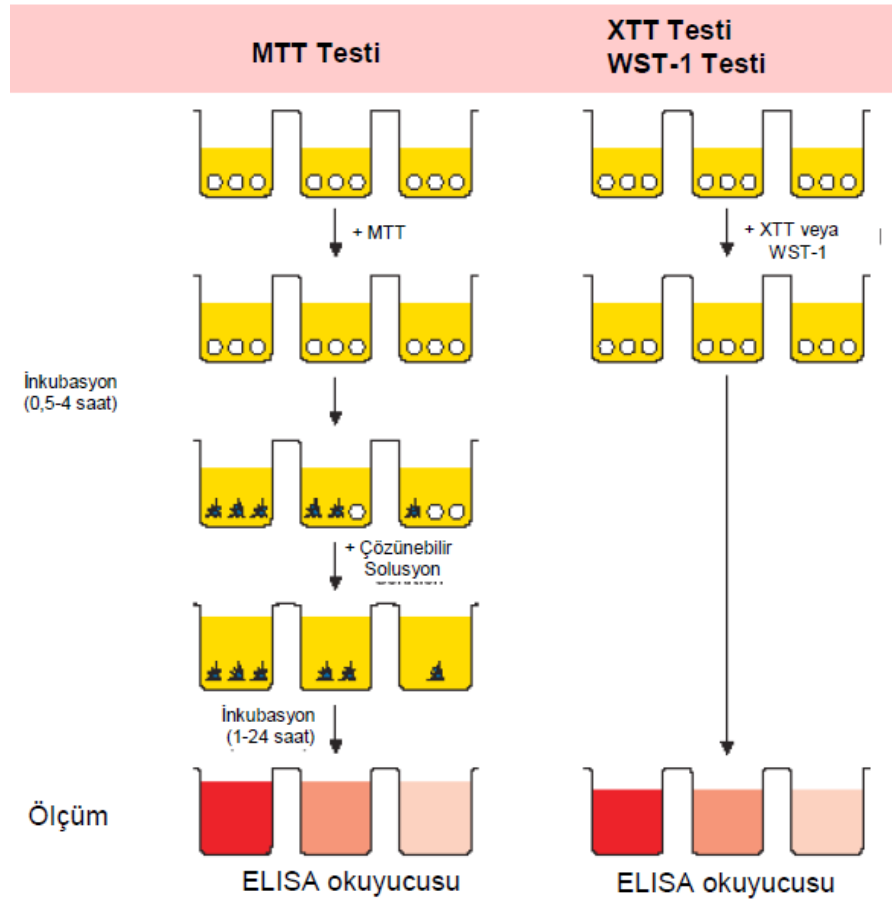
Normal olarak aktive edilmiş hücrelerin ve çeşitli sitokinlere bağımlı hücre hatlarının hücre canlılığı veya proliferasyonunu değerlendirmede kullanılan yeni bir kromojenik bir yöntem olması açısından da ayrı bir önem taşımaktadır.

Yöntem, metabolik olarak aktif olan hücrelerin bir tetrazolyum tuzu olan XTT'yi turuncu formazan bileşenlerine indirgemeleri prensibine dayanmaktadır. (Şekil 2.14)



Şekil 2.10. MTT ve XTT' nin formazana dönüşümü [89].

Oluşan boya suda çözünebilir özellikte olmakla birlikte boya yoğunluğu bir spektrofotometre yardımıyla verilen dalga boylarında okutulabilmektedir. Boya duyarlılığı, metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile orantılıdır. Çok kuyucuklu platelerin ve bir ELISA okuyucusunun kullanılması, çok sayıda örneğin çalışılıp hızlı ve kolay sonuçlar alınabilmesini sağlamaktadır. Test prosedürü hücrelerin 96 kuyucuklu plaklarda kültüre edilip, XTT ajanının eklenip, 2-24 saat inkübasyonda bekletilmesi prensibine dayanmaktadır. İnkübasyon süresi boyunca, duyarlılığı bir spektrofotometre (ELISA okuyucu) ile ölçülebilen turuncu renk oluşmaktadır. Kuyucuklardaki aktif hücrelerin sayılarının çokluğu, mitokondriyal enzimlerin aktivitesinin çokluğu ile orantılıdır [90].



Şekil 2.11. MTT ve XTT metotları [91].

2.7.3. WST-1 Testi

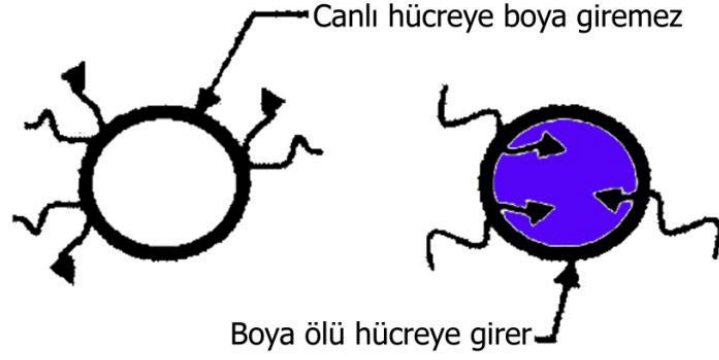
Sitotoksik ve sitostatik bileşiklerin analizinde ve hücre büyümesini inhibe eden antikor ve fizyolojik mediatörlerin değerlendirilmesinde kullanılan bu prosedürde WST-1 tetrazolyum tuzu, yalnızca canlı hücrelerde aktif olan ve mitokondrial respiratuar zincirde yer alan süksinat-tetrazolyum redüktaz tarafından suda çözünebilen formazan boyasına dönüştürülmektedir. Bu yöntemde bir örnekteki bu mitokondrial dehidrogenazın total aktivitesi, canlı hücrelerin artmasıyla yükselmektedir. Enzimin aktivitesinin artması, kültür medyumundaki metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile direkt ilişkili olarak formazan boyasının üretiminde ve miktarında artışa neden olmaktadır. Bu dönüşüm esnasında ise Elisa-Reader kullanılarak absorpsiyon sayılabilir hale gelmektedir [92].

2.8. Membran Bütünlüğü Testleri

Canlı hücreleri ölü olanlardan ayırt eden özellikler membran bütünlüğünün kaybolması sonucu oluşan plazma membranı boyunca gerçekleşen transport olaylarının kaybını içermektedir. Plazma membranının bütünlüğünü ölçmek için eksklüzyon boya, floresan boya ve LDH (laktat dehidrogenaz) sızdırması kullanılabilir.

2.8.1. Eksklüzyon/Floresan Boyaları

Canlı (sağlam plazma membranı olan) ve ölü (plazma membranı hasarlı olan) hücreler diferansiyel boyama ile ayırt edilebilir. Hasar görmüş plazma membranı permeabilitesi olan hücreler boyanırken, hasar görmemiş (canlı) hücreler, boyalar plazma membranını geçemedikleri için bu boya ile (eksklüzyon boya) boyanmazlar. Eksklüzyon testleri için en sık kullanılan boya tripan mavisidir (Şekil 2.16).



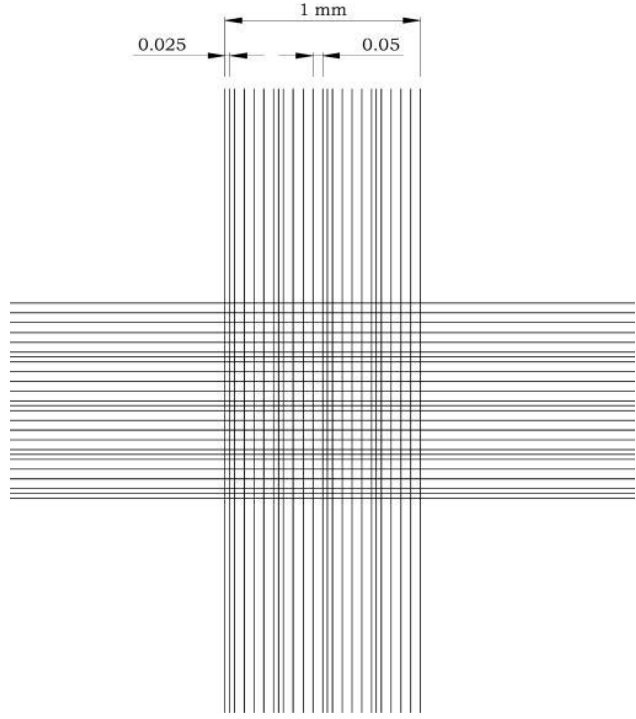
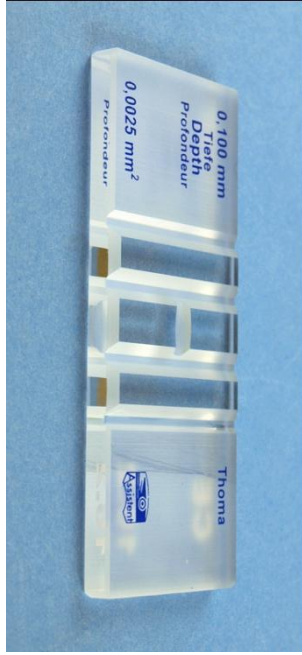
Şekil 2.12. Eksklüzyon boya prensibi [93].

2.8.2. Tripan Mavisı Boyası Canlılık Testi

Tripan Mavisı Boyası sadece ölü hücrelerin membranlarından geçebilir. Her bir muamele edilen grubun yaşama yüzdesi ölü hücrelerin (mavi) ve canlı hücrelerin (boya almamış) sayılmasıyla belirlenir. Analiz edilen parametre; hasarlı, sızıntı yapan plazma membranıdır. Bu testin avantajları arasında ışık mikroskobu ile canlı hücrelerin ölülerden ayırt edilmesinde kullanılan standart bir metot olması, hızlı ve ucuz olması, total hücre popülasyonundan çok küçük bir hacmin test analizi için gerekli olması sayılabilir.

Hücre canlılığı, bu boyaların % 0,9' luk tuzlu suda hazırlanmış solüsyonlarının hücre süspansiyonuna eklenmesi sonucunda çok küçük hacimdeki hücre süspansiyonunun içerdiği canlı hücrelerin thoma lamı gibi bir hemositometre aracılığıyla mikroskop yardımıyla sayılmasıyla belirlenir. Tripan mavisinin (% 0.5–1) solüsyondaki proteinlere olan affinitesi canlı olmayan hücrelere olan affinitesinden daha yüksektir. Eğer hücre süspansiyonundaki serum miktarı % 1'den fazla ise bu metodun doğruluğu azalabilir [94].

Boya ile hücre süspansiyonu 1:1 oranında karıştırılır ve 37°C'de 5 dakika tutulur. Daha sonra thoma lamında mikroskopta sayılır. Canlı hücreler tripan mavisı boyasını geçirmez. Hücre membranının herhangi bir nedenle zarar görmesi halinde söz konusu boya hücre içeriğine girer ve stoplazmayı boyar. Bu durumda mikroskopik incelemede canlı hücreler parlak ve şeffaf renktedir, ölü hücreler ise mavi olarak boyanır [95].



Şekil 2.13. Hemositometre [96].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. DeneYlerde Kullanılan Kimyasal Maddeler, Aletler ve Cihazlar

3.1.1. Kullanılan Aletler ve Cihazlar

<u>CİHAZ ADI</u>	<u>MARKA</u>
CO ₂ 'li inkübatör (37°C, % 5 CO ₂ 'li)	NUAIRE® -USA Autoflow
Laminar flow (steril kabin)	BİLSER® Class II
Invert (ters) mikroskop	LEICA®
ELISA cihazı (spektrofotometre)	RAYTO-RT® 2100C
Su banyosu	GEMO® DT 109 A
Santrifüj	NÜVE® NF 200
Ön soğutmalı santrifüj	HARRIER® -18/80 Precool MSE
Mikro santrifüj	SANYO® -MicroCentaur MSE
Vorteks	VELP® Scientifica 2x ³
Otoklav	HIRAYAMA® -Hiclave HV-85L
Derin dondurucu (-20°C)	ARÇELİK®
Derin dondurucu (-80°C)	NÜVE® DF 490
Hassas terazi	O HAUS® Adventurer Pro
Otomatik mikropipetler (10-100µl,20-200 µl,100-1000 µl)	GILSON®
pH-metre	METTLER-TOLEDO-620 Lab
Isıtmalı manyetik karıştırıcı	STUART® -BIBBY
Ultraviyole spektrofotometre	SCHIMATZU® -UV-1800
Fourier Transform İnfrared	MATTSON® -1000
Nükleer Manyetik Rezonans	¹ H-NMR, BRUKER® -AvanceIII
McFarland Cihazı	BIOSAN® DEN-1

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasal maddelerin adı, kısaltılmış gösterimi ve kapalı kimyasal yapısı.

KİMYASAL MADDENİN ADI	KISALTMA	KAPALI FORMÜL	MOL KÜTLESİ (g/mol)
Maleik anhidrit	MA	C ₄ H ₂ O ₃	98,06
Stiren	ST	C ₈ H ₈	104,15
Vinil asetat	VA	C ₄ H ₆ O ₂	86,09
Metil metakrilat	MMA	C ₅ H ₈ O ₂	100,12
Benzoil peroksit	BPO	C ₁₄ H ₁₀ O ₄	242,23
Azobisisobutironitril	AIBN	C ₈ H ₁₂ N ₄	164,21
Benzen	-	C ₆ H ₆	78,11
Etil metil keton	EMK	C ₄ H ₈ O	72,11
Etil alkol	-	C ₂ H ₅ OH	46,070
Dietil eter	-	C ₄ H ₁₀ O	74,12
Petrol eteri	-	Petrol rafinerisi	-
Kloroform	-	CHCl ₃	119,38
Etil asetat	-	C ₄ H ₈ O ₂	88,12
Trietil amin	TEA	C ₆ H ₁₅ N	101,19
N,N- dimetilformamid	DMF	HCON(CH ₃) ₂	73,10
Su	-	H ₂ O	18,00
Hidroksiüre	HX	CH ₄ N ₂ O ₂	76,05
Sitozin β-D-arabinofuranosid hidroklorür (Cytarabine)	CYT	C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₅	279,68
Dimetil sulfoksit	DMSO	C ₂ H ₆ O ₅	60,05
Fosfat Buffer Saline	PBS ^a	-	-
Ametopterin (Metotreksat)	MTX		
Gemsitabin	GEM		

Çizelge 3.2. Kullanılan kimyasal maddelerin adı ve markaları.

KİMYASAL MADDENİN ADI	MARKA
Dulbecco Fosfat Buffer Saline (DPBS)	PAA Cell Culture Company
Dulbecco Modified Eagles Medium (DMEM) – L-glutaminli	PAA Cell Culture Company
Dulbecco Modified Eagles Medium (without phenol red)	Wisent Bio Products
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biological Industries
Penicillin-Streptomycin (PS)	Biological Industries
Trypsin-EDTA	Biological Industries
Trypan Blue	Invitrogen
MTT (3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid)	Invitrogen
XTT (sodyum 3'-[1-[(fenilamino)-karbonil]-3, 4-tetrazolyum]-bis (4-methoksi-6-nitro)benzen-sulfonikası hidrat)	Cayman Chemical Company
Brain Heart Infusion Broth (BHI)	BIOMARK Lab.
Sabouraud Dextrose Broth (SDB)	OXOID
Mueller - Hinton Agar (MHA)	MERCK
Sabouraud Dextrose Agar (SDA)	Neogen
Vancomycin	OXOID
Imipenem	OXOID
Sulfamethoxazole-Trimethoprim	OXOID
Flukanozol	Generica
Dimetil sulfoksit (DMSO)	MERCK

3.2. Kopolimerlerin Sentezlenmesi

Tez kapsamında yapılması planlanan kopolimerlerin sentezlenmesi için maleik anhidrit monomeri (MA) ile birlikte vinil asetat (VA), metil metakrilat (MMA), alil fenil eter (AFE) ve stiren (ST) monomerleri kullanıldı. Maleik anhidrit-vinil asetat, maleik anhidrit-metil metakrilat, maleik anhidrit-alil fenil eter ve maleik anhidrit-stiren kopolimerleri sentezlenmiştir. Ancak bunlar içerisinde antineoplastik ajanlarla bağlanması oldukça başarılı olup, uyumlu ve tutarlı özellikler gösteren maleik anhidrit-vinil asetat (MAVA) kopolimeri kullanıldı.

3.2.1. MAVA Kopolimerinin Sentezlenmesi

Maleik anhidrit ve vinil asetat olmak üzere iki farklı monomer kullanılarak maleik anhidrit-vinil asetat kopolimeri sentezlenmiştir. VA monomerinin homopolimerleşmemesi için oda sıcaklığında ve kahverengi cam şişelerde saklanması gerekmektedir. 100 mL' lik bir balona 4,9 g MA monomeri konularak 10 mL etil metil keton içerisinde çözülerek üzerine 4,63 mL VA ve 0,05 g BPO yavaşça ve aralıklarla eklendi. Toplam hacim 15 mL etil metil keton eklenmesiyle 25 mL'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında sürekli çalkalama ile homojen bir karışım elde edildi. Her iki monomer yaklaşık 1:1 mol oranında tepkimeye sokuldu. Bu karışım, manyetik karıştırıcı ve manyetik balık kullanılarak, sıcaklık ayarının da belli aralıklarla artırılmasıyla 24 saat bekletildi. Yaklaşık 70°C - 80°C dolayında kahverengiye yakın, bal kıvamında viskoz bir karışım elde edilir edilmez tepkime sonlandırıldı. Ardından bu karışım 100 mL' lik behere alınarak 25 mL etil alkol ile yavaşça çöktürüldü. Çökmeye başlayan beyaz renkli MAVA kopolimeri defalarca etanol ile yıkandıktan sonra, süzülerek bir petri kabına alındı; açık havada ve oda sıcaklığında kurutuldu. Tepkimeye girmeden arta kalan VA monomerinin kendi kendine homopolimerleşmesi ile oluşabilecek polivinilasetatın ortamdaki ve kopolimerden uzaklaştırılması için, kopolimer 20 mL etil asetat içinde 24 saat bekletildi; petrol eteri ile çöktürüldü, ardından vakum filtrasyon sistemi kullanılarak analitik süzgeç kağıdından süzüldü. Ortamdan çözücünün uzaklaştırılması için çökelek vakum etüvde 55°C' de 24 saat kurutularak saflaştırıldı [17].

3.3. Kopolimerlerin Yapısal Karakterizasyonu

Maleik anhidrit-vinil asetat kopolimerinin yapısal karakterizasyonu Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi (FTIR) ve Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektrometresi (¹H-NMR) ile yapıldı. Kopolimerlerden 2,0 mg örnekler alınarak iyice öğütüldü ve 100,0 mg KBr ile birlikte vakum sistemine bağlanarak disk haline getirildi, etüvde kurutulduktan sonra 4000-400 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında 400 tarama ve 4 cm⁻¹ çözünürlükte FTIR spektrumları alındı. ¹H-NMR spektrumları alınırken, tüm örneklerden 6'şar mg alınarak 0,8 mL dimetil sulfoksit (DMSO) çözücüsünde çözüldü. Örneklerin spektrumu DMSO çözücü ortamında alındı.

3.4. Kopolimerlerin Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması

Maleik anhidrit-stiren (MAST), maleik anhidrit-metil metakrilat (MAMMA) ve MAVA kopolimerlerinin farklı kaynaklarda çeşitli biyolojik aktiviteler gösterdiği bilinmektedir [17]. Bu amaçla, kopolimerlerin biyolojik aktivitesi, 5 farklı bakteri türü (antibakteriyel) ve maya mantarı (antifungal) üzerinde araştırılmıştır.

3.4.1. Kullanılan Mikroorganizmalar ve Özellikleri

Biyolojik aktivite testlerinde kullanılan mikroorganizmalar Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi)' ndan temin edilmiştir.

Çizelge 3.3. Antimikrobiyal Aktivite Deneylerinde Kullanılan Mikroorganizmalar ve Kaynakları

	Mikroorganizma	Suş Numarası
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
2	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
4	<i>Meticillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>	ATCC 43300
5	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
6	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231

3.4.2. Biyolojik (Antimikrobiyal) Aktivite Tayini / Disk Difüzyon Testi

Kopolimerlerin antimikrobiyal aktivitelerini tayin etmek amacıyla Disk Difüzyon yöntemi kullanılmıştır [45,46].

Bakteri suşları Brain Heart Infusion Broth'a inoküle edilerek $37\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ 'de, mantar suşları da Sabouraud Dextrose Broth'a inoküle edilerek $25\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Bu kültürlerden alınan bakteri ve maya solusyonları, içerisinde 5 ml buyyon bulunan steril cam tüplere belirli miktarlarda alınarak McFarland cihazında 0.5 standarda göre ayarlanmıştır (0.5 McFarland standardı = $1-2 \times 10^8$ CFU/ml).

Kopolimerler 8 mg tartıldı ve 2 ml DMSO'da çözüldü. Yüksek dozdan başlanarak 1 ml DMSO içeren steril tüplerde sulandırılmaları yapıldı (4/1, 2/1, 1/1, 1/2, 1/4, 1/8) . Sulandırılmalar, otomatik pipet (GILSON) ile steril 6 mm'lik boş disklerle (OXOİD blanc disc) 25 µl emdirildi.

Otoklavda sterilize edilmiş ve $45-50^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğutulmuş Mueller - Hinton Agar ve Sabouraud Dextrose Agar 12 cm'lik steril agar plaklarına 25 ml olacak şekilde dağıtıldı. Katılaştıran agar yüzeyine, 0.5 McFarland standardına göre hazırlanan bakteri ve maya solusyonlarından steril eküvyon çubuk yardımıyla tüm plak yüzeyine yayma ekim yapıldı.

Yüzeylerinin kurumaması için bir süre beklendikten sonra hazırlanan sulandırılmaları yapılmış numune çözeltileri emdirilmiş diskler hafifçe bastırılarak aralarında 20 mm kalacak şekilde yerleştirildi. Negatif kontrol için sadece DMSO emdirilmiş steril diskler kullanıldı.

Laboratuarda bulunan standart suşlar, herhangi bir şüpheye yer bırakmamak için antibiyogramlarının yapılması amacıyla Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderildi. Gelen sonuçlara göre antibiyotik diskleri -20°C 'den çıkarılarak oda ısısında bekletildi. Pozitif kontrol için hazırlanan, bakterilerde Imipenem, Sulfamethoxazole-Trimethoprim ve Vancomycin antibiyotik diskleri, maya için Flukanazol emdirilmiş diskler kullanıldı. Pozitif kontroller petrinin tam ortasına, diğer diskler ile aralarında 20 mm kalacak şekilde yerleştirildi.

Bu şekilde hazırlanan petri kutuları 4°C’de 2 saat bekletildikten sonra bakteri ekilen plaklar $37 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ ’de 24 saat, maya aşılama plaklar $25 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ ’de 48 saat inkübe edildi. Süre sonunda besiyeri üzerinde disklerin etrafında oluşan inhibisyon zonları mm olarak değerlendirildi. Yapılan deneyler 3 kez tekrarlanarak alınan sonuçlar istatistiksel olarak analiz edildi.

3.5. Kopolimer-İlaç Çiftlerinin Sentezlenmesi

Kopolimer-ilaç çiftlerinin hazırlanması sırasında aşağıda açıklanan yöntem kullanıldı.

3.5.1. MAVA Kopolimeri ve Amethopterin (Methotrexate) Çifti

MAVA kopolimeri ve amethopterin hidrat (MTX) mol oranları birebir olacak şekilde tepkimeye sokuldu. Bu nedenle 1:1 mol oranı göz önünde bulundurularak, 0.1 mmol (18,415 mg) MAVA kopolimeri 0.5 mL dimetilformamidde (DMF) çözüldü ve vortekslendi. Açık renkli viskoz olan bu çözeltiye 4 µL trietilamin (TEA) eklendi ve tekrar vortekslendi. Çözeltinin rengi koyulaşana dek bu işleme devam edildi. MTX etken maddesi 0.1 N NaOH’te çözüldü, ardından nötral tamponda sulandırıldı ve -20°C ’de saklandı. Daha sonra hazır olan 0.1 mmol MTX solusyonundan alınarak 250 µL dimetilformamidde (DMF) çözüldü. Daha önce hazırlanan MAVA/TEA karışımına MTX/DMF solusyonu damla damla eklendi. Koyu renkli, bulanık olmayan karışım, çalkalamalı su banyosunda 50°C ’de 2 saat, ardından 70°C ’de sürekli çalkalama ayarında tutularak 48 saat bekletildi. Bu süre sonunda elde edilen koyu-turuncu renkli viskoz karışıma, soğuk etil alkol yavaşça damla damla eklenerek -20°C ’de 2 saat bekletilerek, santrifüj edildikten sonra çöktürme işlemi gerçekleştirildi. Çökelek, MAVA/MTX konjugatı olarak adlandırıldı, oda sıcaklığında kurutulduktan sonra, vakum etüvünde 50°C ’de 24 saat kurutulularak saflaştırıldı. Hava almayan vakumlu flakonda saklandı.

3.5.2. MAVA Kopolimeri ve Gemcitabine Çifti

MAVA kopolimeri ve gemcitabine hidroklorür (GEM) mol oranları birebir olacak şekilde tepkimeye sokuldu. Bu nedenle 1:1 mol oranı göz önünde bulundurularak, 0.2 mmol (36,83 mg) MAVA kopolimeri 1 mL dimetilformamidde (DMF) çözüldü ve vortekslendi. Açık renkli viskoz olan bu çözeltiye 8 µL trietilamin

(TEA) eklendi ve tekrar vortekslendi. Çözeltinin rengi koyu mor olana dek bu işleme devam edildi. GEM etken maddesi önce 50 µL minimum miktar suda, daha sonra da 450 µL dimetilformamidde (DMF) çözüldü. Daha önce hazırlanan MAVA/TEA karışımına GEM/DMF solusyonu damla damla eklendi. Koyu renkli, bulanık, viskoz olmayan karışım, çalkalamalı su banyosunda 50 °C’de 2,5 saat, ardından 70 °C’de sürekli çalkalama ayarında tutularak 48 saat bekletildi. Bu süre sonunda elde edilen koyu-kahve renkli viskoz karışıma, soğuk etil alkol yavaşça damla damla eklenerek – 20 °C’de 1 saat bekletilerek, santrifüj edildikten sonra çöktürme işlemi gerçekleştirildi. Çökelek, MAVA/GEM konjugatı olarak adlandırıldı, oda sıcaklığında kurutulduktan sonra, vakum etüvünde 50 °C’de 24 saat kurutularak saflaştırıldı. Hava almayan vakumlu flakonda saklandı.

3.5.3. MAVA Kopolimeri ve Cytarabine Çifti

MAVA kopolimeri ve cytarabine (CYT) mol oranları birebir olacak şekilde tepkimeye sokuldu. Bu nedenle 1:1 mol oranı göz önünde bulundurularak, 0.05 mmol (9,21 mg) MAVA kopolimeri 375 µL dimetilformamidde (DMF) çözüldü ve vortekslendi. Açık renkli viskoz olan bu çözeltiliye 3 µL trietilamin (TEA) eklendi ve tekrar vortekslendi. Çözeltinin rengi koyu mor olana dek bu işleme devam edildi. CF etken maddesi, 0,5 mL’ lik bir eppendorf tüpe alınarak otomatik mikropipet ile 0,5475 mL DMF eklenerek çözüldü. Daha önce hazırlanan MAVA/TEA karışımına CYT/DMF solusyonu damla damla mikropipet ile yavaşça eklendi. Koyu renkli, bulanık, viskoz olmayan karışım, çalkalamalı su banyosunda 50 °C’de 2,5 saat, ardından 70 °C’de sürekli çalkalama ayarında tutularak 48 saat bekletildi. Bu süre sonunda elde edilen koyu kahve renkli viskoz karışım, çalkalamalı su banyosunda 50 °C’ de 2 saat, ardından 70 °C’ de sürekli çalkalama ayarında tutularak 48 saat bekletildi. Daha sonra koyu kahve renkli viskoz karışıma, soğuk etil alkol yavaşça damla damla eklendi ve -20 °C’ de 1 saat bekletildi.

Açık-kahve renkli çökelek, MAVA/CYT konjugatı olarak adlandırıldı, oda sıcaklığında kurutulduktan sonra, vakum etüvünde 50°C’de 24 saat kurutularak saflaştırıldı. Hava almayan vakumlu flakonda saklandı.

3.6. Kopolimer-İlaç Çiftlerinin Fizyolojik Sıvıda Salım Davranışları

Çalışmamızda yapay vücut sıvısı olarak kullanılan ve yaklaşık 145 mM iyon derişiminde olan PBS tampon çözeltisi kullanıldı. Çözeltinin içeriği 137 mM NaCl, 2 mM KCl ve 10 mM fosfat tamponu (pH=7,4 ± 0,1) şeklindedir. Normal kan pH değeri de 7,4' dür.

Çeşitli avantajları nedeniyle, çalışmada kullanılacak PBS' in tablet formu tercih edildi. 1 adet tablet 100 ml tridistile suda çözüldü. 1 mg polimer-ilaç çifti tartılarak cam tüp içerisine kondu. Üzerine hazırlanan PBS çözeltisinden 2 ml eklendi. Hemen fotoğrafları çekildi. Daha sonra 37°C' de inkübe edildi. 1., 24. ve 48. saatlerde fotoğrafları çekildi. Salım davranışları incelendi.

3.7. Hücre Kültürü

Sentezlediğimiz kopolimer-ilaç çiftlerinin antimikrobiyal, antitümoral ve toksisite aktivitelerini incelemeyi amaçladığımız çalışmamız *in vitro* koşullarda hücre kültürü yöntemleri kullanılarak yapıldı ve çalışmamızda, antikanser etkisi için MCF-7 meme kanseri hücre hattı ve toksik etkinin belirlenmesi için de L929 fare fibroblast hücreleri kullanıldı.

MCF-7 hücre hattı; İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan, L929 fibroblast hücre hattı Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir.

Çalışmamızda kullandığımız besiyeri; % 10 fötal sığır serum (FBS), % 1 penisilin-streptomisin ilave edilmiş DMEM (L-glutamine'li) besiyeridir. DMEM (L-glutamine'li) besiyeri ile üretilen MCF-7 meme kanseri hücreleri ve de L929 fare fibroblast hücreleri 37°C' de ve % 95 nem, % 5 CO₂' li etüvde çoğaltıldı.

3.7.1. Hücrelerin Açılması, Çoğaltılması ve Pasajlanması

- 1) -80°C' de kriyotüpler içerisinde bulunan % 10 DMSO + % 90 FBS ile dondurulmuş MCF-7 ve L929 hücreleri 37°C' ye alındı.
- 2) Kriyotüp içerisine hızlı bir şekilde besi ortamı ilave edildi. Pasteur pipeti yardımıyla karıştırılarak hücreler 15 ml' lik falkon tüp içerisine alındı.
- 3) Falkon tüp içerisine yaklaşık 10 ml daha besiyeri ilave edilerek 1800 rpm'de 6 dakika santrifüj edilerek yıkama yapıldı.

- 4) Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve çöken hücrelerin üzerine 5 ml besi yeri eklenerek 25 cm²' lik flasklara alındı.
- 5) Flasklar, 37°C' deki % 95 nem ve % 5 CO₂ içeren etüve alınarak inkübasyona bırakıldı. 48 saatte bir besi ortamları tazelendi. Hücreler bütün flask yüzeyini kapladığında pasaj yapıldı.
- 6) Flasklarda bulunan ortam döküldü ve flasklar bir kez serumsuz ortam kullanılarak yıkandı.
- 7) Daha sonra hücrelerin üzerine 1 ml tripsin ilave edildi. Bir süre bekletildikten sonra tripsin uzaklaştırılarak flasklar 5-10 dakika boyunca inkübatörde bekletildi.
- 8) İnkübatörden çıkan flasklar inverted mikroskopla incelendi ve tüm hücrelerin kalkıp kalkmadığı kontrol edildi.
- 9) Flaskda bulunan tüm hücreler kalktıktan sonra, 10 ml FBS'lu ortam ilave edildi.
- 10) Flask içerisinde bulunan hücre-ortam karışımınının 5 ml' si başka bir flaska aktarılarak pasajlama işlemi tamamlanmış oldu.
- 11) Hücrelerin yüzeye yapışarak üremeye devam etmeleri için flasklar inkübatöre kaldırılarak inkübasyona bırakıldı ve çoğalmaları sağlandı.

3.7.2. Hücrelerin Dondurulması

- 1) Flasklarda bulunan hücreler öncelikle tripsinizasyon işlemi ile yapışmış oldukları flask yüzeyinden kaldırıldı.
- 2) Hücreler 15 ml' lik falkon tüplere alınarak 1800 rpm' de 7 dakika süre ile santrifüj edildi.
- 3) Santrifüj sonrası, her bir falkon tüpe ait 1,5 ml' lik kriyotüpler hazırlandı.
- 4) 9 : 1 oranında (%10' luk), FBS : DMSO karışımından oluşan ortam hazırlandı.
- 5) Tüplerde bulunan süpernatant kısım uzaklaştırılarak falkon tüpler buz üzerine alındı. Falkon tüplerde bulunan hücreler üzerine 750 µl FBS : DMSO karışımı eklenerek resüspanse edildi.
- 6) Buz içerisinde bulunan kriyotüpler içerisine bu karışım aktararak -80°C'ye kaldırıldı.

3.7.3. Hücrelerin Sayılması / Canlılığının Tespit Edilmesi

Thoma lamı, üzerinde üçlü çizgilerle birbirinden ayrılmış 16 büyük kareden oluşan yivler bulunan özel mikroskop lamıdır. Her büyük karenin alanı 1 mm^2 'dir. Lam üzerine konulan sıvının derinliği 0.1 mm'dir. Sonuçta her büyük kare üzerindeki sıvı hacmi 10^4 ml ' dir.

$$1 \text{ mm}^2 = 0.001 \text{ cm}^2$$

$$0.001 \text{ cm}^2 \times 0.1 = 0.0001 \text{ cm}^3 = 0.0001 \text{ ml} (10^4 \text{ ml})$$

Thoma lamının alt ve üst kısmındaki iki adet büyük 16 karedeki hücreler sayılıp aritmetik ortalamalar alındı. Daha sonra aşağıdaki formül ile istenilen dilüsyon yapıldı.

$$\text{Dilüsyon Miktarı} = \frac{\text{Başlangıçtaki Dilüsyon} \times \text{Ortalama Sayılan Hücre} \times 10.000}{\text{İçin Katılan Miktar} \times \text{Sayısı} \quad (\text{Sabit})}$$

ml. de İstenilen Hücre Sayısı

Örneğin ml'de 100.000 hücre olacak şekilde hücre süspansiyonu elde etmek istiyoruz. Thoma lamının bir tarafındaki 16 karede sayılan hücre sayısı 60, diğer tarafındaki hücre sayısı 40 olsun. Başlangıçtaki hücre pelleti 5 ml üretme besiyeri ile dilüe edilmiş olsun. Buna göre;

$$\text{Ortalama hücre sayısı} = 60 + 40 = 100/2 = 50$$

$$\text{Dilüsyon miktarı} = (5 \times 50 \times 10.000) / 100.000 = 25$$

Hücre pelleti üzerine toplam 25 ml olacak şekilde besiyeri konulursa her ml'de 100.000 hücre olacaktır. Buna göre başlangıçta 5 ml olan hücre süspansiyonuna 20 ml üretme besiyeri ilave edilmelidir.

3.8. İlaç ve Kopolimer-İlaç Çiftlerinin IC₅₀ Dozunun Belirlenmesi

IC₅₀ dozu, bir inhibitörün hedefinin % 50' sini öldürmesi için gerekli olan konsantrasyonunu temsil etmektedir. Daha açık bir ifadeyle, bir maddenin ya da molekülün, biyolojik bir sürecin % 50' sini inhibe etmesi için gerekli olan miktarı anlamındadır. FDA (Food and Drug Administration)' ya göre IC₅₀; bir etken maddenin *in vitro* da % 50 inhibisyon sağlaması için gerekli olan konsantrasyonudur. Kopolimer-ilaç çiftlerinin IC₅₀ dozu, MTT testi ve Tripan Mavis Testi ile belirlenmiştir. MTT suda çözünen bir tetrazolium tuzu olmakla beraber canlı hücre mitokondrilerindeki dehidrogenaz enzimi ile parçalandığında çözülebilir formazana dönüşmektedir. Formazandan kaynaklanan turuncu rengin yoğunluğu metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile orantılıdır. Kopolimer-ilaç çiftlerinin IC₅₀ dozu MTT ve Tripan Mavis Testi ile belirlendi. Bu nedenle, 96 kuyucuklu plaklar kullanılarak 24 saatlik bir deney düzeneği kuruldu.

3.9. Sitotoksitesite Testleri

İlaç ve kopolimer-ilaç çiftlerinin MCF-7 ve L929 hücreleri üzerine sitotoksitesininin incelenmesi amacıyla MTT ve XTT testleri uygulandı.

Canlılığı ölçülecek hücreler düz tabanlı 96 kuyucuklu plaklara ekildi. Yüzey kaplaması tamamlandıktan veya yeterli yoğunluğa ulaştıktan sonra (24 veya 48 saat) ortama ilaç ve kopolimer-ilaç çiftleri çeşitli konsantrasyonlarda ilave edildi. Maddeler ile 48 saat inkübasyonun ardından 10 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan MTT solüsyonundan her bir kuyucuğa 10 µl eklendi ve 37°C'de 4 saat inkübe edildi.

Formazan kristalleri oluşumu invert mikroskopla tek tek incelendi ve fotoğrafları çekildi. MTT durdurucu solüsyondan 100 µl eklendi 30 dakika oda sıcaklığında beklenip formazan kristallerinin çözüldüğü kontrol edildi. Aynı işlemler polimer besiyeri etkileşimini kontrol etmek amacıyla, hücre bulunmayan sadece besiyeri ilave edilmiş 96 kuyucuklu plaklarda da yapıldı. Son olarak optik yoğunluğu ölçmek üzere 96 kuyucuklu plağın kapağı açılarak 450 nm dalga boyuna ayarlanmış ELISA cihazına yerleştirildi ve cihazın optik ölçüm sonuçları bilgisayar ortamından alındı.

XTT testi için de canlılığı ölçülecek hücreler düz tabanlı 96 kuyucuklu plaklara ekildi. Yüzey kaplaması tamamlandıktan veya yeterli yoğunluğa ulaştıktan sonra (24 veya 48 saat) ortama polimer ilave edildi. Madde ile 48 saat

inkübasyonun ardından XTT (2,3,-bis [2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil+2H-tetrazolium-5-kaboks-nilit tuzu) ajanı reaktif 1: cell proliferation kit II (XTT, labelling agent, roche) ve aktivasyon ajanı reaktif II: cell proliferation kit II XTT, electron coupling reagent, Roche)' ndan oluşmaktadır. Reaktifler 50 / 1 XTT ajanı (Labelling reagent) / Aktivasyon ajanı (electron coupling reagent) olacak şekilde karıştırılarak XTT solüsyonu hazırlandı. Bu solüsyondan her bir kuyucuğa 10 µl eklendi ve 37°C'de 4 saat inkübe edildi. Optik yoğunluğu ölçmek üzere 96 kuyucuklu plağın kapağı açılarak 450 nm dalga boyuna ayarlanmış ELISA cihazına yerleştirildi ve cihazın optik ölçüm sonuçları bilgisayar ortamından alındı.

L929 hücrelerinde her iki test için hücre canlılığı yüzdesi; her bir kuyucukta ölçülen optik dansite değerinin kontrol optik dansite değerine bölünmesi ve yüz ile çarpılması ile hesaplandı.

$$\% \text{ Hücre canlılığı} = \frac{\text{Ölçülen optik dansite değeri}}{\text{Kontrol optik dansite değeri}} \times 100$$

MCF-7 hücreleri için hücre ölümü yüzdesi (% inhibisyon); kontrol optik dansite değerinden her bir kuyucukta ölçülen optik dansite değerinin çıkarılması ve sonucun kontrol optik dansite değerine bölünmesi ve yüz ile çarpılması ile hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{\text{Kontrol optik dansite değeri} - \text{Ölçülen optik dansite değeri}}{\text{Kontrol optik dansite değeri}} \times 100$$

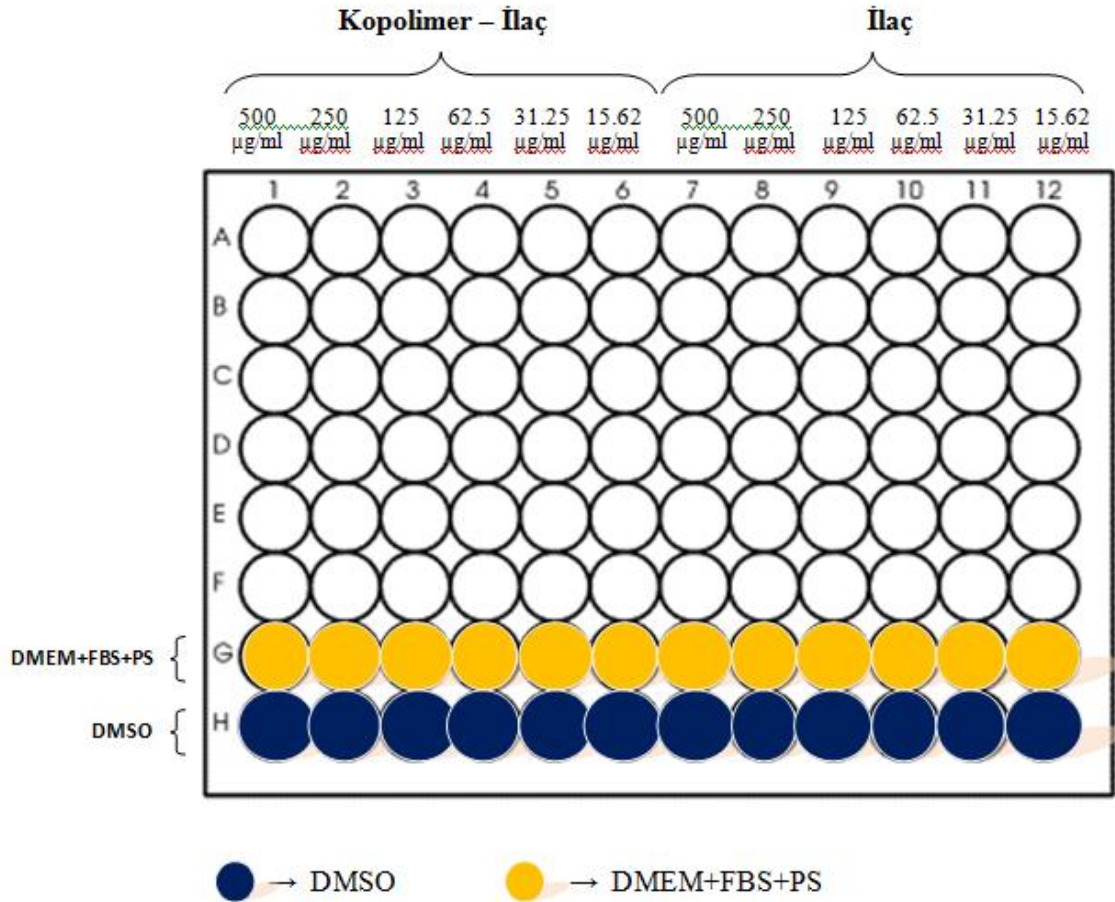
3.9.1. Antitümör Aktivite Testleri / MCF-7 Meme Kanseri Hücreleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Flasktaki, MCF-7 hücrelerinin yüzey kaplaması tamamen gerçekleştikten sonra hücrelerin pasajlanması bölümünde anlatıldığı gibi, hücreler tripsinize edildi. Santrifüj edip süpernatant kısmı döküldükten sonra, hücre sayımı yapıldı. Hücreler ml'de 1×10^5 MCF-7 hücresi olacak şekilde DMEM (fenol red'siz) besiyeri içerisinde deneyde kullanılacak miktarda hazırlandı. Besiyerinin üzerine

%10 FBS + %1 Penisilin-Streptomisin eklenerek süspansiyon oluşturuldu. Hazırlanan hücre süspansiyonundan her kuyucuğa 100 µl (1×10^4 hücre/kuyucuk) eklendi. Kuyucuk sayısı kopolimer-ilaç çiftleri ve ilacın her konsantrasyonu için 6 şar kuyucuk olacak şekilde hesaplandı. Süspansiyonun dağılımının eşit olduğu mikroskop ile incelendikten sonra, 37°C'lik CO₂ etüvüne kaldırıldı ve 24 saat inkübe edildi.

3.9.1.1. MTT Testinin Uygulanması

İnkübasyon sonunda hücrelerin yüzey kaplamalarının ve genel durumlarının normal olduğu tespit edildikten sonra kuyucuklardaki besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı. Kopolimer-ilaç çiftleri ve sadece ilaç içeren çözeltiler hazırlandı ve Şekil 3.1' de gösterilen konsantrasyonlarda 100 er µl olarak kuyucuklara eklendi. Pozitif kontrole 100 µl DMEM (fenol red'siz) + %10 FBS + %1 Penisilin-Streptomisin süspansiyonu, negatif kontrole DMSO eklendi.



Şekil 3.1. Solüsyonların 96'lık plakta dağılımı.

Bütün kuyucuklardaki son hacim 100 µl DMEM (fenol red'siz) + %10 FBS + %1 Penisilin-Streptomisin süspansiyonu ile 200 µl' ye tamamlandı. İşlem tamamlandıktan sonra plak 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Daha önceki bölümde açıklandığı gibi hazırlanan 10 mg/ml MTT solüsyonundan her kuyucuğa 10 µl eklendi ve 37°C'de 4 saat inkübe edildi. Formazan kristalleri oluşumu invert mikroskopla tek tek incelendi ve fotoğrafları çekildi. MTT durdurucu solüsyondan 100 µl eklendi, formazan kristallerinin tamamen çözüldüğü mikroskopik olarak incelendi ve 30 dakika oda sıcaklığında beklenip ELISA cihazı ile 450 nm dalga boyunda optik yoğunluk ölçüldü.

3.9.2. Toksik Aktivite Testleri / L929 Fibroblast Hücreleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Flasktaki, L929 hücrelerinin yüzey kaplaması tamamen gerçekleştikten sonra hücrelerin pasajlanması bölümünde anlatıldığı gibi, hücreler tripsinize edildi. Santrifüj edip süpernatant kısmı döküldükten sonra, hücre sayımı yapıldı. Hücreler ml'de 1×10^5 L929 hücresi olacak şekilde DMEM (fenol kırmızısı boyası içermeyen) besiyeri içerisinde deneyde kullanılacak miktarda hazırlandı. Besiyerinin üzerine %10 FBS + %1 Penisilin-Streptomisin eklenerek süspansiyon oluşturuldu. Hazırlanan hücre süspansiyonundan her kuyucuğa 100 µl (1×10^4 hücre/kuyucuk) eklendi. Kuyucuk sayısı kopolimer-ilaç çiftleri ve ilacın her konsantrasyonu için 6 kuyucuk olacak şekilde hesaplandı. Hücrelerin dağılımının eşit olduğu mikroskop ile incelendikten sonra, 37°C'lik CO₂ etüvüne kaldırıldı ve 24 saat inkübe edildi.

3.9.2.2. XTT Testinin Uygulanması

İnkübasyon sonunda hücrelerin yüzey kaplamalarının ve genel durumlarının normal olduğu tespit edildikten sonra kopolimer-ilaç çiftleri ve sadece ilaç içeren çözeltiler hazırlandı ve Şekil 3.1' de gösterilen konsantrasyonlarda 100 er µl olarak kuyucuklara eklendi. Pozitif kontrole 100 µl DMEM (fenol red'siz) + %10 FBS + %1 Penisilin-Streptomisin süspansiyonu, negatif kontrole DMSO eklendi.

Bütün kuyucuklardaki son hacim 100 µl DMEM (fenol red'siz) + %10 FBS + %1 Penisilin-Streptomisin süspansiyonu ile 200 µl' ye tamamlandı. İşlem tamamlandıktan sonra plak 37°C'de 24 saat inkübe edildi. XTT solüsyonu bir

önceki bölümde açıklandığı gibi hazırlandı. Bu solüsyondan her kuyucuğa 10 µl eklendi ve 37°C’de 4 saat inkübe edildi. ELISA cihazı ile 450 nm dalga boyunda optik yoğunluk ölçüldü.

3.10. İstatistiksel Analizler

Sonuçların istatistiki değerlendirilmesi SPSS (Statistical Packages of Social Sciences version 16.0 for Windows, Mann-Whitney U Testi) programı ile yapıldı. “ $p<0,05$ ” değeri istatistiki olarak anlamlı kabul edildi.

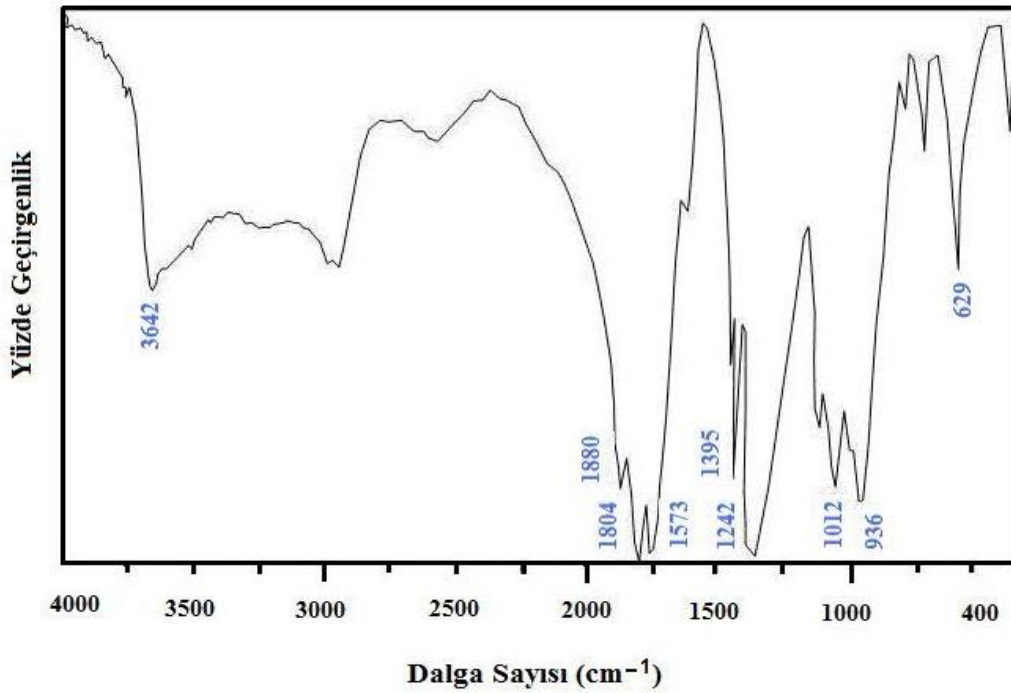
4. BULGULAR

4.1. Kopolimerlerin Yapısal Karakterizasyonu

Maleik anhidrit-vinil asetat kopolimerinin yapısal karakterizasyonu Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi (FTIR) ve Nükleer Manyetik Rezonans Spektrometresi ($^1\text{H-NMR}$) ile yapıldı.

4.1.1. Kopolimerin FTIR analizi

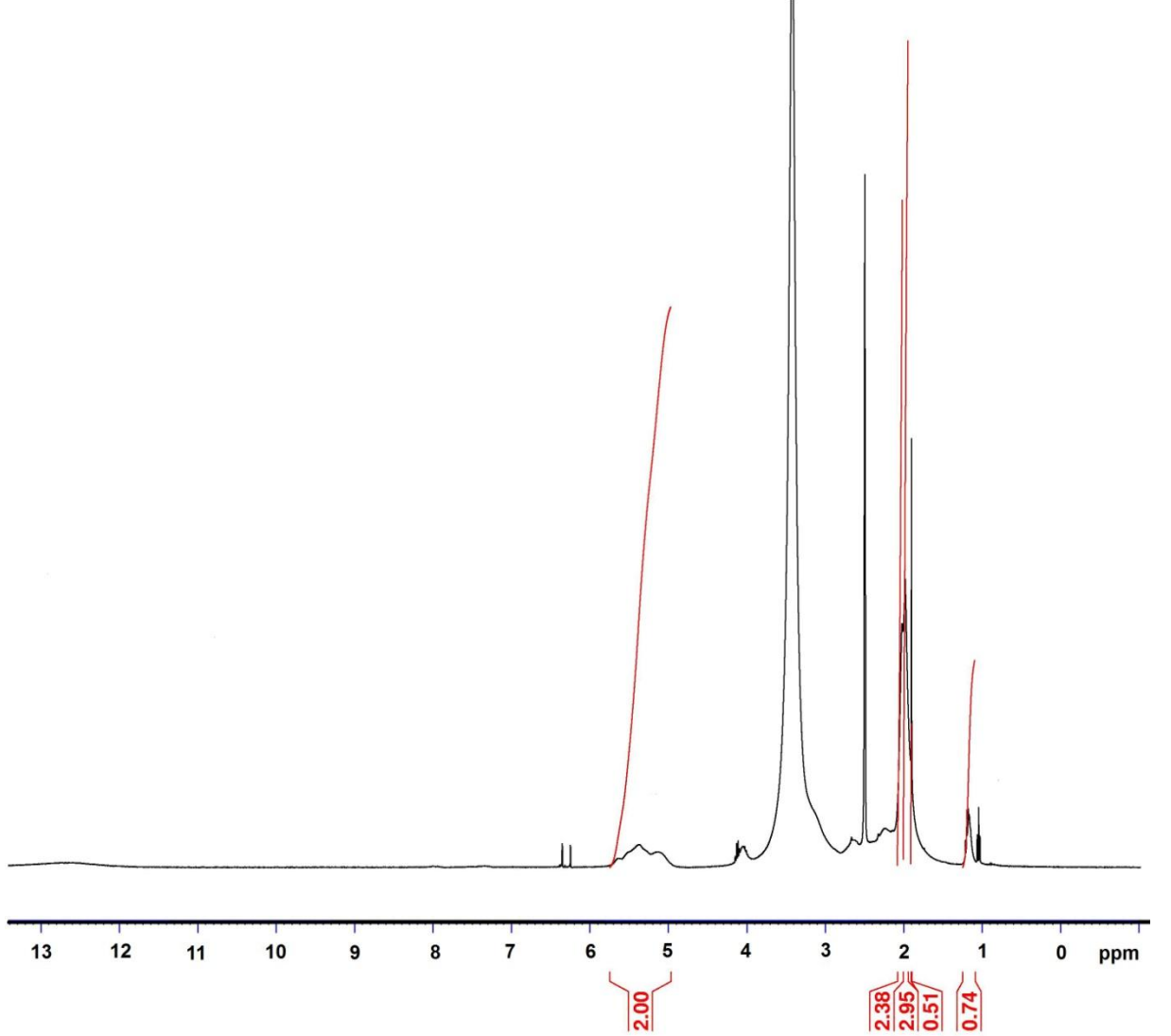
Yapıda görülen en karakteristik birim olan maleik anhidrite ait 1880 ve 1804 cm^{-1} 'deki karakteristik pikler sırasıyla simetrik ve asimetrik anhidrit karbonil (C=O) grubuna ait gerilme titreşimleridir [98]. Şekil 4.1'deki spektrumda 1242 cm^{-1} ve 1012 cm^{-1} 'deki karakteristik pikler C-O bağına ait gerilme titreşimi ve 1395 cm^{-1} 'deki pik ise vinil asetattaki metil (CH_3) grubunun gerilme titreşimidir [99].



Şekil 4.1. Maleik anhidrit-vinil asetat kopolimerinin FTIR spektrumu.

4.1.2. Kopolimerlerin $^1\text{H-NMR}$ Analizi

Aşağıda görüldüğü gibi Şekil 4.2'deki $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda maleik anhidrit-vinil asetat kopolimerindeki maleik anhidrite ait 2 protonun kimyasal kayma değeri 5.4 ppm'de ortaya çıkmıştır, metil ($-\text{CH}_3$) protonları 2 ppm'de yer almıştır [100]. Metilen ($-\text{CH}_2$) pikleri ise 2 ppm civarında gözlenmiştir. Yapıda oksijene bağlı $-\text{CH}$ piki ise 1.1 ppm'de çoklu pikler olarak bulunmuştur [17].



Şekil 4.2. Maleik anhidrit-vinil asetat kopolimerinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu.

4.1.3. Kopolimerlerin Çözünürlüğü ve Fiziksel Özellikleri

Maleik anhidrit-vinil asetat kopolimeri açık pembe görümlü, toz şeklinde oldukça homojen bir yapıdadır. Suda çözünmediği gibi; sikloheksan, ksilen, kloroform, n-hekzan, toluen, benzen gibi organik solventlerde çözünmez. Dimetilformamid, etilmetil keton, tetrahidrofuran, dimetilsulfoksit, aseton, 1,4-dioksan ve piridin organik solventlerinde çözünmektedir.

4.1.4. Kopolimerlerin Tepkimeleri

Burada FTIR spektroskopisi ile alınan spektrum sonuçlarına, sadece maleik anhidrite ait anhidrit halkasının ilaç etken maddesiyle açılıp açılmadığının belirlenmesinde öngörude bulunmak için başvuruldu. Bu nedenle FTIR ile tam bir yapı aydınlatması yapılamadığı ve sadece anhidrit halkasının açılıp açılmadığına dair bir fikir verdiği için ayrıca NMR analizine de gerek duyuldu.

4.2. Kopolimerlerin Antimikrobiyal Aktivitesi

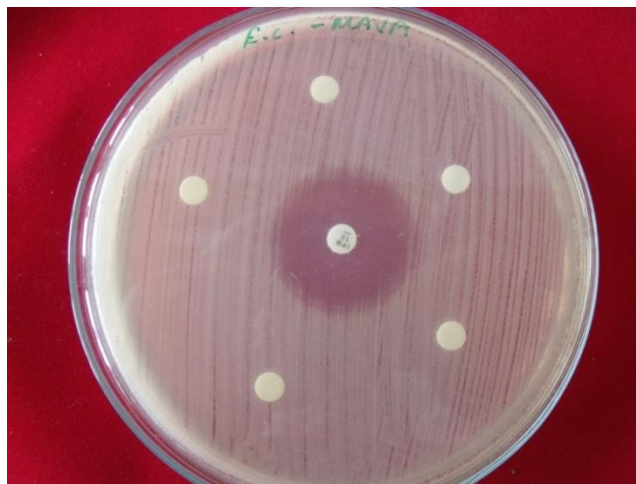
Kopolimerlerin antimikrobiyal aktivitelerini incelemek için gram-pozitif bakteri olarak *S. aureus*, *E. faecalis*, *Meticillin-Resistant Staphylococcus aureus*; gram-negatif bakteri olarak *E. coli* ve *P. aeruginosa*; mantar olarak *C. albicans* ile Disk Difüzyon Yöntemi kullanılarak çalışılmıştır.

4.2.1. MAVA Kopolimerinin Antimikrobiyal Aktivitesi

MAVA kopolimerinin farklı sulandırılmalarının emdirildiği diskler etrafında inhibisyon zonu oluşmamıştır. Pozitif kontrol olarak kullanılan antibiyotik disklerinin etrafında inhibisyon zonları oluşmuştur.



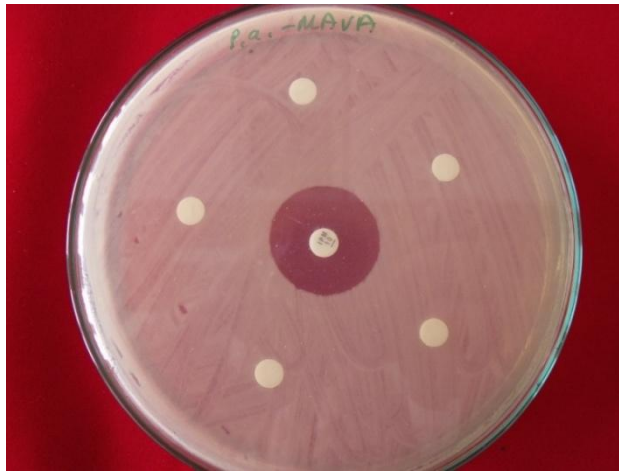
Şekil 4.3. MAVA'nın *Staphylococcus aureus*'a antibakteriyel etkisi



Şekil 4.4. MAVA'nın *Escherichia coli*'ye antibakteriyel etkisi



Şekil 4.5. MAVA'nın *Meticillin-Resistant Staphylococcus aureus*'a antibakteriyel etkisi



Şekil 4.6. MAVA'nın *Pseudomonas aeruginosa*'ya antibakteriyel etkisi



Şekil 4.7. MAVA'nın *Enterococcus faecalis*'e antibakteriyel etkisi



Şekil 4.8. MAVA'nın *Candida albicans*'a antifungal etkisi

MAVA kopolimerinin *S. aureus*, *E. faecalis*, *Meticillin-Resistant Staphylococcus aureus*; *E. coli* ve *P. aeruginosa*, *C. albicans* mikroorganizmaları üzerine antibakteriyel ve antifungal aktivitesi tespit edilmemiştir.

4.2.2. MAST Kopolimerinin Antimikrobiyal Aktivitesi

MAST kopolimerinin farklı sulandırılmalarının emdirildiği diskler etrafında inhibisyon zonu oluşmamıştır. Negatif kontrol olarak kullanılan antibiyotik disklerinin etrafında inhibisyon zonları oluşmuştur.



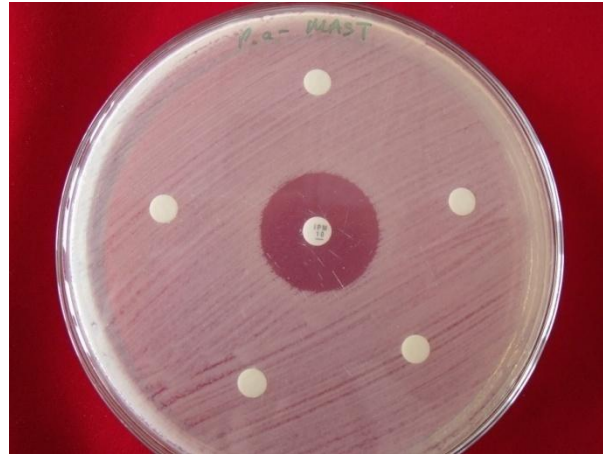
Şekil 4.9. MAST'ın *Staphylococcus aureus*'a antibakteriyel etkisi



Şekil 4.10. MAST'ın *Escherichia coli* 'ye antibakteriyel etkisi



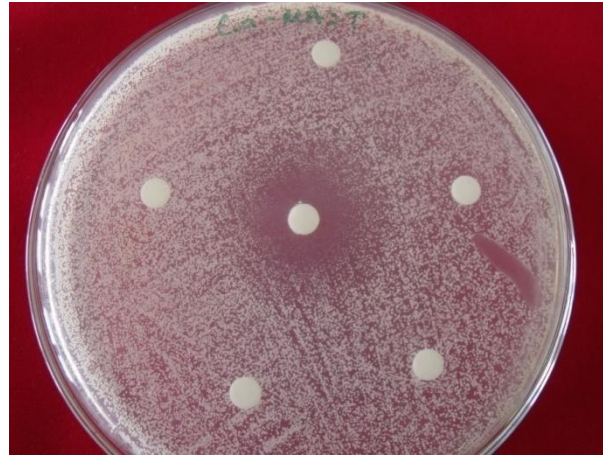
Şekil 4.11. MAST'ın *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*'a antibakteriyel etkisi



Şekil 4.12. MAST'ın *Pseudomonas aeruginosa* 'ya antibakteriyel etkisi



Şekil 4.13. MAST'ın *Enterococcus faecalis* 'e antibakteriyel etkisi



Şekil 4.14. MAST'ın *Candida albicans* 'a antifungal etkisi

MAST kopolimerinin *S. aureus*, *E. faecalis*, *Meticillin-Resistant Staphylococcus aureus*; *E. coli* ve *P. aeruginosa*, *C. albicans* mikroorganizmaları üzerine antibakteriyel ve antifungal aktivitesi tespit edilmemiştir.

4.2.3. MAMMA Kopolimerinin Antimikrobiyal Aktivitesi

MAMMA kopolimerinin farklı sulandırımının emdirildiği diskler etrafında inhibisyon zonu oluşmamıştır. Negatif kontrol olarak kullanılan antibiyotik disklerinin etrafında inhibisyon zonları oluşmuştur.



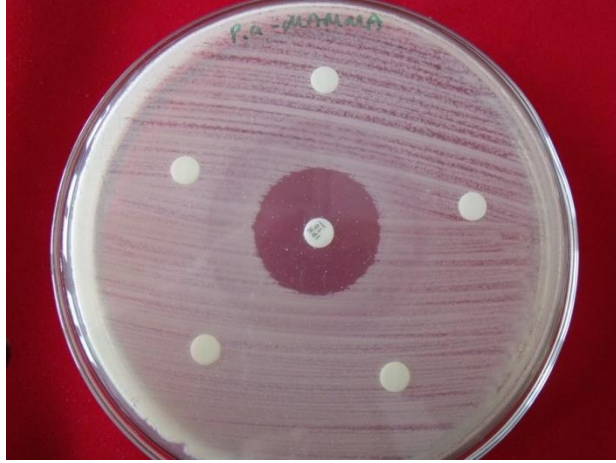
Şekil 4.15. MAMMA'nın *Staphylococcus aureus*'a antibakteriyel etkisi



Şekil 4.16. MAMMA'nın *Escherichia coli*'ye antibakteriyel etkisi



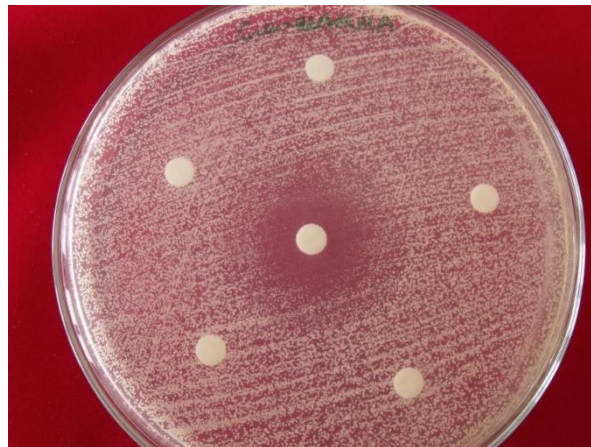
Şekil 4.17. MAMMA'nın Meticillin-Resistant *Staphylococcus aureus*'a antibakteriyel etkisi



Şekil 4.18. MAMMA'nın *Pseudomonas aeruginosa* 'ya antibakteriyel etkisi



Şekil 4.19. MAMMA'nın *Enterococcus faecalis* 'e antibakteriyel etkisi



Şekil 4.20. MAMMA'nın *Candida albicans* 'a antifungal etkisi

MAMMA kopolimerinin *S. aureus*, *E. faecalis*, *Meticillin-Resistant Staphylococcus aureus*; *E. coli* ve *P. aeruginosa*, *C. albicans* mikroorganizmaları üzerine antibakteriyel ve antifungal aktivitesi tespit edilmemiştir.

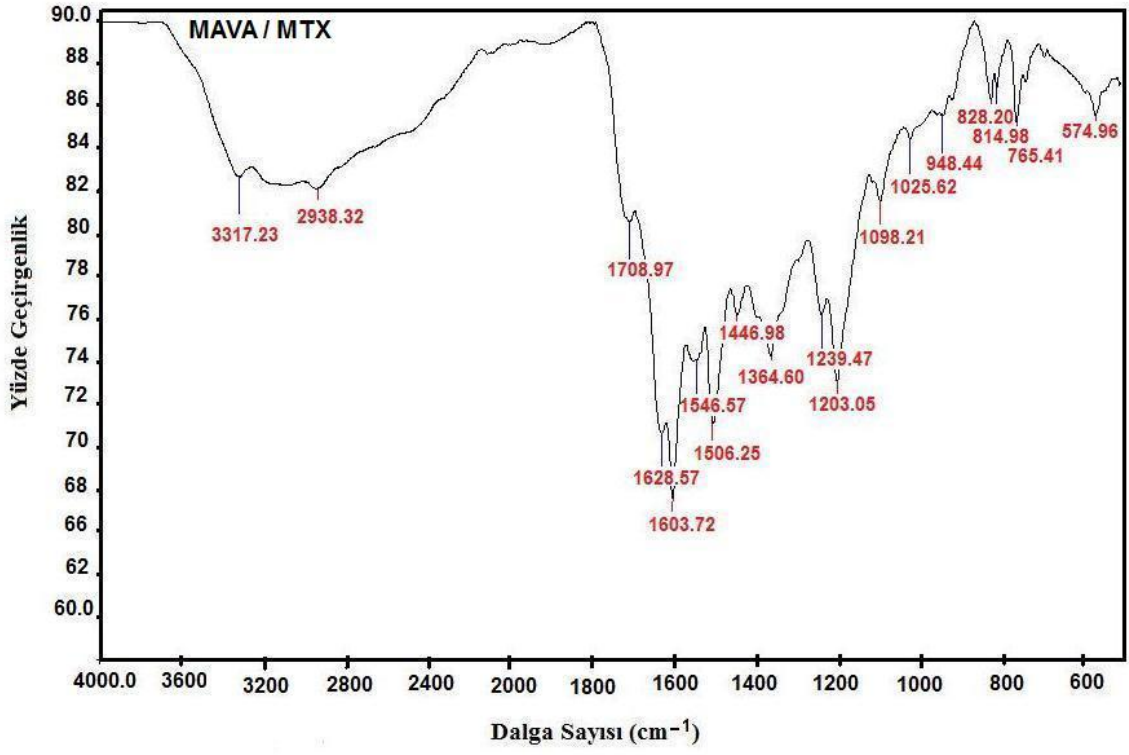
4.3. Kopolimer-İlaç Çiftlerinin Yapısal Karakterizasyonu

Burada FTIR spektroskopisi ile alınan spektrum sonuçlarına, sadece maleik anhidrite ait anhidrit halkasının ilaç etken maddesiyle açılıp açılmadığının belirlenmesinde öngöründe bulunmak için başvuruldu. Bu nedenle FTIR ile tam bir yapı aydınlatması yapılamadığı ve sadece anhidrit halkasının açılıp açılmadığına dair bir fikir verdiği için ayrıca NMR analizine de gerek duyuldu [98].

4.3.1. Kopolimer-İlaç Çiftlerinin FTIR Analizi

4.3.1.1. MAVA Kopolimeri-Amethopterin (Methotrexate) Çiftinin FTIR Spektrumu

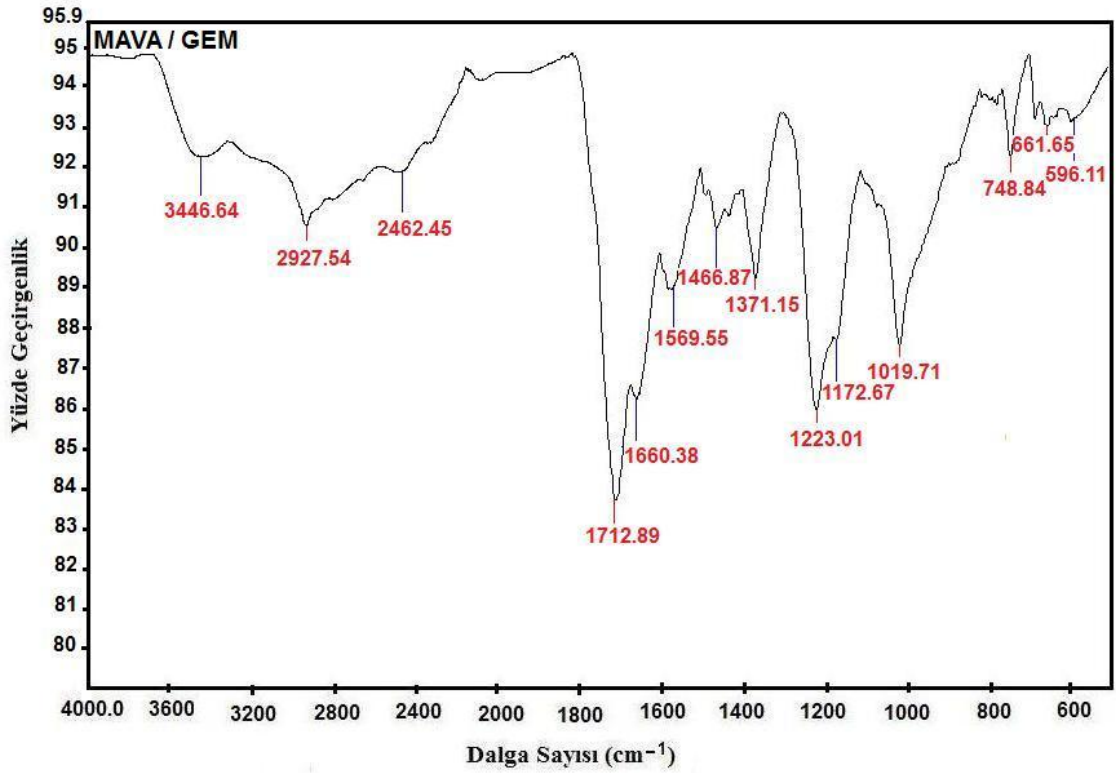
Kopolimerin yapısında görülen en karakteristik birim olan maleik anhidrite ait simetrik ve asimetrik anhidrit karbonil (C=O) grubuna ait gerilme titreşimleri olan 1880 ve 1804 cm^{-1} 'deki karakteristik pikler tamamen kaybolmuştur [98]. Bunun nedeni yapıdaki anhidrit halkasının ilaç etken maddesi MTX ile açılmış olmasıdır. Şekil 4.21' deki spektrumda 1239.47 cm^{-1} 'deki karakteristik pik MAVA kopolimerine ait C-O bağına ait gerilme titreşimidir [99]. MTX molekülünün karakteristik fonksiyonel grup pikleri MAVA/MTX spektrumunda gözlenen diğer pikler; 3317.23 cm^{-1} , 1628.57 cm^{-1} , 1603.72 cm^{-1} , 1546.57 cm^{-1} , 1506.25 cm^{-1} , 1446.98 cm^{-1} , 1364.60 cm^{-1} , 1203.05 cm^{-1} , 1098.21 cm^{-1} , 948.44 cm^{-1} , 828.20 cm^{-1} , 814.98 cm^{-1} , 765.41 cm^{-1} ve 574.96 cm^{-1} pikler MTX molekülünden kaynaklanmaktadır. Spektrumdaki diğer 3 pik için sırasıyla 2938.32 cm^{-1} , 1708.97 cm^{-1} ve 1025.62 cm^{-1} 'dir. 2938.32 cm^{-1} yapıdaki C-H gerilmesinden kaynaklanmaktadır. Normalde 1695 civarında çıkması gereken amit (-N-C=O bağı) ya da karboksilik asit (-COOH bağı) piki burada çok az bir kayma ile 1708.97 cm^{-1} civarında gözlenmiştir. Yapıda amit/karboksilik asit piklerinin görülmesi ilacın polimere bağlanmasının en önemli kanıtıdır. Ve 1025.62 cm^{-1} piki maleik anhidrit halkasının C-O-C gerilme titreşiminden ileri gelmektedir.



Şekil 4.21. MAVA Kopolimeri-Amethopterin (Methotrexate) Çiftinin FTIR Spektrumu.

4.3.1.2. MAVA Kopolimeri-Gemcitabine Çiftinin FTIR Spektrumu

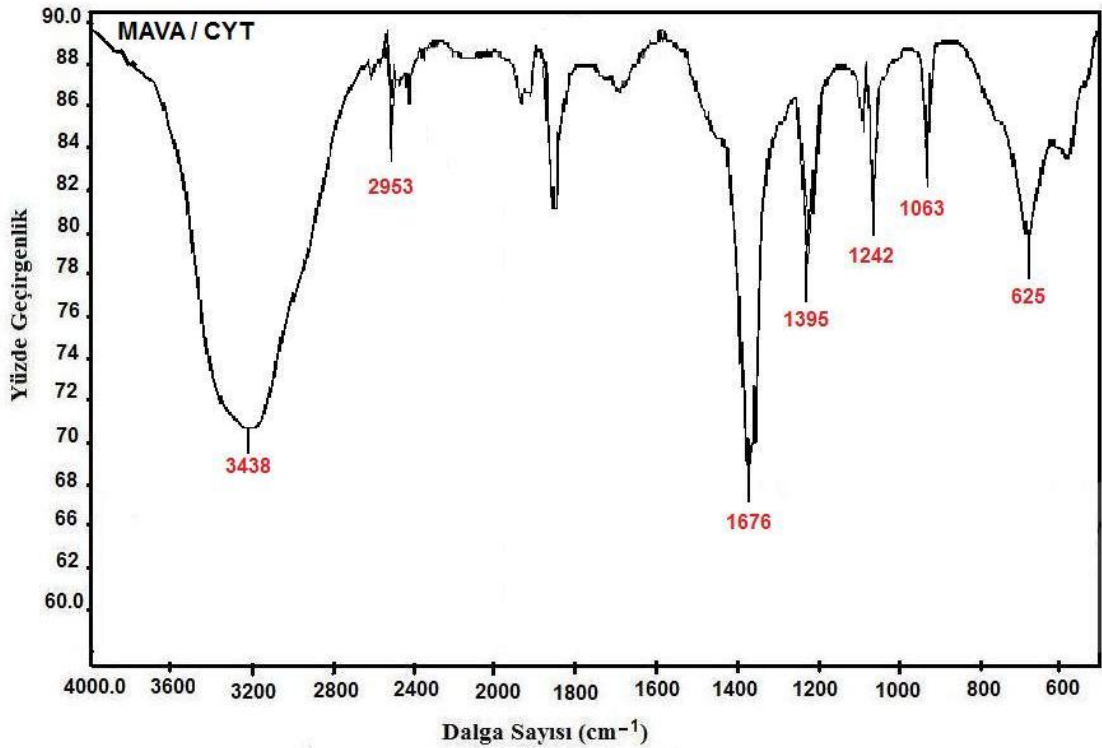
Kopolimerin yapısında görülen en karakteristik birim olan maleik anhidrite ait simetrik ve asimetrik anhidrit karbonil (C=O) grubuna ait gerilme titreşimleri olan 1880 ve 1804 cm^{-1} 'deki karakteristik pikler tamamen kaybolmuştur [100]. Bunun nedeni yapıdaki anhidrit halkasının ilaç etken maddesi GEM ile açılmış olmasıdır. GEM molekülünün karakteristik fonksiyonel grup pikleri MAVA/GEM spektrumunda gözlenen diğer pikler; 2927.54 cm^{-1} , 1466.87 cm^{-1} , 1371.15 cm^{-1} , 1019.71 cm^{-1} ve 748.84 cm^{-1} pikler GEM molekülünden kaynaklanmaktadır. Spektrumdaki diğer pikler için ise sırasıyla şu şekildedir; kopolimere ait C=O gerilme titreşimi 1712.89 cm^{-1} 'de, 1660.38 cm^{-1} 'de amid grubuna ait N-H bağı, 1569.55 cm^{-1} yapıdaki CH_2 grubuna ait pik, 596.11 cm^{-1} ise C-C gerilmesinden kaynaklanan piktir. 3446.64 cm^{-1} ise OH grubunun titreşimleridir.



Şekil 4.22. MAVA Kopolimeri-Gemcitabine Çiftinin FTIR Spektrumu.

4.3.1.3. MAVA Kopolimeri-Cytarabine Çiftinin FTIR Spektrumu

Şekil 4.23’de görüldüğü gibi, maleik anhidritin karakteristik olan 1880 cm^{-1} ve 1804 cm^{-1} ’deki simetrik ve asimetric $\text{C}=\text{O}$ gerilme titreşimleri kaybolarak yerini 1676 cm^{-1} değerine bırakmıştır [101]. Pik değerlerindeki bu değişim maleik anhidritteki anhidrit halkasının ilaç etken maddesi cytarabine (CYT) tarafından açıldığını göstermektedir. Ayrıca 1676 cm^{-1} ’deki pik; amid yapısındaki karbonil ($\text{C}=\text{O}$) titreşimine ait gerilmeyi göstermektedir. Vinil asetatın metil (CH_3) grubunun gerilme titreşimi ise 1395 cm^{-1} ’de ortaya çıkmıştır. Spektrumda 3438 cm^{-1} ’de görülen band genellikle $3600\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ ’de ortaya çıkan genellikle yapıdaki amid grubuyla ilgili simetrik ve asimetric N-H gerilme titreşimine ait karakteristik bir band olup geniş olmasının nedeni moleküller arası hidrojen bağıdır [102]. C-H bağının piki 2953 cm^{-1} değerinde gözlenirken, vinil asetatın COCH_3 grubuna ait gerilme bandı 1063 cm^{-1} ’de gözlenmiştir.



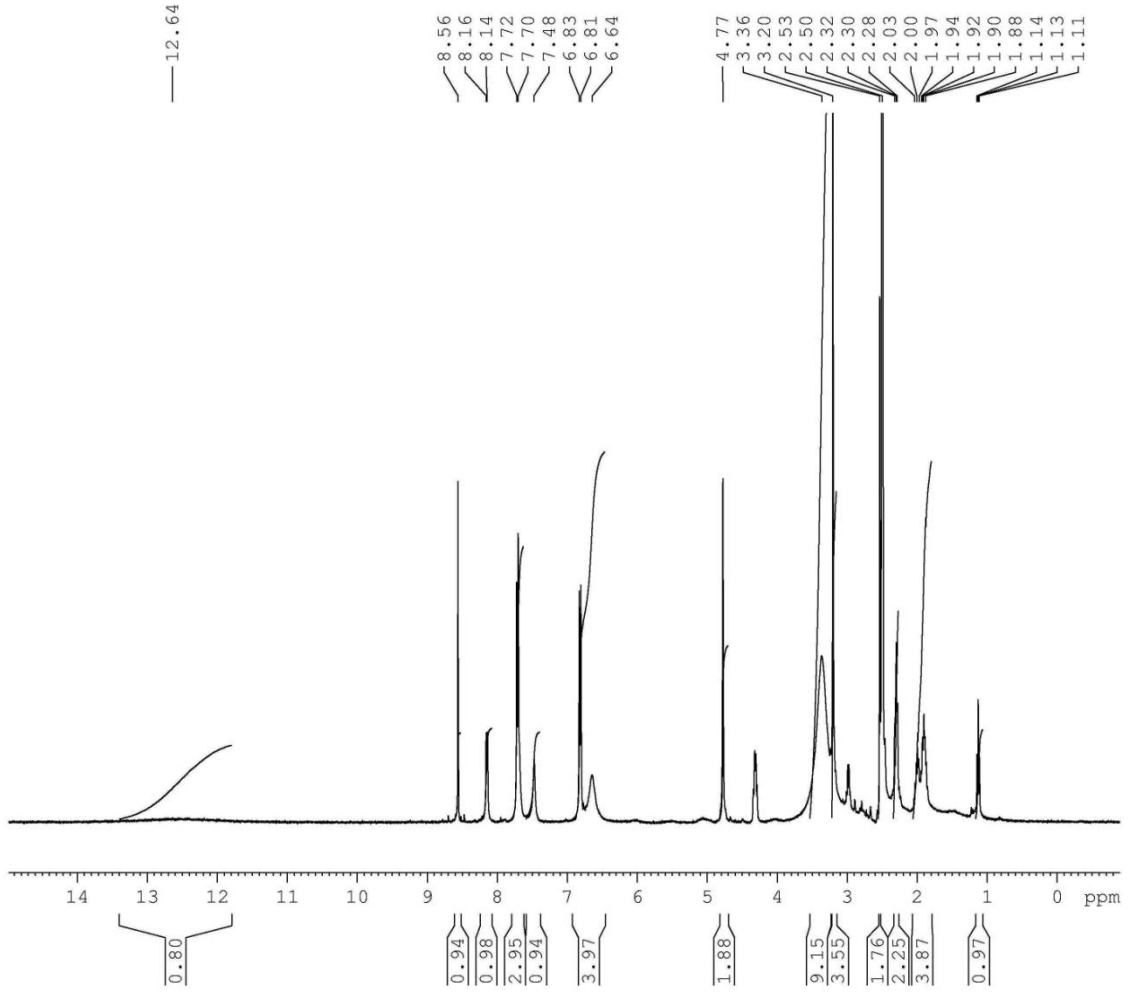
Şekil 4.23. MAVA Kopolimeri-Cytarabine Çiftinin FTIR Spektrumu.

4.3.2. Kopolimer-İlaç Çiftlerinin ¹H-NMR Analizi

4.3.2.1. MAVA Kopolimeri-Amethopterin Çiftinin ¹H-NMR Spektrumu

Şekil 4.24’ de görüldüğü gibi MAVA kopolimerinde maleik anhidritin 2 protonun kimyasal kayma değeri 5,4 ppm civarında olup spektrumda 4.77 ppm değerine kaymıştır. Vinil asetatın metilen (CH₂) pikleri 1.88 ppm’de gözlenmiştir. MAVA kopolimerinin metil (-CH₃) protonları spektrumda 2 ppm’ oldukça yakın 1.94 ve 1.97 ppm’de gözlenmiştir. Kopolimerin metilen -CH₂ pikleri ise bu pikin hemen yanında 2 ppm civarında gözlenmiştir. Yine MAVA kopolimeriyle ilişkili olarak oksijene bağlı -CH piki ise yine spektrumda 1,1 ppm civarında multipler olarak 1.11, 1.13 ve 1.14 ppm’de gözlenmiştir. Bu spektrumda etken maddenin MAVA kopolimerine bağlanmasının en önemli kanıtı, MTX etken maddesinin karakteristik fonksiyonel grup pikleri olan; 1.90, 1.92, 2.00, 2.03, 2.32, 2.50, 2.53, 3.20, 3.36, 6.64, 6.81, 6.83, 7.48, 7.70, 7.72, 8.14, 8.16 ve 8.56 ppm pik değerlerinin spektrumda gözlenmesidir. Eğer bağlanma olmasaydı MTX’den gelen -NH₂ grubuna ait pik, genellikle spektrumda 10,55 ppm civarında ortaya çıkardı. Sonuçlar göz önüne alındığında MTX etken maddesinin oldukça başarılı bir amitleşme mekanizması ile MAVA kopolimerine bağlandığı söylenebilir.

MAVA / MTX



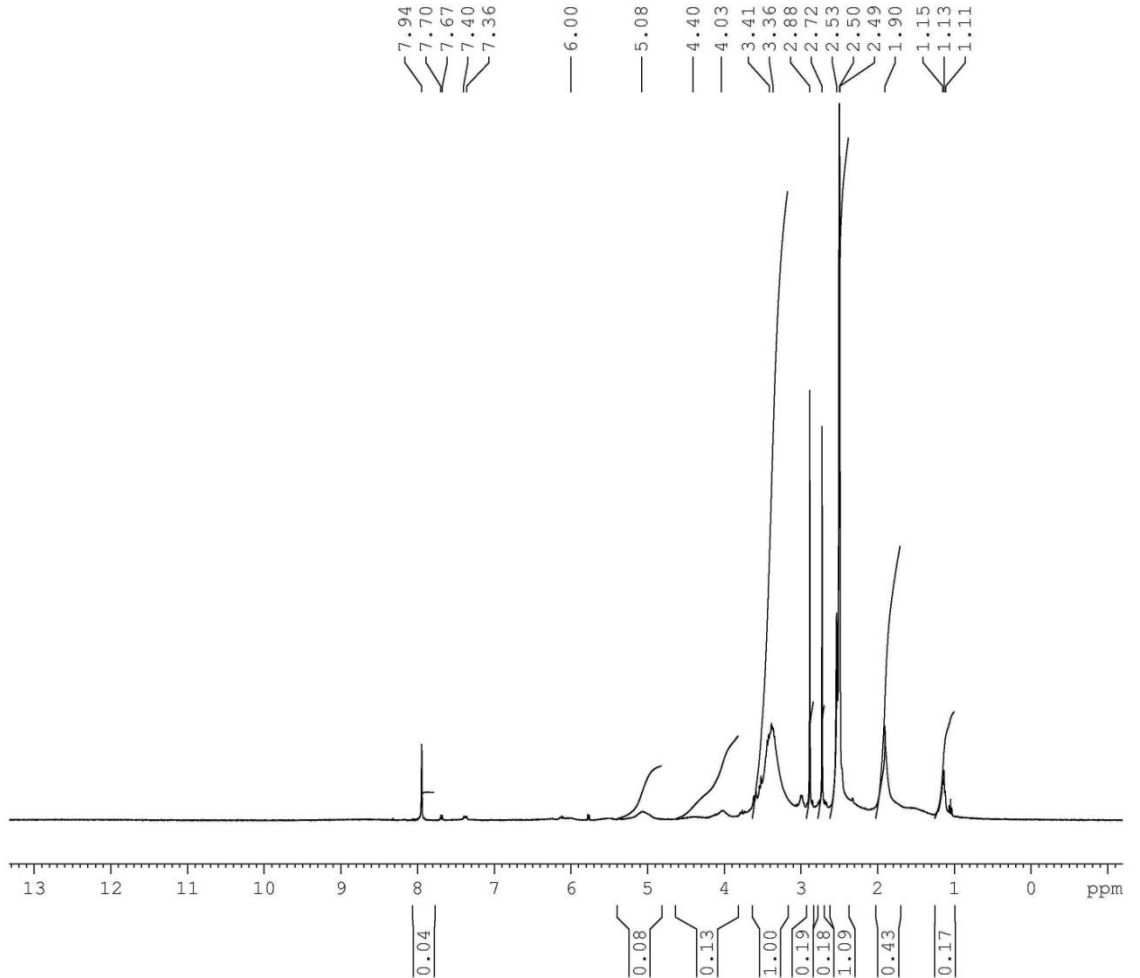
Şekil 4.24. MAVA Kopolimeri-Ametopiterin Çiftinin ^1H -NMR spektrumu.

4.3.2.2. MAVA Kopolimeri-Gemcitabine Çiftinin ^1H -NMR Spektrumu

Karakteristik olarak MAVA kopolimerinde maleik anhidrite ait olan 2 protonun kimyasal kayma değeri spektrumda 5,4 ppm civarında olup 5.08 ppm değerine kaymıştır. Yine MAVA kopolimeriyle ilişkili olarak oksijene bağlı $-\text{CH}$ piki ise yine spektrumda 1,1 ppm civarında multipler olarak 1.11, 1.13 ve 1.15 ppm'de gözlenmiştir. Metil ($-\text{CH}_3$) protonları spektrumda 2 ppm civarında gözlenmesi gerekirken GEM etken maddesinin grup pikleri tarafından maskelenmiştir. Metilen $-\text{CH}_2$ pikleri ise normalde 2 ppm civarında gözlenirken, spektrumda 1.90 ppm değerinde gözlenmiştir. Maleik anhidritin $-\text{CH}$ protonlarına ait 2.53, 2.72 ve 2.88 ppm'de ortaya çıkmıştır. Bu spektrumda etken maddenin MAVA kopolimerine bağlanmasının en önemli kanıtı ise, GEM etken maddesinin

karakteristik fonksiyonel grup pikleri olan; 2.50, 3.36, 3.37, 3.38, 6.07, 6.10 ve 8.04 ppm pik değerlerinin spektrumda çok az bir kayma ile 2.50, 3.36, 3.41, 5.08, 6.00 ppm şeklinde gözlenmesidir. Ayrıca zayıf olmakla birlikte -NH(-CONH-) amid grubu pikleri de 7.70 ppm'de gözlenmiştir. Bu sonuçlar GEM etken maddesinin MAVA kopolimerine bağlandığının en önemli kanıtıdır. Eğer bağlanma olmasaydı CF' den gelen -NH₂ grubuna ait pik, genellikle spektrumda 10,55 ppm civarında ortaya çıkardı. Sonuçlar göz önüne alındığında GEM etken maddesinin amitleşme mekanizması ile MAVA kopolimerine bağlandığı söylenebilir.

MAVA / GEM

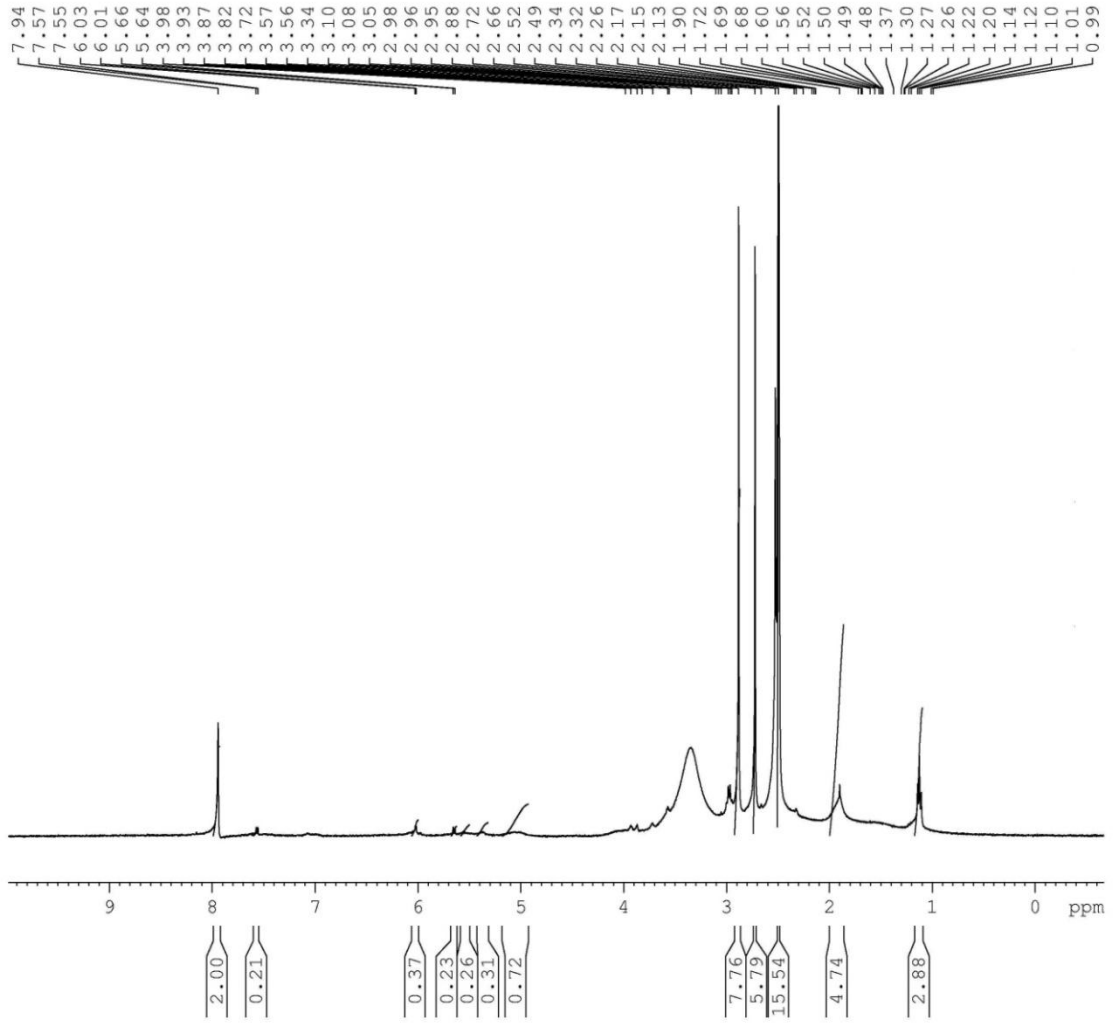


Şekil 4.25. MAVA Kopolimeri-Gemcitabin Çiftinin ¹H-NMR spektrumu.

4.3.2.3. MAVA Kopolimeri-Cytarabine Çiftinin ¹H-NMR Spektrumu

Karakteristik olarak MAVA kopolimerinde maleik anhidrite ait olan 2 protonun kimyasal kayma değeri spektrumda 5,4 ppm civarında olup 5.64 ppm'de gözlenmiştir. Metil (-CH₃) protonları spektrumda 2 ppm civarında gözlenmiştir. Metilen -CH₂ pikleri ise bu pikin hemen yanında 2 ppm civarında gözlenmiştir. Oksijene bağlı -CH piki ise yine spektrumda 1,1 ppm' de multipler olarak gözlenmiştir. Şekil 4.26'de görüldüğü gibi, spektrumun 0-5 ppm aralığı MAVA kopolimerinin ¹H-NMR spektrumuna yaklaşık olarak benzer olup, göze çarpan farklılık; 7,9 ppm civarındaki aromatik halkaya ait olan pik ve 2,5-3,3 ppm'de görünen amid yapısına ait -NH grubunu temsil eden piklerdir. Aromatik halka ilaç etken maddesi siterabin (CYT) molekülünün kimyasal yapısından gelmektedir. Bu CYT etken maddesinin MAVA kopolimerine bağlandığının en önemli kanıtıdır. Eğer bağlanma olmasaydı CYT'den gelen -NH₂ grubuna ait pik, genellikle spektrumda 10,55 ppm civarında ortaya çıkardı. Sonuçlar göz önüne alındığında CYT etken maddesinin amitleşme mekanizması ile MAVA kopolimerine bağlandığı söylenebilir.

MAVA / CYT



Şekil 4.26. MAVA Kopolimeri-Siterabin Çiftinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu.

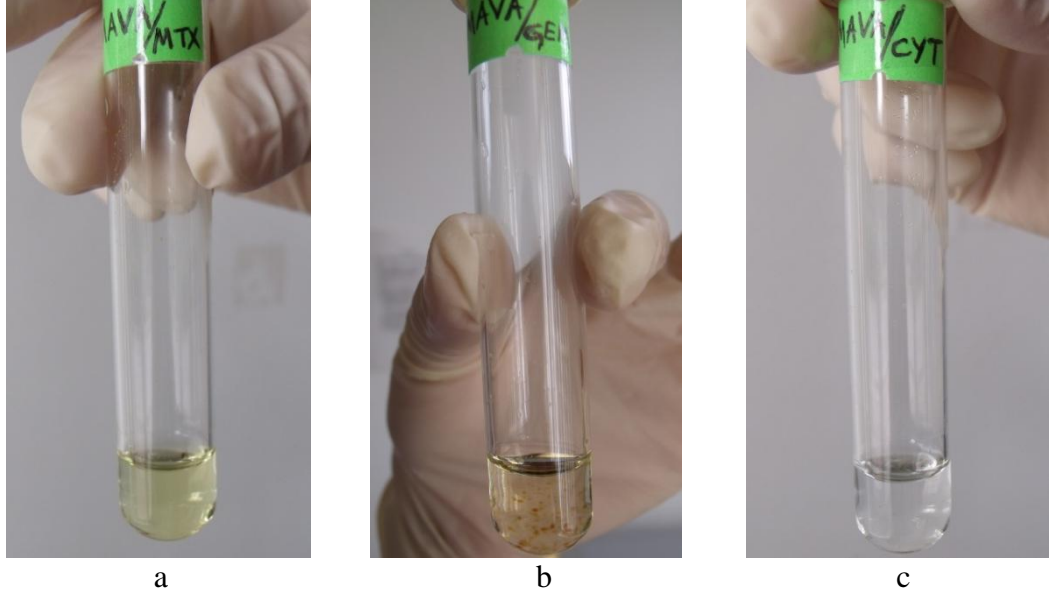
4.3.3. Kopolimerin-İlaç Çiftlerinin Çözünürlüğü ve Fiziksel Özellikleri

Daha öncede bahsedildiği gibi, maleik anhidrit kopolimerleri, burada MAVA kopolimeri, genellikle suda çözünmez, ancak organik çözücülerde çözünür. İlacın kopolimere bağlanma oranı arttıkça sudaki çözünürlükte buna bağlı olarak artmaktadır. Ayrıca, FTIR ve ¹H-NMR sonuçlarının pozitif olması da çözünürlüğü desteklemektedir. Sentezlenen konjugatların çözünürlük ve bazı fiziksel özellikleri şunlar söylenebilir: MAVA/MTX çifti; toz halinde, koyu sarı renkli olup, suda oldukça iyi çözünmekle birlikte sulu çözeltisinin rengi sarıdır. MAVA/GEM çifti; toz halinde, koyu kahve renginde olup, suda oldukça iyi çözünmekle birlikte, sulu çözeltisinin rengi kahverengidir. Ve MAVA/CYT çifti; toz halinde, açık sarı renkli olup, suda oldukça iyi çözünmekle birlikte, sulu çözeltisinin rengi beyazdır. Her üç örnekte oldukça homojen bir görüntüye sahiptir.

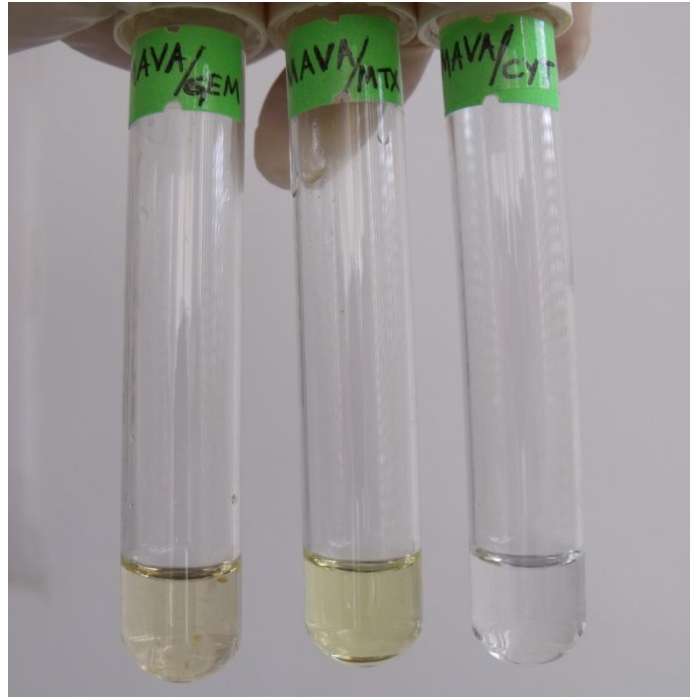
4.4. Kopolimer-İlaç Çiftlerinin Fizyolojik Sıvıda Salım Davranışları

Çalışmamızda yapay vücut sıvısı olarak kullanılan ve yaklaşık 145 mM iyon derişiminde olan PBS tampon çözeltisi kullanıldı.

37°C' de inkübasyondan sonra, kopolimer-ilaç çiftlerinin PBS çözeltisindeki salım davranışları 1., 24. ve 48. saatlerde fotoğraflanarak tespit edildi.

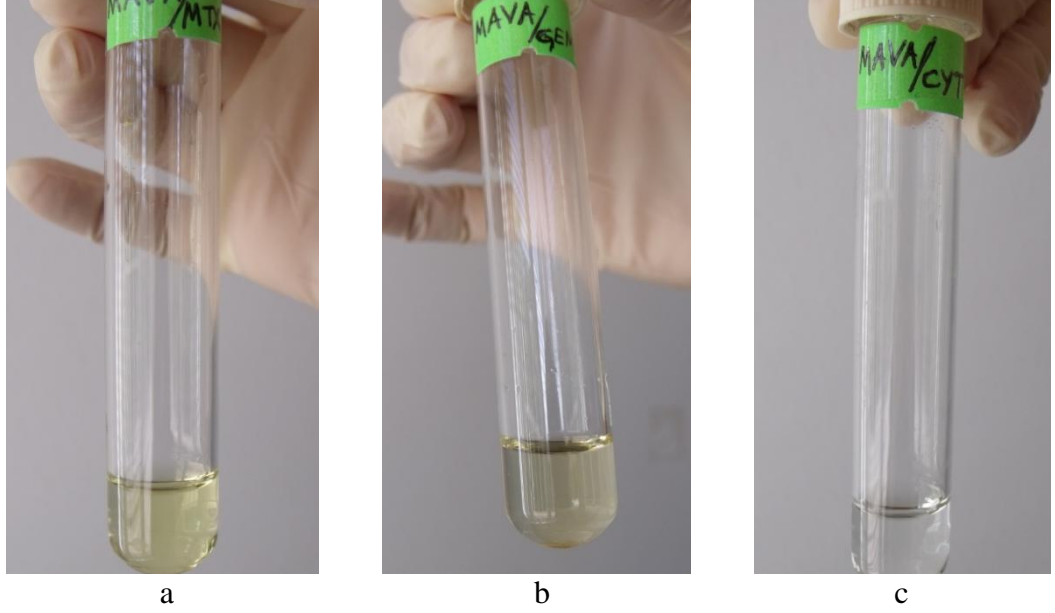


Şekil 4.27. (a)MAVA-MTX, (b)MAVA-GEM, (c)MAVA-CYT, 1. saat görünüm.



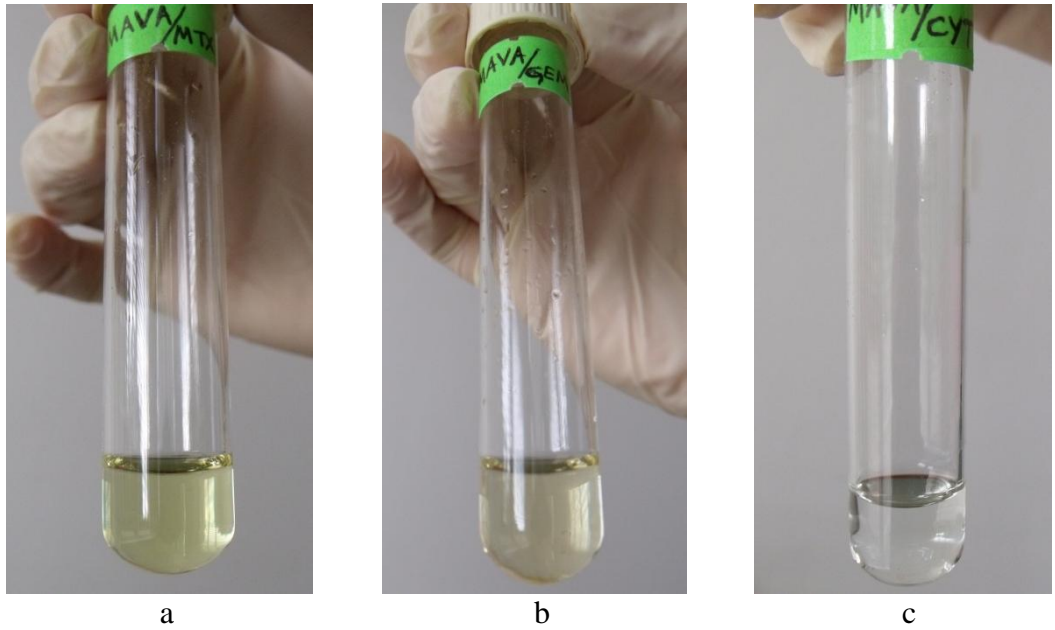
Şekil 4.28. MAVA-MTX, MAVA-GEM, MAVA-CYT, 1. saat görünüm.

Şekil 4.27 ve 4.28’de görüldüğü gibi MAVA-CYT ilk 10 dakika içinde neredeyse tamamen çözülmüştür. MAVA-MTX neredeyse tamamen çözülmüş, MAVA-GEM ise sıvının rengini değiştirecek kadar ancak az miktarda çözülmüştür.



Şekil 4.29. (a)MAVA-MTX, (b)MAVA-GEM, (c)MAVA-CYT, 24. saat görünüm.

Şekil 4.29 ‘da görüldüğü gibi MAVA-CYT 24. saatin sonunda tamamen çözülmüştür. MAVA-MTX neredeyse tamamen çözülmüş, MAVA-GEM çiftinin ise dibinde bir kısmı çözünmeden kalmıştır.

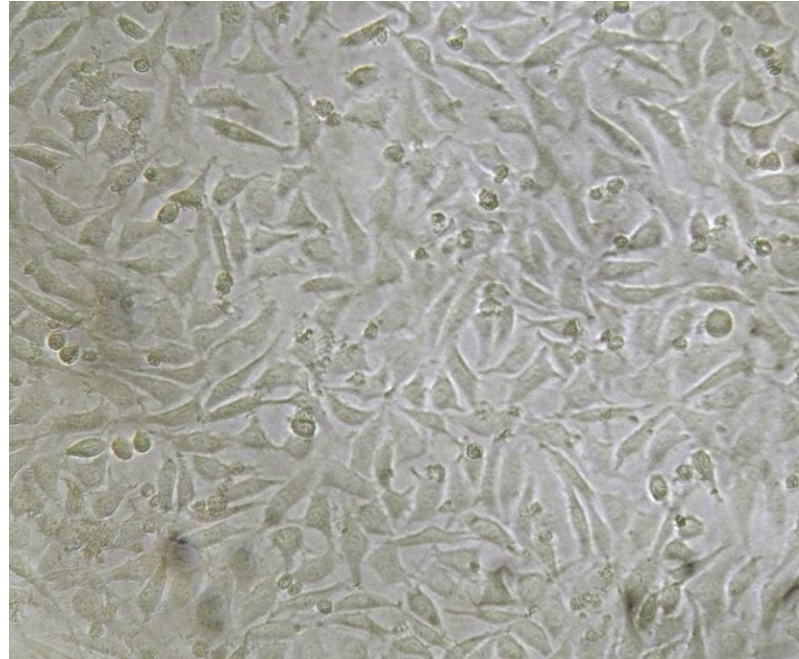


Şekil 4.30. (a)MAVA-MTX, (b)MAVA-GEM, (c)MAVA-CYT, 48. saat gör.

Şekil 4.30 'da görüldüğü gibi MAVA-CYT 48. saatin sonunda tamamen çözünmüştür. MAVA-MTX de 48. saatin sonunda tamamen çözünmüştür. MAVA-GEM çifti ise PBS'nin rengini daha çok değiştirmiş yani 24. saate oranla daha fazla çözünmüştür. Tüpün dip kısmında az miktarda çözünmeyen bir miktar kalmıştır.

4.5. İlaç ve Kopolimer-İlaç Çiftlerinin MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hatları Üzerine Antitümör Etkisinin Araştırılması

Gereç ve yöntemde belirtildiği gibi MCF-7 hücreleri hazırlanarak mikropalak kuyucuklarına ekildi, 37 °C 'de inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyon sonucunda hücrelerin morfolojik durumları invert mikroskopta incelendi. Hücrelerin morfolojik görünümünün normal olduğu ve yüzen ölü hücre bulunmadığı tespit edildi (Şekil 4.31).

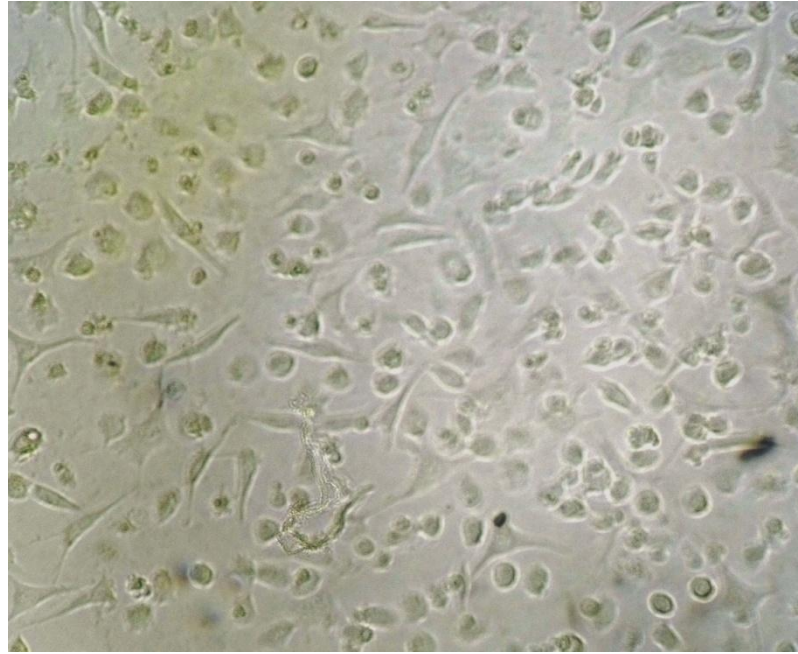


Şekil 4.31. MCF-7 hücrelerinin 24 saat inkübasyon sonrası morfolojik görüntüsü (20x).

4.5.1. MTT Yöntemi

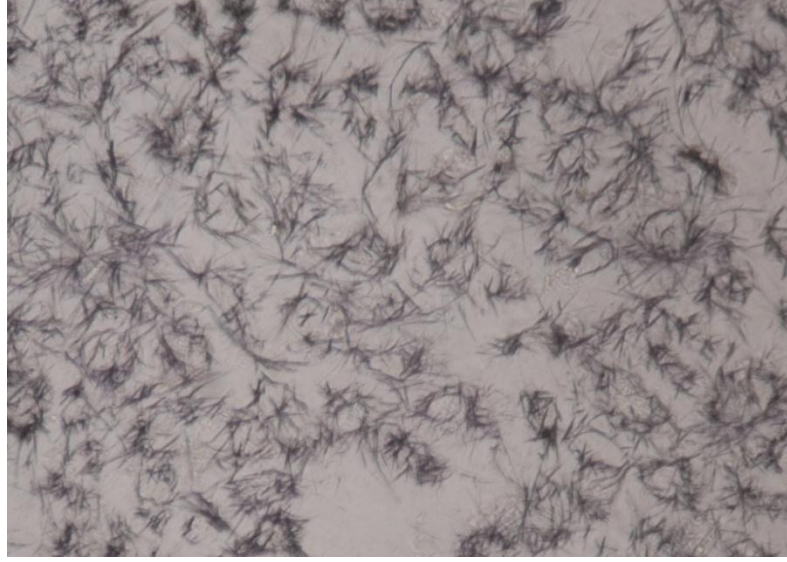
İnkübasyon sonunda kopolimer-ilaç çiftleri ve sadece ilaç içeren çözeltiler hazırlandı ve farklı konsantrasyonlarda 100 µl olarak kuyucuklara eklendi ve plak 37°C'de 24 saat inkübe edildi.

Şekil 4.32' de MAVA-Ametopiterin (Metotreksat) kopolimer-ilaç çiftinin 62,5 µg/ml konsantrasyonundaki hücrelerin 24 saat inkübasyon sonucundaki mikroskopik görüntüleri verilmiştir. Hücreler atipik forma dönüşmüş, büzülüp küçülmüş, yüzey uzantılarını kaybederek yuvarlaklaşmış ve tipik formda hücre sayısı oldukça azalmıştır.

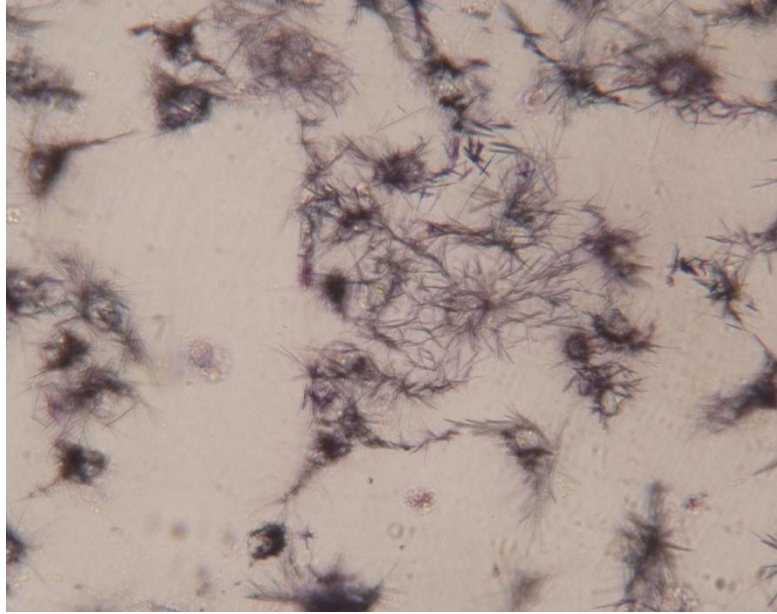


Şekil 4.32. MCF-7 hücrelerinin MAVA-Ametopiterin (Metotreksat) kopolimer-ilaç çiftinin 62,5 µg/ml konsantrasyonu eklendikten sonra 24 saatlik inkübasyon sonucu morfolojik görüntüsü (20x).

İnkübasyonun ardından eklenen MTT solusyonu sonrasında formazan kristallerinin oluşumu invert mikroskopta incelendi. (Şekil 4.33 ve 4.34) Bir süre oda sıcaklığında bekletilip ELISA cihazı ile 450 nm dalga boyunda optik yoğunluk ölçüldü.



Şekil 4.33. MCF-7 hücrelerinde formazan kristallerinin oluşumu – pozitif kontrol (48 saat inkübasyon sonrası, MTT eklendikten sonra) (20x).



Şekil 4.34. MCF-7 hücrelerinde formazan kristallerinin oluşumu – negatif kontrol (48 saat inkübasyon sonrası, MTT eklendikten sonra) (40x).

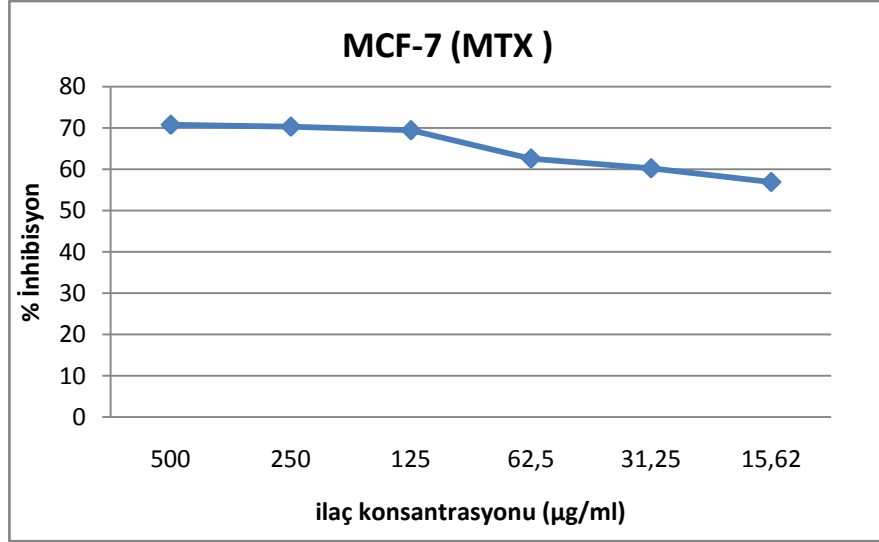
4.5.1.1. Ametopterin (MTX) ve MAVA-Ametopterin (MTX) Çiftinin MCF-7 Meme Kanseri Hücreleri Üzerine Antitümör Aktivitesi

Mikroplaktaki kuyucuklara DMSO eklenmesi ile çözünen formazan kristallerinin oluşturduğu renk değişimi ve ilaç ve kopolimer-ilaç çiftlerinin farklı konsantrasyonlarının oluşturduğu renk değişimi ELISA da 450 nm dalga boyunda ölçüldü. Pozitif ve negatif kontrol ve her bir farklı ilaç ve kopolimer-ilaç konsantrasyonu için ayrı ayrı uygulanan 6 kuyucuğun ortalamaları alındı. Gereç ve yöntem bölümünde belirtilen formülden yararlanılarak % İnhibisyon hesaplandı ve ilgili grafik elde edildi (Çizelge 4.6, Şekil 4.35).

Çizelge 4.6 : Ametopiterin (Metotreksat) 'nin çeşitli konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerine Optik Dansite değerleri ve % İnhibisyon oranları

İlaç (Konsantrasyon)	Optik Dansite Ortalaması	İnhibisyon (%)
500 µg/ml	0,2302	70,80
250 µg/ml	0,2338	70,34
125 µg/ml	0,2406	69,48
62,5 µg/ml	0,2711	62,61
31,25 µg/ml	0,2819	60,24
15,62 µg/ml	0,3397	56,91
Pozitif Kontrol (DMEM+FBS+PS)	0,7883	0
Negatif Kontrol (DMSO)	0,1805	77,11

Çizelge 4.6' da Ametopterin MCF-7 hücreleri üzerindeki antitümör etkisi, çeşitli konsantrasyonlarına bağlı olarak inhibisyon (kanser hücrelerini öldürme) yüzdesi olarak verilmiştir. Çizelgede görüldüğü gibi, Ametopterin konsantrasyonu azaldıkça antitümör aktivitesi de orantılı olarak düşmektedir.



Şekil 4.35. MTX'in farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerini öldürme yüzdesi.

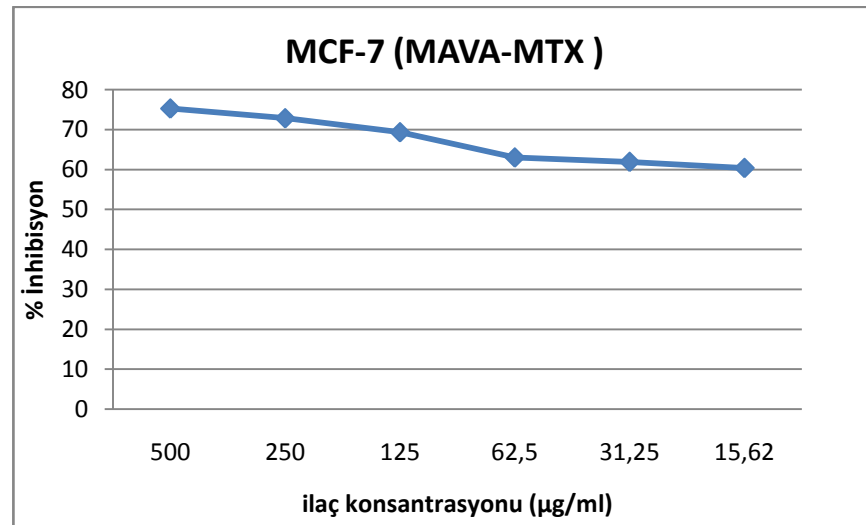
En yüksek konsantrasyonda kanser hücrelerini öldürme oranı (% 70,80), negatif kontrolün öldürme oranına (% 77,11) oldukça yakındır.

Sonuç olarak; genel kullanım kemoterapi ilaçlarından Ametopterinin, meme kanseri hücreleri üzerine de antitümör etkisinin bulunduğu gösterilmiştir.

Çizelge 4.7 : MAVA-Ametopiterin (Metotreksat) kopolimer-ilaç çiftinin çeşitli konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerine Optik Dansite değerleri ve % İnhibisyon oranları

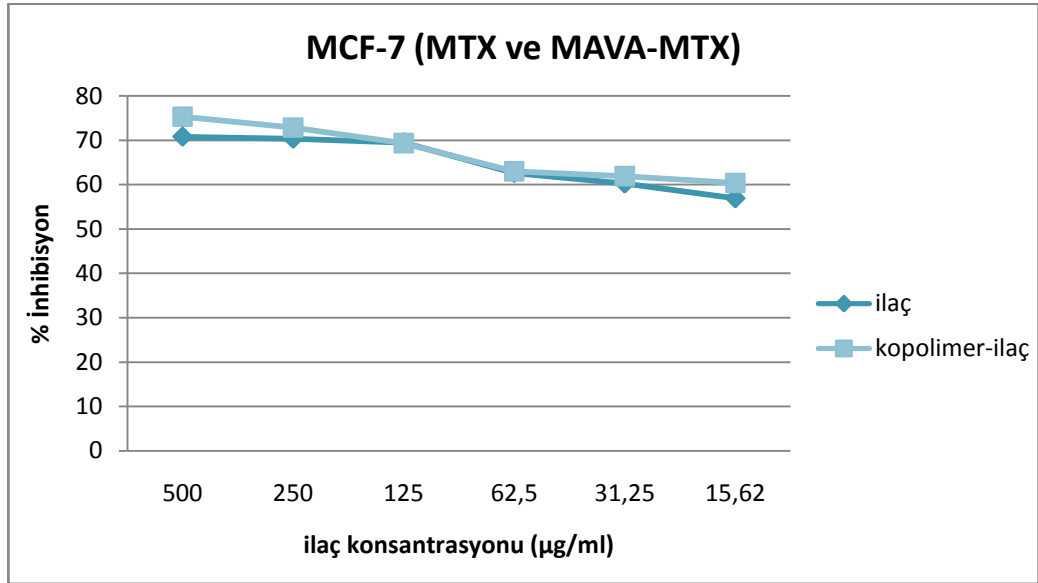
İlaç (Konsantrasyon)	Optik Dansite Ortalaması	İnhibisyon (%)
500 µg/ml	0,1948	75,29
250 µg/ml	0,2140	72,85
125 µg/ml	0,2416	69,35
62,5 µg/ml	0,2915	63,02
31,25 µg/ml	0,3001	61,93
15,62 µg/ml	0,3122	60,40
Pozitif Kontrol (DMEM+FBS+PS)	0,7883	0
Negatif Kontrol (DMSO)	0,1805	77,11

Çizelge 4.7’ de MAVA-Ametopiterinin MCF-7 hücreleri üzerindeki antitümör etkisi, çeşitli konsantrasyonlarına bağlı olarak inhibisyon (kanser hücrelerini öldürme) yüzdesi olarak verilmiştir. Çizelgede görüldüğü gibi, MAVA-Ametopiterinin konsantrasyonu azaldıkça antitümör aktivitesi de orantılı olarak düşmektedir.

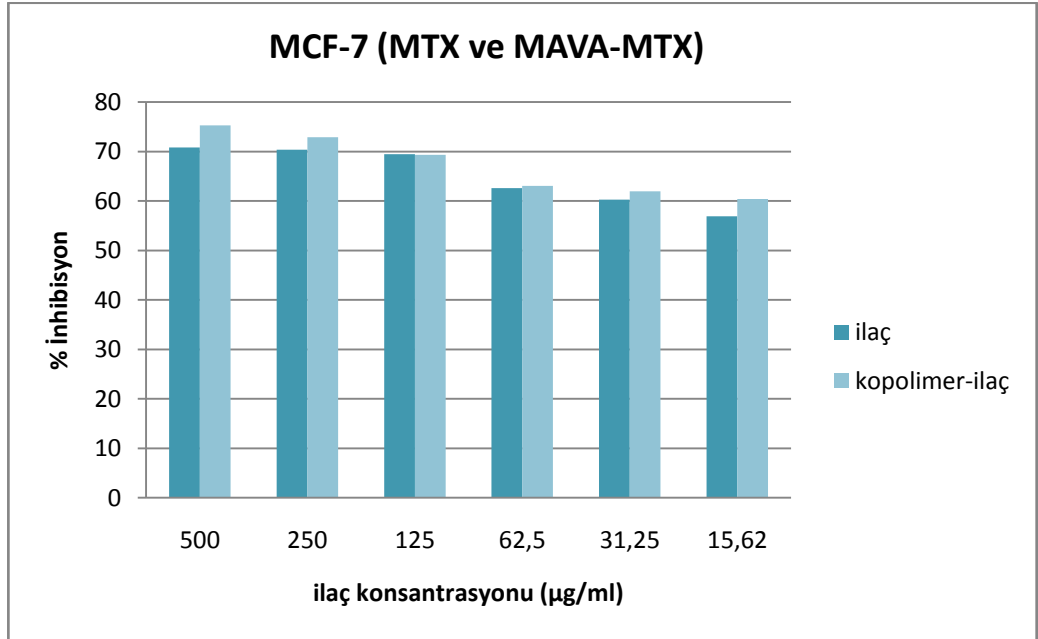


Şekil 4.36. MAVA-MTX’in farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerini öldürme yüzdesi.

En yüksek konsantrasyonda kanser hücrelerini öldürme oranı (% 75,29), negatif kontrolün öldürme oranına (% 77,11) oldukça yakındır.



Şekil 4.37. MTX ve MAVA-MTX'in farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerini öldürme yüzdesi.



Şekil 4.38. MTX ve MAVA-MTX'in farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerini öldürme yüzdesi (2).

Sonuç olarak; kopolimer-ilaç çiftinin inhibisyon yüzdesinin, sadece ilacın inhibisyon yüzdesinden anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur ($p < 0,05$).

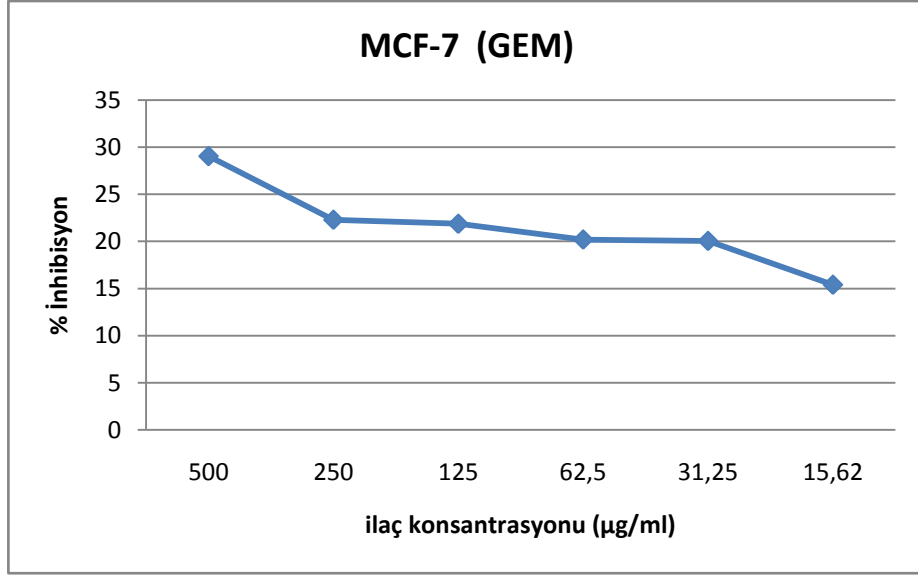
4.5.1.2. Gemitabin (GEM) ve MAVA-Gemitabin (GEM) Çiftinin MCF-7 Meme Kanseri Hücreleri Üzerine Antitümör Aktivitesi

Mikroplaktaki kuyucuklara DMSO eklenmesi ile çözünen formazan kristallerinin oluşturduğu renk değişimi ve ilaç ve kopolimer-ilaç çiftlerinin farklı konsantrasyonlarının oluşturduğu renk değişimi ELISA da 450 nm dalga boyunda ölçüldü. Pozitif ve negatif kontrol ve her bir farklı ilaç ve kopolimer-ilaç konsantrasyonu için ayrı ayrı uygulanan 6 kuyucuğun ortalamaları alındı. Gereç ve yöntem bölümünde belirtilen formülden yararlanılarak % İnhibisyon hesaplandı ve ilgili grafik elde edildi (Çizelge 4.8, Şekil 4.39).

Çizelge 4.8 : Gemitabin'in çeşitli konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerine Optik Dansite değerleri ve % İnhibisyon oranları

İlaç (Konsantrasyon)	Optik Dansite Ortalaması	İnhibisyon (%)
500 µg/ml	0,7375	29,05
250 µg/ml	0,8076	22,30
125 µg/ml	0,8121	21,87
62,5 µg/ml	0,8294	20,20
31,25 µg/ml	0,8310	20,05
15,62 µg/ml	0,8793	15,40
Pozitif Kontrol (DMEM+FBS+PS)	1,0394	0
Negatif Kontrol (DMSO)	0,1239	88,08

Çizelge 4.8' de Gemitabinin MCF-7 hücreleri üzerindeki antitümör etkisi, çeşitli konsantrasyonlarına bağlı olarak inhibisyon (kanser hücrelerini öldürme) yüzdesi olarak verilmiştir. Çizelgede görüldüğü gibi, Gemitabin çiftinin konsantrasyonu azaldıkça antitümör aktivitesi de orantılı olarak düşmektedir.



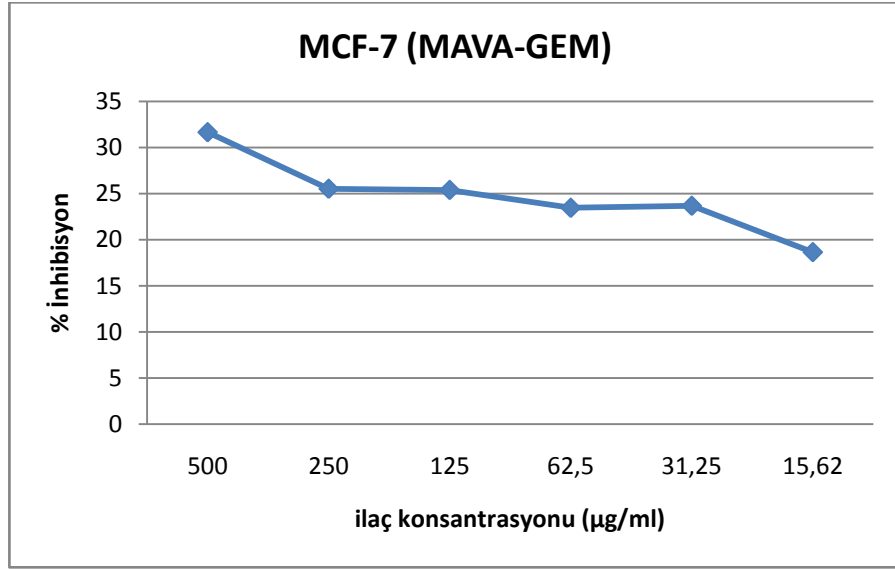
Şekil 4.39. GEM'in farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerini öldürme yüzdesi.

En yüksek konsantrasyonun kanser hücrelerini öldürme oranının kontrole göre düşük olduğu gözlenmiştir. Meme kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılan Gemsitabinin antitümör aktivitesinin bulunduğu gösterilmiştir.

Çizelge 4.9 : MAVA-Gemsitabin kopolimer-ilaç çiftinin çeşitli konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerine Optik Dansite değerleri ve % İnhibisyon oranları

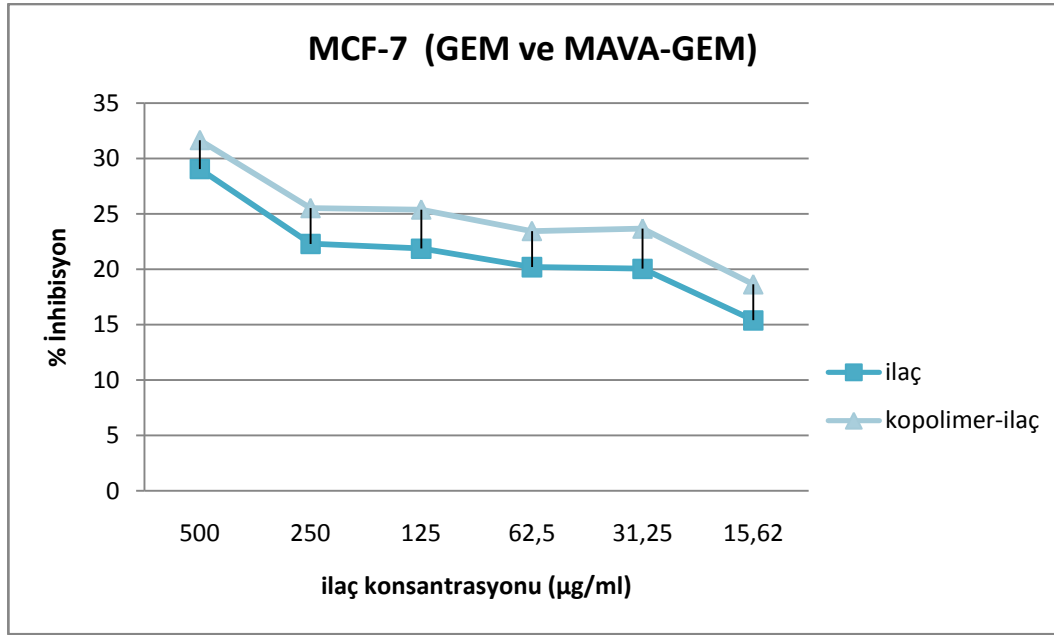
İlaç (Konsantrasyon)	Optik Dansite Ortalaması	İnhibisyon (%)
500 µg/ml	0,7103	31,66
250 µg/ml	0,7741	25,52
125 µg/ml	0,7755	25,39
62,5 µg/ml	0,7957	23,45
31,25 µg/ml	0,7934	23,67
15,62 µg/ml	0,8457	18,64
Pozitif Kontrol (DMEM+FBS+PS)	1,0394	0
Negatif Kontrol (DMSO)	0,1239	88,08

Çizelge 4.9’ da MAVA-Gemsitabinin MCF-7 hücreleri üzerindeki antitümör etkisi, çeşitli konsantrasyonlarına bağlı olarak inhibisyon (kanser hücrelerini öldürme) yüzdesi olarak verilmiştir. Çizelgede görüldüğü gibi, MAVA-Gemsitabin çiftinin konsantrasyonu azaldıkça antitümör aktivitesi de orantılı olarak düşmektedir.

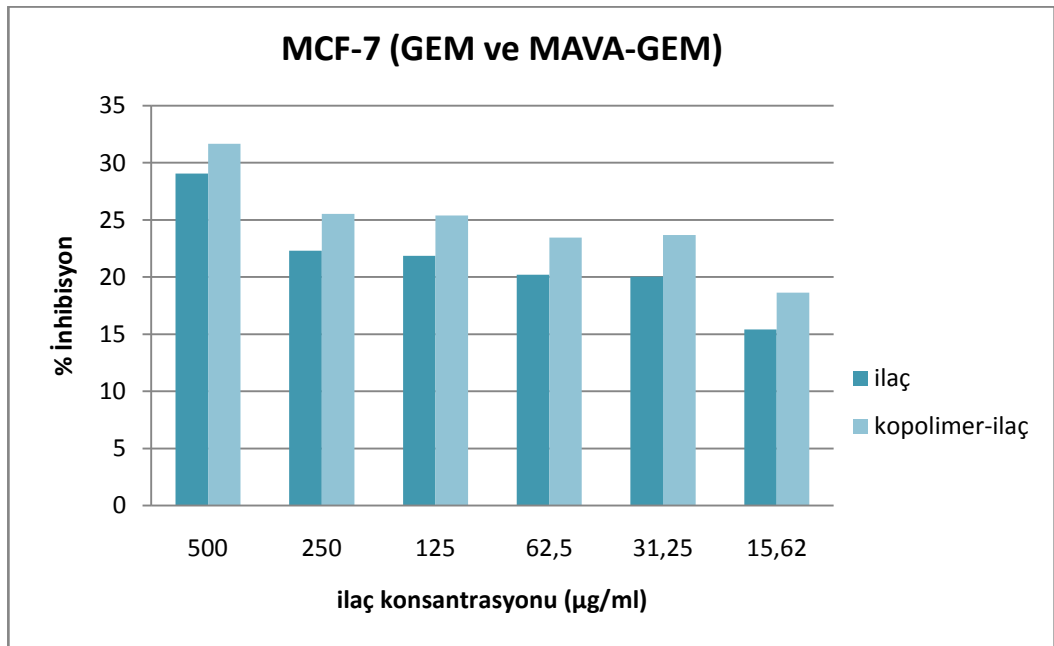


Şekil 4.40. MAVA-GEM’in farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerini öldürme yüzdesi.

Gemsitabinin en yüksek konsantrasyonun hücreleri öldürme oranı % 29,05 iken, MAVA-Gemsitabin çiftinin oranı % 31,66’dır ($p < 0,05$).



Şekil 4.41. GEM ve MAVA-GEM'in farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerini öldürme yüzdesi.



Şekil 4.42. GEM ve MAVA-GEM'in farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerini öldürme yüzdesi (2).

Sonuç olarak; kopolimer-ilaç çiftinin inhibisyon yüzdesinin, sadece ilacın inhibisyon yüzdesinden anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur ($p < 0,05$).

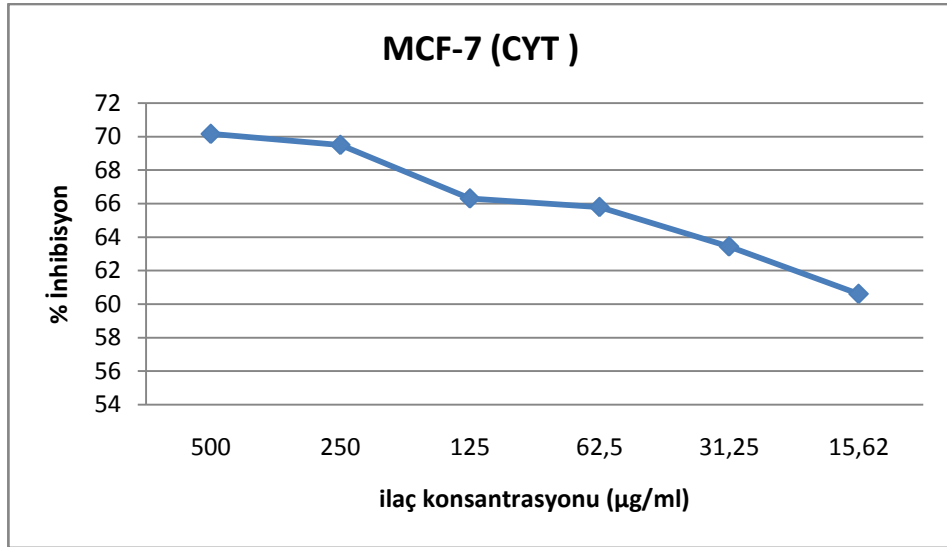
4.5.1.3. Siterabin (CYT) ve MAVA- Siterabin (CYT) Çiftinin MCF-7 Meme Kanseri Hücreleri Üzerine Antitümör Aktivitesi

Mikroplaktaki kuyucuklara DMSO eklenmesi ile çözünen formazan kristallerinin oluşturduğu renk değişimi ve ilaç ve kopolimer-ilaç çiftlerinin farklı konsantrasyonlarının oluşturduğu renk değişimi ELISA da 450 nm dalga boyunda ölçüldü. Pozitif ve negatif kontrol ve her bir farklı ilaç ve kopolimer-ilaç konsantrasyonu için ayrı ayrı uygulanan 6 kuyucuğun ortalamaları alındı. Gereç ve yöntem bölümünde belirtilen formülden yararlanılarak % İnhibisyon hesaplandı ve ilgili grafik elde edildi (Çizelge ... Şekil...).

Çizelge 4.10 : Siterabin'in çeşitli konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerine Optik Dansite değerleri ve % İnhibisyon oranları

İlaç (Konsantrasyon)	Optik Dansite Ortalaması	İnhibisyon (%)
500 µg/ml	0,2807	70,17
250 µg/ml	0,2869	69,51
125 µg/ml	0,3171	66,31
62,5 µg/ml	0,3219	65,80
31,25 µg/ml	0,3441	63,44
15,62 µg/ml	0,3707	60,61
Pozitif Kontrol (DMEM+FBS+PS)	0,9411	0
Negatif Kontrol (DMSO)	0,1268	88,53

Çizelge 4.10' da Siterabinin MCF-7 hücreleri üzerindeki antitümör etkisi, çeşitli konsantrasyonlarına bağlı olarak inhibisyon (kanser hücrelerini öldürme) yüzdesi olarak verilmiştir. Çizelgede görüldüğü gibi, Siterabinin konsantrasyonu azaldıkça antitümör aktivitesi de orantılı olarak düşmektedir.



Şekil 4.43. CYT' nin farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerini öldürme yüzdesi.

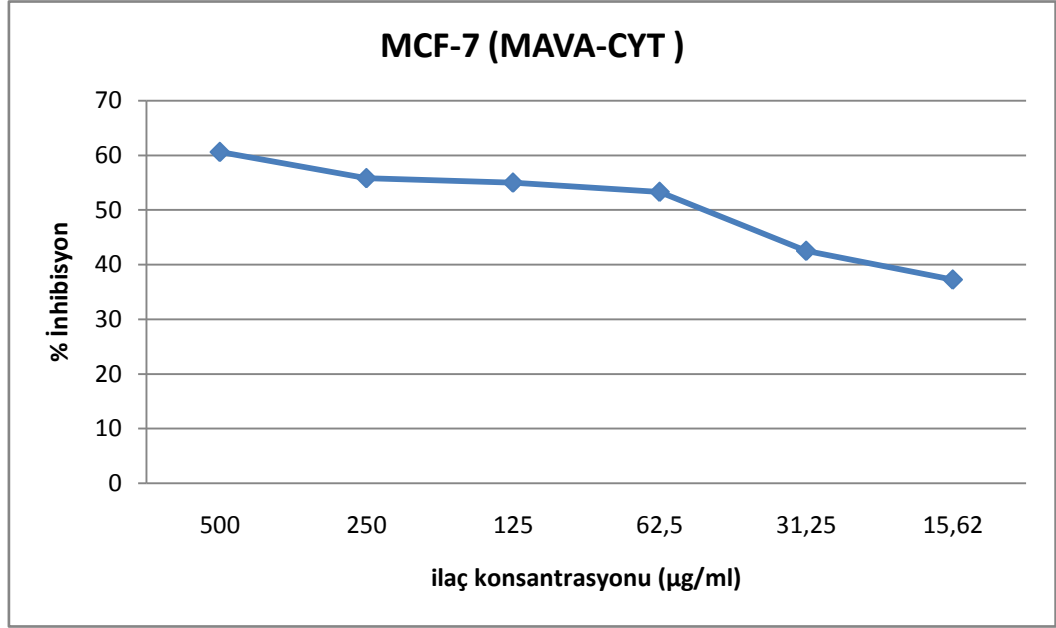
En yüksek konsantrasyonda kanser hücrelerini öldürme oranı (% 70,17), negatif kontrolün öldürme oranına (% 88,53) yakındır.

Sonuç olarak; genel kullanım kemoterapi ilaçlarından Siterabinin, meme kanseri hücreleri üzerine de antitümör etkisinin bulunduğu gösterilmiştir.

Çizelge 4.11: MAVA-Siterabin kopolimer-ilaç çiftinin çeşitli konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerine Optik Dansite değerleri ve % İnhibisyon oranları

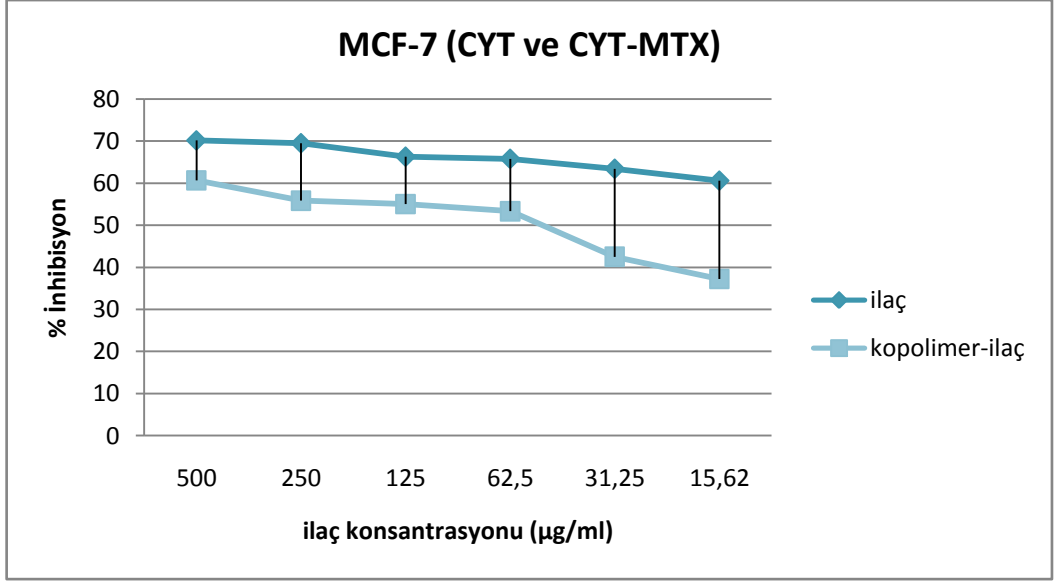
İlaç (Konsantrasyon)	Optik Dansite Ortalaması	İnhibisyon (%)
500 µg/ml	0,3704	60,64
250 µg/ml	0,4156	55,84
125 µg/ml	0,4233	55,02
62,5 µg/ml	0,4392	53,33
31,25 µg/ml	0,5409	42,52
15,62 µg/ml	0,5905	37,25
Pozitif Kontrol (DMEM+FBS+PS)	0,9411	0
Negatif Kontrol (DMSO)	0,1268	88,53

Çizelge 4.11’ de MAVA-Siterabinin MCF-7 hücreleri üzerindeki antitümör etkisi, çeşitli konsantrasyonlarına bağlı olarak inhibisyon (kanser hücrelerini öldürme) yüzdesi olarak verilmiştir. Çizelgede görüldüğü gibi, MAVA-Siterabinin konsantrasyonu azaldıkça antitümör aktivitesi de orantılı olarak düşmektedir.

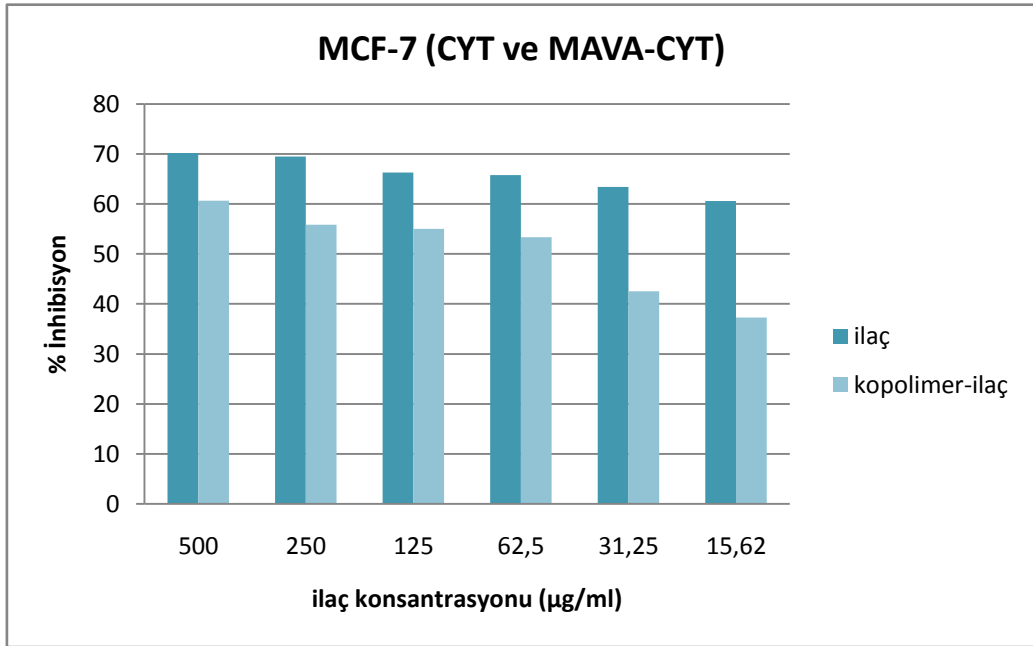


Şekil 4.44. MAVA-CYT’ nin farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerini öldürme yüzdesi.

MAVA-Siterabin çiftinin kontrole (% 88,53) yakın bir inhibisyon yüzdesi (% 60,64) bulunmaktadır.

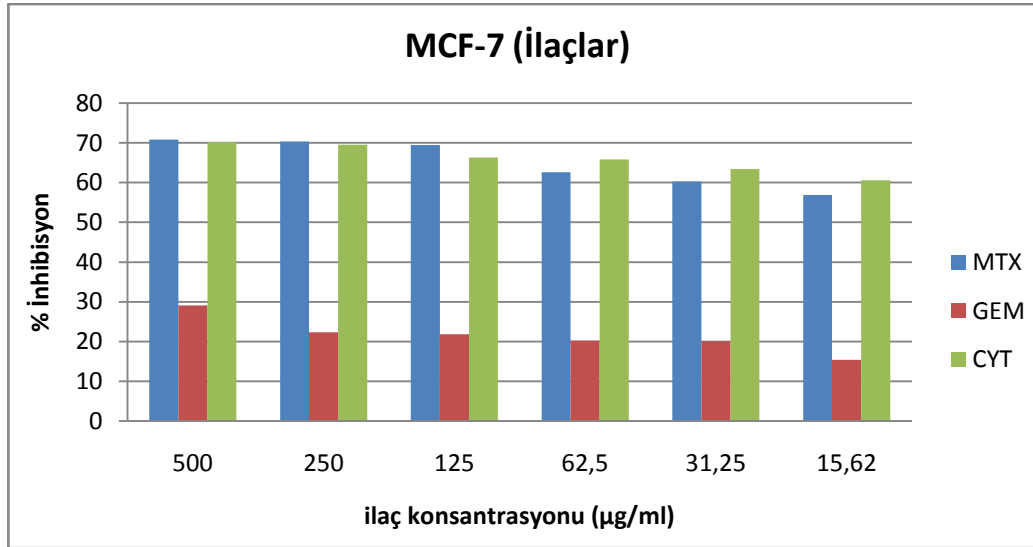


Şekil 4.45. CYT ve MAVA-CYT' nin farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerini öldürme yüzdesi.



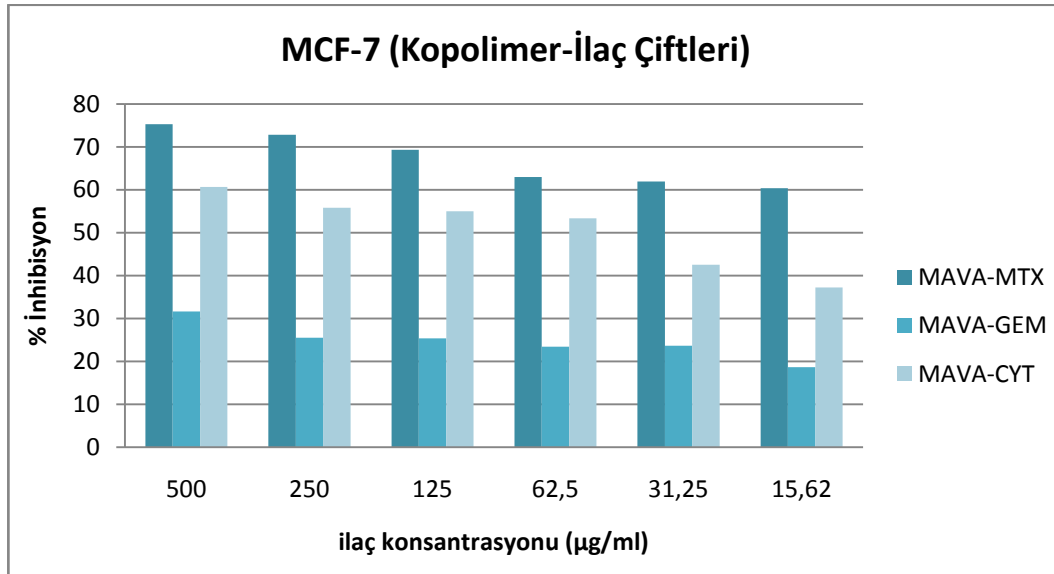
Şekil 4.46. CYT ve MAVA-CYT' nin farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücrelerini öldürme yüzdesi (2).

MAVA-Siterabinin öldürme oranı Siterabinin öldürme oranı ile karşılaştırıldığında kopolimer-ilaç çiftinin yüzdesi anlamlı derecede düşük bulunmuştur. ($p < 0,05$)



Şekil 4.47. İlaçların farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerine inhibisyon yüzdelерinin karşılaştırılması.

Çalışmamızda kullandığımız antikanser ilaçları karşılaştırıldığında en yüksek inhibisyon yüzdesinin % 70,80 ile Ametopterin(MTX) ilacına ait olduğu görülmektedir. Siterabin(CYT) hemen hemen aynı bir oranla (% 70,29) ikinci sırada, Gemsitabin(GEM) ise % 29,05'lik bir oranla üçüncü sırada yer almaktadır.

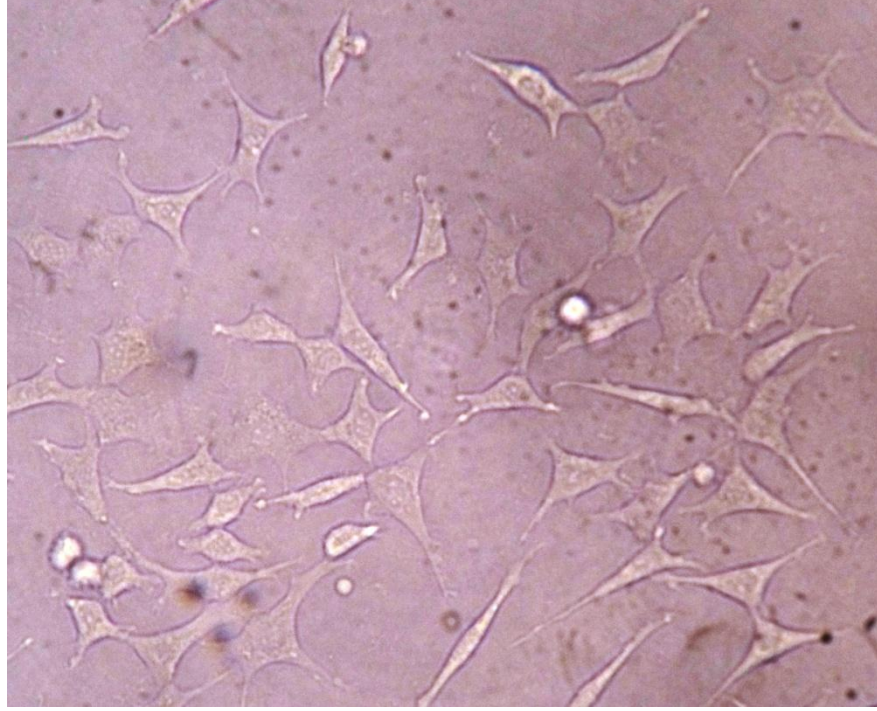


Şekil 4.48. Kopolimer-ilaç çiftlerinin farklı konsantrasyonlarının MCF-7 hücreleri üzerine inhibisyon yüzdelерinin karşılaştırılması.

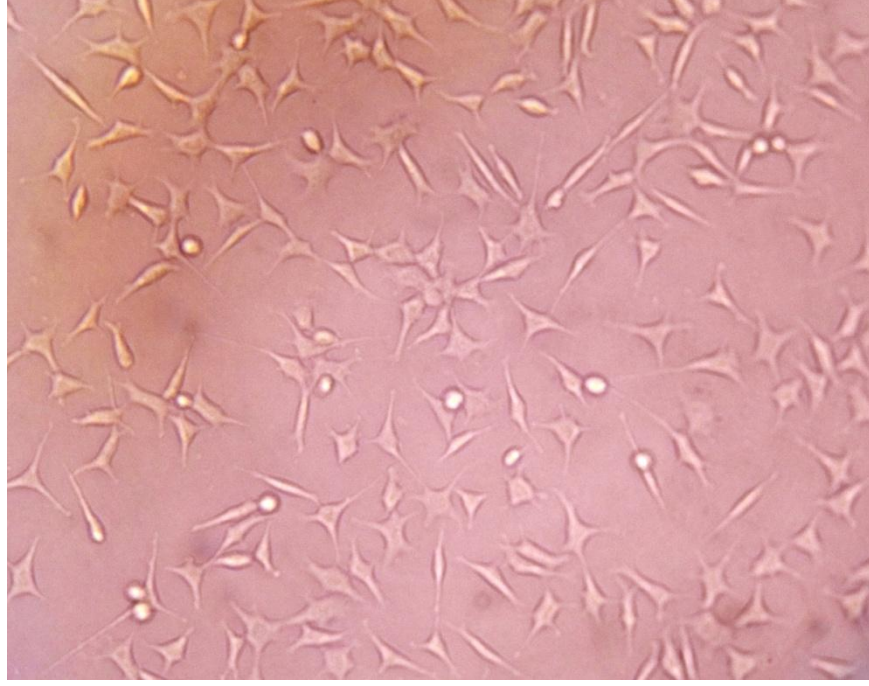
Hazırladığımız 3 farklı kopolimer-ilaç çifti karşılaştırıldığında en yüksek inhibisyon yüzdesinin % 75,29 ile MAVA-Ametopterin (MTX) çiftine ait olduğu görülmektedir. MAVA-Siterabin (CYT) % 60,64 oranla ikinci sırayı almaktadır. MAVA-Gemsitabin (GEM) % 31,66'lık bir oranla üçüncü sırada yer almaktadır.

4.6. İlaç ve Kopolimer-İlaç Çiftlerinin L929 Fibroblast Hücre Hatları Üzerine Antitümör Etkisinin Araştırılması

Gereç ve yöntemde belirtildiği gibi L929 hücreleri hazırlanarak mikroplak kuyucuklarına ekildi, 37 °C 'de inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyon sonucunda hücrelerin morfolojik durumları invert mikroskopta incelendi. Hücrelerin morfolojik görünümünün normal olduğu ve yüzen ölü hücre bulunmadığı tespit edildi (Şekil 4.49 ve 4.50).



Şekil 4.49. L-929 hücrelerinin 24 saat inkübasyon sonrası morfolojik görüntüsü (XTT eklenmeden önce) (40x).



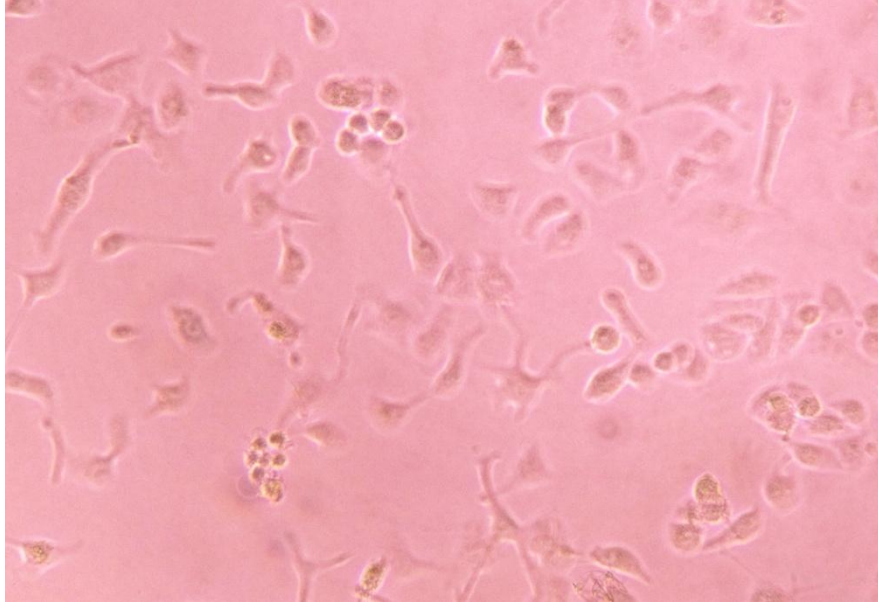
Şekil 4.50. L-929 hücrelerinin 24 saat inkübasyon sonrası morfolojik görüntüsü (XTT eklenmeden önce) (20x).

4.6.1. XTT Yöntemi

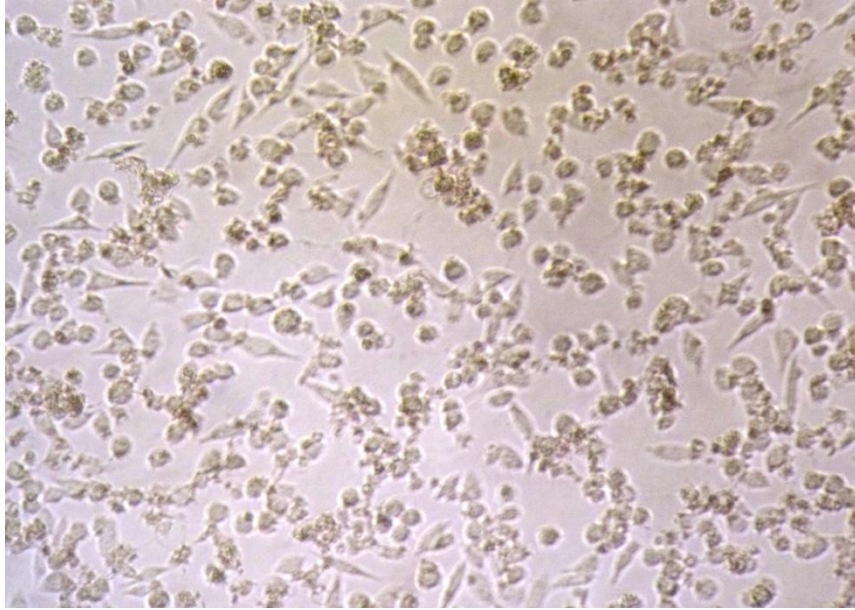
İnkübasyon sonunda kopolimer-ilaç çiftleri ve sadece ilaç içeren çözeltiler hazırlandı ve farklı konsantrasyonlarda 100 μ l olarak kuyucuklara eklendi ve plak 37°C'de 24 saat inkübe edildi.

Şekil 4.51' de MAVA-Ametopiterin (Metotreksat) kopolimer-ilaç çiftinin 15.62 μ g/ml konsantrasyonundaki hücrelerin 24 saat inkübasyon sonucundaki mikroskopik görüntüleri verilmiştir. Hücreler büyük çoğunlukla tipik formda olduğu ve aralarında çok az sayıda yuvarlaklaşmış hücreler bulunduğu görülmektedir.

Şekil 4.52' de ise, DMSO eklenmiş L929 hücrelerinin büyük çoğunluğunun atipik forma dönüştüğü, yuvarlaklaşarak canlılığını kaybettiği görülmektedir.



Şekil 4.51. MAVA-Ametopiterin'in 15,62 µg/ml konsantrasyonunda L-929 hücreleri üzerindeki etkisi (20x).



Şekil 4.52. DMSO eklenmiş (negatif kontrol) L929 hücreleri görüntüsü (10x).

XTT solusyonu bir önceki bölümde açıklandığı gibi hazırlandı. Bu solüsyondan her kuyucuğa eklendi ve 4 saat inkübe edildi. ELISA cihazı ile 450 nm dalga boyunda optik yoğunluk ölçüldü.

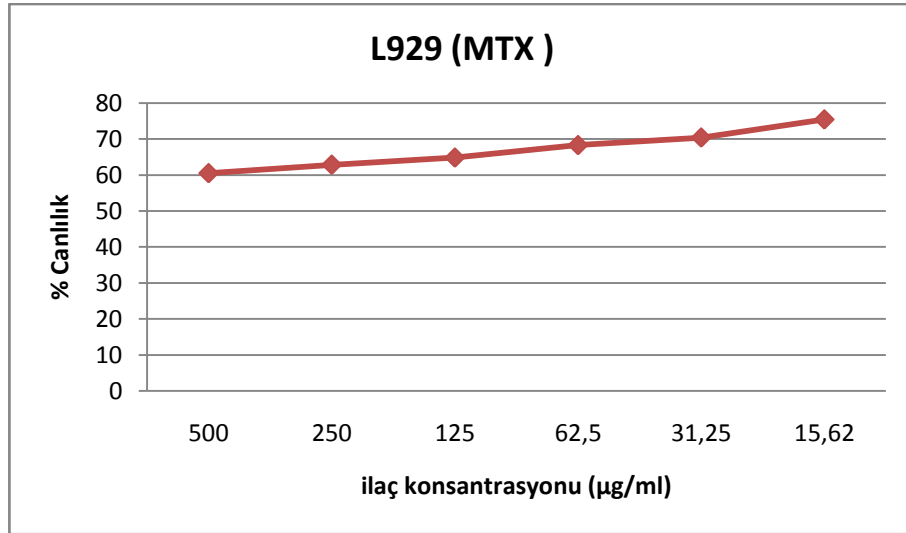
4.6.1.1. Ametopterin (MTX) ve MAVA-Ametopterin (MTX) Çiftinin L929 Fibroblast Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisi

XTT solüsyonu eklenip 4 saat inkübe edildikten sonra optik yoğunluk ölçüldü. Pozitif ve negatif kontrol ve her bir farklı ilaç ve kopolimer-ilaç konsantrasyonu için ayrı ayrı uygulanan 6 kuyucuğun ortalamaları alındı. Gereç ve yöntem bölümünde belirtilen formülden yararlanılarak % canlılık hesaplandı ve ilgili grafik elde edildi (Çizelge 4.12, Şekil 4.53).

Çizelge 4.12 : Ametopiterin (Metotreksat) 'nin çeşitli konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine Optik Dansite değerleri ve % Canlılık oranları -- XTT

İlaç (Konsantrasyon)	Optik Dansite Ortalaması	Canlılık (%)
500 µg/ml	0,3473	60,48
250 µg/ml	0,3608	62,84
125 µg/ml	0,3722	64,82
62,5 µg/ml	0,3922	68,30
31,25 µg/ml	0,4043	70,41
15,62 µg/ml	0,4275	75,45
Pozitif Kontrol (DMEM+FBS+PS)	0,5742	100
Negatif Kontrol (DMSO)	0,1436	25,01

Çizelge 4.12' de Ametopiterin'in L929 hücreleri üzerindeki toksik etkisi, çeşitli konsantrasyonlarda canlılık yüzdesi olarak verilmiştir. Çizelgede görüldüğü gibi, Ametopiterin konsantrasyonu azaldıkça hücre canlılığı yüzdesi artmakta, yani toksik etkisi azalmaktadır.



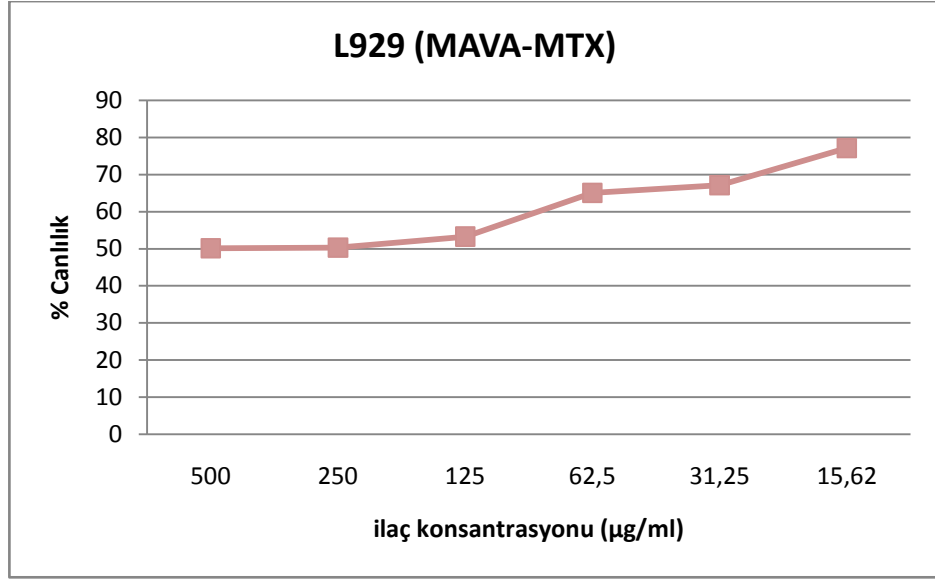
Şekil 4.53. MTX' in farklı konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine canlılık yüzdesi.

En düşük konsantrasyonun hücre canlılığına etkisinin (% 75,45) kontrole (% 100) yakın olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 4.13 : MAVA-Ametopiterin (Metotreksat) kopolimer-ilaç çiftinin çeşitli konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine Optik Dansite değerleri ve % Canlılık oranları -- XTT

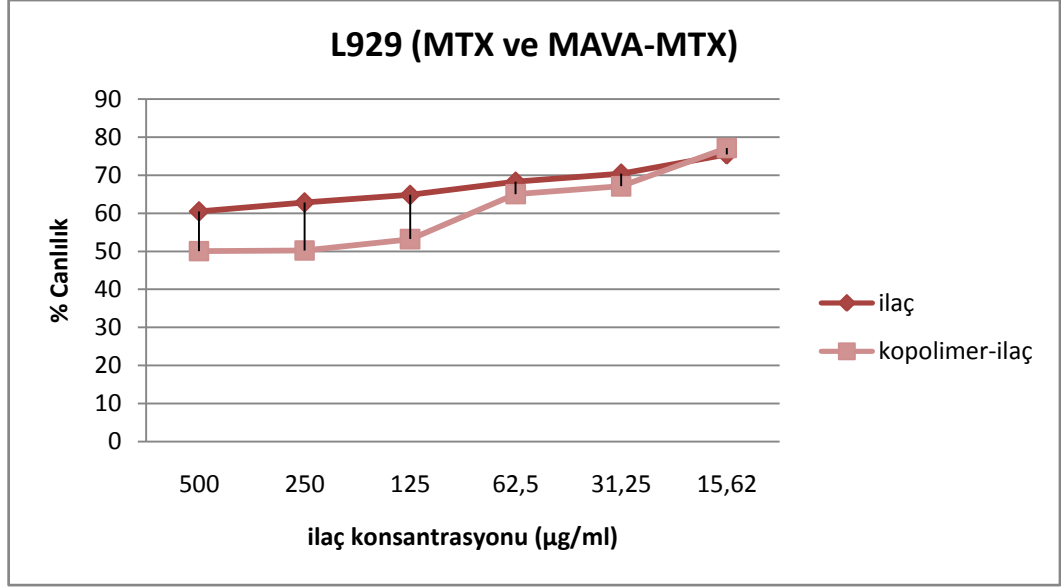
İlaç (Konsantrasyon)	Optik Dansite Ortalaması	Canlılık (%)
500 µg/ml	0,2876	50,09
250 µg/ml	0,2907	50,23
125 µg/ml	0,3056	53,23
62,5 µg/ml	0,3733	65,02
31,25 µg/ml	0,3852	67,09
15,62 µg/ml	0,4427	77,10
Pozitif Kontrol (DMEM+FBS+PS)	0,5742	100
Negatif Kontrol (DMSO)	0,1436	25,01

Çizelge 4.13’ de MAVA-Ametopiterin’in L929 hücreleri üzerindeki toksik etkisi, çeşitli konsantrasyonlarda canlılık yüzdesi olarak verilmiştir. Çizelgede görüldüğü gibi, MAVA-Ametopiterin konsantrasyonu azaldıkça hücre canlılığı yüzdesi artmakta, yani toksik etkisi azalmaktadır.

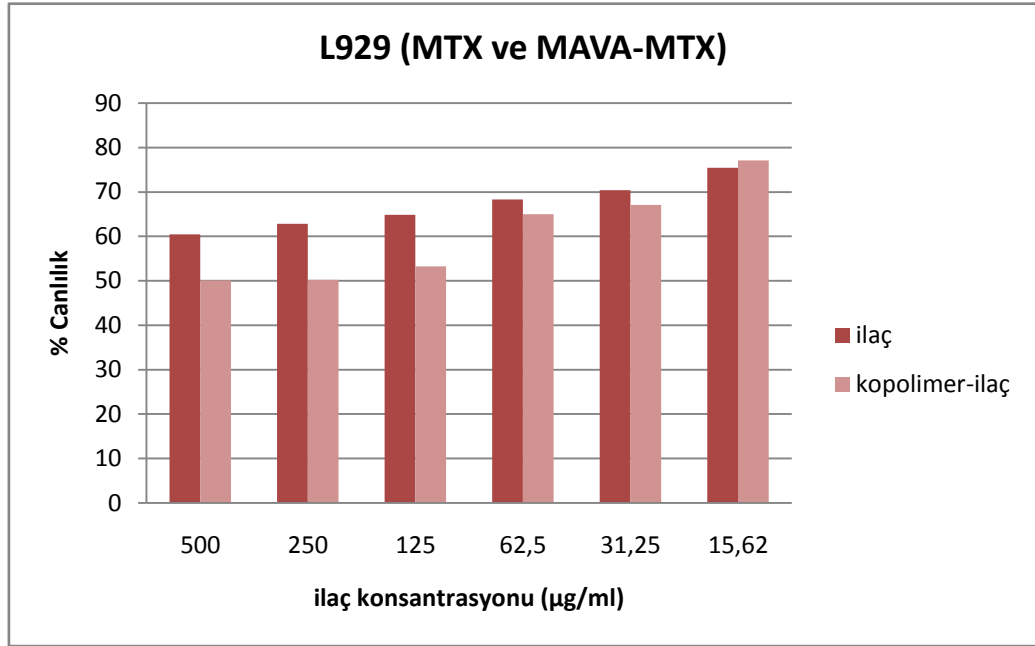


Şekil 4.54. MAVA-MTX’ in farklı konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine canlılık yüzdesi.

En düşük konsantrasyonun hücre canlılığına etkisinin (% 77,10) kontrole (% 100) yakın olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.55. MTX ve MAVA-MTX' in farklı konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine canlılık yüzdesi.



Şekil 4.56. MTX ve MAVA-MTX' in farklı konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine canlılık yüzdesi (2).

Ametopterin ve MAVA-Ametoptrin'in en düşük konsantrasyonları karşılaştırıldığında, iki veri arasında anlamlı fark gözlenmemiştir. ($p > 0,05$). Ancak ilaç ve kopolimer-ilaç çifti karşılaştırıldığında; saf ilacın hücreler üzerindeki toksik etkisinin daha az olduğu görülmüştür.

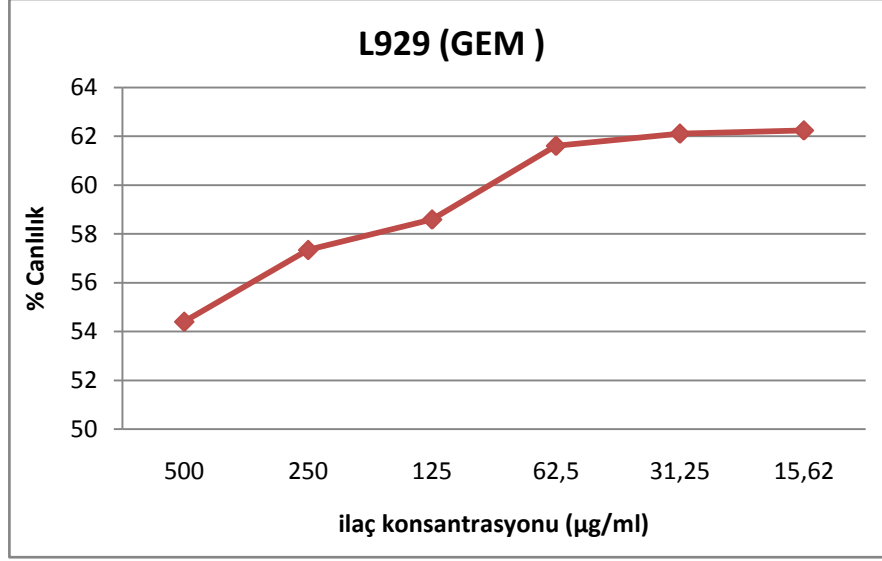
4.6.1.2. Gemsitabin (GEM) ve MAVA-Gemsitabin (GEM) Çiftinin L929 Fibroblast Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisi

XTT solüsyonundan her kuyucuğa 10 µl eklenip 37°C’de 4 saat inkübe edildikten sonra ELISA cihazı ile 450 nm dalga boyunda optik yoğunluk ölçüldü. Pozitif ve negatif kontrol ve her bir farklı ilaç ve kopolimer-ilaç konsantrasyonu için ayrı ayrı uygulanan 6 kuyucuğun ortalamaları alındı. Gereç ve yöntem bölümünde belirtilen formülden yararlanılarak % canlılık hesaplandı ve ilgili grafik elde edildi (Çizelge 4.14, Şekil 4.57).

Çizelge 4.14 : Gemsitabin’in çeşitli konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine Optik Dansite değerleri ve % Canlılık oranları -- XTT

İlaç (Konsantrasyon)	Optik Dansite Ortalaması	Canlılık (%)
500 µg/ml	0,2831	54,40
250 µg/ml	0,2984	57,34
125 µg/ml	0,3049	58,59
62,5 µg/ml	0,3206	61,61
31,25 µg/ml	0,3232	62,11
15,62 µg/ml	0,3239	62,24
Pozitif Kontrol (DMEM+FBS+PS)	0,5204	100
Negatif Kontrol (DMSO)	0,1655	31,80

Çizelge 4.14’ de Gemsitabin’in L929 hücreleri üzerindeki toksik etkisi, çeşitli konsantrasyonlarda canlılık yüzdesi olarak verilmiştir. Çizelgede görüldüğü gibi, Gemsitabin konsantrasyonu azaldıkça hücre canlılığı yüzdesi artmakta, yani toksik etkisi azalmaktadır.



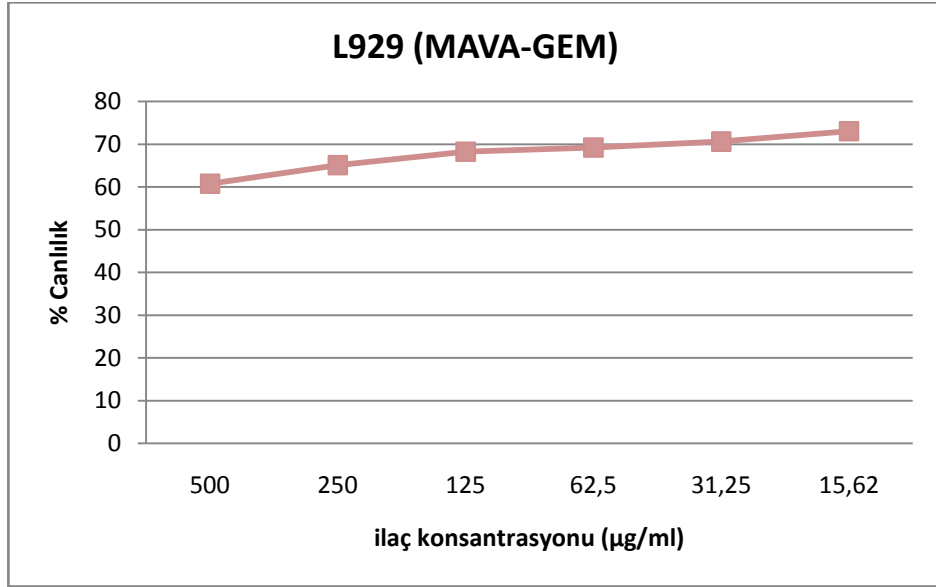
Şekil 4.57. GEM' in farklı konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine canlılık yüzdesi.

En düşük konsantrasyonun hücre canlılığına etkisinin (% 62,24) kontrole (% 100) yakın olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 4.15 : MAVA-Gemsitabin kopolimer-ilaç çiftinin çeşitli konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine Optik Dansite değerleri ve % Canlılık oranları -- XTT

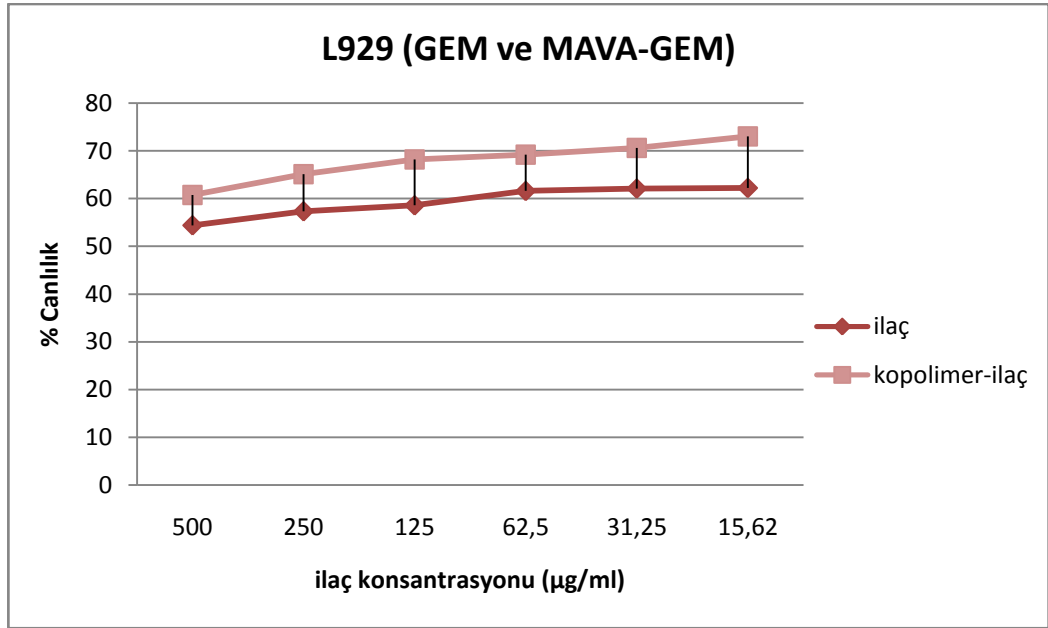
İlaç (Konsantrasyon)	Optik Dansite Ortalaması	Canlılık (%)
500 µg/ml	0,3162	60,76
250 µg/ml	0,3388	65,10
125 µg/ml	0,3550	68,22
62,5 µg/ml	0,3601	69,20
31,25 µg/ml	0,3674	70,60
15,62 µg/ml	0,3800	73,02
Pozitif Kontrol (DMEM+FBS+PS)	0,5204	100
Negatif Kontrol (DMSO)	0,1655	31,80

Çizelge 4.15’ de MAVA-Gemsitabin’in L929 hücreleri üzerindeki toksik etkisi, çeşitli konsantrasyonlarda canlılık yüzdesi olarak verilmiştir. Çizelgede görüldüğü gibi, MAVA-Gemsitabin konsantrasyonu azaldıkça hücre canlılığı yüzdesi artmakta, yani toksik etkisi azalmaktadır.

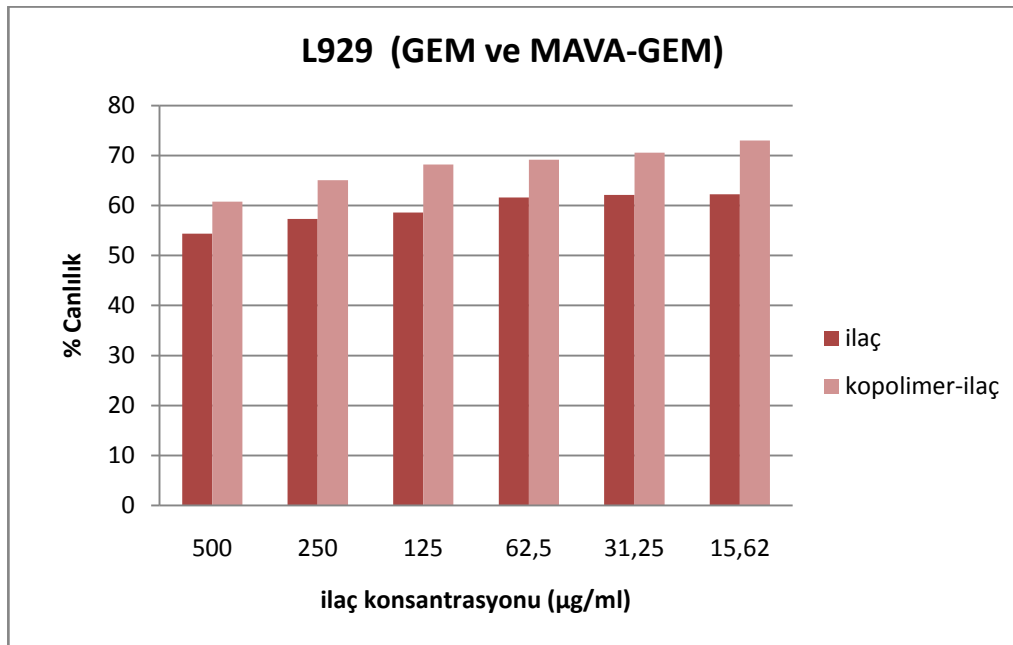


Şekil 4.58. MAVA-GEM’ in farklı konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine canlılık yüzdesi.

En düşük konsantrasyonun hücre canlılığına etkisinin (% 73,02) kontrole (% 100) yakın olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.59. GEM ve MAVA-GEM' in farklı konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine canlılık yüzdesi.



Şekil 4.60. GEM ve MAVA-GEM' in farklı konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine canlılık yüzdesi (2).

Gemsitabin ve MAVA-Gemsitabin'in en düşük konsantrasyonları karşılaştırıldığında, iki veri arasında anlamlı fark gözlenmiştir. ($p < 0,05$). Ayrıca kopolimer-ilaç çiftinin (% 73,02), sadece ilaca (% 62,11) göre canlılık oranının daha fazla olduğu, yani hücreler üzerindeki toksik etkisinin daha az olduğu görülmüştür.

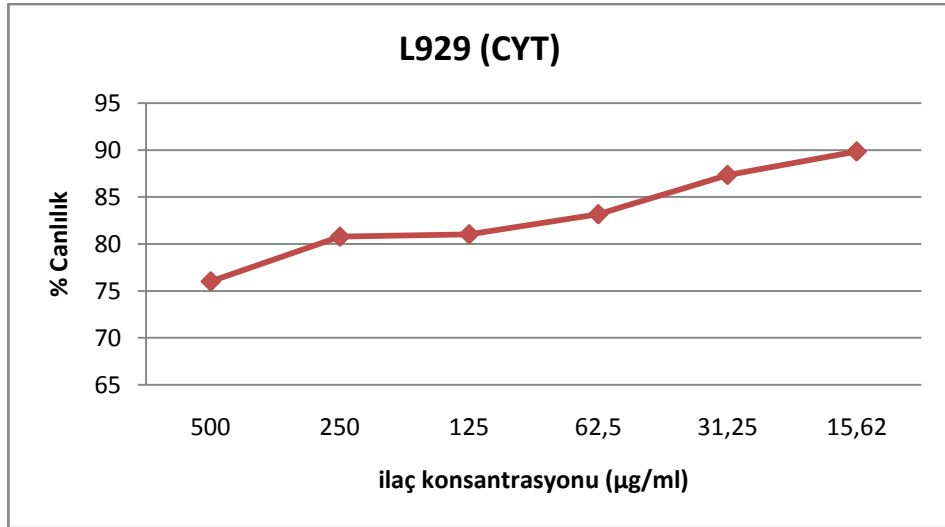
4.6.1.3. Siterabin (CYT) ve MAVA- Siterabin (CYT) Çiftinin L929 Fibroblast Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkisi

XTT solüsyonundan her kuyucuğa 10 µl eklenip 37°C'de 4 saat inkübe edildikten sonra ELISA cihazı ile 450 nm dalga boyunda optik yoğunluk ölçüldü. Pozitif ve negatif kontrol ve her bir farklı ilaç ve kopolimer-ilaç konsantrasyonu için ayrı ayrı uygulanan 6 kuyucuğun ortalamaları alındı. Gereç ve yöntem bölümünde belirtilen formülden yararlanılarak % canlılık hesaplandı ve ilgili grafik elde edildi (Çizelge 4.16, Şekil 4.61).

Çizelge 4.16 : Siterabin'in çeşitli konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine Optik Dansite değerleri ve % Canlılık oranları -- XTT

İlaç (Konsantrasyon)	Optik Dansite Ortalaması	Canlılık (%)
500 µg/ml	1,0277	76,01
250 µg/ml	1,0921	80,77
125 µg/ml	1,0956	81,03
62,5 µg/ml	1,1245	83,17
31,25 µg/ml	1,1810	87,35
15,62 µg/ml	1,2150	89,86
Pozitif Kontrol (DMEM+FBS+PS)	1,3521	100
Negatif Kontrol (DMSO)	0,1497	11,07

Çizelge 4.16' da Siterabin'in L929 hücreleri üzerindeki toksik etkisi, çeşitli konsantrasyonlarda canlılık yüzdesi olarak verilmiştir. Çizelgede görüldüğü gibi, Siterabin konsantrasyonu azaldıkça hücre canlılığı yüzdesi artmakta, yani toksik etkisi azalmaktadır.



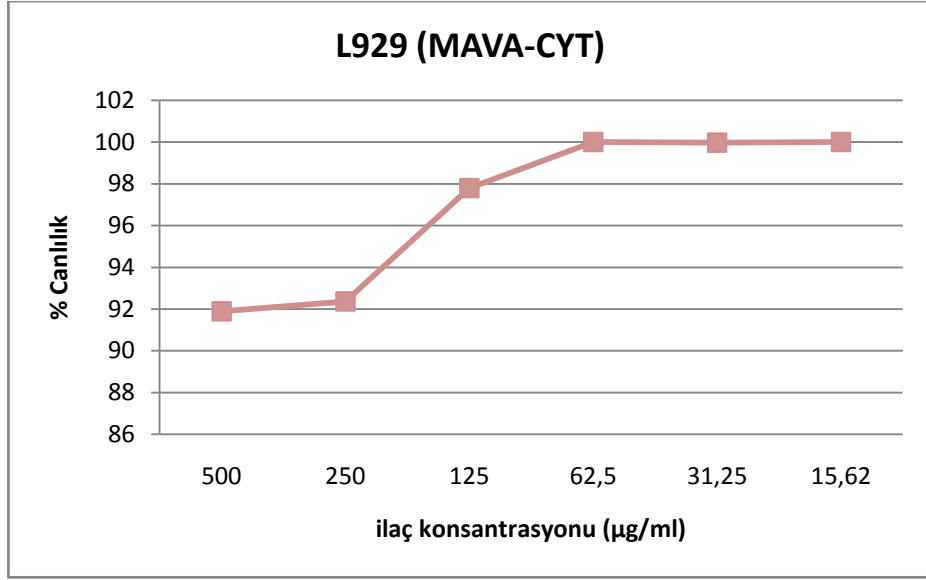
Şekil 4.61. CYT' in farklı konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine canlılık yüzdesi.

En düşük konsantrasyon 31,25 µg/ml olarak kabul edilirse, bu konsantrasyonun hücre canlılığına etkisinin (% 89,86) kontrole (% 100) oldukça yakın olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 4.17 : MAVA-Siterabin kopolimer-ilaç çiftinin çeşitli konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine Optik Dansite değerleri ve % Canlılık oranları – XTT

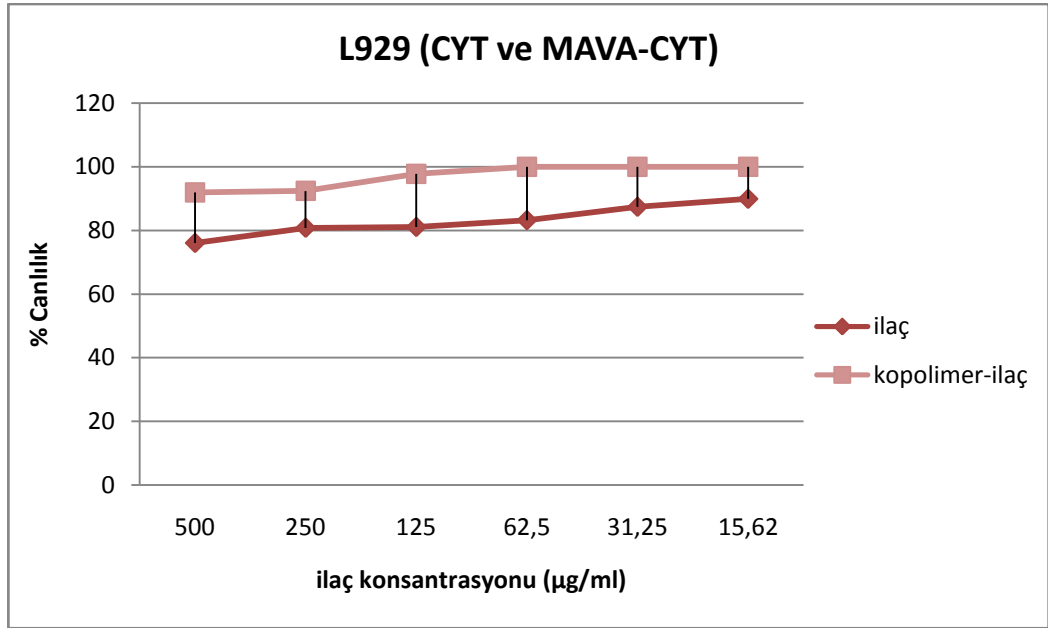
İlaç (Konsantrasyon)	Optik Dansite Ortalaması	Canlılık (%)
500 µg/ml	1,2424	91,89
250 µg/ml	1,2488	92,36
125 µg/ml	1,3222	97,79
62,5 µg/ml	1,4033	100
31,25 µg/ml	1,3517	99,97
15,62 µg/ml	1,4663	100
Pozitif Kontrol (DMEM+FBS+PS)	1,3521	100
Negatif Kontrol (DMSO)	0,1497	11,07

Çizelge 4.17’ de MAVA- Siterabin’in L929 hücreleri üzerindeki toksik etkisi, çeşitli konsantrasyonlarda canlılık yüzdesi olarak verilmiştir. Çizelgede görüldüğü gibi, MAVA- Siterabin konsantrasyonu azaldıkça hücre canlılığı yüzdesi artmakta, yani toksik etkisi azalmaktadır.

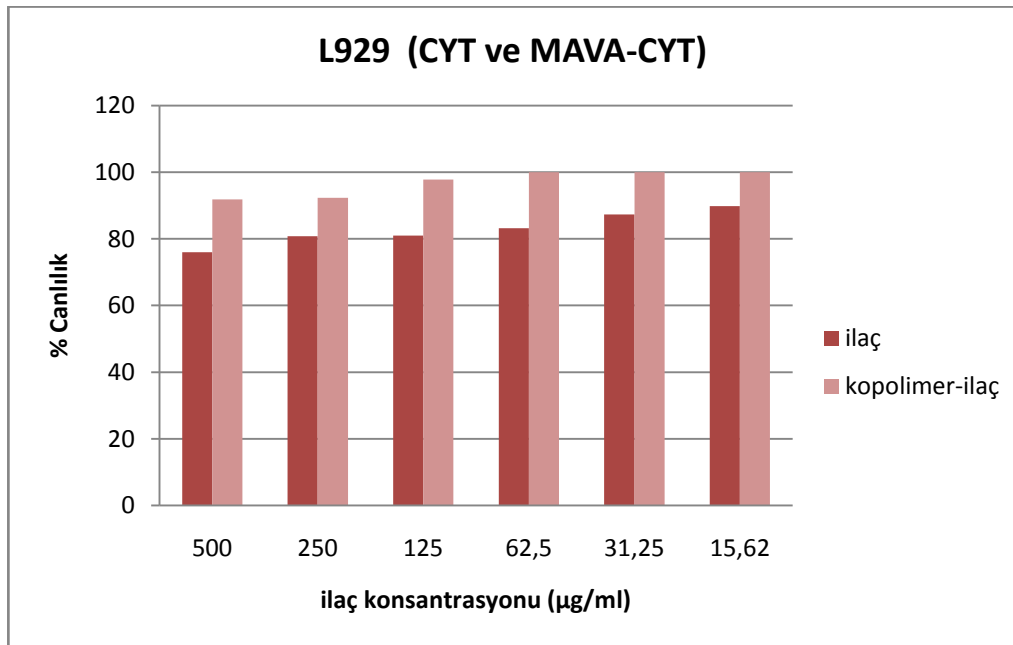


Şekil 4.62. MAVA-CYT’ in farklı konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine canlılık yüzdesi.

En düşük konsantrasyonun hücre canlılığına etkisinin (% 100) kontrolle (% 100) aynı değere sahip olduğu gözlenmiştir. Kopolimer-ilaç çiftinin neredeyse hiç toksik etkisi yoktur.

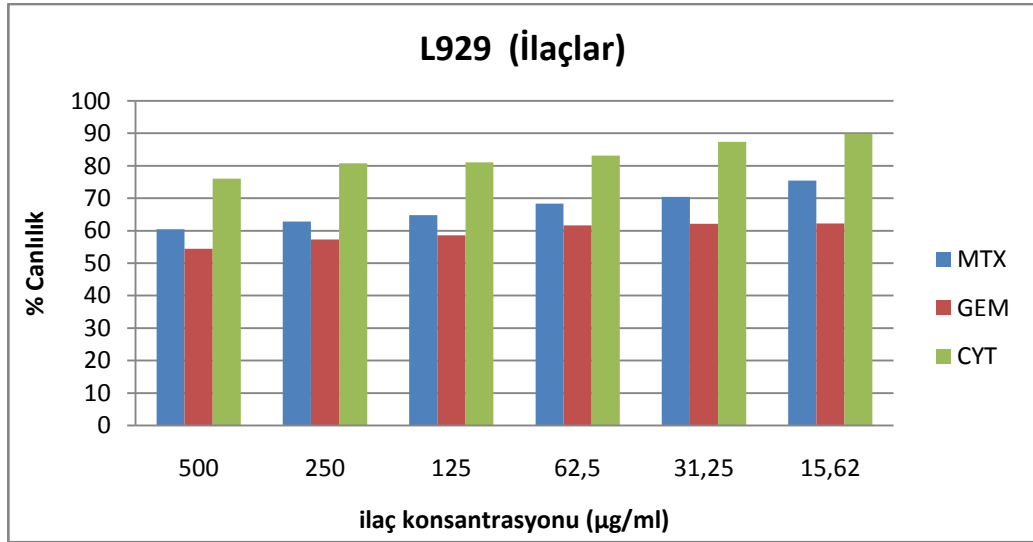


Şekil 4.63. CYT ve MAVA-CYT' in farklı konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine canlılık yüzdesi.



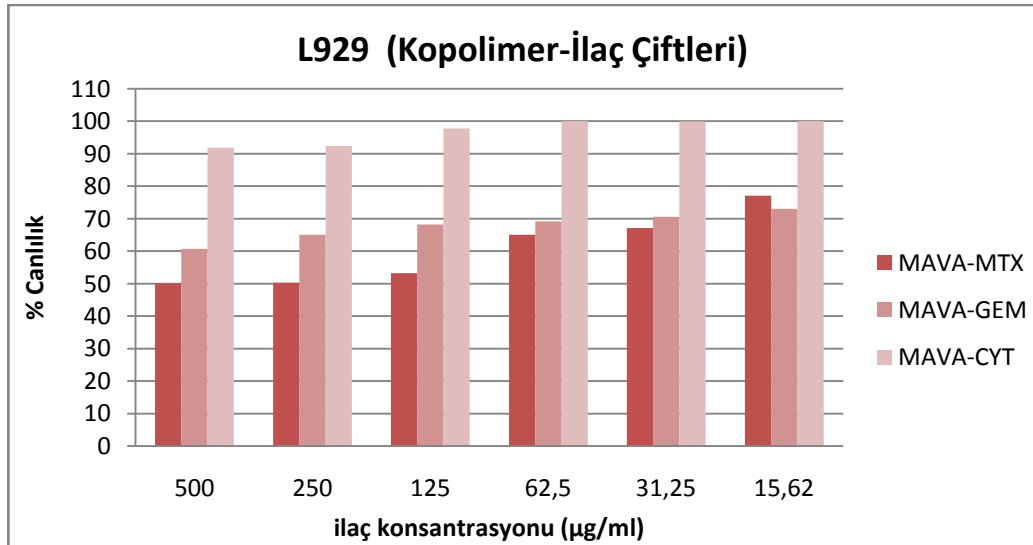
Şekil 4.64. CYT ve MAVA-CYT' in farklı konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine canlılık yüzdesi (2).

Siterabin ve MAVA- Siterabin'in en düşük konsantrasyonları karşılaştırıldığında, iki veri arasında anlamlı fark gözlenmiştir. ($p < 0,05$). Ayrıca kopolimer-ilaç çifti (% 100), sadece ilaca (% 89,86) göre daha yüksek bir canlılık oranına sahiptir. Hatta kopolimer-ilaç çiftinin toksik etkisi hemen hemen hiç bulunmamaktadır.



Şekil 4.65. İlaçların farklı konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine canlılık yüzdelerinin karşılaştırılması.

Çalışmamızda kullandığımız antikanser ilaçları karşılaştırıldığında en yüksek canlılık yüzdesinin % 89,86 ile Siterabin(CYT) ilacına ait olduğu görülmektedir. Ametopterin(MTX), % 75,45 ile ikinci sırada, Gemsitabin(GEM) ise % 62,24' lık bir oranla üçüncü sırada yer almaktadır (Şekil 4.65).



Şekil 4.66. Kopolimer-İlaç çiftlerinin farklı konsantrasyonlarının L929 hücreleri üzerine canlılık yüzdelerinin karşılaştırılması.

Hazırladığımız 3 farklı kopolimer-ilaç çifti karşılaştırıldığında en yüksek canlılık yüzdesinin % 100 ile MAVA-Siterabin ilacına ait olduğu görülmektedir. Bu kopolimer-ilaç çiftinin neredeyse hiç toksik etkisi bulunmamaktadır. MAVA-Ametopterin % 77,10 ile ikinci sırada, MAVA-Gemsitabin ise % 73,02' lik canlılık yüzdesi ile üçüncü sırada yer almaktadır (Şekil 4.66).

5. TARTIŞMA

Kanser tedavisinde kullanılan antineoplastik ilaçlar vücuda verildiklerinde tüm dokulara dağılırlar. Bu kararsız dağılımın sonucunda dokularda toksik etki oluşmakta ve yan etkiler ortaya çıkmaktadır [5,6]. Bu nedenle ilaçların vücutta gitmeleri gereken yerlerde lokalize olmalarını sağlamak ve yan etkilerini azaltmak amacıyla çeşitli öneriler geliştirilmektedir [7]. Bu önerilerden biri olan, kemoterapötik ajanlara kovalent olarak bağlanabilen, suda çözünebilir polimer fikri 1970'lerin ortalarında Ringsdorf tarafından ortaya atılmıştır. Bu modelden uyarlanarak günümüzde, kanser tanı ve tedavi yöntemlerinin iyileştirilmesi için genel kullanım kemoterapi ilaçlarına alternatif olarak polimer-ilaç çiftleri geliştirilmektedir. Biyoaktif polimerler olarak da bilinen bu makromoleküllerin ilaç etken maddeleri ile etkileştirilerek geliştirilmesiyle kanser tedavisinin yani antitümör aktivitenin artırılması, düşük kan düzeyi sağlanarak yan etkilerin azaltılması amaçlanmaktadır [7,8].

Meme kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılan ve polimer-ilaç konjugatları ile ilgili çalışmalarda sıkça karşımıza çıkan Doxorubicin ve Gemcitabine ilaçlarının kısa yarılanma ömrüne sahip olmaları ve dokulardaki toksik etkilerinin fazla olması klinik uygulamalarını sınırlandırmaktadır [11,103,104].

Amethopterin, Cytarabine, Melphalan, Hydroxyurea gibi meme kanseri tedavisine spesifik olmayan genel kullanım kemoterapi ilaçlarının da yan etkilerinin fazla olması ve tümör dokusuna karşı seçiciliklerinin düşük olması nedeniyle kopolimerlere bağlanarak toksisitelerini düşürmek ve seçiciliklerini artırmak hedeflenmektedir [105-108].

Çalışmamızda kullanılan Maleik Anhidrit (MA), fonksiyonel özelliği nedeniyle oldukça fazla tepkime verme yeteneğine sahip olmasının yanı sıra, polifonksiyonel maddeler ile de etkileşerek çok sayıda fonksiyonel özelliğe sahip yeni makromoleküllerin sentezlenmesini sağlayan bir monomerdur. MA, halkalı bir yapıya sahiptir. Bu halkanın kimyasal maddelerle etkileşerek açılması farklı özelliklere sahip maddelerin sentezlenmesine yol açar ki, bu da kullanım amacına göre çok farklı özelliklere sahip yeni birçok maddenin sentezlenmesine imkan tanır [14,15,16].

Yüksel B., yaptığı tez çalışmasında maleik anhidrit monomeri içeren Poli(NVP-co-MA) kopolimeri sentezlemiş ve antimikrobiyal aktivitesini araştırmıştır. Buna göre sentezlenen kopolimerin artan derişimine bağılı olarak antimikrobiyal aktivitenin de arttığı disk difüzyon yöntemi ile göstermiştir [109].

Uzlu E. ise, yine tez çalışmasında sentezlediğı maleik anhidrit içeren başka bir kopolimerin Poli(NVIM-co-MA) antimikrobiyal aktivitesini araştırmıştır. Bu kopolimerin antimikrobiyal aktiviteyi, gram pozitif bakteriler>gram negatif bakteriler>mantarlar şeklindeki sıralama ile artırdığını ispatlamıştır [110].

Biz çalışmamızda maleik anhidrit kullanarak 3 farklı kopolimer ürettik ve bunların antimikrobiyal etkilerini inceledik. Kopolimerleri 6 farklı derişimde DMSO içinde çözüp, vücut için kullanılabilir en yüksek dozu kullanmamıza rağmen herhangi bir aktivite tespit edemedik. Kaynak taramasında bizim ürettiğimiz MAVA, MAST ve MAMMA kopolimerlerinin antibakteriyel ve antifungal aktivitesinin incelenmesi ile ilgili bir bulguya rastlanmamıştır. Ancak Fanq ve ark., bir seri Poly(styrene-alt-maleic anhydride) amidleri oluşturmuşlar ve bunları mikrobisit olarak düşünmüş ve in vitro hücre kültürü çalışmalarında bu amidlerin HIV-1 enfeksiyonunu etkili bir şekilde azalttıklarını göstermişlerdir [111].

Vandana ve Sahoo, yaptıkları çalışmada Gemsitabin ilacını Poly(ethylene glycol)=PEG molekülünü modifiye ederek oluşturdukları maddeye bağlayarak polimer-ilaç konjugatı elde etmişlerdir. Bu konjugatın antitümör aktivitesinin gemsitabine göre daha yüksek olduğunu ve apoptoza uğrayan hücrelerin arttığını bildirmişlerdir [112].

Greco ve ark., antitümör aktivitesi olduğu bilinen N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide (HPMA) copolymer–doxorubicin kopolimer-ilaç konjugatına aminoglutethimide (AGM) inhibitörünü bağlayarak MCF-7 meme kanseri hücre serilerindeki antitümör aktivitenin belirgin bir şekilde arttığını göstermişlerdir [113].

Lammers ve ark., hem doxorubicin hem de gemcitabine içeren polimer-ilaç konjugatına belli oranda tyrosinamide molekülü eklemişlerdir. Bu şekilde toksik etkiyi artırmadan, kanser hücrelerinin gelişimini azalttıklarını bildirmişlerdir [104].

Cavallaro ve ark., gemcitabin ilacına poly(*N*-2-hydroxyethyl)-dl-aspartamide (PHEA) bağlayarak oluşturdukları makromolekülün insan nazofaringeal epidermal karsinoma hücrelerinde antitümör aktiviteyi artırdıklarını göstermişlerdir [114].

She ve ark., bir nanopartikül olan dendritik polimerlere doxorubicin bağlayarak oluşturulan mPEGylated (polietilen glikol ile türevlendirilmiş) peptide dendronedoxorubicin (dendrone-DOX) konjugatı ile yapılan in vitro ve in vivo çalışmalar sonucunda fare meme kanseri tümör dokusunu inhibe ettiğini saptamışlardır [115].

Pawar ve ark., PEG-Doxorubicin molekülüne N-asetil glikozamin (NAG) molekülünü bağlayarak elde ettikleri polimer-ilaç konjugatını MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri üzerinde denemişlerdir. NAG molekülünün bağlanmasıyla saf doxorubicine oranla meme kanseri hücreleri üzerinde daha fazla antitümör aktivite olduğu bildirilmiştir [116].

David ve ark., bazı polimer-metotreksat konjugatlarının (25 adet) sitotoksik davranışlarını karşılaştırmalı olarak HeLa insan servikal kanseri ve insan kolon kanseri hücrelerinde incelemiştir. Sonuç olarak her iki kanser hücresi üzerine polimer bağlı MTX konjugatlarının daha yüksek aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir [117].

Şahin ve ark., üzüm çekirdeği yağının metotreksatın toksik etkilerini azaltmak amacıyla insan kronik miyeloid lösemi hücreleri üzerindeki koruyucu etkisini belirlemek amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Sonuçlara göre üzüm çekirdeği yağının lösemnin tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılmasını önermişlerdir [118].

Bartyık ve ark., daha önceki çalışmalarında metotreksatın glikolaz mekanizmasını etkileyerek antitümör aktivite gösterdiklerini bildirmişlerdir. Metotreksat tedavisi uyguladıkları akut lösemili 10 çocuk ile yaptıkları çalışmada, MTX'in alfaokaldehit metabolizmasını etkileyerek glikolazı inhibe ettiklerini ve metotreksatın bu şekilde antitümör aktiviteye katkıda bulunduğunu göstermişlerdir [54].

Wang ve arkadaşlarına göre, kombinasyon tedavileri sitotoksiteyi artırmakta ve bazı direnç mekanizmalarını bertaraf etmektedir. Siterabin ve florodeoksiüridin antineoplastik ajanlarını nanopartiküllere bağlayarak multi-drug konjugatı elde etmişler ve bu konjugatın insan hepatoselüler karsinoma hücreleri üzerindeki antitümör aktiviteyi artırdığını göstermişlerdir [119].

Rzayev ve ark., carboxyl-trithiocarbonate molekülünün var olan antitümör aktivitesini artırmak amacıyla maleik anhidrit kopolimeri ile birleştirerek, daha az yan etkilere sahip etkili bir antikanser ajanı elde etmişlerdir. Oluşturdukları polimerin HeLa insan servikal karsinoma hücreleri üzerindeki aktiviteyi artırdığını ve L929 fare fibroblast hücreleri üzerindeki toksik etkiyi azalttığını göstermişlerdir [120].

Liang ve ark., paclitaxel isimli kanser ilacının ilaç salımını artırmak amacıyla ilaca polimerik nanopartiküller bağlamışlardır. İlaç salım ve sitotoksite testleri sonucunda polimer-ilaç konjugatının salımının arttığı ve L929 fare fibroblast hücre serileri üzerine toksik etkisinin olmadığını kanıtlamışlardır [121].

Siew ve ark., sentezledikleri poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) [P(3HB-co-4HB) kopolimerinin karakterizasyonunu yaptıktan sonra Çin hamster akciğer fibroblast (V79) ve fare adipoz doku fibroblast (L929) hücreleri üzerinde sitotoksitelerini ve genotoksitelerini incelemişlerdir. Deney sonuçlarına göre, sentezlenen kopolimerin her iki hücre için de biyouyumlu olduğunu göstermişlerdir [122].

Kaplan ve Baysal, siyanoakrilat kopolimerlerinin (ethyl 2-cyanoacrylate) fare fibroblast (L929) hücre serileri üzerindeki sitotoksitelerini göstermek için elusyon (elution) test yöntemi denilen, materyalin ekstrakte edilerek kültür ortamına eklendiği bir yöntem kullanmışlardır. Buna göre, ilk dilüsyonda hücrelerin sayısında belirgin bir artış görüldüğü, ekstrakt miktarının artırılmasıyla biyomateryallerin toksik etkisinin ortadan kaldırılabileceği bildirilmiştir [123].

Kaneda ve ark., divinil eter maleik anhidrit (DIVEMA) kopolimerine tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) bağlayarak tümör üzerindeki terapötik etkisini

in vivo olarak ölçmeyi amaçlamışlardır. Fare sarkoma solid tümörleri üzerinde yaptıkları çalışma sonucunda DIVEMA kopolimerinin antitümör aktiviteyi artıran iyi bir polimerik taşıyıcı olabileceğini bildirmişlerdir [124].

Saito ve ark., *E.coli*' den elde edilen ve antitümör özellik gösteren L-asparajinaz enzimini kimyasal olarak poli etilen glikol ve maleik anhidrit ile modifiye etmişlerdir. Bu modifiye enzimi fare lenfoma hücreleri üzerinde denemişler ve antitümör aktiviteyi, anti-asparajinaz antikor üretimini baskılayarak artırdığını göstermişlerdir [125].

Yadav ve ark., siterabine PEGylated PLGA (poly(lactic-co-glycolic acid)) nanopartiküllerini bağlamışlar, fare lenfoid lösemi hücreleri üzerinde yaptıkları salım çalışmalarında ilacın kandaki konsantrasyonunu saf ilaca göre artırdıklarını bildirmişlerdir [126].

Stella ve ark., gemitabinin plazmada metabolize olmasını hızlandırmak amacıyla, bu antikanser ilacına poly(H(2)NPEGCA-co-HDCA) kopolimerini bağlamışlardır. Elde ettikleri bu konjugatın sitotoksitesini insan serviks karsinoma hücre serileri (KB3-1) ve insan meme kanseri hücre serileri (MCF-7) üzerinde denemişler ve belli konsantrasyonda toksik etkiyi azalttıklarını bildirmişlerdir [127].

Akinboye ve ark., emetini tiyoüre, üre, sülfonamid, dithiokarbamat, karbamat ve maleik anhidrit amidleri ile türevlendirmişler ve bu analogların prostat kanseri hücre serileri (LNCaP ve PC3) üzerine sitotoksik aktivitesini incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda özellikle maleik anhidrit içeren analogların prostat kanseri hücreleri üzerine sitotoksik etkisini artırdığını ortaya koymuşlardır [128].

Kamada ve ark., bir polimerik ilaç taşıyıcı olan polyvinylpyrrolidone-co-dimethyl maleic anhydride [poly(VP-co-DMMA)] sentezlemişlerdir. Tedaviden 96 saat sonra proksimal tüp epitelyum hücreleri üzerinde sitotoksik etki olmadığını ve yüksek dozların böbrek ya da diğer dokular üzerinde toksik etki oluşturmayacağını, dolayısıyla molekülün renal ilaç salım sistemleri için uygun bir taşıyıcı olduğunu göstermişlerdir [129].

Karasulu ve ark., metotreksatın MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerine durdurucu etkilerini araştırmak amacıyla MTX ilacına ait bir mikroemülsiyon (M-MTX) hazırlamışlardır. In vitro sitotoksisite sonuçlarına göre M-MTX' in, saf ilaca oranla daha yüksek antitümör aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca gastrointestinal hücre serileri üzerine yapılan testlerde ise M-MTX'in toksik etkisinin bulunmadığını tespit etmişlerdir [130].

Ayla, yaptığı çalışmada, doğal bir polifenolik bileşik olan ve üzüm çekirdeğinden elde edilen resveratrol etken maddesi ile Gemsitabin ve Parasetamolun ayrı ayrı ve bir arada kullanıldıklarında MDAH-2774 over tümörü hücre soyu üzerine etkilerini incelemiştir. Sonuçta, gemsitabin, resveratrol ve parasetamol kombinasyonunun MDAH-2774 over tümörü hücreleri üzerine, hücre siklusunda, sentez fazındaki hücrelerin sayısını azalttığı, hücre proliferasyonunu önlediğı ve hücre yapısında bozulmaya yol açtığını gözlemiştir [131].

Numanoğlu, yaptığı çalışmada Genistein ve Hipertemi' nin MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde kombine etkisini çeşitli yöntemlerle araştırmıştır. Toksik etkiyi ise fetus fibroblast hücre serilerinde (WI 38) araştırmıştır. Özellikle üçüncü günde genistein ve hiperteminin sitotoksik ve apoptotik etkiyi artırdığını gözlemiştir. Toksik etki ise ikinci günden itibaren azalmaya başlamıştır [91].

Sonuç olarak, suda çözünmeyen çeşitli kopolimerlere antineoplastik ajanların bağlanarak biyoaktif kopolimerlere dönüştürülmesi ile suda çözünebilir hale getirilerek oluşturulan bu kopolimer-ilac konjugatlarının çeşitli kanser hücreleri üzerine antitümör aktivitelerinin artırıldığı, ilgili çalışmalarda bildirilmiştir. Biz de çalışmamızda sentezlediğimiz üç farklı kopolimer-ilac konjugatından iki tanesinde MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde antitümör aktivitenin, saf ilaca göre anlamlı derecede arttığını tespit ettik ve literatür araştırmamızda da, elde ettiğimiz sonuçların diğeri araştırmaların sonuçlarıyla aynı doğrultuda olduğunu görmekteyiz.

Sentezlediğimiz kopolimer-ilaç konjugatlarının L929 fare fibroblast hücre serileri üzerine toksik etkilerini saf ilaca göre karşılaştırmalı olarak araştırdığımızda, oluşturulan kopolimer-ilaç konjugatlarının toksik etkiyi azalttığını göstererek, literatürle aynı doğrultuda sonuçlara ulaştık.

Bu kopolimer-ilaç konjugatlarının farklı kanser hücreleri üzerine antitümör aktivitesinin yine saf ilaçla karşılaştırmalı olarak incelenmesinin faydalı olacağı kanısındayız. Ayrıca tedavi amacıyla kullanılması öngörülen bu moleküllerin hayvan deneyleri yapılarak desteklenmesinin, klinik uygulamaya geçiş için gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında; antineoplastik özellik gösteren ilaç etken maddeleri ile fonksiyonel özellikleri nedeniyle birçok farklı biyolojik aktivite gösteren kopolimerler etkileştirilerek, suda çözünebilir yeni polimer-ilaç konjugatları elde edilmesi, bu polimer-ilaç çiftlerinin karakterize edildikten sonra biyolojik aktivitelerine (Antibakteriyel, Antifungal) bakılması, kontrollü salınım davranışları ve sitotoksitesilerinin incelenmesi ve antitümör aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışma kapsamında aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

Çalışmamızda ön araştırmalara bağlı olarak, iki tanesi meme kanseri tedavisinde kullanılan (Doxorubicin, Gemcitabine), dört tanesi genel kullanım kemoterapi ilaçlarından olan (Amethopterin, Cytarabine, Hydroxyurea, Melphalan) toplam 6 antineoplastik ilaca, 2 farklı kopolimer (MAVA ve MAAFE) bağlanmasıyla 12 kopolimer-ilaç çifti elde edilmesi planlandı. Ancak elde edilen tüm ürünler için FTIR, ¹HNMR, suda çözünürlük, fosfat tamponlu çözeltideki (PBS) davranışları gibi özelliklerin tümünün aynı anda birbiri ile uyumlu ve tutarlı olduğu 3 adet kopolimer-ilaç çifti sentezlenmiş, karakterize edilmiş ve toksik etkisi ile antitümör aktivitesi incelenmiştir.

MAVA kopolimerinin yapısal karakterizasyonu için yapılan FTIR ve ¹HNMR analizleri sonucunda anhidrit halkasına ait ve oldukça karakteristik olan pikler tespit edilmiştir.

Kopolimerlerin biyolojik aktiviteleri *S. aureus*, *E. faecalis*, *Meticillin-Resistant Staphylococcus aureus*; *E. coli* ve *P. aeruginosa*, *C. albicans* mikroorganizmaları üzerinde Disk Difüzyon Yöntemi ile araştırıldı. Antibakteriyel ve antifungal etki, MAVA, MAST ve MAMMA kopolimerlerinin 6 farklı konsantrasyonunda incelendi. Pozitif kontrol olarak kullanılan antibiyotiklerin etrafında inhibisyon zonu oluşmuştur. Ancak 3 kez tekrarlanan çalışmalarda kopolimerlerde herhangi bir aktivite tespit edilememiştir.

MAVA kopolimerinin tek olarak sitotoksik ve antitümör etkisinin tespiti için kopolimeri PBS' de çözmeyi denedik. Ancak tek başına iken suda çözünür özelliği bulunmayan kopolimer sadece DMSO' da çözülebildi. İlk çözünmesi DMSO' da yapıldıktan sonra diğer sulandırıcılar için PBS çözeltisi

kullanıldığında maddenin tekrar çözünmez hale geldiği görüldü. Hücre duvarı olmayan hücreler için DMSO' nun toksik olması nedeniyle, sulandırımın DMSO' da yapılması mümkün olmadı. Bu nedenle tek başına MAVA kopolimerinin sitotoksik ve antitümör aktiviteleri tespit edilemedi.

Üç farklı antineoplastik ilaçla türevlendirilen maleik anhidrit kopolimerlerinin FTIR ve ¹HNMR ile yapısal karakterizasyonu sonucunda oldukça iyi sonuçlar alınmıştır. Kopolimer-ilac çiftlerinin FTIR sonuçlarına göre anhidrit halkasına ait karakteristik pikler kaybolmuş yani anhidrit halkası ilac etken maddeleri ile açılmıştır. Bu durum kopolimere ilaçların bağlanmış olabileceğinin göstergesi olarak kabul edildi. Bağlanmanın gerçekleştiğinin doğrulanması için, yapısal karakterizasyon için daha geçerli olan ¹HNMR analizi yapıldı. ¹HNMR spektrumunda ilac etken maddelerine ait pikler tespit edildi. Analiz sonuçlarına göre, ilac etken maddeleri kopolimerlere başarılı amidleşme mekanizmaları ile bağlandığı gösterildi. Özellikle MAVA-MTX çifti FTIR ve ¹HNMR spektrumundaki sonuçlarda diğer çiftlere oranla daha çok halka açılma tepkimesi vermesi, daha fazla sayıda pik oluşturması ve dolayısıyla tüm gruplara MTX molekülünün bağlandığının doğrulanması nedeniyle öne çıkmaktadır.

Kopolimerlerin tek başına suda çözünmemesi insan vücudunda kullanım açısından sorun oluşturmaktadır. Antineoplastik ilaçlarla türevlendirilen kopolimer-ilac çiftlerinin suda çözünebilmeleri, vücut sıvılarında da çözünerek ilgili dokuya ve hücrelere taşınabileceklerinin ön göstergesidir. Sentezlenen tüm kopolimer-ilac çiftlerinin başlangıç olarak suda oldukça iyi çözüldüğü gözlenmiştir. Sonraki aşamada kopolimer-ilac çiftlerinin vücut benzeri bir ortamdaki davranışlarını belirlemek amacıyla yapay vücut sıvısı olarak kabul edilen PBS tampon çözeltisi kullanıldı. Bu çözelti içerisinde, vücut sıcaklığı olan 37° C'de inkübe edilen kopolimer-ilac çiftlerinin 1 saat içerisinde, 24. saatte ve 48. saatte davranışları gözlendi. MAVA-CYT çifti 1 saat içerisinde neredeyse tamamen çözünmüştür. MAVA-MTX çifti 24. saatin sonunda neredeyse tamamen çözünmüştür. MAVA-GEM ise 48. saatin sonunda hala tamamen çözünmemiştir. Kopolimerlere bağlanmış antineoplastik ilaçların vücuda verildikten sonraki salım davranışı birbirlerinden farklı olabilir. Örneğin MAVA-siterabin (CYT) içindeki ilac derhal çözünerek daha kısa süreli etki yaptığı, MAVA-gemsitabin (GEM)'in içerdiği ilacın ise yavaş yavaş çözünerek uzun süreli bir etki yaptığı öngürülebilir.

Çalışmamızın sonraki aşamasında kopolimerlerden ilaçların salım davranışlarının değerlendirilmesi için farklı cihaz ve yöntemlerin kullanılması, ayrıca salım davranışlarının artırılması ve/veya düzenlenmesi amacıyla farklı kontrollü salım sistemleri geliştirilmesi önerilebilir.

MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerindeki antitümör aktivitenin artırılması amacıyla hazırladığımız kopolimer-ilaç çiftlerinin aktiviteleri, ilaçların tek başına oluşturduğu antitümör aktiviteleriyle karşılaştırıldı. Buna göre; MAVA-MTX ve MAVA-GEM çiftleri, saf MTX ve GEM ilaçlarına göre daha yüksek antitümör aktivite gösterdi. Ancak MAVA-CYT çifti saf CYT ilacına göre daha düşük antitümör aktivite gösterdi. Buna rağmen MAVA-CYT çiftinin kanser hücrelerini öldürme oranı oldukça yüksek (% 60,64) bulundu.

Kopolimerlere antineoplastik ilaçlar bağlamamızın nedenlerinden biri de ilaçların vücuttaki toksik etkilerini ve yan etkilerini azaltmaktır. Kopolimer-ilaç çiftlerinin kanser hücrelerini öldürme etkileri kanıtlandıktan sonra, vücutta bulunan sağlıklı hücreler üzerine toksik etkilerinin olup olmadığını göstermek amacıyla, L929 fibroblast hücreleri kullanılarak kopolimer-ilaç çiftleri ve ilaçların sitotoksitesisi belirlendi. Buna göre; ilaca göre daha az antitümör etkisi olan MAVA-CYT çiftinin neredeyse hiç toksik etkisinin bulunmadığı tespit edildi. MAVA-MTX ve MAVA-GEM çiftlerinin ise birbirlerine yakın ve oldukça düşük miktarda toksik etkilerinin bulunduğu gösterildi. Ancak MAVA-MTX çifti yüksek antitümör aktivite göstermesine rağmen, saf ilaca göre daha yüksek toksik etki oluşturdu.

Saf ilaca göre daha düşük antitümör aktivite göstermesine rağmen, MAVA-CYT çiftinin L929 hücreleri üzerindeki % canlılık oranının % 99,97 olması ve saf ilaca göre (% 89,86) çok daha az toksik etki göstermesi de oldukça önemli bir sonuçtur.

MAVA-MTX ve MAVA-CYT kopolimer-ilaç çiftleri, içerdikleri ilaçların meme kanserinden başka kanser türlerinin tedavisinde de kullanılmaları nedeniyle, farklı çalışmalarda diğer kanser hücreleri üzerindeki antitümör aktivitelerinin araştırılması önerilebilir.

Sonuç olarak; MAV A-MTX ve MAV A-GEM ifti, antikanser tedavilerinde alternatif bir ürün olarak kullanılabilir kapasiteye sahip maddeler olarak karakterize edilmiştir. İleriki aşamada bu iki maddenin hayvan deneylerinde test edilmesi ve sonrasında klinik araştırmaya yöneltilerek kemoterapi ilacı olarak geliştirilmesi önerilebilir.

KAYNAKLAR

- [1] Yazıhan, N. , Yılmaz H. Türkiye’de Meme Kanseri. (2006).
www.ukdk.org/pdf/kitap/32.pdf.
- [2] Okyay, P., Meme Kanseri Epidemiyolojisi. (2010)
www.pitt.edu/~super4/34011-35001/34841.ppt
- [3] Türkiye’ de En Çok Görülen Kanser Türü Meme Kanseri. 10.08.2010.
<http://www.t24.com.tr>
- [4] Tyler, T., (2010). Drug Interactions in Metastatic Breast Cancer. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*. 17(3):236-45.
- [5] Li, C., Wallace, S. (2008). Polymer-Drug Conjugates: Recent Development in Clinical Oncology *Advanced Drug Delivery Reviews*. 60- 886–898.
- [6] Duncan, R. (May 2003). The Dawning Era of Polymer Therapeutics, *Drug Discovery, Nature Reviews* .Volume 2, 347-360.
- [7] Young, B. L., Deog, J. K., Chang H. A. (2010). HPMa-Docetaxel or Gemcitabine Conjugates and Uses Therefore. US Patent Application Publication.
- [8] Karakuş, G. (2011). Bazı Maleik Anhidrit Kopolimerlerinin Antineoplastik Ajanlarla Türevlendirilmesi ve Karakterizasyonu. Doktora tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Ana Bilim Dalı, Sivas.
- [9] Pack, D.W., Hoffman, A.S., Pun, S. ve Stayton, P.S., (2005). Design and Development of Polymers for Gene Delivery, *Nature Rev. Drug Discov.*, 4: 581–593.
- [10] Abe, A., Albertsson, A.C., Duncan, R., Dusek, K., de Jeu, W.H., Joanny, J.F., Kausch, H.H., Kobayashi, S., Lee, K.S., Leibler, L., Long, T.E., Manners, I., Möller, M., Nuyken, O., Terentjev, E.M., Voit, B., Wegner, G. ve Wiesner, U., (2006). *Advances in Polymer Science*, Vol:189,190, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- [11] Cao, N., Feng, S. (2008). Doxorubicin conjugated to D- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS): Conjugation chemistry, characterization, in vitro and in vivo evaluation. *Elsevier, Biomaterials* 29: 3856-3865.
- [12] Denizli, A., Kiremitçi, M., (1988). Kontrollü Salınım Teknolojisinin Kemotreapötik Uygulamaları. *ANKEM Dergi* 2 (No 1): 77-85.

- [13] Langer, R. (1980). Polymeric Delivery Systems For Controlled Drug Release, *Chemical Engineering Communications* 6: 1.
- [14] Jeong, J. H., Byoun, Y. S., Ko, S. B., Lee, Y. S. (2001). Chemical Modification of poly(styrene-alt-maleic anhydride) with Antimicrobial 4-aminobenzoic acid and 4-Hydroxy benzoic acid, 7: 310-315.
- [15] Zengin, H. B. (1999). Bazı maleik anhidrit kopolimerlerinin değişik amid ve imid türevlerinin sentezi ve ısıl bozunması. Doktora tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Bilimleri Enstitüsü Kimya Ana Bilim Dalı, Sivas.
- [16] Liu, H. Y., Cao, K., Yao, Z., Li, B. G., Hu, G. H. (2007). Variations of the Glass-transition Temperature in The Imidization of Poly(styrene-co-maleic anhydride), 104: 2418-2422.
- [17] Spridon, D., Panaitescu, L., Ursu, D., Uglea, C. V., Popa, U., Ottenbrite, R. O. (1997). Synthesis and Biocompatibility of Maleic Anhydride Copolymers: Maleic Anhydride-Vinyl Acetate, Maleic Anhydride-Methyl Methacrylate and Maleic Anhydride-Styrene 43: 175-181.
- [18] Chouhan, R. and Bajpai, A. K. (2009). Real Time in vitro Studies of Doxorubicin Release From PHEMA Nanoparticles, *Journal of Nanobiotechnology*. Vol: 7, 1-12.
- [19] Franks, L. M., Knowles, M. A. (2005). What is cancer?, Knowles, M. A., Selby, P. J., Introduction to The Cellular and Molecular Biology of Cancer, Oxford University Press, USA, 1,4.
- [20] Alican, F. (1993). *Kanser*, AFA Matbaacılık, İzmir, s10-33.
- [21] Tomatis, L. (1990). *Cancer: Causes, Occurrence and Control*, IARC Scientific Publications No. 100, Lyon, p15-121.
- [22] Zhang, J., Lu, A., Beech, D., Jiang, B., Lu Y. (2007). Suppression of Breast Cancer Metastasis Through the Inhibition of VEGF-mediated Tumor Angiogenesis. *Cancer Ther.*5:273-286.
- [23] <https://apss.who.int.infobase/report.aspx>
- [24] Kiltie, A. (2005). Radiotherapy and molecular radiotherapy, Knowles, M. A., Selby, P. J., Introduction to The Cellular and Molecular Biology of Cancer, Oxford University Press, USA, 414.

- [25] Baloğlu, E. (2001). Synthesis and Biological Evaluation of Paclitaxel Analogs, Doctor of Philosophy in Chemistry, Virginia Polytechnic Institute and State University.
- [26] Rose, P. G. (2002). Chemoradiotherapy for Cervical Cancer, *European Journal of Cancer*, 38, 270-278.
- [27] Saçak, M. (2006). *Polimer Kimyası*, Gazi Kitabevi, Ankara, 525s.
- [28] Duncan, R. (2003). The Dawning Era of Polymer Therapeutics, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2: 347-60.
- [29] Harris, J.M. ve Chess, R.B. (2003). Effect of Pegylation on Pharmaceuticals, *Nat. Rev. Drug Discov.* 2: 214-221.
- [30] Morawetz, H. (1985). *Polymers: The Origins and the Growth of a Science*. Wiley, New York.
- [31] Ringsdorf, H. (2004). Hermann Staudinger and the Future of Polymer Research: Jubilees – Beloved Occasions for Cultural Piety, *Angew. Chem. Int.*, 43:1064–76.
- [32] Breslow, D.S. (1976). Biologically Active Synthetic Polymers, *Pure Appl. Chem.*, 46:103–13.
- [33] Maeda, H., Konno, T., Iwai, K., Maki, S. ve Tashiro, S. (1984). Tumor Selective Drug Delivery with Lipid Contrast Medium (SMANCs/Lipiodol): Sustained Antitumor Effect, Enhanced Diagnostic Value and Quantification of Dosage Regimen, *Gan To Kagaku Ryoho*, 11(4): 814-26.
- [34] Maeda, H. (1998). Recent Advances in Research on SMANCs, *Gan To Kagaku Ryoho*, Suppl 1:1-9.
- [35] Richard, D.K., Bradley, J.C., Fred, C.K., Wigdahl, B. ve Schengrund, C-L. (2004). Novel Polysulfated Galactose-Derivatized Dendrimers As Binding Antagonists of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(5): 1614-1623.
- [36] Satchi-Fainaro, R., Puder, M., Davies, J.W., Tran, H.T., Sampson, D.A., Grene, A.K., Corfas, G. ve Folkman, J. (2004). Targeting Angiogenesis with a Conjugate of HPMA Copolymer and Tnp-470, *Nature Med.*, 10: 255–261.
- [37] Ferbitz, J. and Mormann, W. (2002). Copolymerisation of Maleic Anhydride with Electron-Acceptor Monomers, *Macromol. Symp.*, Vol: 181, 63-71.

- [38] Jain, J. P. Modi, S. Domb, A. J. And Kumar, N. (2005). Role of Polyanhydrides as Localized Drug Carriers, Journal of Controlled Release, Vol: 103, 541-563.
- [39] Kaplan Can, H., Doğan, A. L., Rzaev, Z. M. O., Uner, A. H. and Güner, A. (2005). The Dissolution of Copper in Common Solvents Used for Low Dielectric Polymers, Journal of Applied Polymer Science, Vol: 96, 2352-2359.
- [40] Derbentli, S. (2003). Antimikrobiyal Maddelerin Genel Özellikleri, Antimikrobiyal Maddeler, , Gazi kitapevi, Ankara, 141-142.
- [41] Bökesoy, T.A. (2000). Çakıcı, I. ve Melli, M., Farmakoloji Ders Kitabı , Türk Farmakoloji Derneği, 521-635.
- [42] Levinson, W. ve Jawetz, E. (1997). Mikrobiyoloji Çeviri Kurulu ; Dündar, I.H., Erken, E., Kılıç, B., Memişoğlu, H.R., Özcan, K., Özgünen, T. ve Yarkin, F. Tıbbi Mikrobiyoloji ve İmmunoloji, Barış Kitabevi, İstanbul.
- [43] Ulusoylu, M., Soyoğul, U., Gürkan, E. ve Tuzlacı, E. (2001). *Centaurea iberica* bitkisinin biyolojik aktivite tayinleri, XIII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiri Kitabı, 670 (17), 287-290.
- [44] Murray, P., (2009). Klinik Mikrobiyoloji, Atlas Yayınevi, (Çeviri Editör: Başustaoğlu, A.) 390-443s. <http://www.gata.edu.tr/infkom/MRSA.pdf>.
- [45] Beşe, M. (1989). Mikrobiyolojide Kullanılan Antibiyotik Duyarlılık ve Deneme Yöntemleri, 45-47.
- [46] Foster, W.J. ve Woodruff, H.B. (1943). Microbiological Aspects of Penicillin: I. Methods of Assay. J Bacteriol. 46(2):187-202.
- [47] CLSI M7- A7. (2006). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically.
- [48] Kahlmeter, G., Brown, D.F., Goldstein, F.W., MacGowan, A.P., Mouton, J.W., Odenholt, I., Rodloff, A., Soussy, C.J., Steinbakk, M., Soriano, F., Stetsiouk, O. (2006). European Committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST) technical notes on antimicrobial susceptibility testing. Clin Microbiol Infect; 12: 501-503.
- [49] Page, C.P., Curtis, M.J., Sutter, M.J., Walker, M.J., Hoffman, B.B. (eds), (1997) Pharmacology, (Second Edition), Barcelona, Mosby.
- [50] <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00563>.

[51] SIGMA-ALDRICH

<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-biology/cancer-research/cancer-research-products.html?TablePage=14938470>.

[52] Gorlick, R., Goker, E., Trippett, T., Waltham, M., and Banerjee, J. R. (1996). Intrinsis and Acquired Resistance to Methotrexate in Acute Leukaemia. *Drug Therapy*, 335(14):1041–1047.

[53] Anta, J. M., Real, F. X., and Mayol, X. (2005). Lowtumor cell density environment yield survival advantage of tumor cells exposed to MTX in vitro. *Biochimi. Biophys. Acta*, 1721:98–106.

[54] Bartyik, K., Turi, S., Orosz, F., and Karg, E. (2004). Methotrexate inhibits the glyoxalase system in vivo in children with acute lymphoid leukaemia. *Eur. J. Cancer*, 40:2287–1192.

[55] Kurtz, J. E., Andres, E., Natarajan-Am'e. S., Noel, E., and Dufour, P. (2003). Oral chemotherapy in colorectal cancer treatment: review of the literature. *Eur. J. Inter. Med.* 14:18–25.

[56] Moutardier, V., Tosini, F., Vlieghe, P., Cara, L., Delpero, J. R., and Clerc, T. (2003). Colloidal Anticancer Drugs Bioavailabilities in Oral Administration Models. *Int. J. Pharmaceut.* 260:23–38.

[57] <http://structures.wishartlab.com/molecules/DB00563/image.png>

[58] Galmarini, C.M., Mackey, J.R., Dumontet, C. (2001): Nucleoside analogues: Mecanism of Drug Resistance and Reversal Strategies, *Leukemia*; Jun; 15(6): 875-90.

[59] <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00441>

[60] <http://structures.wishartlab.com/molecules/DB00441/image.png>

[61] Freshney, R.I. (1994), *Culture of Animal Cells, A manual of Basic Technique*, USA.

[62] Ustaçelebi, Ş. (1991), *Genetic Virology*, Hacettepe Tas Kitapçılık, ANKARA.

[63] Koneman, W.E., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger P.C. ve Winn, W.C., (1992), *Diagnostic Microbiology*, J.B. Lippincott Company, Philedelphia.

[64] Ryan, K.J., (1994). *Medical Microbiology*, Printice-Hall International Inc, USA, 231-32.

- [65] Boyd, R.F., (1995). Basic Medical Microbiology, Little Brow and Company, USA.
- [66] Tanya, L.H., Leibowitz, G. ve Levine, F. (1998). Telomerase Activity is Sufficient to Allow Transformed Cells to Escape from Crisis, *Molecular and Cellular Biology*, 19(3): 1864-1870.
- [67] Rheinberger, H.J. (2007). *Cultures of Experiment*, Ber. Wiss., 30(2):135-44.
- [68] Komori, K., Nada, J., Miyajima, S., Ono, Y., Tatsuma, T. ve Sakai, Y., (2008). Development of New Cytotoxicity Testing Systems That Include Toxicokinetic Processes, *Takugahu Zasshi*, 128(1):29-35.
- [69] Fuchs, W., Veits, J., Helferich, D., Granzow, H., Teifke, J.P. ve Mettenleiter, T.C. (2007). *Molecular Biology of Avian Infectious Laryngotracheitis Virus*, *Vet. Res.*, 38(2):261-79.
- [70] Akbaba, G., Sunay, Ç. (2000). Hayvan Deneyleri Yararsız ve Acımasız Çalışmalar mı, Sağlığımız İçin Önemli Bir Gereksinim mi? *Bilim ve Teknik*, Mayıs.
- [71] Davis, J.M. (1994). *Basic Cell Culture*, Oxford Uni. Pres.
- [72] Dickson, R.B., Bates, S.E., Mc Manaway, M.E. ve Lippman, M.E. (1986). Characterization of Estrogen Responsive Transforming Activity in Human Breast Cancer Cell Lines, *Cancer Res*, 46: 1707-1713.
- [73] Soule, HD; Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 51 (5): 1409–1416. [PMID 4357757](#).
- [74] Tong, D., Czerwenka, K., Sedlak, J., Schneeberger, C., Schiebel, I., Concin, N., Leodolter, S. ve Zeillinger, R. (1999). Association of In Vitro Invasiveness and Gene Expression of Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, pS2 and Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Human Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer Res Treat*, 56: 91-97.
- [75] Mukhopadhyay, R., Theriault, R.L. ve Price, J.E. (1999). Increased Levels of Alpha6 Integrins are Associated with the Metastatic Phenotype of Human Breast Cancer Cells, *Clin Exp Metastasis*, 17: 325-332.

- [76] Zange, R. ve Kissel, T. (1997). Comparative in vitro biocompatibility testing of Polycyanoacrylates and Poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide) using different mouse fibroblast (L929) biocompatibility test models, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 44: 149-157.
- [77] Sakaguchi, S., Furusawa, S., Wu, J. ve Nagata, K. (2007). Preventive Effects of a Biscoclaurine Alkaloid, Cepharanthine, on Endotoxin or Tumor Necrosis Factor-Alpha- Induced Septic Shock Symptoms: Involvement of from Cell Death in L929 Cells and Nitric Oxide Production in Raw 264.7 Cells, *Int Immunopharmacol*, 7(2):191-7.
- [78] Reis, R.L. (2005). *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, CRC Pres LLC, Florida, 339-349.
- [79] Berridge, M.V., Tan, A.S. (1993). Characterization of the Cellular Reduction of MTT: subcellular localisation, substrate dependence and involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction, *Archiv. Biochem. Biophys.*, 303, 474-82.
- [80] Berridge, M.V., Tan, A.S., Kathy, D.M., (1996).The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts, *Biochemica*, 4, 14-19.
- [81] http://bioantares.com/Cytotoxicity_Screening.html.
- [82] Mossman, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assay. *Journal Immunol Methods*, 65:55-63.
- [83] Berridge, M.V., Tan, A.S., Kathy, D.M. (1996). The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica*, 4, 14-19.
- [84] 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 Res*, 48:589-601.
- [85] Van de Loosdrechth, A.A., Nennie, E., Ossenkoppele, G.J. ve Belen, R.H., (1991). Langenhuijsen and Macrophages in a Modified Calorimetric MTT Assay, a Methodological Study. *J Immunol Methods*, 141: 15-22.

- [86] Wilson, J.K., Sargent J.M., Elgie A.W., Hill J.G. ve Taylor C.G. (1990). A Feasibility Study of The MTT Assay for Chemosensitivity Testing in Ovarian Malignancy”, Br J Cancer, 62:189-194.
- [87] Abe, K. ve Matsuki, N. (2000). Measurement of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromide (MTT) Reduction Activity and Lactate Dehydrogenase Release Using MTT, Neurosci Res, 38:325-329.
- [88] İlbars, N. (2007). Yeni Nesil Metal Desteksiz Seramiklerin ve Yapıştırılmasında Kullanılan Rezin Simanların Biyouyumluluğunun Değerlendirilmesi, Dişhekimliği Bilimleri Merkezi Protetik Diş Tedavisi Programı Doktora Tezi, GATA Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [89] <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233311001974>.
- [90] Roche Diagnosis Manual. (2013).
- [91] Numanoglu, S. (2008). Östrojen Bağımlı Meme Kanseri Hücrelerinde (MCF-7) Genistein ve Hiperteminin Kombine Etkisinin Araştırılması, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Programı Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- [92] Marshall, N.J., Goodwin, C.J., Holt, S.J. (1995). A critical Assessment of The Use of Microculture Tetrazolium Assays to Measure Cell Growth and Function, Review, Growth Regulation, 5, 69–84.
- [93] <http://www.hanasc.co.kr/beckman/vicell.html>.
- [94] Gürtürk, S. (1977). Viroloji, Ankara Üniversitesi Basımevi, 64-73, Ankara.
- [95] Brain, W., Kangro, M. ve H. O. (1996). Virology Methods Manual, 35-37.
- [96] http://www.eplantscience.com/botanical_biotechnology_biology_chemistry/algae/algal_culturing/quantitative_determinations_of_algal_density_and_growth.php.
- [97] Pal, J., Singh, H. and Gosh, A. K. (2004). Modification of LLPDE Using Esterified Styrene Maleic Anhydride Copolymer: Study of Its Properties and Environmental Degradability, J Applied Polymer Science, Vol:92, 102-108.
- [98] Qiao, Z., Xie, Y., Chen, M., Xu, J., Zhu, Y., Qian, Y. (2000). Synthesis of Lead Sulfide/Polyvinyl Acetate Nanocomposites with Controllable Morphology, Chemical Physics Letters, Vol: 321, 504-507.

- [99] Nemtoi, G., Beldie, C., Ticolea, C., Popa, I., Cretscu, I., Humelnicu, I. and Humelnicu, D. (2001). Behavior of The Poly(maleic anhydride-co-vinyl acetate) Copolymer in Aqueous Solutions, *European Polymer Journal*, Vol:37, 729-735.
- [100] Popa, I., Offenbergl, H., Beldie, C. and Uglea, C. V. (1997). Benzocaine Modified Maleic Anhydride copolymers-I. Synthesis and Characterization of Benzocaine Modified Poly(maleic anhydride-co-vinyl acetate), Poly(maleic anhydride-co-methyl methacrylate) and Poly(maleic anhydride-co-styrene), *European Polymer Journal*, Vol:3, 1511-1514.
- [101] Skoog, D.A., Holler, F. J. and Nieman, T.A. (1998). *Enstrümantal Analiz İlkeleri*, Bilim Yayıncılık (Çeviri: Kılıç E., Köseoğlu F. ve Yılmaz H.), Ankara, 850s.
- [102] Lin Jia, Jian-Jun Zheng, Shu-Man Jiang, Kai-Hong Huang. (2010). Preparation, physicochemical characterization and cytotoxicity in vitro of Gemcitabine-loaded PEG-PDLLA nanovesicles. *World J Gastroenterol*, Vol: 16(8): 1008-1013
- [103] Lammers T., Vladimir S., Ulbrich K., Peschke P., Huber P.E., Hennink W.E, Stormb G. (2009). Simultaneous delivery of doxorubicin and gemcitabine to tumors in vivo using prototypic polymeric drug carriers: *Biomaterials* Vol: 30 3466–3475.
- [104] Liang, L.S., Jackson J., Min W., Risovic, V., Wasan, K.M., Burt, H.M. (2004). Methotrexate loaded poly(L-lactic acid) microspheres for intra-articular delivery of methotrexate to the joint, *J Pharm Sci.*, Apr;93(4):943-56.
- [105] Choi, Y., Kim, M., Cho, Y., Yun, E., Song, R. (2013). Synthesis, characterization and target protein binding of drug-conjugated quantum dots in vitro and in living cells. *Nanotechnology*. Vol: 22;24(7) :075101. doi: 10.1088/0957 - 4484/24/7/075101.
- [106] Cavallaro, G., Pitarresi, G., Licciardi, M., Giammona, G. (2001). Polymeric prodrug for release of an antitumoral agent by specific enzymes. *Bioconjug Chem. J*, Mar-Apr;12(2):143-51.
- [107] Ajazuddin, Alexander, A., Amarji, B., Kanaujia, P. (2012). Synthesis, characterization and in vitro studies of pegylated melphalan conjugates. *Drug Dev Ind Pharm*. Jul 11. (Epub ahead of print).

- [108] Yüksel, B. (2008). Bazı Polimerlerin Sentezi ve Biyolojik Aktivitelerinin Ölçülmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Ana Bilim Dalı, Ankara.
- [109] Uzluk, E. (2008). Bazı Polimerlerin Sentezi, Karakterizasyonu Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Ana Bilim Dalı, Ankara.
- [110] Fang, W., Cai, Y., Chen, X., Su, R., Chen, T., Xia, N., Li, L., Yang, Q., Han, J., Han, S. (2009). Poly(styrene-alt-maleic anhydride) derivatives as potent anti-HIV microbicide candidates. *Bioorg Med Chem Lett.* Vol:1;19(7):1903-7.
- [111] Vandana M., Sahoo S.K. (2010). Long circulation and cytotoxicity of PEGylated gemcitabine and its potential for the treatment of pancreatic cancer, *Biomaterials* Vol: 31, 9340-9356.
- [112] Greco, F., Vicent, M.J., Penning, N.A., Nicholson, R.I., Duncan, R. (2005). HPMA copolymer-aminoglutethimide conjugates inhibit aromatase in MCF-7 cell lines, *Journal of Drug Targeting*, Vol:13(8-9): 459-470.
- [113] Cavallaro G., Mariano L., Salmaso S., Caliceti P., Gaetano G. (2006). Folate-mediated targeting of polymeric conjugates of gemcitabine, *International Journal of Pharmaceutics* 307, 258-269.
- [114] She W., Luo K., Zhang C., Wang G., Geng Y., Li L., He B., Gu Z. (2013). The potential of self-assembled, pH-responsive nanoparticles of mPEGylated peptide dendronedoxorubicin conjugates for cancer therapy, *Biomaterials* Vol: 34, 1613-1623.
- [115] Pawar, S.K., Badhwar, A.J, Kharas, F., Khandare, J.J., Vavia, P.R. (2012). Design, synthesis and evaluation of N-acetyl glucosamine (NAG)-PEG-doxorubicin targeted conjugates for anticancer delivery, *International Journal of Pharmaceutics* 436, 183- 193.
- [116] David, D. N'Da, Eberhard Neuse, Margo Nell and Constance E.J. van Rensburg S. (2006). Carrier-bound Methotrexate. III. Antiproliferative Activity of Macromolecular MTX Conjugates Against the Human HeLa and Colon Carcinoma Cell Lines, *Afr. J. Chem.*, Vol: 59, 33-42.

- [117] Şahin N.Ö., Berköz M., Dericci Eker E., Pomierny B., Przejczowska K. (2012). Cytotoxic and antioxidant effects of grape seed oil on the treatment of leukemia with methotrexate, *European Journal of Chemistry* Vol: 3 (2) 147-151.
- [118] Wang J., Yin C., Tang G., Lin X., Wu Q. (2013). Glucose-functionalized multidrug-conjugating nanoparticles based on amphiphilic terpolymer with enhanced anti-tumorous cell cytotoxicity, *International Journal of Pharmaceutics* 441, 291– 298.
- [119] Rzaev, Z.M., Türk, M., Söylemez, E.A. (2012). Bioengineering functional copolymers. XXI. Synthesis of a novel end carboxyl-trithiocarbonate functionalized poly(maleic anhydride) and its interaction with cancer cells, *Bioorg Med Chem.* Aug 15;20(16):5053-61.
- [120] Liang, Y., Xiao, L., Li, Y., Zhai, Y., Xie, C., Deng, L., Dong, A. (2011). Poly(ester anhydride)/mPEG amphiphilic block co-polymer nanoparticles as delivery devices for paclitaxel. *J Biomater Sci Polym Ed.* ;22(4-6):701-15.
- [121] Siew, E.L., Rajab N.F., Osman, A.B., Sudesh, K., Inayat-Hussain, S.H. (2007). In vitro biocompatibility evaluation of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymer in fibroblast cells. *J Biomed Mater Res A.* May;81(2):317-25.
- [122] Kaplan, M., Baysal, K. (2005). In vitro toxicity test of ethyl 2-cyanoacrylate, a tissue adhesive used in cardiovascular surgery, by fibroblast cell culture method. *Heart Surg Forum.* 8(3):E169-72.
- [123] Kaneda, Y., Yamamoto, Y., Kamada, H., Tsunoda, S., Tsutsumi, Y., Hirano, T., Mayumi, T. (1998). Antitumor activity of tumor necrosis factor alpha conjugated with divinyl ether and maleic anhydride copolymer on solid tumors in mice. *Cancer Res. J Vol: Jan 15;58(2):290-5.*
- [124] Saito, T., Ueno, T., Sekine, T., Kodera, Y., Hiroto, M., Matsushima, A., Nishimura, H., Inada, Y. (1997). Chemical modification of L-asparaginase with comb-shaped copolymer of poly(ethylene glycol) derivative and maleic anhydride. *Leukemia. J.* Apr;11 Suppl 3:408-9.
- [125] Yadav, K.S., Jacob, S., Sachdeva, G., Chuttani, K., Mishra, A.K., Sawant, K.K. (2011). Long circulating PEGylated PLGA nanoparticles of cytarabine for targeting leukemia. *Microencapsul.J.* Vol: 28(8):729-42.

- [126] Stella, B., Arpicco, S., Rocco, F., Marsaud, V., Renoir, J.M., Cattel, L., Couvreur, P. (2007). Encapsulation of gemcitabine lipophilic derivatives into polycyanoacrylate nanospheres and nanocapsules. *Int J Pharm.* Vol: 1;344(1-2):71-7.
- [127] Akinboye, E.S., Rosen, M.D., Denmeade, S.R., Kwabi-Addo, B., Bakare, O. (2012). Design, synthesis, and evaluation of pH-dependent hydrolyzable emetine analogues as treatment for prostate cancer. *J Med Chem.* Vol:13;55(17):7450-9.
- [128] Kamada, H., Tsutsumi, Y., Sato-Kamada, K., Yamamoto, Y., Yoshioka, Y., Okamoto, T., Nakagawa, S., Nagat,a S., Mayumi, T. (2003). Synthesis of a poly(vinylpyrrolidone-co-dimethyl maleic anhydride) co-polymer and its application for renal drug targeting. *Nat Biotechnol.* Apr;21(4):399-404.
- [129] Karasulu, H.Y., Karabulut, B., Göker, E., Güneri, T., Gabor, F. (2007). Controlled release of methotrexate from w/o microemulsion and its in vitro tumor activity, *Drug Deliv.* Apr;14(4):225-33.
- [130] Ayla, Ş. (2007). Parasetamol ve Resveratrol' ün MDAH-2774 İnsan Over Kanseri Hücreleri Kültürlerinin Gemitabin'le Sitotoksiteleri ile Proliferasyon Üzerine Etkileri. Uzmanlık tezi, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Tutku TUNÇ
Doğum Yeri ve Tarihi	Ankara-1977
Medeni Durumu	Bekar
Yabancı Dil	İngilizce
İletişim Adresi	Cumhuriyet Üniversitesi Eğitim Fakültesi Ortaöğretim Biyoloji Eğitimi Bölümü - SİVAS
E-posta Adresi	ttunc@cumhuriyet.edu.tr

Eğitim ve Akademik Durum

Lise	Sivas Selçuk Anadolu Lisesi, 1995
Lisans	Marmara Üniversitesi, 2000
Yüksek Lisans	Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, 2004
Unvan	Öğretim Görevlisi

İş Tecrübesi

Milli Eğitim Bakanlığı	Biyoloji Öğretmeni, 2002-2008
Cumhuriyet Üniversitesi	Öğretim Görevlisi, 2008-