

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**DOĞAL VE SENTETİK POLİMERLERİN DEĞİŞİK KOMBİNASYONLARI İLE
HAZIRLANAN İLAÇ VE GEN TAŞIYICI SİSTEMLER: SENTEZ VE
KARAKTERİZASYONLARI İLE BİRLİKTE UYGULAMA ALANLARININ BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Ceyda ŞİMŞEK

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

EKİM 2023

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**DOĞAL VE SENTETİK POLİMERLERİN DEĞİŞİK KOMBİNASYONLARI İLE
HAZIRLANAN İLAÇ VE GEN TAŞIYICI SİSTEMLER: SENTEZ VE
KARAKTERİZASYONLARI İLE BİRLİKTE UYGULAMA ALANLARININ BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

**Ceyda ŞİMŞEK
(509162202)**

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Candan ERBİL

EKİM 2023

ISTANBUL TECHNICAL UNIVERSITY ★ GRADUATE SCHOOL

**DRUG AND GENE DELIVERY SYSTEMS OF SYNTHETIC AND NATURAL
POLYMERS: SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND BIOMEDICAL
APPLICATIONS**

PhD THESIS

**Ceyda ŞİMŞEK
(509162202)**

Department of Chemistry

Chemistry Programme

Thesis Advisor: Prof. Dr. Candan ERBİL

OCTOBER 2023

İTÜ, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'nün 509162202 numaralı Doktora Öğrencisi Ceyda ŞİMŞEK, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “DOĞAL VE SENTETİK POLİMERLERİN DEĞİŞİK KOMBİNASYONLARI İLE HAZIRLANAN GEN TAŞIYICI SİSTEMLER: SENTEZ VE KARAKTERİZASYONLARI İLE BİRLİKTE UYGULAMA ALANLARININ BELİRLENMESİ” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Candan ERBİL**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Bünyamin KARAGÖZ**
İstanbul Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Yasemin YÜKSEL DURMAZ
İstanbul Medipol Üniversitesi

Doç. Dr. Demet GÖEN ÇOLAK
İstanbul Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Emine TEKİN
Düzce Üniversitesi

Teslim Tarihi : 31 Ağustos 2023
Savunma Tarihi : 26 Ekim 2023





Hayallerime,



ÖNSÖZ

Lisans tezinden bu yana eğitim ve kariyer sürecim başta olmak üzere hayatımın her anında beni bilgi ve deneyimleri ile destekleyen, yanımda olan ve çocukluk hayalimi gerçekleştirmemi sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Candan ERBİL'e sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Doktora çalışmamı gerçekleştirmesini sağlayan hem imkanları hem de bilgileri ile bu süreci tamamlamama yardımcı olan sayın hocalarım Prof. Dr. Yasemin YÜKSEL DURMAZ'a, Prof. Dr. Bünyamin KARAGÖZ'e ve Doç. Dr. Demet GÖEN ÇOLAK'a da ayrıca teşekkür ediyorum.

Üniversiteye başladığım an hayatıma giren, ömür boyu yarım elmam, dostum olarak kalacak Cansu KOZBEKÇİ SABAH'a beni her ne olursa olsun her zaman desteklediği, yaşadığım iyi/kötü her olayda yanımda olduğu ve benim arkadaşım olduğu için çok teşekkür ediyorum. Aynı şekilde, üniversite hayatımın en büyük kazanımları olan, 15 yıl içerisinde hayatımın tüm kararlarında ve adımlarında yanımda olan en yakın arkadaşlarım Çağrı ŞAHİN'e, Erhan DEMİREL'e, Sebahat TOPAL'a ve Burak KORKMAZ'a ve ilerleyen zamanlarda tanıştığım ve hayatımdaki "iyi ki" dediğim kişilerden olan canım arkadaşlarım Çiçek ENDEŞAV, Yonca ALKAN GÖKSU'ya çok teşekkür ediyorum. İTÜ'ye başladığım 2008 yılından bu yana farklı zamanlarda hayatıma giren, benim tüm şikayetlerimi dinleyen, bana yol gösteren ve varlıkları ile hayatımı güzelleştiren başta sayın hocam ve arkadaşlarım Dr. Öğr. Gör. Berkay SÜTAY, Cemre ŞAHİN, Burak TAVŞANLI, Hande TINAS, Ebru AKGÜL, Büşra AKIN ÖZMEN, Enes Berkay GÖNEN ve Eda KÜÇÜK olmak üzere tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma çok teşekkür ederim. Ayrıca 2015 yılından bu yana birçok anı paylaştığım ve beraber çalıştığım başta lisans tez öğrencilerim olmak üzere hayatıma renk katan tüm öğrencilerime de sonsuz teşekkürler.

Hayatımda olduğu için kendimi her an şanslı saydığım, her zaman her şartta yanımda olan ve olacağına emin olduğum, yaşamımda çok büyük ve özel bir yeri olan mutluluk kaynağım Ayberk İNCE'ye ayrıca teşekkür ederim.

Doğduğu andan itibaren hayatımın merkezine yerleşen, dünyadaki en büyük desteğim, dostum, sırdaşım olan canımdan çok sevdiğim kardeşim Utku ŞİMŞEK'e hem sırtımı yaslayabileceğim desteğim olduğu hem de sadece var olduğu için teşekkür ederim.

Son olarak, beni bu günlere getiren ve var olduğum kişi olmamı sağlayan her zaman koşulsuz, şartsız bir şekilde beni destekleyen, hayatımdaki en kıymetli insanlar olan annem Gülderen ŞİMŞEK ve babam Telat ŞİMŞEK'e hem benim ailem oldukları hem de şu an bulunduğum yere gelmemi sağladıkları için sonsuz teşekkürler.

Bitirmiş olduğum doktora çalışmasının konusu benim çocukluk hayalimdi ve tüm eğitim hayatımı bu hayali gerçekleştirecek şekilde yönlendirmek için elimden geleni yaptım. Bu sebeple, bu tez sadece doktor ünvanı almamı sağlayan bir basamak değil aynı zamanda benim en büyük hayalime ulaşmamı sağlayan ve beni mesleki anlamda geliştiren özel bir çalışmaydı. Bu süreçte benim yanımda olan herkese çok teşekkürler.

Ekim 2023

Ceyda ŞİMŞEK
(Kimyager)



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	ix
İÇİNDEKİLER	xi
KISALTMALAR	xiii
SEMBOLLER	xv
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xvii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xix
ÖZET.....	xxi
SUMMARY	xxv
1. GİRİŞ.....	1
2. TEORİK BİLGİ	5
2.1 Gen Terapisi	5
2.1.1 Gen terapisi tarihçesi.....	6
2.1.2 Gen terapisi prensip ve mekanizması.....	7
2.1.3 Gen terapisinde kullanılan taşıyıcılar.....	18
2.1.3.1 Viral vektörler	19
2.1.3.2 Viral olmayan vektörler	21
2.2 Kitosan ve Aşı Polimerleri	31
2.2.1 Deasetilasyon derecesi ve molekül ağırlığının vektör tasarımına etkisi ...	34
2.2.2 Kitosanın modifikasyonu ve aşı (graft) polimerleri.....	37
2.2.2.1 Radikal Polimerizasyonu	43
2.3 İlaç Taşıma/Salım Sistemleri	49
2.3.1 Hidrojeller	53
2.3.1.1 Sıcaklık duyarlı hidrojeller ve ilaç salım sistemleri.....	56
2.3.1.2 pH duyarlı hidrojeller ve ilaç salım sistemleri	58
2.3.1.3 Akıllı hidrojeller ile ilaç taşıma sistemlerinin tasarlanması.....	61
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	67
3.1 Kullanılan Kimyasallar	67
3.2 Kullanılan Cihazlar	68
3.3 DeneySEL Yöntemler	69
3.3.1 Katyonik PNIPAAm hidrojellerin sentezi	69
3.3.2 Katyonik PNIPAAm hidrojellerin mekanik dayanımlarının belirlenmesi	70
3.3.3 Katyonik PNIPAAm hidrojellerinin dinamik şişme ve büzülme	
ölçümleri	71
3.3.4 L-AA yükleme/salım deneyleri.....	72
3.3.5 Hidrojellerin difüzyon mekanizmasının belirlenmesi.....	73
3.3.6 Kitosanın deasetilasyonu.....	73
3.3.7 CS-g-PDAPMAAm aşı kopolimerlerinin sentezi	74
3.3.8 Kitosanın degradasyonu.....	76
3.3.9 CsgD aşı kopolimerlerinin hidrolizi ve PDAPMAAm saçaklarının	
eldesi	76

3.3.10 PDMA PMAAm homopolimerlerinin sentezi.....	77
3.3.11 (L/L _D /M/M _D)Cs, PDMA PMAAm ve CsgD aşısı kopolimerlerinin karakterizasyonu.....	78
3.3.11.1 Kapiler viskozimetresi ile intrinsik viskozite ve molekül ağırlıklarının belirlenmesi	78
3.3.11.2 Jel geçirgenlik kromatografisi ile molekül ağırlığı ölçümleri.....	79
3.3.11.3 Gravimetrik analizler.....	79
3.3.11.4 CsgD aşısı polimerlerinin dal sayısının ve uzunluğunun belirlenmesi	80
3.3.12 CgD aşısı kopolimerlerinin pH'a bağlı çözünürlüklerinin araştırılması....	82
3.3.13 CsgD aşısı kopolimerlerinin hemolitik aktivitelerinin incelenmesi.....	82
3.3.14 CsgD/ anti-GAPDH siRNA polilekslerinin hazırlanması ve agaroz jel elektroforez yöntemi ile taşıyıcıların siRNA yükleme kapasitelerinin belirlenmesi	83
3.3.15 CsgD/ anti-GAPDH siRNA polilekslerinin boyut ve zeta potansiyellerinin belirlenmesi	84
3.3.16 <i>In vitro</i> çalışmalar.....	85
3.3.16.1 Hücre kültürü prosedürü.....	85
3.3.16.2 CsgD/ anti-GAPDH siRNA polilekslerinin hücre canlılığına etkisinin incelenmesi	86
3.3.16.3 CsgD/ anti-GAPDH siRNA polilekslerinin transfeksiyon etkinliğinin belirlenmesi.....	87
4. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	89
4.1 Katyonik PNIPAAm Hidrojellerinin Hazırlanması.....	91
4.2 Komonomer ve çapraz bağlayıcı türünün PNIPAAm katyonik hidrojellerinin sıkıştırma kuvveti ve denge şişme derecelerine etkisi.....	95
4.3 Komonomer ve çapraz bağlayıcı türünün PNIPAAm katyonik hidrojellerinin Dinamik şişme ve büzülme Davranışlarına Etkisi.....	101
4.4 Komonomer ve çapraz bağlayıcı türünün PNIPAAm katyonik hidrojellerinin Su Difüzyonu ve L-AA salım mekanizmasına etkisi	103
4.5 Cs-g-PDMA PMAAm aşısı kopolimerlerinin sentezi ve karakterizasyonu	106
4.6 CsgD Aşısı Polimerlerinin Çözünürlük Sınırlarının Belirlenmesi.....	119
4.7 CsgD Aşısı Kopolimerlerinin Hemolitik Aktivitelerinin İncelenmesi.....	121
4.8 CsgD/ anti-GAPDH siRNA Polilekslerinin Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi ile siRNA Yükleme Kapasitelerinin Belirlenmesi	124
4.9 CsgD/ anti-GAPDH siRNA polilekslerinin sitotoksitelerinin incelenmesi.....	126
4.10 CsgD/ anti-GAPDH siRNA Polilekslerinin Transfeksiyon Etkinliğinin Belirlenmesi.....	128
5. TARTIŞMA	131
KAYNAKLAR.....	135
ÖZGEÇMİŞ.....	165

KISALTMALAR

Ac	: Asetik asit
AIBN	: Azobisisobutironitril
BIS	: Metilen bis akrilamit
Cs	: Kitosan
CsgD	: Kitosan-aşı-poli(N-[3-(dimetilamino)propil]metakrilamit)
D₂O	: Döteryum oksit
DDA	: Deasetilasyon Derecesi
DDS	: Destile deiyonize su
DLS	: Dinamik ışık saçılımı
DMAEMA	: 2-(dimetilamino) etil metakrilat)
DMAEMA	: N-[3-(dimetilamino)propil]metakrilamit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EE	: Enkapsülasyon Etkinliği
FTIR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
GE	: Aşı etkinliği
G_N	: Dal sayısı
GPC	: Jel geçirgenlik kromatografisi
GY	: Aşı verimi
KPS	: Potasyum persülfat
L	: Dal uzunluğu
L-AA	: L-askorbik asit
LCs	: Düşük molekül ağırlıklı ticari kitosan
LCST	: Alt kritik çözünme sıcaklığı
LdCs	: Düşük molekül ağırlıklı deasetillenmiş kitosan
MAPTAC	: 3-(metakriloamino)propil]trimetil amonyum klorür
MCs	: Orta molekül ağırlıklı ticari kitosan
MDA-MB-231	: İnsan dirençli meme kanseri hücresi
MdCs	: Orta molekül ağırlıklı deasetillenmiş kitosan
NaAc	: Sodyum asetat
NIPAAm	: N-izopropil akrilamit

NMR	: Nükleer manyetik rezonans
PBS	: Tuzlu fosfat tamponu
pDNA	: Plasmid deoksiribonükleik asit
PEI	: Polietilenimin
RNA	: Ribonükleik asit
siRNA	: Küçük interferans ribonükleik asit
TAB	: Tetraallil amonyum bromür
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin
THF	: Tetrahidrofuran
VPTT	: Hacim faz geçiş sıcaklığı



SEMBOLLER

$[\eta]$	: İntinsik viskozite
D	: Difüzyon katsayısı
E	: Elastik (Young) modülü
F, F_R	: t anında çözünmüş ilaç kesri
F_s	: t anında tutulan suyun kesri
g	: 1000 karbon başına düşen dal sayısı
K, a	: Mark-Houwink-Sakurada sabitleri
M_n	: Sayıca ortalama molekül ağırlığı
M_0, M_t, M_∞	: Başlangıçta, t ve denge anında hidrojelden salınan ilaç miktarı
M_w	: Ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı
n	: Korsmeyer-Peppas modeline ait difüzyon üsteli
Q_{DS}	: Dinamik büzülme derecesi
Q_G	: Kütlece şişme derecesi
Q_s	: Dinamik şişme derecesi
Q_v	: Hacimce şişme derecesi
η_{sp}	: Spesifik viskozite



ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Taşıyıcının hücre içi ve dışı aşması gereken problemler.....	8
Çizelge 3.1 : PNIPAAm katyonik hidrojellerin sentez parametreleri.	70
Çizelge 3.2 : CsgD aşısı kopolimerlerinin sentez koşulları.....	75
Çizelge 4.1 : PNIPAAm tabanlı katyonik hidrojellerin mekanik özellikleri.....	96
Çizelge 4.2 : Katyonik PNIPAAm hidrojellerin su difüzyon ve L-AA salım kinetikleri.	105
Çizelge 4.3 : Hidrojellerin L-AA salımı sırasındaki E-modülleri (kPa).....	106
Çizelge 4.4 : %1 L _D Cs varlığında sentezlenen CsgD aşısı kopolimerlerinin zincir parametrelerine KPS konsantrasyonunun etkisi	111
Çizelge 4.5 : %1 L _D Cs varlığında sentezlenen CsgD aşısı kopolimerlerinin zincir parametrelerine D:Cs(t) oranının etkisi.	111
Çizelge 4.6 : 8:1 D:Cs(t) oranı ile sentezlenen CsgD aşısı kopolimerlerinin zincir parametrelerine Cs konsantrasyonunun, molekül ağırlığının ve deasetilasyon derecesinin etkisi.	112
Çizelge 4.7 : CsgD aşısı kopolimerlerinin intrinsik viskoziteleri, sayıca ($\bar{M}_n$) ve ağırlıkça ($\bar{M}_w$) molekül ağırlıkları ile PDI değerleri.	114
Çizelge 4.8 : CsgD aşısı kopolimerlerinin zincir parametreleri.	115
Çizelge 4.9 : PDMAAPMAAm homopolimerlerinin intrinsik viskozite ve molekül ağırlıkları.....	117
Çizelge 4.10 : L ve L _D kitosanın ile degrede türevlerinin intrinsik viskoziteleri ve molekül ağırlıkları.....	118
Çizelge 4.11 : LDC'nin, LC'nin, CsgD aşısı kopolimerlerinin ve PDMAAPMAAm homopolimerinin çözünbildiği en yüksek pH değerleri.....	120
Çizelge 4.12 : LDCs'nin, CsgD aşısı kopolimerlerinin ve PDMAAPMAAm homopolimerinin pH 7,4 PBS'deki zeta potansiyelleri.	124



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Malzemelerin hücreye alım şekilleri.	9
Şekil 2.2 : Endozomal çevrim şeması.	11
Şekil 2.3 : Endozomal kaçış yöntemleri.	12
Şekil 2.4 : siRNA, miRNA ve shRNA'nın oluşum ve çalışma mekanizması.	16
Şekil 2.5 : Viral ve viral olmayan vektörler ve hücreye girişleri.	18
Şekil 2.6 : Viral vektör türleri ve özellikleri.	20
Şekil 2.7 : Viral olmayan inorganik ve organik vektör örnekleri.	22
Şekil 2.8 : Lipopleks oluşum şeması.	24
Şekil 2.9 : Gen terapisinde kullanılan bazı yağ molekülü örnekleri.	25
Şekil 2.10 : Polipleks oluşum şeması.	27
Şekil 2.11 : Gen terapisinde kullanılan bazı doğal ve sentetik katyonik polimerler ve pKa değerleri.	28
Şekil 2.12 : Kitin ve kitosan	32
Şekil 2.13 : Kitosana farklı yöntemlerle modifikasyonu.	38
Şekil 2.14 : Aşı polimerizasyonunda üzerine ve doğrudan aşılama mekanizmaları .	41
Şekil 2.15 : ATRP'nin reaksiyon mekanizması.	44
Şekil 2.16 : RAFT polimerizasyonun reaksiyon mekanizması.	45
Şekil 2.17 : Kitosanın radikal oluşum noktaları.	48
Şekil 2.18 : Kitosanın eter bağının kırılması ve zincir parçalanması mekanizması. .	49
Şekil 2.19 : Geleneksel ve kontrollü salım esnasında vücuttaki ilaç konsantrasyonunun zamana bağlı değişimi.	50
Şekil 2.20 : İlaç taşıyıcı olarak kullanılan malzemeler.	51
Şekil 2.21 : Pasif ve aktif hedefleme ile taşıyıcının hücreye gönderilmesi.	52
Şekil 2.22 : Hidrojellerin çevre uyaranlarına karşı davranışları.	55
Şekil 2.23 : Sıcaklığa duyarlı hidrojellerin şişme/büzülme ve ilaç salım davranışı ..	57
Şekil 2.24 : Anyonik hidrojelin şişme ve ilaç salım davranışı.	59
Şekil 2.25 : Polielektrolit hidrojellerde iyonomer-multipllet oluşumu.	60
Şekil 3.1 : LCs ve LDs'nin ¹ H-NMR spektrumları.	74
Şekil 3.2 : CsgD2 aşı kopolimeri ile PDMAAm dallarına ait ¹ H-NMR spektrumları.	77
Şekil 3.3 : a) Santrifüj sonrasında çöken ve/veya patlayan kırmızı kan hücreleri b) 96 kuyucuklu plakalara aktarılan süpernant çözeltileri.	83
Şekil 3.4 : a) Agaroz jel elektroforez sistemi b) ChemiDoc XRS+ görüntüleme sistemi.	84
Şekil 3.5 : a) hemositometrenin b) mikroskop altındaki hücrelerin görüntüsü.	85
Şekil 3.6 : CsgD aşı kopolimerleri ile etkileşen hücrelerin MTS testi sonrasında oluşturdukları formazona bağlı renk değişimleri.	86
Şekil 4.1: PNIPAAm katyonik hidrojellerinin sentez şeması.	92
Şekil 4.2: S1, S3 ve S4 no.lu sıkıştırma eğrileri, E modülleri ve görünüşleri.	92
Şekil 4.3: S7-S10 no.lu örneklerin E modülleri, gravimetrik şişme dereceleri ve görünüşleri.	93

Şekil 4.4:	S1, S2, S5-S8 örneklerinin farklı sıcaklık ve pH'lardaki sıkıştırma gerilim-gerinim grafikleri	97
Şekil 4.5:	Katyonik PNIPAAm hidrojellerinin hacimce şişme dereceleri.	99
Şekil 4.6:	S1, S2, S5-S8 hidrojellerinin dinamik şişme grafikleri ile S7 örneğinin şişme görselleri (25 °C DDS).	102
Şekil 4.7:	S1, S2, S5-S8 hidrojellerinin 37 °C DDS'deki dinamik büzülme grafikleri.	102
Şekil 4.8:	S1, S5, S6 ve S7 örneklerinin zamana bağlı ilaç salım kesirleri.	104
Şekil 4.9:	L _D Cs, CsgD2, CsgD8 aşı kopolimerleri ile PDMAPMAMAm'ın FTIR spektrumları.	107
Şekil 4.10:	PDMAPMAMAm, L _D Cs ve CsgD aşı kopolimerlerinin ¹ H-NMR spektrumları.	109
Şekil 4.11:	L _D Cs, LCs ve CsgD aşı kopolimerlerine ait η_{sp}/c vs c grafikleri.	114
Şekil 4.12:	CsgD aşı kopolimerlerin pH 7,4 PBS'teki görüntüleri.	119
Şekil 4.13:	CsgD:anti-GAPDH siRNA polilekslerinin siRNA taşıma ve salım mekanizması.	121
Şekil 4.14:	L _D Cs, CsgD aşı kopolimerleri ve PDMAPMAMAm homopolimerinin hemolitik aktiviteleri (ortalama $\pm$ SD, n = 3).	122
Şekil 4.15:	a) CsgD2 ve CsgD5 b) CsgD8 ve L _D Cs polilekslerinin jel görüntüleri c) polilekslerin boyutları ve zeta potansiyelleri.	125
Şekil 4.16:	CsgD/siRNA polilekslerinin MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin canlılığına etkisi (ortalama $\pm$ SD, n = 3) (PC: işlem görmemiş hücre).	127
Şekil 4.17:	CsgD:siRNA, CsgD:SCR siRNA polilekslerin ve lipofektamin:siRNA kompleksinin MDA-MB 231 meme kanseri hücresindeki GAPDH protein seviyesi üzerine etkisi (ortalama $\pm$ SD, n = 6) (UT:işlem görmemiş hücre).	129

DOĞAL VE SENTETİK POLİMERLERİN DEĞİŞİK KOMBİNASYONLARI İLE HAZIRLANAN İLAÇ VE GEN TAŞIYICI SİSTEMLER: SENTEZ VE KARAKTERİZASYONLARI İLE BİRLİKTE UYGULAMA ALANLARININ BELİRLENMESİ

ÖZET

Kontrollü ilaç ve gen taşıma sistemleri hastalıkları geleneksel yöntemlere göre daha etkin bir şekilde tedavi edebilmeleri, yan etkileri azaltmaları ve ölümcül, genetik hastalıklarda da başarılı sonuçlara sahip olmaları ile günümüzde hakkında en çok araştırma yapılan konulardır. Son zamanlarda, kontrollü ilaç ve gen taşıma sistemleri tek başlarına başarılı sonuçlarından yola çıkılarak yapılan çalışmalar ilaç ve genin aynı anda vücuda gönderilmesi ile sinerjik bir etki oluştuğunu ve tedavinin etkinliğini daha çok arttırılabildiğini göstermektedir. Günümüzde özellikle kanser terapisi olmak üzere birçok genetik hastalığın tedavisinde hem ilaç hem de gen taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi konusunda yoğun araştırmalar yapılmaktadır.

Polimerik malzemeler kolay modifiye edilebilmeleri ve terapötik ajana/hastalığa göre özel olarak tasarlanabilmeleri ile ilaç/gen taşıyıcı sistemlerin oluşturulmasında önemli bir yere sahiptirler. Özellikle, katyonik doğrusal ve çapraz bağlı polimerler, hücre ile yüksek oranda etkileşim kurabilmeleri, endozomal çevrimden kaçabilme etkinlikleri, antibakteriyel özellikleri ile en sık kullanılan polimer sınıfıdır ve pH, sıcaklık gibi fizyolojik uyaranlara karşı duyarlı doğal ve sentetik polimerler ile beraber kullanarak belirli bir hastalığa, organa veya hücreye özel taşıma sistemleri tasarlanabilmektedir. Katyonik doğal bir polimer olan kitosan (Cs), biyobozunur, biyouyumlu yapısı ile ilaç/gen taşıma sistemlerin sıklıkla kullanılmaktadır. Öte yandan, kitosanın sadece bazı seyreltik asit çözeltilerinde çözünmesi, uygulama alanını kısıtlamaktadır. Bu çözünürlük problemini aşmak ve kullanım alanlarını genişletmek adına kitosanın hem katyonik sentetik hem de sıcaklığa duyarlı polimerle beraber kullanımı hakkında yoğun araştırmalar yapılmaktadır.

Poli(N-izopropil akrilamit) (PNIPAAm) 32-34 °C'deki hacim faz geçiş sıcaklığı (VPTT) sayesinde vücut sıcaklığına, poli(2-(dimetilamino) etil metakrilat) (PDMAEMA), polietilenimin (PEI) gibi katyonik polimerler ise pKa değerleri ile kan, organ ve hücre içi pH değerlerine karşı duyarlı ilaç/gen taşıyıcı sistemlerinin sentezlenmesine olanak sağlar. Ayrıca sentetik katyonik polimerler kitosanın hem çözünürlüğünü hem de hücre içi çalışmalarda salım/transfeksiyon etkinliğini arttırmaktadır. Genel olarak, sentetik ve doğal polimerlerin beraber kullanılması hem biyolojik olarak zararsız hem de etkin taşıyıcıların tasarlanmasını sağlamaktadır.

Bu tez çalışmasında, hem ilaç hem de gen taşıyıcı sistem olarak kullanılabilecek poli(N-[3-(dimetilamino)propil]metakrilamit) (PDMAEMA) içeren doğrusal ve çapraz bağlı katyonik polimerleri farklı reaksiyon koşulları altında sentezlendi ve yapılar detaylı şekilde karakterize edilerek ilaç/gen taşıyıcı olma potansiyeline sahip uygun kombinasyonlar belirlendi. Bu doğrultuda, tez çalışması pH/sıcaklık duyarlı PNIPAAm katyonik hidrojelleri ve pH duyarlı Cs-g-PDMAEMA aşı

kopolimerlerinin sentez ve karakterizasyonları ile uygulama alanlarının belirlenmesi olarak iki kısma ayrıldı ve DMAPMAAm içeren kopolimerlerin/hidrojellerin ilaç ve gen taşıma sistemlerine uygunlukları incelendi.

İlk aşamada, DMAEMA, DMAPMAAm ve 3-(metakriloamino)propil]trimetil amonyum klorür (MAPTAC) içeren katyonik PNIPAAm hidrojelleri, nötral metilen bis akrilamit (BIS) ve katyonik tetraallil amonyum bromür (TAB) çapraz bağlayıcı varlığında üç farklı çözücü/başlatıcı çifti kullanılarak serbest radikal çözelti polimerizasyonu ile sentezlendi ve katyonik komonomerlerin, çapraz bağlayıcıların ve çözücü/başlatıcı çiftinin mekanik özelliklere, şişme/büzülme ve ilaç salım davranışlarına etkisi değerlendirildi. Potasyum persülfat / N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (KPS/TEMED), KPS/NaOH başlatıcı çiftleri ile 25 °C'de veya azobisisobutironitril (AIBN) termal başlatıcısı ile 50 °C'de sırasıyla, destile deiyonize su (DDS) ve 1,4-dioksan çözücüleri içerisinde sentezlenen PNIPAAm katyonik hidrojelleri ile ilgili ilk bulgular sonucunda, başlatıcı/çözücü çiftinin, katyonik komonomer ve çapraz bağlayıcı türünün homojenlik, mekanik özellikler ve şişme davranışlarını önemli ölçüde etkilediği gözlemlendi. Model komonomer olarak seçilen DMAPMAAm'in üç farklı başlatıcı/çözücü çifti içerisinde sentezlenen kopolimerlerinin şişme ve mekanik özelliklerine ait değerler, KPS-TEMED/DDS çözücü başlatıcı çiftinin, opak ve KPS/ 0.1N NaOH sistemine göre daha düşük şişme derecesine ve yüksek mekanik kuvvete sahip hidrojellerin oluşmasını sağladığını gösterdi. Ayrıca P(NIPAAm-ko-DMAEMA)/BIS ve P(NIPAAm-ko-MAPTAC)/BIS hidrojellerinin 37 °C DDS ve pH 4'teki mekanik dayanımlarının DMAPMAAm içeren örneklerle göre daha yüksek, şişme derecelerinin ise daha düşük olduğu bulgulandı. Denge şişme ve mekanik dayanım testlerinden elde edilen tüm sonuçlar doğrultusunda, MAPTA+ Cl⁻ iyonomer çiftlerinin oluşturduğu fiziksel çapraz bağların ve DMAEMA'in ester gruplarından kaynaklanan hidrofobik etkilerin, hidrojellerin 37 °C'deki mekanik dayanımlarının artmasını sağlayabileceği ifade edildi.

PNIPAAm hidrojellerinin 25 °C/37 °C DDS içerisindeki şişme/büzülme süreçlerinde suyun ağ yapının içine/dışarıya difüzyonu ile 37 °C'de DDS içerisinde gerçekleştirilen L-AA salım deneylerinden elde edilen sonuçlarda iyonik ve hidrofobik etkilerin önemini açıkça göstermektedir. BIS ile çapraz bağlı ve AIBN/1,4-dioksan başlatıcı/çözücü çifti ile sentezlenen PNIPAAm katyonik hidrojellerinin su difüzyon mekanizmalarının Fick yasasına uyduğu, aynı koşullarda TAB ile çapraz bağlı ağ yapıların ise Fick yasasına uymayan difüzyon mekanizmasına sahip olduğu bulgulandı. Bu durum, katyonik monomerlerin protonlanmış amin grupları ile TAB'ın kuvaterize amonyum gruplarının arasındaki elektrostatik itme kuvvetlerinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca P(NIPAAm-ko-MAPTAC)/BIS hidrojelinin yapısında kalıcı protonlanmış gruplar olmasına rağmen difüzyon üstelinin 0,5 değerine yakın olmasının sebebi ise fiziksel çapraz bağ olarak davranan multipler oluşumları ile açıklanmaktadır. Benzer şekilde, P(NIPAAm-ko-MAPTAC)/BIS hidrojelinin L-AA salımına ait difüzyon üstelinin diğer örneklerden daha düşük ve yalancı-Fick (less-Fick) mekanizmasına sahip olması bu iyonomer/multipler yapılarının varlığını desteklemektedir. Bu kısımdan elde edilen bulgular, başlatıcı/çözücü çiftinin, katyonik monomer ve çapraz bağlayıcı türünün ağ yapıların mekanik özellik, şişme ve ilaç salım davranışlarında keskin değişikliklere yol açtığı ve uygun kombinasyonlar belirlenerek anyonik ilaç/gen vb. biyomakromoleküller için ideal taşıyıcı sistemlerin oluşturulabileceği göstermektedir.

Çalışmanın ikinci kısmını oluşturan ve viral olmayan vektör olarak kullanılması planlanan CsgD aşısı kopolimerleri ise KPS termal başlatıcısı varlığında serbest radikal çözelti polimerizasyonu ile sentezlendi. Farklı molekül ağırlıkları ve deasetilasyon

derecelerine sahip kitosanlar içeren bu aşı kopolimerlerinin öncelikle karakterizasyon deneyleri gerçekleştirilerek sentez sırasında kullanılan Cs, DMAPMAAm ve KPS konsantrasyonunun yapıların zincir parametreleri, aşı verimleri, molekül ağırlıkları ve dal sayısı/uzunluklarına etkileri incelendi. Elde edilen bulgular, sentezde DMAPMAAm:Cs (D:Cs) mol oranı 8:1 olarak seçilen aşı kopolimerlerinin en yüksek verime sahip olduğunu, KPS konsantrasyonunun aşı kopolimerlerinin verimi, zincir parametrelerini ve diğer tüm yapısal özelliklerini keskin bir şekilde değiştirdiğini gösterdi. KPS konsantrasyonu arttıkça, daha düşük molekül ağırlıklı, daha kısa dallara sahip CsgD aşı kopolimerlerinin oluşmasına sebep olmaktadır. Ayrıca KPS'in kitosan zincirlerinin degrades olmasına yol açtığı, KPS konsantrasyonu arttıkça örneklerdeki kitosan zincirlerinin kısaldığı ve yüksek KPS konsantrasyonunda aşı yerine blok kopolimerlerin oluştuğu bulgulandı. Öte yandan, özellikle kitosanın başlangıçtaki molekül ağırlığının ve deasetilasyon derecesinin aşı kopolimerleri üzerinde belirgin bir etkiye sahip olmadığı gözlemlendi. Karakterizasyon aşamalarının sonucunda gen taşıyıcı sistemler için en uygun örneklerin, düşük molekül ağırlıklı, deasetilasyon derecesi %94 olan kitosan ile 8:1 D:Cs mol oranında DMAPMAAm içeren, farklı KPS konsantrasyonlarında sentezlenmiş CsgD aşı kopolimerleri olduğu görüldü ve bu kopolimerlerin küçük interferans RNA (siRNA) ile CsgD/siRNA kompleksleri oluşturuldu.

Polipleks adı verilen bu kompleksler oluşturulmalarının ardından dinamik ışık saçılımı (DLS) yöntemiyle zeta potansiyeli ve tanecik boyutları, agaroz jel elektroforez ile CsgD:siRNA kütlece bağlanma oranları ve CsgD aşı kopolimerlerinin hemolitik aktiviteleri belirlendi. Uygun CsgD/siRNA bağlanma oranları ve CsgD konsantrasyonlarının belirlenmesinin ardından MDA-MB-231 dirençli meme kanseri hücresi kullanılarak MTS testi ile hücre canlılığı ve GAPDH testi ile transfeksiyon etkinliği deneyleri gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar, CsgD aşı kopolimerlerinin molekül ağırlıkları, zincir parametreleri, dal sayısı/uzunluklarının taşıyıcının biyoyumluluğu ve transfeksiyon etkinlikleri üzerinde önemli bir etkisinin olduğunu göstermektedir. Özellikle, küçük molekül ağırlığına sahip kısa DMAPMAAm dalları içeren CsgD aşı kopolimerlerinin hücre canlılıklarının yüksek olduğu (> %70), GAPDH protein ifadesini ticari taşıyıcı olan lipofektamin ile benzer şekilde, %50 civarlarına kadar düşürebildiği bulgulandı. Tez çalışmasından elde edilen tüm sonuçlar, CsgD aşı kopolimerlerinin ilaç/gen taşıyıcısı olarak büyük bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.



DRUG AND GENE DELIVERY SYSTEMS OF SYNTHETIC AND NATURAL POLYMERS: SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND BIOMEDICAL APPLICATIONS

SUMMARY

Scientists have been researching and developing new materials for controlled and targeted drug delivery systems for many years, in order to increase patient compliance treatment effectiveness, and reduce the side effects of drugs. Drug/gene delivery systems ensure the bioactive materials without degradation and create any toxic effect until they are carried to the targeted organs/cells or release of loaded drugs is completed. The expected results in this case are reduced costs by using lower doses of drugs and side effects, being effected on the the quality of life of patients, are reduced. However, drug delivery systems have been insufficient in the treatment of genetic diseases and so, the studies in this field have been directed to gene therapy. Gene therapy, which is a new treatment method, is based on the replace or supplement of the damaged gene in the cell with healthy genetic material, in order to cure genetic diseases. It is aimed by gene therapy, to provide solutions to fatal or incurable diseases caused by mutation, missing / excessive copying of one or more genes.

Although drug and gene delivery systems have successful results separately, the recent studies show that dual delivery systems, that is, the carriers in which drug and gene are loaded at the same time, increase the effectiveness of the treatment by creating a synergistic effect. Today, intensive research is being carried out on the development of both drug and gene delivery systems in the treatment of many genetic diseases, especially in cancer therapy.

Synthetic and/or natural materials used in the biomedical and pharmaceutical fields are required to form targeted/sustainable (or controlled) systems and to be biologically resistant, nontoxic, biocompatible and biodegradable. Among these, polymeric materials have a special place in the design of carrier systems because they can be easily functionalized according to the therapeutic agent/disease. In particular, cationic linear and cross-linked polymers are the most frequently types of the polymers used, due to their ability to interact with the cell membrane at a high level and to escape the endosomal cycle, and their antibacterial properties. Besides, they can also be used in combination with natural and synthetic polymers, which can be sense to the changes in the physiological parameters such as pH and temperature, to design delivery systems specific to a particular disease, organ or cell.

Chitosan (Cs), which is a cationic natural polymer, is frequently used in drug/gene delivery systems with its biodegradable and biocompatible structure. However, the fact that chitosan is dissolved only in some dilute acid solutions limits its application area. In order to overcome this solubility problem and expand its application areas, the hybrid systems of chitosan are studied with both cationic synthetic and temperature sensitive polymers. Poly (N-isopropyl acrylamide) (PNIPAAm) is used as a temperature sensitive carrier due to its volume phase transition temperature (VPTT) at 32°-34°C, while cationic polymers such as poly(2-dimethylaminoethyl methacrylate)

(PDMAEMA) and poly (N-[3-(dimethylamino) propyl] methacrylamide) (PDMAPMAAm) are used as pH sensitive carriers thanks to their pKa, that are suitable to pH values of blood, organs and intracellular. Because of their stimuli-sensitive behaviours, these materials are considered as a potential carrier for genes and drug molecules. Moreover, synthetic cationic polymers increase both solubility and release/transfection efficiency of chitosan in intracellular studies. On the other hand, the synthetic cationic polymers have a high charge density exhibit cytotoxic effects. The hybrid materials combined the synthetic and natural polymers are biologically harmless and so, can be used the design of effective drug/gene carriers.

The gene carriers need to be nano-sized, to deliver therapeutic agent into the cell. Whereas, hydrogels, which are macroscopic mesh structures, are often favored for drug delivery systems to be placed on the skin (wound dressing) or inside the body (implant). These macro-, micro- and nano-sized carriers should be biocompatible, have a balanced cationic charge, be resistant to effects such as pressure and enzymes for the body, and release the therapeutic agent under favoured conditions. For this reason, it is very important to investigate the mechanical, swelling and release properties of these carriers. It is especially important to determine the mechanical (compressive and/or tensile) strength of polymeric materials with macro-sized, which are used as drug carriers, wound dressings and implants by tensile/compression tests, and these measurements give easier and faster results than tests performed for nano/micro systems.

In this thesis, linear cationic polymers bearing PDMAPMAAm chains as grafts and and cross-linked statistical copolymeric hydrogels containing DMAPMAAm units (or short (DMAPMAAm)_n sequences) were synthesized under different reaction conditions, to use as gene and drug carrier system, their structures were characterized in detail and suitable combinations with drug/gene carrier potential were determined. By taking into considering all these explanations, the main idea of the present thesis is investigated into two parts: synthesis and characterization of (i) pH/temperature-sensitive PNIPAAm based macro-sized cationic hydrogels and (ii) pH-sensitive Cs-g-PDMAPMAAm (CsgD) nano-sized graft copolymers, and the suitability of all these DMAPMAAm-containing crosslinked/linear copolymers as drug and gene delivery systems, respectively.

In the first step, cationic PNIPAAm hydrogels containing DMAEMA, DMAPMAAm and [3-(methacryloylamino)propyl]trimethylammonium chloride (MAPTAC) were synthesized by free radical solution polymerization using three different solvent/initiator pairs in the presence of neutral N,N'-methylenebisacrylamide (BIS) and cationic tetraallylammonium bromide (TAB) crosslinker and the effect of cationic comonomers, crosslinkers and solvent/initiator pair on mechanical properties, swelling/deswelling and L-ascorbic acid (L-AA) release behaviors were evaluated. Polymerization of PNIPAAm based cationic hydrogels were initiated utilizing redox-pairs potassium persulfate/ N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine (KPS/TEMED) and KPS/NaOH or a thermal initiator azobisisobutyronitrile (AIBN) in the distilled deionized water (DDW), 0.1 N NaOH, and 1,4-dioxane solvents respectively. Also, formation of hydrogels using KPS systems was carried out at 25 °C while AIBN was activated at 50 °C. According to our findings, the cationic comonomer and crosslinker, as well as the initiator/solvent pair, have a significant impact on the homogeneity, mechanical strength, and swelling behavior of hydrogels. DMAPMAAm is the model comonomer to indicate effect of initiator/solvent pair KPS-TEMED/DDW, KPS/0.1N NaOH and AIBN/1,4-dioxane systems on the uniaxial compression moduli, gravimetric swelling degree and appearance of hydrogels. The results shows that KPS-

TEMED/DDW initiator/solvent pair provide formation of opaque hydrogels which has less swelling degree and improved mechanical strength more than KPS/0.1N NaOH system. When the mechanical property of P(NIPAAm-*co*-DMAEMA)/BIS and P(NIPAAm-*co*-MAPTAC)/BIS hydrogels at 37 °C/DDW and 37 °C/pH 4 is compared to DMAPMAAm containing hydrogels, the results exhibit that DMAEMA/BIS and MAPTAC/BIS including crosslinked networks have greater compressive moduli and a less swollen structure. All of the results demonstrated that the physical cross-linking points generated by ionomer pairs of MAPTA⁺ Cl⁻ units, as well as the hydrophobic contributions of ester groups in the DMAEMA units, may be responsible for their raised mechanical strength in DDW at 37 °C. Moreover, the charge screening effect of chloride ions in the swelling media at pH 4 contributed in higher compressive moduli as compared to DDW.

The results obtained from the diffusion of water into/out of the network structure in the swelling/shrinkage processes of PNIPAAm hydrogels at 25 °C/37 °C in DDW and L-AA release experiments performed in DDS at 37°C clearly show the importance of ionic and hydrophobic effects. It was found that the water diffusion mechanisms of PNIPAAm cationic hydrogels crosslinked with BIS and synthesized presence of AIBN/1,4-dioxane initiator/solvent pair obeyed Fick's law. On the other hand, the hydrogels crosslinked with TAB under the same conditions had non-Fickian water transport mechanism due to the electrostatic repulsion forces between the protonated amine groups of the cationic monomers and the quaternized ammonium groups of TAB. However, despite the presence of permanently protonated groups in the P(NIPAAm-*co*-MAPTAC)/BIS hydrogels, the water diffusion exponent is close to 0.5 due to the formation of multiplets that act as physical cross-links. Similarly, the fact that the diffusion exponent of the P(NIPAAm-*co*-MAPTAC)/BIS hydrogel for L-AA release is lower than the other samples and has a less-Fick mechanism is explained by these ionomer/multiplet structures. The results obtained in this part show that the initiator/solvent pair, cationic monomer and type of crosslinker lead to sharp changes in the mechanical properties, swelling/deswelling and drug release behaviour of the network structures and that ideal carrier systems can be created for anionic biomacromolecules such as drug and gene by determining suitable combinations.

CsgD graft copolymers, which constitute the second part of the study and are planned to be used as non-viral vectors, were synthesized by free radical solution polymerization in the presence of KPS thermal initiator. These graft copolymers containing chitosans with different molecular weights and degrees of deacetylation, were firstly characterized and the effects of Cs, DMAPMAAm and KPS concentration on the chain parameters, graft yields, molecular weights and branch number/lengths of the structures were investigated. The results showed that the graft copolymers which were synthesized using 8:1 DMAPMAAm:Cs (D:Cs) molar ratio had the highest yield, while the KPS concentration sharply changed the graft yield, chain parameters and all other structural properties of the graft copolymers. Increasing KPS concentration leads to the formation of CsgD graft copolymers with lower molecular weight and shorter branches. It was also found that KPS leads to the degradation of chitosan and chitosan chains in the samples become shorter depends on the increasing KPS concentration. The radicals on the etheric oxygen leads to form block copolymers instead of graft at high KPS concentration. On the other hand, it was observed that the initial molecular weight of chitosan and the degree of deacetylation did not have a significant effect on the graft copolymers. As a result of the characterization steps, the most suitable samples for gene carrier systems were found to be CsgD graft copolymers synthesized at different KPS concentrations containing low molecular weight chitosan with a

deacetylation degree of 94% and DMAPMAAm at a molar ratio of 8:1 D:Cs. Therefore, CsgD/small interfering RNA (siRNA) complexes which is called polyplex, were formed using these combinations and their zeta potential and particle sizes were examined by dynamic light scattering (DLS) method, CsgD:siRNA mass binding ratios by agarose gel electrophoresis. Moreover, hemolytic activity of CsgD copolymers, cell viability of polyplexes by using MTS assay and transfection efficiency of siRNA on the MDA-MB-231 human breast cell lines were investigated. All the biophysical properties and *in vitro* studies showed that the molecular weight, chain parameters and branch length/number have important effect on the biocompatibility and transfection efficiency of CsgD polyplexes. Also, the cell viability of CsgD graft copolymers with lower molecular weight and shorter DMAPMAAm branches are within acceptable limits (< 70%) and the ability of these copolymers to knockdown of the target gene is comparable level with lipofectamine which is commercial gene carrier. All the findings in the 2nd part of this thesis demonstrated that CsgD/siRNA complexes have a great potential as gene carrier.



1. GİRİŞ

Bilim insanları uzun yıllardır hastaların ilaca olan uyumluluğunu, tedavinin etkinliğini arttırmak ve ilacın yan etkilerini azaltmak amacıyla kontrollü ve hedefe yönelik ilaç salım sistemleri hakkında araştırmalar yapmakta ve yeni malzemeler geliştirmektedir. İlaçlar, taşıyıcı sistemler içerisinde vücuda gönderildiği zaman hedeflenen organ/hücreye ulaşana kadar konsantrasyonlarının azalması, bozulması ve diğer organların ilaçtan etkilenmesini engellenmektedir. Bu sayede, daha düşük dozlarda ilaç kullanılarak maliyet düşürülmekte ve kemoterapi ilaçları gibi vücudun tamamını etkileyerek hastaların yaşam kalitesini düşüren yan etkiler azaltılmaktadır [1]. İlaç salım sistemleri tüm bu avantajlarına rağmen genetik hastalıkların tedavisinde yetersiz kalmıştır ve bu alandaki araştırmalar yön değiştirerek gen terapisi hakkında çalışmalar başlamıştır. Gen terapisi, genetik hastalıkları iyileştirmek amacıyla hücre içerisindeki hasarlı genin sağlıklı genetik malzeme ile değiştirilmesi veya desteklenmesi konseptine dayalı bir tedavi yöntemidir. Bir ya da daha fazla genin mutasyonu, eksik/fazla kopyalanması sebebiyle ortaya çıkan ölümcül, tedavisi olmayan veya standart yöntemlerle tedavi edilemeyen hastalıklara gen terapisi ile çözüm getirilmesi hedeflenmektedir [2].

Modern tıp biliminde çığır açan bu iki yöntemin beraber kullanımı daha etkili sistemlerin oluşturulmasına olanak sağlamaktadır. Bu iki alanın birleştirilmesi ile ortaya çıkan sinerjik etki sayesinde her iki yöntemin güçlü yönlerine sahip ilaç/gen taşıyıcı sistemler tasarlanabilmektedir ve karmaşık, tedavisi mümkün olmayan hastalıklar için hassas, etkin ve yenilikçi tedaviler geliştirilmektedir. İlaç ve gen terapisinde lipozomlar, polimerler, miseller ve karbon nanotüpler gibi malzemelerin kullanılmaktadır [3–5]. Polimerik malzemeler, taşıyacakları malzemeye özgün olarak üretilibilmeleri, pH, sıcaklık, enzimler gibi fizyolojik uyaranlara karşı şişme/büzülme, bozunma vb. davranışlar sergileyebilecek şekilde modifiye edilebilmeleri sayesinde bu sınıfta özel bir yere sahiptir. Bilim insanları, polimer tabanlı nano parçacıklar, mikroküreler ve hidrojel gibi malzemelerin kontrollü ilaç salım konusundaki başarısından yararlanarak, genetik materyali kontrollü bir şekilde hapsedebilecek ve

iletebilecek taşıyıcılar oluşturmaktadırlar. Bu sistemler, terapötik genlerin iletimini ve ekspresyonunu iyileştirerek spesifik hücrelerin veya dokuların hassas şekilde hedeflenmesini sağlar. Ayrıca kontrollü ilaç salım sistemleri, gen terapisinin terapötik etkisini genişleterek, biyomoleküllerin zaman içinde sürekli ve düzenli bir şekilde verilmesini sağlayabilir [6, 7].

Polimerik malzemelerin içerisinde en yaygın olarak kullanılanlar katyonik doğrusal ve çapraz bağlı polimerlerdir. Biyomühendislik/biyoteknoloji alanlarında kullanılacak biyouyumlu polimerik malzemelerin biyolojik sistemlerle etkileşime girerek iyileştirici ajanları uygun şekilde taşınması ve salması gerekmektedir. Bu sebeple, hücreye ilaç/gen taşıyacak polimerik sistemler, biyobozunur, kararlı, zararsız (zehirli olmayan), bağışıklık sistemine uyumlu ve biyolojik olarak yenilenme özelliğine sahip olmalıdırlar. Ayrıca taşıyıcı polimerin negatif yüklü hücre zarı ile etkileşerek sitoplazmaya girebilmesi ve endozomal çevrimden kaçarak hedef ilaç/geni salması için genellikle pozitif yüklü olması gerektiği ifade edilmektedir [8–11].

Hem doğal hem de katyonik bir polimer olan kitosan (Cs), katyonik karakteri ve biyouyumlu, biyobozunur olması sayesinde ilaç taşıma/gen terapisi alanlarında sıklıkla kullanılmaktadır. Yapısında birincil amin grubu bulunan kitosan, bu sayede pH'a karşı duyarlı bir davranış gösterir, hedefli sistem için kolay fonksiyonlandırılabilir. Biyopolimerik nano taşıyıcı olarak ilacın kan dolaşımındaki temizlenme (drug clearance) oranını ve toksisitesini düşürmek, kontrollü salım yapmak ve ilacın terapötik indeksini arttırmak gibi birçok avantaja sahiptir. Ancak, kitosanın sadece bazı seyreltik asit çözeltilerinde çözünmesi, uygulama alanını kısıtladığından, bu problemini aşmak ve kullanım alanlarını genişletmek adına kitosanın son yıllarda kimyasal modifikasyonu üzerine yoğun araştırmalar yürütülmektedir. Ayrıca gen terapisi üzerine yapılan çalışmalarda modifiye edilmiş kitosanın transfeksiyon etkinliğinin yüksek olduğu da belirlenmiştir. Örneğin, kitosanın katyonik monomerler/polimerlerle modifikasyonu sonucunda yapıdaki pozitif yük taşıyan gruplar arttığından DNA'ya bağlanma etkinliği yükselmekte, böylece daha katyonik yapıya sahip kitosanın hücre içindeki endozomal kaçış ve transfeksiyon etkinliği de artmaktadır [12–14]. Ayrıca ilaç/gen taşıyıcı sistemlerde doğal ve sentetik polimerlerin bir arada kullanılması ile hem biyouyumlu, toksik olmayan hem de hedefe yönelik, istenilen özelliklere sahip, kolay modifiye edilebilen malzemeler tasarlanabilmektedir.

Polietilen imin (PEI) ve poli(2-dimetil amino) etilmetakrilat (PDMAEMA) gen terapisinde ve ilaç salım sistemlerinde en çok tercih edilen sentetik polimerlerdir. Öte yandan, katyonik bir biyopolimer olan kitosan ile sentezlenen aşı polimerleri de, transfeksiyon etkinliği, toksisite ve tampon kapasitesi gibi, polimerlerin gen terapisi uygulamalarında kullanılabilirliğini belirleyen temel özelliklerini geliştirerek oldukça etkili sistemler oluşturmalarını sağlamaktadır [15–18].

Son yıllarda, poli (N-[3-(dimetilamino)propil]metakrilamit) (PDMAPMAAm) polimerleri de ilaç/ viral olmayan gen taşıma ve protein tanıma gibi sistemlerde sıklıkla kullanılmaktadır [19–23]. PEI ve PDMAEMA’nın aşı polimerlerinin yanı sıra PDMAPMAAm içeren polimerlerin de kullanılmasının en önemli nedeni, PDMAPMAAm transfeksiyon etkinliği açısından diğerlerinden daha zayıf olmasına karşın ilaç taşıma sistemlerindeki başarısı, toksisite ve sitotoksitesinin daha düşük olması, ayrıca PEI’ye göre de tampon kapasitesinin daha yüksek olmasıdır [22, 24, 25].

Özellikle ilaç salım sistemlerinde katyonik polimerlerin yanı sıra sıcaklığa duyarlı malzemeler de sıklıkla kullanılmaktadır. Hastalık durumunda vücudun tamamında ya da hastalıklı doku/hücre çevresinde sıcaklık değişimi gözlemlenmektedir. Sıcaklığa duyarlı doğrusal/çapraz bağlı polimerler, bu değişime karşı konformasyonlarını değiştirmeleri sayesinde kontrollü sistemler oluşturulmasına olanak sağlar. Poli(N-izopropil akrilamit) (PNIPAAm) vücut sıcaklığına yakın bir noktada (32-34 °C) hacim faz geçiş sıcaklığına (VPTT) sahiptir ve hidrofilik komonomerler/polimerler ile birlikte kullanıldığında faz geçiş sıcaklığı daha yüksek değerlere çıkartılabilmektedir [26–28].

Terapötik ajan hücre içerisine gönderilecek ise taşıyıcının nano boyutlarda olması gerekmektedir. Öte yandan, deri üstüne (yara örtüsü) veya vücut içerisine yerleştirilecek (implant) ilaç yüklü sistemler içinse genellikle makroskopik boyuta ağ yapılar olan hidrojeller tercih edilmektedir. Makro, mikro ve nano boyuttaki bu taşıyıcı malzemelerin biyouyumlu olması, katyonik yükünün dengeli olması ve vücut için basınç, enzim gibi etkilere karşı dayanıklı olması, terapötik ajanı uygun koşullarda salabilmesi gerekmektedir. Bu sebeple, taşıyıcıların mekanik, şişme ve salım özelliklerinin incelenmesi oldukça önemlidir. Özellikle ilaç taşıyıcı, yara örtüsü ve implant olarak kullanılarak polimerik malzemelerin çekme/sıkıştırma testleri ile

mekanik dayanımlarının belirlenmesi oldukça önemlidir ve bu ölçümler nano/mikro sistemler için gerçekleştirilen testlere göre daha kolay ve hızlı sonuçlar vermektedir.

Bu tez çalışmasının amacı ilaç ve gen taşıma sistemi olarak kullanılabilecek, son yıllarda biyolojik uygulamalarda kullanımı yaygınlaşmış olan PDMAAAm polimerini içeren doğrusal ve çapraz bağlı katyonik polimerik sistemler sentezleyerek uygulama alanlarına bağlı karakterizasyonlarını gerçekleştirmek, sentez koşullarının, komonomer ve başlatıcı türü/konsantrasyonunun yapılar etkisi incelemek ve literatüre bu konuda kapsamlı bilgi sunmaktır. Bu amaç doğrultusunda ilk olarak, NIPAAm, DMAPMAAm, DMAEMA ve 3-(metakriloamino)propil]trimetil amonyum klorür (MAPTAC) monomerleri ile nötral dört fonksiyonlu BIS veya katyonik sekiz fonksiyonlu TAB çapraz bağlayıcıları ile bağlı PNIPAAm katyonik hidrojelleri sentezlenecek ve ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılacaktır. KPS-TEMED/DDS, KPS/ 0.1N NaOH veya AIBN/1,4-dioksan başlatıcı/çözücü çifti varlığında serbest radikal çözelti polimerizasyonu ile sentezlenen PNIPAAm katyonik hidrojellerinin DDS, pH 4 ve pH 9'daki mekanik özellikleri, 25/37 °C'de DDS'teki şişme/büzülme davranışları incelenecektir. Ardından, hidrojellere model ilaç olarak belirlenen anyonik L-AA yüklenecek ve 37 °C DDS içerisindeki salım mekanizmaları belirlenerek ağ yapıların özellikle anyonik terapotikler için uygunlukları araştırılacaktır.

Çalışmanın ilerleyen kısmında, farklı molekül ağırlıkları ve deasetilasyon derecelerine sahip kitosan ve farklı mol oranlarında DMAPMAAm kullanılarak Cs-g-PDMAAAm aşı kopolimerleri sentezlenecektir. Farklı KPS konsantrasyonlarında sentezlenen aşı kopolimerlerinin aşı verimleri, aşı etkinlikleri, zincir parametreleri, dal sayıları/uzunlukları belirlenerek başlatıcı, polimer ve monomer konsantrasyonu ile kitosan türünün yapılar üzerindeki etkisi incelenecektir. Bu adımın ardından, gen terapisi için uygun kombinasyonlar belirlenerek Cs-g-PDMAAAm aşı kopolimerlerinin anti-GAPDH siRNA ile polipleksleri oluşturulacak, yapıların DLS ile tanecik boyutları, zeta potansiyelleri, agaroz jel elektroforez ile siRNA ile bağlanma oranları, hemolitik aktiviteleri araştırılacaktır. Son olarak, Cs-g-PDMAAAm aşı kopolimerlerinin MDA-MB-231 insan meme kanser hücrelerindeki hücre canlılıkları ve GAPDH protein seviyelerini düşürme oranları belirlenerek gen terapisi için uygunlukları değerlendirilecektir.

2. TEORİK BİLGİ

2.1 Gen Terapisi

Kanser, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, nörolojik ve genetik bozukluklar gibi kalıtsal ve/veya fiziki, kimyasal ve sosyal çevre koşulları kaynaklı dış faktörlerin etkisi ile ortaya çıkan ve insan hayatını tehdit eden hastalıklar hem yaşam kalitemizi azaltmakta hem de ölümlerle sonuçlanabilmekte ve tedavilerinde kullanılan geleneksel ilaç ve cerrahi işlemlere dayalı yöntemler her durumda yeterli etkinliğe sahip olmayıp hastaların yaşam kalitelerini daha da düşürebilmektedir [8–11, 29]. Günümüzde, genetik anormallikleri de içeren bu ölümcül hastalıkların engellenmesi, teşhisi ve tedavisi için biyomedikal teknoloji alanında birçok yeni araştırma yapılmaktadır ancak geliştirilen farmakolojik ajanlar, peptit tabanlı terapötikler, tüm hastalıklara karşı etkili değildir ve kullanımları kısıtlıdır [30]. Birçok hastalık ya doğuştan ya da yaşamın ilerleyen dönemlerinde ortaya çıkan spesifik genlerin mutasyonundan kaynaklanmaktadır ve normal farmakolojik uygulamalar ile tedavisi imkansızdır. Bu durum, bilim insanlarının hastalıkların semptomlarının engellenmesi ile beraber bu hastalıklara sebep olan faktörlerin ortadan kaldırılmasını sağlayacak farklı terapötik yaklaşımların geliştirmeleri ve yeni tedavi stratejileri oluşturmaları konusunda araştırma yapmaya yönlendirmiştir [31]. Gen terapisi ise, genetik ve kardiyovasküler hastalıkları da içine alan, birçok hastalık ile mücadele etmek için geliştirilmiş, yenilikçi ve öne çıkan bir yöntemdir. Genomda gerçekleşen mutasyon veya silinme (kayıp gen) vücudun hücre döngüsünün düzenlenmesi, hücre iskeleti, ligant/reseptör fonksiyonları ve hücre dışı proteinleri de içeren bir dizi normal metabolik sürecin engellenmesine yol açarken gen terapisi bu problemlerin ortadan kaldırılması için yeni çözümler üretilmesine olanak sağlamaktadır.

Gen terapisi, bir hücredeki mevcut anormalliği düzelterek veya hücreye yeni bir işlev sağlayarak terapötik bir etki oluşturma amacıyla belirli bir hücreye genetik materyallerin gönderilmesini esas alan bir yöntemdir. Seçilmiş bir genin fonksiyonunu onarmak veya özel bir genin susturulmasını sağlamak için farklı gen terapisi uygulamaları mevcuttur ve bu yöntemin asıl amacı tek adımda uygun genetik materyalin bozuk veya kayıp gen ile değiştirilmesini sağlayabilmektir [32].

2.1.1 Gen terapisi tarihçesi

Genetik biliminin öncüsü olarak kabul edilen Avusturyalı rahip Gregor Jonann Mendel, bezelyelerin tohum rengi üzerine yaptığı çalışma ile ilk kez “baskın” ve “çekinik” gen terimlerini ortaya koymuş ve bezelyelerin miras aldığı genler üzerinden bir kalıtım modeli geliştirmiştir [33]. 1950 yılında ise, Amerikalı biyokimyacı James Watson ve İngiliz biyofizikçi Francis Crick çift sarmal deoksiribonükleik asit (dsDNA)’i model alarak, Franklin, Wilkins, Chargaff ve bu konuda çalışmış diğer bilim insanlarının DNA hakkında keşfetmiş oldukları yeni bilgileri bir araya getirerek gen yapısı deşifre etmiş ve DNA’nın 3 boyutlu yapısını aydınlatmışlardır. Watson ve Crick’in ortaya koyduğu modele göre DNA yapısında beş halkalı şeker (deoksiriboz), 3 adet fosfat grubu ve birbirine hidrojen bağları ile bağlı farklı nükleik asitler (adenin, guanin, sitozin ve timin) barındıran, çift sarmallı, antiparalel, sağa doğru dönen bir helikstir [34].

1960’ların ortalarında araştırmacılar, kalıtsal hastalıkları tedavi etmek için DNA gruplarının hastaların hücrelerine yerleştirilebileceklerini öngörmüşler, 1970 yılında ise ilk kez DNA zincirinin önceden belirlenmiş bir bölgesinde gen parçalanmasını sağlayacak nükleaz isimli enzimleri keşfetmişlerdir [35, 36]. Bilim dünyasındaki bu gelişmeler, genetik konusunda yeni olasılıkların doğmasına ve gen terapisi hakkında araştırmaların başlamasına olanak sağlamıştır.

İlk insan gen transferi, 1989 yılında tümör infiltre eden lenfositlerden (kanser hücrelerini tanıyan ve öldüren lenfositler) yararlanılarak yapılırken, gen terapisi ilk kez 1990 yılında, T ve B lenfositlerinin fonksiyonlarının bozukluklarından ortaya çıkan ve primer immün yetmezliği hastalığı olan Ağır Kombine İmmün Yetmezliğe (SCID) sahip Ashanti DeSilva isimli hastanın tedavisi için adenoazin deaminaz (ADA) geninde uygulanmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir [32]. 21. Yüzyılda, rekombinant DNA teknolojisi ve bununla ilgili medikal alanlardaki gelişmeler sonucunda fetüslerin genetik yapısının görüntülenebilmektedir ve bu durum genetik değişimlerden kaynaklanan hastalıkların belirlenmesi, düzeltilmesi ve tedavisini kapsayan gen terapisine dayalı klinik çalışmaların yapılmasına olanak sağlamıştır [37–39].

Ticari olarak kullanılan ilk gen terapisi ürünü, Shenzhen SiBiono GeneTech Co. Ltd şirketi tarafından 2003 yılında piyasaya sürülen ve Çin gıda ve ilaç idaresi (CFDA)

tarafından onaylı Gendicine (rekombinant insan p53 adenovirüs) adlı ilaçtır ve baş/boyun kanserinin tedavisi için geliştirilmiştir. Gendicine enjeksiyon yoluyla hücreye gönderildiğinde, modifiye edilmiş hücreler tarafından p53 (tümör baskılayıcı protein) proteini üretilir. Hücresel stres ile aktive edilen p53, hücre döngüsünün durdurulmasına ve DNA onarımına aracılık eder. Ayrıca stres koşuluna (pH, sıcaklık, toksinler, mekanik darbe vb.) bağlı olarak istemli hücre ölümünü (apoptoz) ve yaşlanmayı tetikler. Gendicine 12 yıl boyunca 30.000'i aşkın hasta üzerinde kullanılmış ve güvenli sonuçlar elde edilmiş bir ilaçtır [40]. Gen terapisi, kronolojik gelişmeleri ve elde edilen başarılı sonuçları ışığında, günümüzde hemofili, sistik fibrosis, talasemi, hiperkolesterol gibi kalıtsal hastalıklara yol açan gen mutasyonlarının düzeltilmesi ve kanser, Parkinson, Alzheimer, AIDS gibi sonradan ortaya çıkan hastalıklarla mücadelede aktif olarak kullanılmaktadır [41, 42]. Öte yandan, eşeyli üreme hücrelerinde ortaya çıkan etik problemleri ve özel izinlere sahip olması sebebiyle gen terapisi çalışmaları genellikle somatik hücreler üzerine yapılmaktadır [43].

2.1.2 Gen terapisi prensip ve mekanizması

Gen terapisinde genel olarak vücutta belirli bir bölgeye gönderilen nükleik asitlerin ve terapötikler, hedeflenen özel bir genin ve bu gene bağlı üretilen proteinin ekspresyonunun değiştirilmesini sağlayarak hastalıkların tedavi edilmesini hedefler. Bu noktada en önemli unsur, genetik materyalleri herhangi bir zarar almadan hedef hücreye gönderilebilmesidir. Ancak, bu terapötik genlerin damar içinde oluşan ekzonükleolitik parçalanmaları, vücuttaki endonükleaz enzimleri ile bioaktivitelerini kaybetmeleri, negatif yüke, hidrofilik karaktere ve yüksek molekül ağırlığına sahip olmalarından kaynaklanan düşük hücre zarı geçirgenlikleri gibi dezavantajlarından dolayı çıplak halde kullanımları oldukça kısıtlıdır. Bu sebeple, tedavi edici bu genleri taşımak için viral (virüse dayalı) ve viral olmayan (sentetik) taşıyıcı vektörler geliştirilmektedir. Öte yandan, bu taşıyıcıların terapötikleri taşıma/salım sırasında izlediği süreç birbirinden farklıdır.

Ökaryotik hücrelerde gen terapisi her iki taşıyıcı türü içinde hücresel alım, endozomal kaçış (virüslerde direkt hücre zarı difüzyonu da olabilir), taşıyıcı/terapötik kompleksinin ayrılması adımlarını içerirken bu sürecin devamında virüse dayalı sistemlerde transdüksiyon (virüs tarafından gen aktarımı), viral olmayan taşıyıcılar

için ise DNA ve ribonükleik asitin (RNA) sitoplazma veya çekirdeğe transferi ve translasyon aşamaları gerçekleşmektedir. Translasyon haricindeki adımlar, DNA/RNA'nın bir taşıyıcı ile hedef bölgeye gönderilmesinden ileri gelen, taşıyıcının yapısına, özelliklerine bağlı olan ve aşılması gereken problemlerdir. Gen terapisinde doğru taşıyıcıyı tasarlamak ve klinik uygulamalardaki başarıyı arttırmak için bu sürecin tüm adımlarına hakim olmak gerekmektedir (Çizelge 2.1) [44].

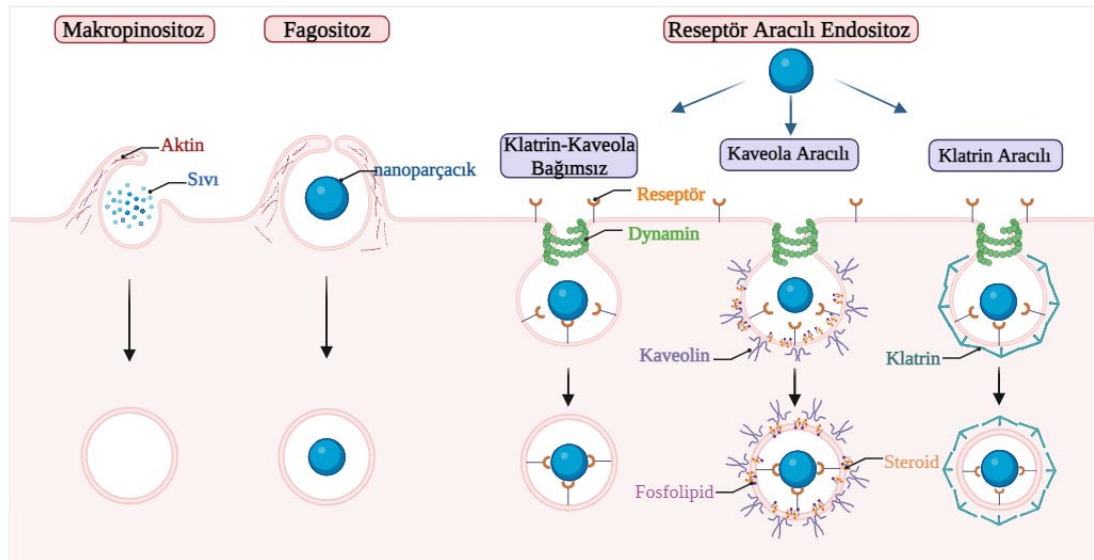
Çizelge 2.1 : Taşıyıcının hücre içi ve dışı aşması gereken problemler [44].

Hücre İçi Bariyerler	Hücre Dışı Bariyerler
Hücre zarı ile etkileşim ve hücre alım	Taşıyıcı kararlılığı
Endozomal kaçış	Kan dolaşımı veya organlarda nükleaz degradasyonu
Çekirdeğe giriş (DNA kompleksleri için)	Polikasyonun hedef hücrede tanınması
Taşıyıcı/terapötik kompleksinin ayrılması	Taşıyıcının hedef hücreye ulaşması

Hücre alım, moleküllerin biyolojik aktivitelerini düzenleyen en önemli süreçlerden biridir ve molekül ile hücre zarının arasındaki etkileşimlere bağlı olarak değişim göstermektedir. Hücre zarı, hücrenin dış sınırlarını oluşturan ince (4-10 nm) bir tabakadır ve en önemli iki bileşeni yağlar ve proteinlerdir. Yağların yapısal bir görevi mevcuttur ve negatif yüke sahip iki katmanlı yapısı sayesinde hücre ile mikro çevre arasındaki sınırları belirler. Proteinlerin ise işlevsel bir göreve sahiptir ve hem hücrenin iç-dış ortamları arasındaki madde taşınımını düzenler hem de hücre alım sinyallerini iletir [45]. Hücre zarı seçici geçirgendir ve sadece küçük moleküllerin katmandan doğrudan geçmesine izin verir. Hücreler arası iletişim ve besinlerin alımı biyolojik olarak tanımlanmış şekilde, hücre zarı aracılığıyla gerçekleşebilir. Oksijen, karbondioksit, su ve küçük hidrofobik veya polar olmayan moleküller konsantrasyona bağlı olarak difüzyon yolu ile, iyon ve aminoasit gibi moleküller iyon kanalları ve protein pompalarını kullanarak aktif taşıma (az yoğun ortamdan çok yoğun ortama ATP harcayarak geçiş) yoluyla hücreye girerler [46]. Öte yandan, nano boyutlu hidrofilik biyomakromoleküller hücreye endositoz yoluyla, hücre zarından oluşan bir keseciğin içerisinde girebilirler [47].

Endositoz temel olarak fagositoz, makropinositoz ve reseptör aracılı endositoz olarak üç sınıfta incelenmektedir (Şekil 2.1). Fagositozda, hücre zarının dışında oluşan

“yalancı ayak” olarak adlandırılan çıkıntılar hücreye alınacak büyük boyutlu katı moleküllerin çevresini sarmaktadır. İnsan akyuvar hücreleri fagositoz yapan hücrelere örnek olarak verilebilir. Makropinositozda ise, sıvı ve sıvı içerisinde bulunan (çözünebilen moleküller, besinler ve antijenler gibi) büyük boyutlu moleküller, plazma zarının dışı doğru uzanması ve kendine doğru katlanması sonucu oluşan keseciklerin içerisine hapsolür ve oluşan makropinozom adı verilen kesecikler ile hücreye alınır. Fagositoz ve makropinositoz spesifik olmayan hücresel alım şekli iken reseptör aracılı endositoz da malzemeler, hücre zarındaki uygun bir reseptöre tutunarak hücreye alınır. Reseptör aracılı endositoz kendi içerisinde klattrin aracılı, kaveola aracılı ve klattrin-kaveola bağımsız endositoz olarak üç sınıfa ayrılmaktadır. Bu mekanizmaların hepsinde ortak nokta, ligand adı verilen maddelerin, özel reseptörlere tutunması ile ligand-reseptör kompleksi oluşturması ve hücre zarından oluşan üzeri örtülü kesecikler içerisinde sitozole gönderilmesidir. Klattrin aracılı endositozda, farklı reseptör ve ligandlar, çevresinde kafes benzeri yapıya sahip klattrin proteinler bulunan kesecikler içerisine alınarak erken endozoma gönderilir. Kaveola aracılı endositozda ise, hücre zarında küçük, yuvarlak, kolesterol ve sfingolipidler ile zenginleştirilmiş ve kaveola proteinleri ile çevrili kesecikler oluşur ve bu yolla yağların ve sinyal moleküllerinin taşınımı sağlanır. Klattrin-kaveola bağımsız endositozda klattrin ve kaveola proteinleri bulunmamaktadır. Bu yol büyüme hormonları, hücre dışı sıvısı, glikosil fosfatidilinositol bağlantılı proteinlerin hücreye girmesi için kullanılır [45, 48, 49].



Şekil 2.1 : Malzemelerin hücreye alım şekilleri.

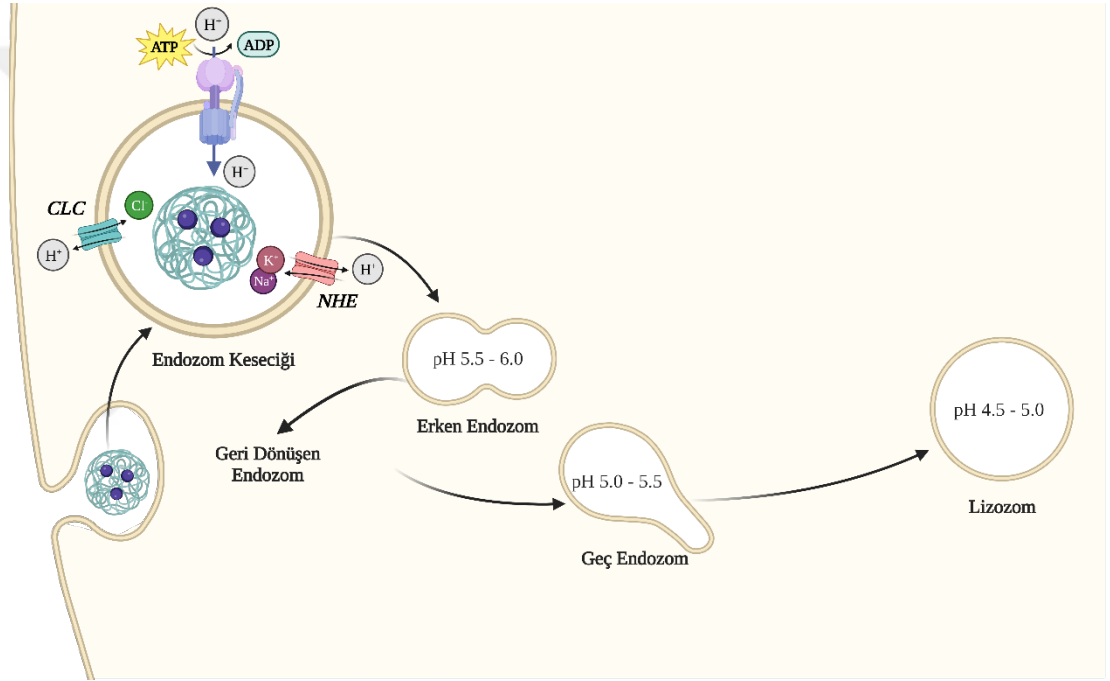
Zuhorn ve çalışma arkadaşları, biyolojik ve genetik yaklaşımları kullanarak endositozu engellemek ve klatrin aracılı endositoz ile hücre içine transferi görüntülemek için katyonik bir lipid olan SAINT-2 ve dioleoil fosfatil etanol amin (DOPE) ile hazırlanan SAINT-2/DOPE lipozom tabanlı taşıyıcıları sentezlenmişler ve plasmidDNA (pDNA) ile komplekslerini oluşturmuşlardır. Lipopleks adı verilen bu komplekslerin COS-7 (maymun fibroblast) hücrelerine giriş mekanizması incelendiğinde, yapıların klatrin aracılı endositoz ile gerçekleştiği gözlemlenmiştir [50]. Öte yandan, farklı çalışma gruplarının dallanmış polietilenimin (BPEI) ile oluşturdukları taşıyıcıların rahim ağzı kanser hücrelerine (HeLa) girişi araştırılmış ve komplekslerin makropinositoz, klatrin veya kaveola aracılı endositoz gibi farklı yöntemlerle hücrelere alındığı belirtilmiştir [51–53]. Bu tip yağ veya polimer tabanlı kompleksler genel olarak adezyon reseptörleri ile hücre zarına bağlanırlar. Belirli bir hücre için taşıyıcının giriş etkinliğini arttırmak amacıyla sentezlenen nanoparçacıkların yüzeyleri farklı ligandlar ile fonksiyonlandırılabilir [54, 55]. Ayrıca sentetik taşıyıcıların boyutu, şekli, yüzeyindeki hidrofilik/hidrofobik grupların oranı da hücre alım oranını direkt etkileyen faktörlerdir. Bu sebeple, hücre türü, gönderilecek terapötik, hedeflenen bölge baz alınarak farklı taşıyıcılar geliştirilmelidir [56, 57].

Virüslerin hücreye alım süreçleri, viral olmayan taşıyıcılardan daha farklı ilerlemektedir. Hücre zarındaki özel viral proteinler ve hücre reseptörlerinin virüs ile etkileşimi sonucunda taşıyıcı girişi gerçekleşmektedir. Bu mekanizma viral vektörün türüne ve hedef hücreye göre değişirken en yaygın mekanizma zar üzerindeki proteinlerin vektör yüzeyine yapışıp katlanmasıdır [58].

Endozomal çevrimde, endositoz yoluyla hücreye alınan malzeme hücre zarından oluşan endozom isimli keseciklerin içerisinde hapsolür ve bu süreç malzemenin endozomdan lizozoma hücre içi taşınımını kapsar. Endozomun farklı aşamalarında keseciğin içerisindeki pH'nın nötralden asidik bölgeye doğru düşmesi ve enzimler ile malzemenin parçalanması sonucu endozomal çevrim tamamlanır. Gen terapisinde, genetik materyali son aşamaya kadar koruyacak uygun taşıyıcı tasarlamak için endozomal çevrim ve kaçış mekanizmalarını detaylı olarak incelemek gerekmektedir [59].

Endozomlar, erken, geri dönüşen ve geç endozom olarak üçe ayrılır ve taşıyıcı hücreye girdiğinde erken endozomun (pH ~6,5) içerisinde bulunur. Keseciklerin üzerinde

bulunan elektrojenik boşluklu H^+ ATPaz (V-ATPaz) kanallarından içeriye proton pompalanmaya başlar. Ayrıca bu kesecikler üzerinde klor-hidrojen kanalları (CLC-3 ve CLC-5, CLC ailesi değişiricileri) ve Na^+/H^+ değişiricileri (NHE) mevcuttur. Klor iyonları proton pompası tarafından oluşan pozitif membran potansiyelini yönlendirerek, keseciğin asiditesini arttıran en önemli karşıt iyonlardır. NHE kanalları ile endozoma gönderilen katyonlar ise elektronötralizasyonu sağlayarak, ortamın asitliğini dengeler. Bu süreç içerisinde, endozom olgunlaşarak geç endozoma evrilir ve keseceğin pH'ı 5,5 civarına düşer. Ardından, endozom lizozom ile birleşerek endolizozomal keseciklere (pH ~4,5) dönüşür ve içerideki malzeme eğer bu süreç içerisinde kaçamazsa enzimler tarafından parçalanır (Şekil 2.2) [48, 60, 61] .

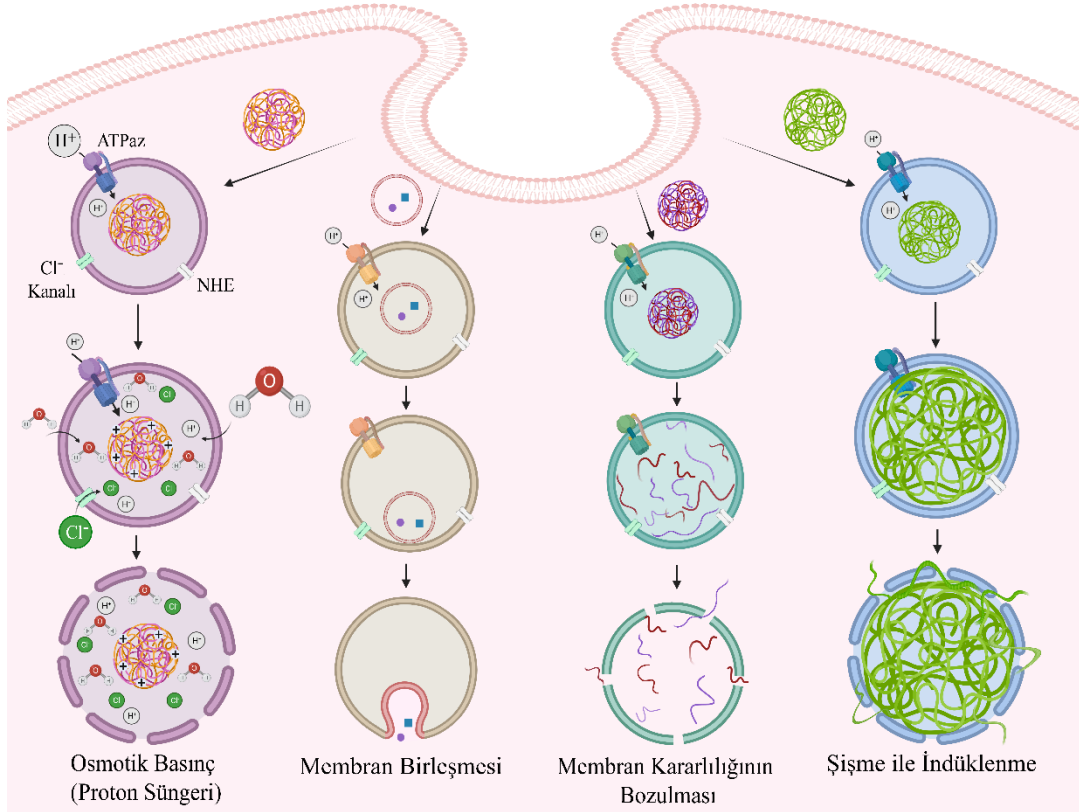


Şekil 2.2 : Endozomal çevrim şeması.

Taşıyıcı malzemelerin etkin gen salımı yapması için endozomal çevrimden kaçarak sitozole geçebilmesi gerekmektedir ve endozomdan membranla birleşme (füzyon), ozmotik basınç etkisi, şişme ile indüklenme veya membran kararlılığının bozulması mekanizmalarının birini kullanarak kaçabilir (Şekil 2.3).

Çeşitli virüsler, lipozomal veya lipid karaktere sahip hibrit polimerlerik karaktere sahip taşıyıcılar yağ tabakasından oluşan hücre zarına yapışabilir ve zar ile birleşerek endozomdan kaçabilirler. Membran birleşmesi olarak ifade edilen bu durumda, malzemenin sadece hedeflenen hücrenin endo-lizozom keseciklerine yapışması gerekmektedir. Yağ tabanlı malzemelerin yanı sıra, pH duyarlı katyonik polimerler de

bu mekanizma ile sitozole geçebilmektedir (Şekil 2.3). Bazik ve nötral pH'ta yüzey yükleri olmayan katyonik polimerler endozomun/lizozomun pH bölgesinde protonlanır ve oluşan katyonik yükleri ile negatif yüklü yağ tabakasına tutunurlar. pH duyarlı, yapışma için tasarlanan karboksillendirilmiş poli (glisidol) modifiye lipozom lipopleksleri ile HeLa hücreleri üzerine yapılan çeşitli çalışmalar sonucunda, birleşmenin sadece endo-lizozomda gerçekleştiği ve taşıyıcıların yüksek transfeksiyon etkinliğine sahip olduğu rapor edilmiştir [62, 63].



Şekil 2.3 : Endozomal kaçış yöntemleri.

Bir diğer yöntem olan şişme ile indüklenmiş endozomal kaçışta ise, malzeme endozomal çevrim sırasında düşen pH'a bağlı olarak şişer ve hücre zarını parçalar. Taşıyıcının bu şekilde sitozole geçebilmesi için pH duyarlı davranış göstermesi, düşük pH'ta şişerek hücre zarına baskı yapması ve parçalanmaya sebep olması gerekmektedir ancak bu yapı net olarak aydınlatılamamıştır (Şekil 2.3) [64, 65]. Hu ve arkadaşları PDMAEMA polimerini çekirdek ve poli(aminoetil metakrilat) (PAEMA) polimerini ise kabuk olarak kullandıkları poli(etilen glikol) dimetakrilat (PEGDMA) ile çapraz bağlanmış çekirdek-kabuk nanoparçacıklarının gen salım etkinliklerini ve salım mekanizmasını incelemişlerdir. Boyutları 200 ile 550 nm aralığından değişen nanoparçacıkların pH duyarlılığı için yapılan deneyler sonucunda, pH 7.4'ten 4.9'a

indirildiğinde yapıların şişme derecelerinin büyük oranda arttığı, en keskin değişimin 7.0-6.8 aralığında gerçekleştiği, bu durumun benzer yükler arasındaki elektrostatik etkileşimden ve çekirdekdeki polimerin solvatasyonundan kaynaklandığı rapor edilmiştir. Ayrıca model bileşik olarak kullanılan calcein isimli floresan boya ve oval albumin proteinleri yüklü nanoparçacıkların dendrik hücre hattındaki ilaç ve protein salım etkinliklerinin yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Öte yandan, çekirdekdeki polimer, pH'a karşı duyarlı davranış göstermeyen bir başka yapı ile değiştirildiğinde, hücre içerisinde etkin bir salım olmadığı da bulgulanmıştır [66].

Membran kararlılığın bozulması ise hücre zarının hidrofobik etkileşimler ile parçalanmasına dayalı bir yöntemdir (Şekil 2.3). Örneğin, yüzey aktif madde özelliği gösteren moleküller yağ tabakasının çözünmesine ve membranın bozunmasına sebep olmaktadır. Ayrıca katyonik veya hidrofobik polimerlerde membran yüzeyine tutunduklarında membranda konformasyonel değişikliklere sebep olarak endozomal zarın kararlılığını bozarlar. Bu mekanizma, membran birleşmesi yöntemi ile benzerlik göstermektedir [67]. Örneğin, Stayton ve çalışma arkadaşları, farklı oranlarda PDMAEMA ve poli(n-bütül metakrilat) (PBMA) içeren istatistik kopolimerleri sentezlemiş ve bu yapılar üzerinden kırmızı kan hücrelerinin kararlılığının bozulması ile endozomal kaçış arasındaki ilişkisini incelemişlerdir. Yapılan çalışmanın sonucunda, membran kararlılığını en çok bozan yapıların en fazla siRNA salımını sağladığı bulgulanmıştır [68]. Öte yandan, membran kararlılığını bozan bir diğer yöntem ise zarda por oluşumuna sebep olan peptitlerdir. Antimikrobiyal veya sentetik özel peptitler çift katmanlı zar ile etkileşerek özel porlar oluştururlar. Bu geçici açılmalar taşıyıcının dışarıya difüzyonunu sağlar. Bu difüzyon sırasında yağ tabakasının kararlılığı bozulur [69].

Ozmotik basınç değişimine dayalı endozomal kaçış diğer adıyla proton sünger etkisi en yaygın kaçış mekanizması olarak ifade edilmektedir. Endozomda, yapı içerisine özel ATP kanallarından asit pompalanarak yabancı cismin parçalanması sağlanır (Şekil 2.3). Taşıyıcı malzeme tampon özelliğine sahipse, kesecik içerisine gönderilen asidi tamponlayarak pH'ın düşmesini engeller, bu durumda içeriye daha çok proton ve iyon dengesini sağlamak için klor pompalanmaya devam eder. Bu süreçte, endozomun ozmotik dengesi bozulur, dengenin yeniden kurulması için kanallardan içeriye su girişi başlar ve zaman içerisinde şişen endozom parçalanır. Bu şekilde endozomdan kaçabilen malzemeler proton sünger özelliği gösteren yapılar olarak ifade edilir ve

genellikle zayıf katyonik karaktere sahip polimerler bu şekilde endozomdan kaçarlar [70, 71]. Bu mekanizma ilk kez 1997 yılında Behr tarafından PEI kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda keşfedilmiştir [72]. PEI'nin yapısında bulunan yüksek orandaki ikincil ve üçüncül amin grupları sayesinde, fizyolojik (pH 7.4) ve endozomal (pH 5.5) pH aralığında pKa değerine ve buna bağlı olarak yüksek tampon kapasitesine sahiptir. PEI, bu sayede lizozomal nükleaz aktivitesini engeller ve keseciğin ozmotik basınç dengesini bozarak parçalanmasını sağlar [17]. PEI'nin yanı sıra imidazol içeren polimerler, poliamidoaminler de pH 7.4 ile 5,1 arasında tampon kapasitesine sahiptir [73–75]. Ayrıca PDMAEMA (pKa ~7.4) ve PDMAPMAAm (pKa ~8.8) gibi pH duyarlı akrilat ve akrilamid türevi polimerler de sahip oldukları pKa değerleri ile endozomal çevrim sürecinde proton süngerı özelliği gösterebilmektedirler [24, 76]. Öte yandan, gen terapisinde sık kullanılan kitosan gibi doğal, katyonik, biyobozunur polimerlerinde düşük de olsa tampon kapasitesine sahip oldukları belirtilmektedir.

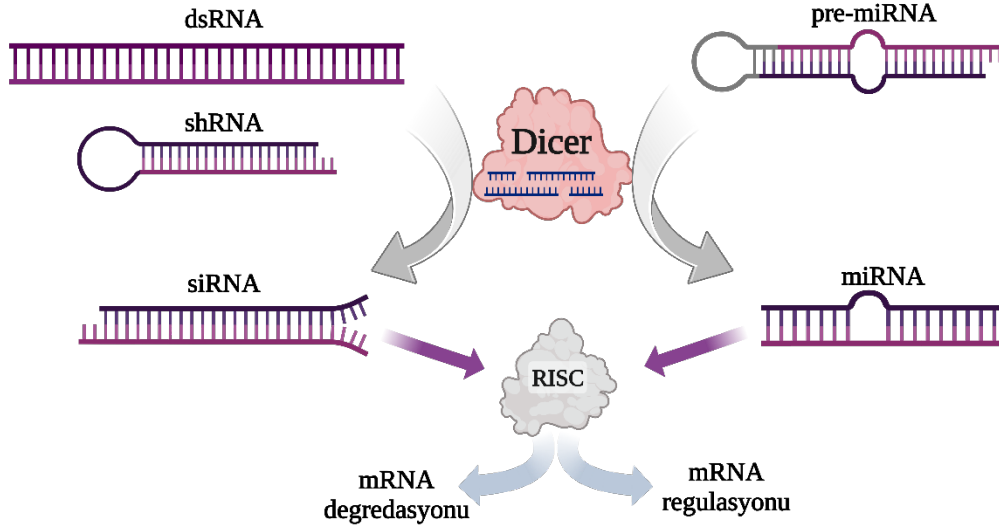
Taşıyıcı malzemeler endozomdan kaçtıktan sonra, taşıdıkları genetik materyal DNA ise, sitoplazma içerisinde hareket ederek çekirdeğe ulaşabilmelidirler ve bu adım çekirdeğe taşıma olarak ifade edilmektedir. Taşıyıcının, protein, mikrotübül ve organelleri içeren konsantre bir ortamda hareket yeteneği oldukça kısıtlıdır ve sitozoldeki hareketlilik malzemenin boyutuna bağlı difüzyon ile gerçekleşir [77]. Çıplak DNA 3.000 baz çiftine veya daha fazlasına sahipse veya DNA taşıyıcısının boyutları çok büyükse sitoplazma içerisinde hareket etmeleri mümkün değildir [78]. Öte yandan, yüzeylerinde pozitif yük bulunduran polipleks, lipopleks gibi yapılar anyonik mikrotübüller veya motor proteinleri ile spesifik olmayan etkileşimler kurarak çekirdeğe doğru hareket edebilirler. Ancak, çekirdeğe taşınım mekanizması çok net aydınlatılamamaktadır. Bu sebeple taşıyıcının başarısı, malzemenin hücreye alınması, endozomdan kaçışı ve hücreye genetik materyali bırakabilmesi süreçlerinin toplamını ifade eden transfeksiyon etkinlikleri ile değerlendirilir [79].

Taşınan genetik materyal RNA olduğu durumda çekirdeğe aktarım adımının önemi ortadan kalkar ve malzeme çekirdeğe girmeden sitozolde RNA'yı salarak transfeksiyon adımını gerçekleştirebilir. Gen terapisinde sık kullanılan mesajcı RNA (mRNA), DNA'nın aksine çekirdeğe girmeden hücre içinde salınarak tedavi etkinliği gösterebilmektedir [80]. mRNA'nın terapötik potansiyeli, BioNTech ve Pfizer

ortaklığında Özlem Türeci ve Uğur Şahin tarafından, COVID-19 hastalığı için mRNA teknolojisi kullanılarak üretilen aşılarda kanıtlanmıştır [81–83].

Gen terapisi belirli bir genin ifadesinin baskılanmasını ya da modifikasyonunu hedeflemektedir. Günümüzde, mRNA (post-transkripsiyonal gen susturulması) seviyesinde gen ifadesinin baskılanmasını sağlayan ve yeni bir terapötik nükleik asit sınıfı olan RNA interferans (RNAi) teknolojisi hakkında yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Antisens oligonükleotitler, mikro ribonükleik asit (miRNA), küçük interferans ribonükleik asit (small interference RNA, siRNA) ve kısa saç tokası ribonükleik asit (small hairpin RNA, shRNA) ile beraber hücre içerisine gönderilerek belirli bir mRNA'nın sitozolde susturulmasını sağlar ve ilgili proteinin üretimini azaltabilir/durdurabilir. Bu üç RNA türü farklı uzunluklara, çıkış noktalarına ve mekanizmalara sahiptir. siRNA, gen susturmak için geliştirilmiş, 21-23 nükleotit uzunluğunda olan ve çift sarmal RNA'nın (dsRNA) “dicer” adı verilen enzim tarafından kesilmesi ile oluşan bir RNA türüdür. siRNA, protein komplekslerine bağlanır (RNA-induced silencing complex, RISC) ve mRNA'yı hedefleyerek, mRNA'nın tamamlayıcı dizinini oluşturur. Amacı, mRNA'yı degrade ederek gen ifadesini durdurmaktır. miRNA ise gen regülasyonunda kullanılan 21-25 nükleotit uzunluğunda bulunan, endojen (iç içe büyüyen) tek sarmal RNA'nın katlanıp saç tokası yapısına geçmesi ile oluşan yapının “dicer” enzimi ile kesilmesinden elde edilen bir RNA türüdür. Amacı, siRNA gibi mRNA'yı degrade etmek değil translasyonu engellemektir. RNAi teknolojisinde kullanılan üçüncü RNA türü olan shRNA ise sentetik RNA molekülüdür ve miRNA'yı taklit etmek için üretilmiştir. 19-29 nükleotit uzunluğunda olan ve saç tokasına benzeyen shRNA genellikle viral taşıyıcılar ile hücreye gönderilir. shRNA hücre içerisinde “dicer” enzimi ile kesilerek siRNA'ya dönüşür (Şekil 2.4) [84–86].

Özetle, hedeflenen tedavi ve tasarlanan taşıyıcıya göre kullanılan genetik materyal türü değişmektedir. Hakkında en çok çalışma yapılan kanserde, apoptozu durduran proteinlerin (Bcl-2 proteini) üretiminin engellenmesi hedeflenmektedir ve genellikle bu amaç doğrultusunda mRNA degradasyonu ile gen susturma özelliği gösteren siRNA kullanımı tercih edilmektedir.



Şekil 2.4 : siRNA, miRNA ve shRNA'nın oluşum ve çalışma mekanizması.

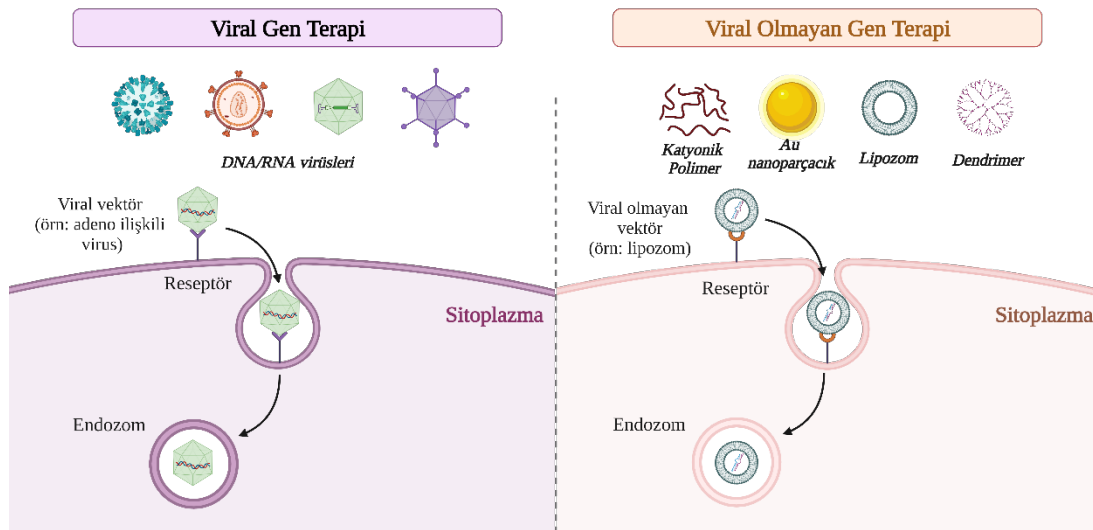
Genetik materyalin translasyon veya transkripsiyonu gerçekleştirmesi için son aşama taşıyıcıdan sitozol veya çekirdekte ayrılması yani salımıdır. DNA veya RNA'nın hücrede serbest kalması taşıyıcının transfeksiyon etkinliğini belirleyen en önemli adımdır ve yüksek etkinlikte sistemler geliştirmek amacıyla genetik materyal ile bağlama kadar serbest bırakma (disosiye olma, salınma) kapasitesi de yüksek sistemler dizayn edilmesi gerekmektedir. Bu durum, özellikle viral olmayan vektörler için oldukça önemlidir. Gen terapisinde sık kullanılan lipopleks (yağ-DNA/RNA), polipleks (katyonik polimer-DNA/RNA) ve lipopolipleks (yağ-polimer-DNA/RNA) komplekslerinin genetik materyalleri bırakma süreçleri tam aydınlatılamamakla beraber kullanılan komplekslerin özelliklerinin transfeksiyona etkisi incelenerek uygun taşıyıcı koşulları belirlenmektedir [87, 88]. DNA/RNA ile polimer/yağ kompleksleri hidrofobik, elektrostatik etkileşimler vb. fiziksel etkileşimler ile oluşmaktadır. Genetik materyal ile polimer/yağ arasındaki bağlanma gücünü veya katyonik yapılar için (+) yüklerin oranını azaltmak, poli(etilen glikol) ile konjugasyon ve polimerlerin molekül ağırlığını azaltmak DNA/RNA salım etkinliğini arttırmak için en çok başvurulan yöntemlerdir [77]. Örneğin, Nouri ve çalışma arkadaşları PEI'nin yüksek katyonik yük yoğunluğunun gen salımında ortaya çıkardığı sorunları aşmak amacıyla yapısında PEI'ye kıyasla daha az katyonik grup bulunan DMAEMA polimerini kullanarak farklı oranlarda DMAEMA içeren PDMAEMA-g-PEI aşırı kopolimerinin sentezlemişlerdir. PDMAEMA-g-PEI aşırı kopolimerleri yeşil floresan protein plasmid (pEGFP) pDNA ile kompleksleştirmiş, insan embriyo böbrek hücreleri (HEK293T) üzerinde *in vitro* testler yapılmış ve sonuçlar PEI ile

kıyaslanmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, katyonik yükleri ayarlanmış DMAEMA-g-PEI/DNA komplekslerinin hem hücreye girebilecek boyutlara (115 nm) ve zeta potansiyellerine sahip olduklarını hem de yapıdaki DMAEMA oranı arttıkça hücre uyumluluğu ve transfeksiyon etkinliğinin yükseldiği, PDMAEMA-g-PEI aşırı kopolimerlerinin PEI'ye kıyasla daha etkin taşıyıcılar olduğu rapor etmişlerdir [89]. Erbacher ve çalışma arkadaşları ise poli-L-lisinin (PLL) transfeksiyon etkinliğini arttırmak ve katyonik polimer ile DNA arasında elektrostatik etkileşimleri azaltmak amacıyla poli-L-lisine glikonik asit (GlcA) grupları ile modifiye etmiş (glikokonjugat) ve DNA salımını HepG2 hücrelerini (insan karaciğer karsinomu hücre hattı) kullanarak incelemişlerdir. Modifiye PLL'nin GlcA gruplarının sebebiyle katyonik yüklerinin azaldığı ve bu sebeple modifiye edilmemiş PLL'e göre DNA ile daha zayıf etkileşim kurduğu ve DNA'nın daha kolay disosiyasyon olduğu bulgulanmıştır [90].

Genetik materyalin serbest kalması için taşıyıcının endozomdan kaçabilmesi gerektiği bilinmektedir. Membran birleşmesi ile endozomdan kaçış mekanizması ayrıca kendi içerisinde malzemenin salım adımını da içermektedir çünkü taşıyıcı ile endozom zarı birleşir ve zarı açılma gerçekleşir. Lipopleksler ve bazı lipopolipoplekslerin endozomdan kaçışı ve DNA/RNA salımı için en sık öngörülen mekanizma membran birleşmesidir. Polipoplekslerde ise kaçış mekanizması genellikle proton sünger etkisi ile gerçekleşir. Bu yüzden, polimerlerdeki katyonik yük dengesi ve molekül ağırlığı değişimi lipoplekslere göre daha önemlidir [91]. Danielsen ve çalışma arkadaşları, glukozamin glukon ve kitosanın zincir uzunluğunun kitosan-DNA komplekslerinin kararlılığına etkisini incelemek amacıyla farklı zincir uzunluklarında (10-1000 monomer) kitosanları pDNA ile kompleksleştirmişler, ardından oluşturdukları polipopleksleri hyaluronik asit (HA) ve heparin ile karıştırmışlardır. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile polipoplekslerin kararlılıkları incelendiğinde, yapıdaki HA oranı arttıkça pDNA'nın kitosandan ayrılmadığı, heparin konsantrasyonu arttıkça ayrışma oranının da doğru orantılı olarak arttığı bulgulanmıştır. Ayrıca kitosanın zincir uzunluğunun ve komplekslerdeki miktarlarının komplekslerin kararlılığını keskin bir şekilde etkilediği, daha yüksek konsantrasyonda ya da zincir uzunluğunda kitosan varlığında polipoplekslerin ayrışması için daha çok heparin kullanılması gerektiği ifade edilmiştir [92].

2.1.3 Gen terapisinde kullanılan taşıyıcılar

Gen terapisinde kullanılan en basit yol terapötik proteinin kodlarına sahip çıplak DNA'yı hedef bölgeye enjekte etmektir. Öte yandan, bu yöntemde büyük boyutlu ve anyonik özelliklere sahip DNA'nın hücre zarından geçmesi ve hedef hücrenin çekirdeğine ulaşarak gen ekspresyonunu gerçekleşmesi uzun bir zaman alır ve etkinliği oldukça düşüktür. Bu sebeple, tedavi edici genlerin vücut içerisinde herhangi bir zarar almadan hedef hücreye taşıyabilmek ve hücre içerisindeki terapötik etkinliğini arttırmak için çeşitli taşıyıcılar tasarlanmaktadır ve bu taşıyıcılar viral ve viral olmayan vektörler olarak iki sınıfa ayrılmaktadır (Şekil 2.5) [93]. Örneğin, günümüzde Spinal Musküler Atrofi (SMA) hastalığına sebep olan bozuk SMN1 genini değiştirerek tamir edecek geni taşımak için viral vektörler kullanılmaktadır. COVID-19 için geliştirilen mRNA teknolojisine dayalı aşılar ise mRNA, sentetik, yani viral olmayan vektörler ile vücuda gönderilmektedir.



Şekil 2.5 : Viral ve viral olmayan vektörler ve hücreye girişleri.

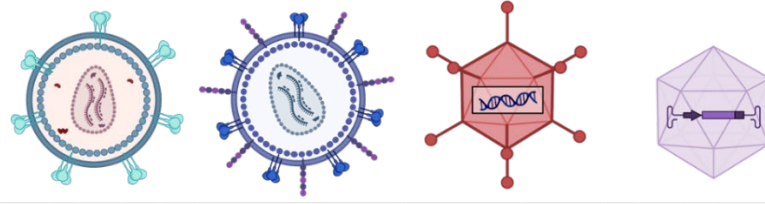
Gen terapisinde kullanılan ilk vektör sınıfı, bozuk ve genetik olarak değiştirilmiş, lentivirüs, retrovirüs, adenovirüs ve adeno bağlantılı virüsler gibi çeşitli virüslerin kullanıldığı viral taşıyıcılardır. Viral vektörlerin gen taşıma etkinlikleri yüksek olmasına rağmen, vücutta virüslere karşı antikor oluşması, inflamatuvar yanıtlar, toksisite problemleri ve mutagen riskleri sebebiyle güvenlikleri hakkında ciddi endişe duyulmaktadır [94, 95]. Öte yandan, doğal ve sentetik bileşikler ile tasarlanan viral olmayan vektörler, immunojenik olmama, düşük maliyet, yüksek kimyasal değişkenlik ve geliştirilebilir yükleme kapasitesi gibi birçok avantaja sahip oldukları

için gen terapisindeki kullanımları hakkında yoğun araştırmalar yapılmaktadır [29, 96, 97]. Polimer, lipid ve inorganik kaynaklı malzemelerin viral olmayan vektör olarak kullanılmaları oldukça yaygındır. Viral ve viral olmayan vektörlerin birbirlerine karşı farklı avantaj ve dezavantajları olduğu için günümüzde hem virüslerin hem de sentetik malzemelerin bir arada kullanıldığı hibrit sistemlerde tasarlanmaktadır. Yeni ve etkin bir vektör oluşturmak için gen terapisinde kullanılan taşıyıcılar hakkında genel bir bilgiye sahip olmak gerekmektedir.

2.1.3.1 Viral vektörler

Viral tekniklerde farklı sınıflardaki virüsler, gen terapisi için araç olarak kullanılmaktadır. Virüsler, kendi DNA'larını konak hücreye etkin bir şekilde aktarabilmekte ve hücrenin genetik yapısını değiştirebilmektedir. Bu eşsiz özellik, virüsleri modifiye edip içlerine yabancı bir gen yerleştirilerek hastalıklı hücreye yollanması fikrinin doğmasına yol açmıştır [98]. Viral vektörler genellikle lentivirüs, retrovirüs, adenovirüs ve adeno ilişkili virüslerin (AAV) gibi virüslerin genetik modifikasyonları ile geliştirilmektedir [99].

Viral vektörlerde, hedef hücreye gönderilecek terapötik gen virüs içerisine yerleştirilir, hücreye yollanır ve transdüksiyon gerçekleşir. Genetik materyalin replikasyonunun etkin bir şekilde sağlanması için yüksek miktarda virüs parçacığının kullanılması gerekmektedir [100]. Vektör seçimi, genetik materyal tutma kapasitesi, konak özgüllüğü, gen ekspresyon profili ve immün sistemi tetikleme olasılığı göz önüne alınarak yapılmaktadır [99]. Her virüsün kendine özgü özellikleri mevcuttur (Şekil 2.6).



	Retrovirüs	Lentivirüs	Adenovirüs	AAV
Boyut	~80-100 nm	~80-100 nm	~70-100 nm	~25 nm
Genom Türü	ssRNA	ssRNA	dsDNA	ssDNA
Paketleme Kapasitesi	10 kb	8 kb	~8-36 kb	~ 4,7 kb
Transdüksiyon	Çoğalan hücre	Çoğalan ve çoğalamayan hücre	Çoğalan ve çoğalamayan hücre	Çoğalan ve çoğalamayan hücre
Transdüksiyon Etkinliği	Orta	Orta	Yüksek	Orta
Ekspresyon	Kalıcı	Kalıcı	Geçici	Geçici veya kalıcı
İmmünojenite	Orta-yüksek	Orta-yüksek	Yüksek	Düşük
Gen Terapi Stratejisi	Ex-vivo	Ex-vivo	In-vivo	In-vivo

Şekil 2.6 : Viral vektör türleri ve özellikleri.

Retrovirüsler, küçük RNA virüsleridir, iki adet tek zincirli RNA'nın (ssRNA) proteinler ile beraber birleşmesinden oluşmaktadır ve üretilen ilk gen terapi virüslerdir. Retrovirüs, genom replikasyonunu ve uzun zaman aralığında tekrarlanabilirliği sağlayan bir genoma sahiptir ve bu basit yapıları ile terapötik genleri değiştirebilirler. Bu virüsler konak hücreye girdiklerinde viral RNA, ters transkripsiyon ile çift sarmallı DNA molekülü oluşturur ve çekirdeğe girerek konağın genomuna entegre olur. Bu genom, provirüs olarak adlandırılmaktadır ve ilgili proteinin sentezini sağlar. Provirüsler transkripsiyon ile mRNA üretir ve bu yeni RNA hücre dışına salınarak diğer hücrelerinde aynı sürece girmesini sağlar. Bu tür vektörler tasarlanırken, virüsün kendine ait olan gag (yapı proteini, kapsit), pol (protein, ters transkriptaz) veya env (zarf glikoproteini) gibi genlerinin çıkartılıp hedeflenen terapötik gen (en fazla 10 kilobaz,kb, uzunluğunda) ile değiştirilir [101, 102].

Lentivirüsler, retrovirüslerde ortaya çıkan kısıtlamalar sonucunda kullanılmaya başlanmıştır. Hem çoğalan hem de çoğalamayan hücrelere bulaşma yeteneğine sahip özel bir retrovirüs grubu olan lentivirüsler, retrovirüslerde bulunan üç hayati gen ürünü olan gag, pol ve env proteinlerine ek olarak viral gen ekspresyonunu regüle edebilecek 3-6 adet ek viral proteine sahiptir ve çoğalan/çoğalamayan birçok farklı konak hücreye enfekte olabildiği için kullanım alanı daha geniştir. Günümüzde, insan bağışıklık yetmezliği tip 1 (HIV-1) virüsünden üretilen lentiviral vektörler hakkında

araştırmalar hızla ilerlemektedir ve yabancı genlerin verimli bir şekilde konak hücrelerin genomlarına entegre edilerek uzun süreli ekspresyon sağlanması amaçlanmaktadır [103].

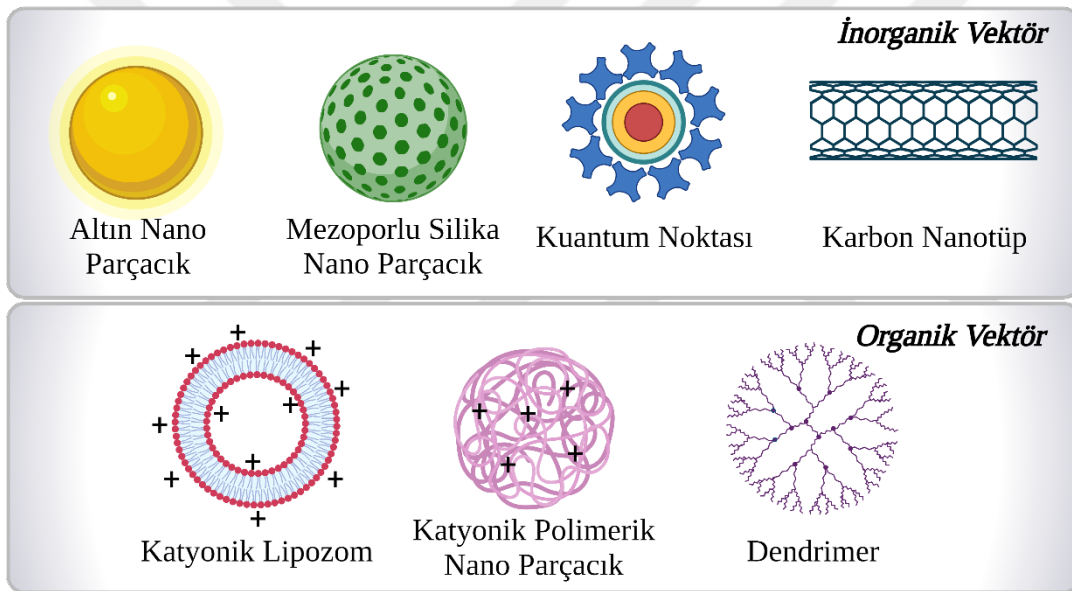
Adenovirüsler, yaklaşık 36 kb uzunluğunda büyük genoma, yaklaşık 70-100 nm aralığında çapa sahip çift sarmallı katlanmamış DNA (dsDNA) virüsleridir. Gen transferinde en sık kullanılan viral sistemlerdir ve 1000’den fazla adenovirüs türü bulunmaktadır. Adenovirüsler, hücreye reseptör aracılı endositoz yoluyla girerek genomlarını çekirdeğe transfer ederler ancak kromozomları konak hücrenin genomuna entegre olmaz ve gen ekspresyonları kısadır. Adenovirüslerin girebileceği konak hücre türü oldukça geniştir ve hem çoğalabilen hem de nöronlar gibi çoğalamayan birçok hücreye enfekte olabilmektedirler. Bu özellikleri ile adenovirüsler birçok insan hastalığından sorumludurlar. Öte yandan, immünojenik olmaları ve sebep oldukları yan etkilerden dolayı gen terapisinde kullanımları oldukça kısıtlıdır [93, 104].

Adeno ilişkili virüsler, tek zincirli katlanmamış DNA (ssDNA) virüsleridir ve parvovirüs ailesinin bir parçasıdır. 4.5 kb uzunluğunda ve 22-26 nm çapa sahip olan bu virüsler küçük oldukları için insan hücrelerine kolaylıkla bulaşmaktadır. Birçok farklı canlının kanı kullanılarak yapılan araştırmalar sonucunda, vücutlarında binlerce farklı türde AAV zinciri bulunmuştur. AAV’nin tek zincirli genomunda, genom replikasyonunu ve paketlenmesini sağlayan proteinleri üreten rep ve virüsün dış kılıfını oluşturan koruyucu kapsit proteinlerinin üreten cap genleri bulunmaktadır. AAV, adenovirüsler gibi çoğalan ve çoğalamayan birçok hücreye bulaşabilirken, adenovirüslerden farklı olarak DNA’ları konak hücrenin genomuna entegre olmaktadır. Bu virüsler, anormal hücre bölünmesi ile bağlantılı retrovirüslere bir alternatiftir ve insanlar, primatlar gibi birçok memelinin hücrelerini enfekte edebilmektedir. Ayrıca mutojenik etkilerinin az olması ile güvenli vektör sınıfında yer almaktadır ancak AAV vektörlerinin gen tutma kapasitesi oldukça sınırlıdır [105].

2.1.3.2 Viral olmayan vektörler

Viral olmayan vektörlerle gen transferi viral yöntemlere göre daha güvenlidir ve kolay tasarlanabilmeleri, düşük imünojenik etkiye sahip olmaları ile gen terapisinde oldukça önemli bir yere sahiptir. Geçmişte, transfeksiyon etkinliklerinin, gen ekspresyonlarının viral vektörlere göre daha düşük olması sebebiyle çeşitli dezavantajlara sahipken süregelen çalışmalar ve gelişmeler sonucunda yüksek etkinliğe sahip ve viral

vektörleri taklit edebilen taşıyıcılar tasarlanmaktadır. Viral olmayan vektörlerin, nükleik asit ekspresyonu, hedef hücreye ulaşma ve girebilme, endozomal kaçış ve çekirdeğe girebilme gibi viral fonksiyonları taklit edebilmesi gerekmektedir [106]. Birçok vektör endozomal çevrim yolu ile hücreye girer ve genetik materyal endozomal organeller içerisinde taşınır ve endozomal-lizozomal birleşme sonucu enzimatik parçalanma ile hücreden atılır. Etkili bir taşıyıcı bu çevrimden kaçabilmelidir ve yapılan çalışmalar yüksek etkinlikte, endozomal çevrimden kaçabilen ve toksik olmayan birçok taşıyıcı sentezlenebildiğini göstermektedir. Viral olmayan taşıyıcılar genel olarak inorganik ve organik malzemeler olarak iki sınıfta incelenmektedir ve bu sınıflar içerisinde en önemlisi polimerleri ve yağları da kapsayan organik malzemelerdir (Şekil 2.7) [102].



Şekil 2.7 : Viral olmayan inorganik ve organik vektör örnekleri.

İnorganik malzemelerden elde edilen vektörler organik tabanlı yapılara göre daha karardır. Viral olmayan ilk vektörlerden biri 1960’larda kalsiyum-fosfat temelli olarak tasarlanmıştır. Kalsiyum fosfat, pozitif yükleri ile DNA’yı bağlayarak kompleks oluşturur ve DNA’nın boyutlarının küçülmesini sağlar. Günümüzde, mezoporlu silika nanoparçacıkları gibi silika tabanlı sistemler, altın nanoparçacıkları, manyetik nanoparçacıklar, karbon nanotüpler, grafen ve kuantum noktaları gibi farklı inorganik taşıyıcı üretilmektedir [107, 108]. Öte yandan, birçok inorganik tabanlı taşıyıcının, organik malzemelere göre biyoyumluluğu daha düşük ve immunojenik etkisi ise oldukça yüksektir. Ayrıca organik malzemelerin kolay modifiye edilebilmesi, hedefe yönelik uyarlanabilmeleri, inorganik malzemelere üstünlük

sağlamaktadır. Günümüzde, inorganik malzemeler genellikle polimerler ve yağlarla beraber hibrit vektörler oluşturmak için kullanılmaktadır. Örneğin, Liu ve çalışma arkadaşları Parkinson hastalığının tedavisi için uygun pDNA'yı pozitif yüklü altın nanoparçacıklarının yüzeyine adsorplamış ve bu parçacıkları lipozomların içerisine hapsederek hibrit bir vektör oluşturmuşlardır. Bu vektörlere sinir büyütme faktörü ve dokosaheksaenoik asit takarak farenin sinir hücreleri üzerindeki etkinliklerini takip etmişlerdir. Elde edilen bulgular, vektörlerin farelerin motor ve motor olmayan disfonksiyonlarını geliştirerek dikkate değer nörokoruyucu etki gösterdiğini göstermiştir [109].

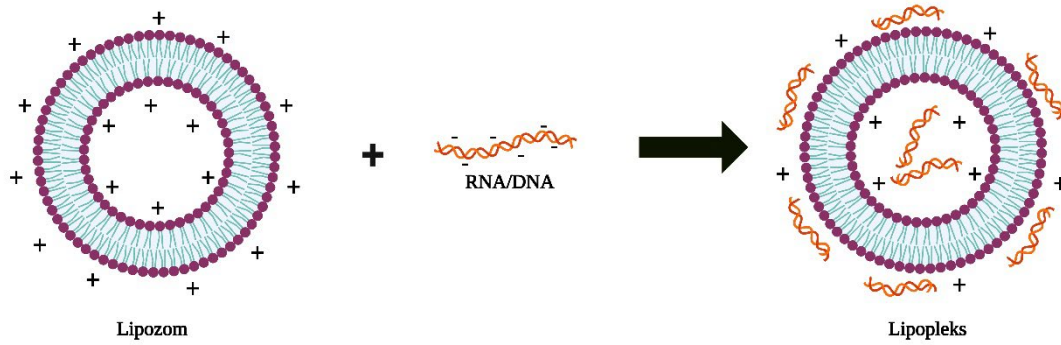
Organik malzeme tabanlı vektörler, biyobozunur ve biyouyumlu malzemelerden elde edilen, gen terapisinde hakkında en çok araştırma yapılan taşıyıcı sınıfıdır. Bu vektörlerin ilk amacı genetik materyali dış etkenlerden koruyarak hedef hücreye kadar götürebilmek, girebilmek ve endozomal çevrimden kaçarak uygun bölgede salım gerçekleştirmektir. Katyonik yağların ve polimerlerin, nükleik asitlerle ile elektrostatik etkileşimleri sonucu oluşturdukları sırasıyla lipopleks ve polipleks adı verilen yağ/polimer-genetik malzeme kompleksleri en dikkat çekici vektörlerdendir [110, 111]. Lipopleks ve polipleksler, siRNA, pDNA gibi nükleik asitlerin negatif yüklerini nötralize eder ve sahip oldukları pozitif yükleri ve nano boyutları sayesinde hücre içerisine kolaylıkla girebilirler. Reseptör aracılı endositoz yoluyla hücreye alınan kompleksler endozom ve lizozom gibi asidik stoplazmik organellerden kaçabilmek için proton süngeri olarak davranır ve endozomun/lizozomun şişerek patlamasını sağlar ya da hidrofobik etkileşimler ile endozomda/lizozomda yırtıklar oluşturur. Endozomal çevrimden kaçan lipopleksler/polipleksler taşıdıkları genetik malzemenin salımını gerçekleştirirler [112–115].

Viral olmayan polimer ve yağ tabanlı taşıyıcılarla ilgili çalışmaların öncüsü 1965 yılında Pagano ve Vahari'nin geliştirdikleri dietilaminoetil-dekstran (DEAE-dekstran) vektörüdür. DEAE-dekstran katyonik polimerinin DNA ile oluşturulan kompleksleri ile ilgili yapılan çalışmada memeli hücrelerindeki gen transferinin ve viral bulaşıcılığın (konak hücreye girebilen virüs parçacıklarının sayısı) geliştirildiği ifade edilmektedir [116, 117]. Bu çalışmanın ardından, lipozomlara DNA enkapsülasyonu, hayalet eritrositlerde (membran zarı parçalanmış, hemoglobini ayrılmış eritrosit) PEG tabanlı DNA salımı ve polikasyon/dimetil sulfoksit DNA komplekslerinin oluşturulması gibi çalışmalar yapılmış ve memeli hücrelerde etkili gen transferi

gerçekleştirilebileceğini bulgulanmıştır [118–121]. Öte yandan, tüm bu çalışmalar sonucunda farklı hücre tiplerine göre farklı taşıyıcıların oluşturulması gerektiği ve vektörlerin sitotoksikite sorunlarının giderilmesi gerektiği de ifade edilmektedir. Bu sebeple, günümüz hala yağ ve polimer tabanlı vektörler geliştirilmektedir.

Lipopleksler

Yağlar uzun süredir gen taşıyıcısı olarak kullanılmaktadır. Genellikle, pozitif yükü bulunan hidrofilik başa ve hidrofobik kuyruğa sahip olan yağ molekülleri, katyonik grupları sayesinde elektrostatik etkileşimler ile nükleik asitlere bağlanır ve lipopleksleri oluştururlar (Şekil 2.8). Yağların kuyrukları hidrofobik etkileşimler sonucunda kendi kendine düzenlendiğinden lipopleksler genel olarak lipozom, katı yağ nanoparçaları yada yağ emülsiyonları olarak da ifade edilmektedir. Lipozom sistemlerinin katyonik doğası ve hem lipofilik hem de hidrofilik bileşikleri tutabilme özellikleri, nükleik asit ve çeşitli ilaçların enkapsülasyonuna olanak sağlar [122, 123]. Lipozomlar biyobozunur doğaya, düşük toksisiteye sahip oldukları ve hem hidrofobik hem hidrofilik özellik gösterdikleri için, gen terapisinde kullanımları yaygındır.

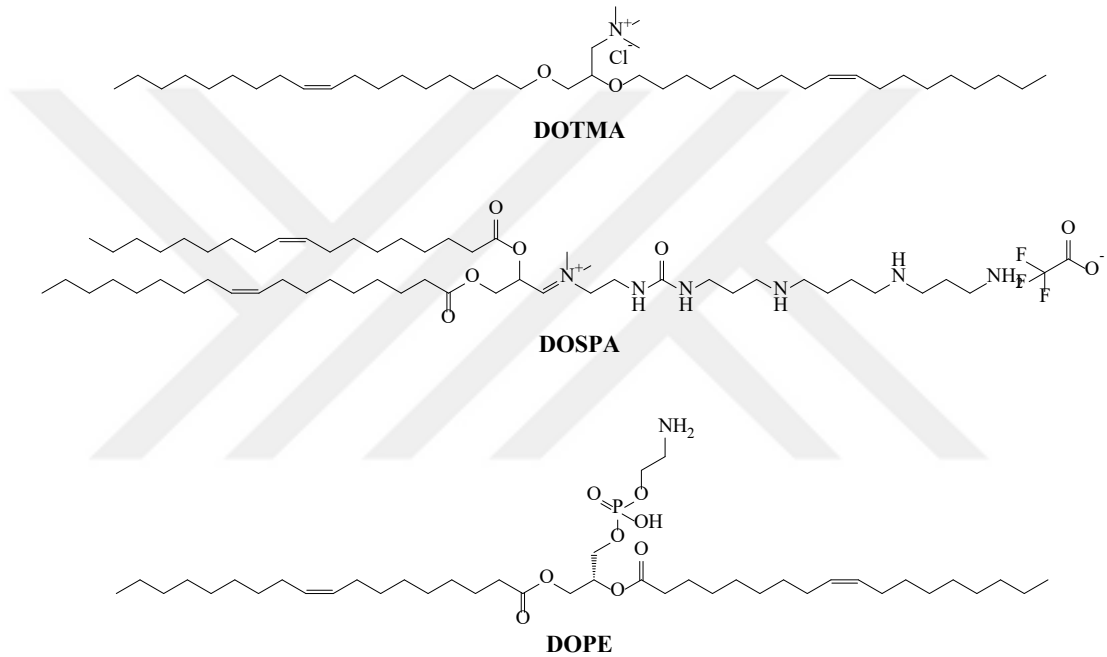


Şekil 2.8 : Lipopleks oluşum şeması.

Felgner ve çalışma arkadaşları, 1987 yılında sentetik katyonik yağ olan N-[1-(2,3-dioleiloksi)propil]-N,N,N-trimetil amonyum klorür (DOTMA) molekülünün memeli hücrelerdeki pDNA salımını incelemiş ve yağ tabanlı transfeksiyon anlamına gelen lipofeksiyon tanımını yapmışlardır (Şekil 2.9) [124]. Bu konu hakkındaki çalışmalar, standart teknik olarak ifade edilen DEAE-dekstran ve kalsiyum fosfat DNA yöntemlerine göre daha etkin sistemler oluşturulabildiğini ve gen transferi sistemlerinin geliştirildiğini göstermiştir. 1987’den sonra DOTMA ve diğer sentetik yağlar pDNA’nın transfeksiyonu için standart taşıyıcı haline gelmiştir.

Günümüzde en sık kullanılan katyonik lipozom, *in vitro* sistemlerde tercih edilen ve ticari taşıyıcı olan Lipofektamin/Lipofektamin 2000’dir. Lipofektamin, (2,3-

dioleiloksi-N-[2(spermin-karboksamido)etil] N,N-dimetil-1-propanaminyum-trifluoroasetat (DOSPA) ve 1,2-dioleol-sn-glisero-3- fosfatidiletanolamin (DOPE) moleküllerinin karışımından oluşur ve nükleik asitlerin negatif yüklerini kapatıp hücre zarında oluşan elektrostatik itme kuvvetlerini baskılayarak hücre alımı sağlar (Şekil 2.9). Ayrıca lipofektamin katyonik yağları, nötral yardımcı yağlarla birleştirildiğinde taşıyıcının pDNA, mRNA ve siRNA transfeksiyon etkinliğinin arttırıldığı ifade edilmektedir [125]. Lipofektamin genellikle, yeni sentezlenen viral olmayan taşıyıcıların transfeksiyon etkinliklerini incelenirken kıyas yapılacak vektör olarak kullanılmaktadır.



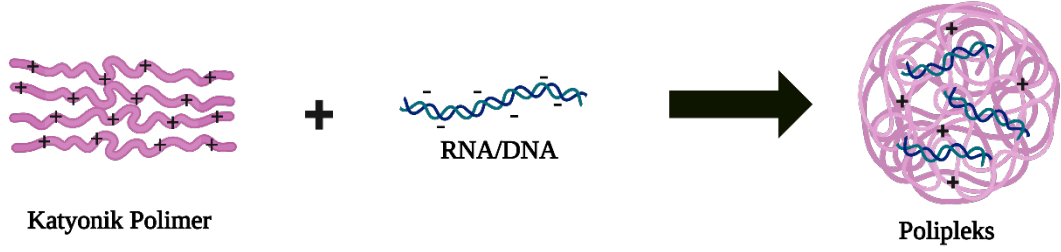
Şekil 2.9 : Gen terapisinde kullanılan bazı yağ molekülü örnekleri.

Lipopleksler nükleik asitleri hücre içi ve dışı nükleazlara karşı yüksek oranda korurlar ancak serum proteinleri ile spesifik olmayan etkileşimleri ve kanda hızlı şekilde temizlenmeleri sebebiyle kan dolaşımındaki yarı ömürleri oldukça düşüktür. Bu yüzden lipozomların PEG gibi polimerler ile kaplanarak kullanılması yaygın bir yöntemdir. Bu şekilde hem polimer hem de lipozom içeren vektörlere lipopolipleks adı verilmektedir [126–128]. Örneğin, Coelho ve çalışma arkadaşları, PEG'in lipozomları kan içerisinde koruduğunu ancak hücre içerisine girildiğinde endozomal kaçış oranını azattığını belirterek endozom içerisinde PEG polimerinin ayrışmasını sağlayacak, pH'a bağlı kırılabilen bağlar içeren PEG-yag vektörleri sentezlemişlerdir. Burada, fizyolojik koşullarda kararlılığı yüksek, endozom içerisinde ise pH düştükçe

PEG ve lipozom arasındaki bağların kırılması ile PEG'in ayrıştığı ve parçalanarak hücreden atıldığı taşıyıcılar oluşturulması hedeflenmiş ve bu doğrultuda farklı uzunluklarda PEG ve yağ molekülü içeren hemiasetal tabanlı metoksi PEG lipozomları (mPEG-Cn-lipid) sentezlemişlerdir. HEK 293T insan böbreküstü hücresi üzerinde yapılan testler sonucunda, pH 7.4 koşulunda lipopoliplekslerin oldukça kararlı olduğu, pH asidik koşullara yaklaştıkça yapıda hidrolizin gerçekleştiği ve zincirler kıaldıkça hidroliz oranının arttığı, komplekslerin transfeksiyon etkinliklerinin yüksek olduğu rapor edilmiştir [129]. Lipopoliplekslerde polimerler sadece lipozomu korumak için komplekslerin dış yüzeyinde bulunmazlar. Tam tersine nükleik asitin polimer ile kompleksleştirilerek çekirdek oluşturulduğu ve dış kabuğunda lipozom bulunan lipopolipleksler de mevcuttur. Örneğin, Sanmartin ve çalışma arkadaşları farklı tür de lipozomlar ve PEI kullanarak aşılar için özel vektörler tasarlamışlardır. 25 kDa boyutunda PEI polimeri ile sfingomiyalin (sfingolipit), disetilfosfat ve kolesteraol moleküllerinin farklı oranları ile sentezledikleri lipozomları kullanarak farklı lipopolipleksler oluşturmuş ve içlerine suda veya yağda çözünen farklı antijenler yüklemişlerdir. İnsan melanom hücrelerinde yaptıkları hücre testleri sonucu bu yapıların antijenleri lipoplekslere göre daha fazla koruduğu ve farklı antijenler için kullanılabilecek bir sistem olduğu ifade edilmiştir [130].

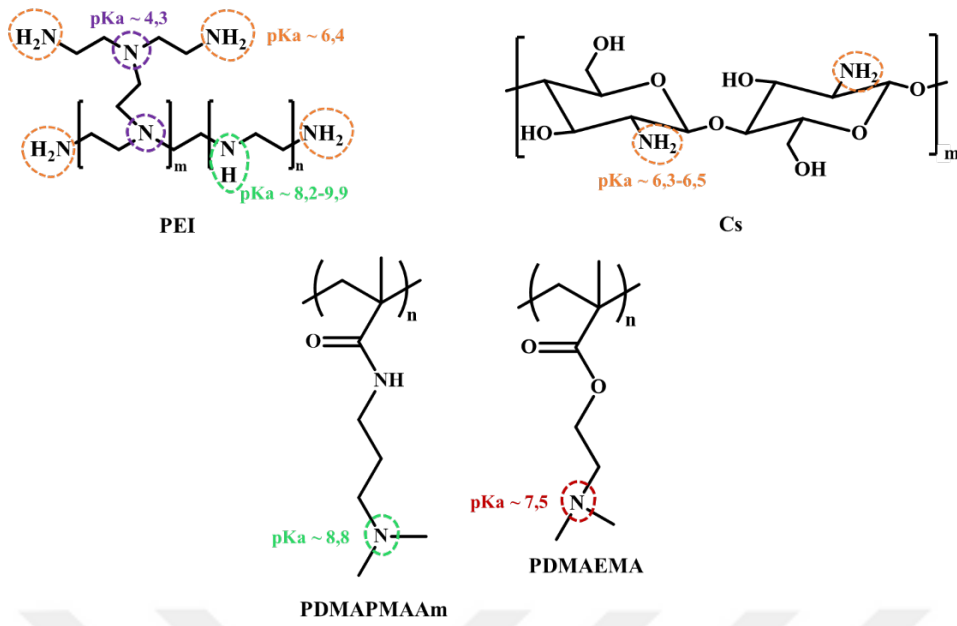
Polipleksler

Gen terapisi ve tıp alanında taşıyıcı olarak birçok farklı polimer kullanılmaktadır. Polimerlerin kolay üretilmesi ve amaca göre modifiye edilebilmeleri, ucuz olmaları biyomedikal alanlarda kullanımlarını yaygınlaştırmaktadır. Özellikle katyonik polimerler, suda çözünürlükleri yüksek olduğu ve tıpkı katyonik lipozomlar gibi elektrostatik etkileşimler ile negatif yüklü nükleik asitleri bağlayarak hem nükleaz enzimlerine karşı genetik materyali koruyabildikleri hem negatif yüklerini perdeleyerek hücre alımını sağladıkları için vektörler içerisinde özel bir yere sahiptirler (Şekil 2.10). Ayrıca bu polimerlerin katyonik lipozomlardan en büyük farkları su/sulu çözeltiler içerisinde çözünebilmeleri, daha küçük boyutlu kompleksler oluşturabilmeleri, serum proteinlerine bağlanma sorununa sahip olmamaları ve sitotoksitelerinin daha düşük olmasıdır [125, 131, 132]. Polipleksler hücreye genel olarak reseptör aracılı endositoz yoluyla girerler ve sahip oldukları katyonik yükler ve pKa değerleri sayesinde proton süngeri özelliği gösterirler.



Şekil 2.10 : Polieleks oluşum şeması.

Viral olmayan vektör olarak PEI, PDMAEMA, PDMAEMAAm gibi sentetik ve kitosan gibi doğal birçok farklı kasyonik polimer kullanılmaktadır (Şekil 2.11). Bu polimerler sahip oldukları amin gruplarından dolayı farklı pKa değerlerine sahiptirler ve bu sayede pH duyarlı davranış gösterirler. Doğal kasyonik polimerler genellikle toksik değildir, immunojenik etkileri düşüktür ve biyobozunurlardır. Sentetik kasyonik polimerlerin avantajı ise biyoaktif bileşenlerle ve fonksiyonel gruplarla kolaylıkla modifiye edilebilmeleridir ancak sitotoksik olmaları en büyük dezavantajlardır. Öte yandan, sentetik polimerlerin sahip oldukları yüksek kasyonik yük yoğunluğunun sebep olduğu sitotoksosite, polimer zincir uzunluğu, molekül ağırlığı değişimi ile azaltılabilir [102]. Örneğin, Correia ve çalışma arkadaşları zayıf kasyonik karaktere sahip DMAEMA ve iyonik olmayan hidrofilik oligo(etilen glikol)metil eter metakrilat monomerlerini farklı oranlarda kullanarak çeşitli istatistik ve blok polimerler sentezlemiş ve MTT yöntemiyle pankreas kanser hücresindeki sitotoksitesilerini incelemişlerdir. Elde edilen sonuçlardan, polimerin yapısına ve kasyonik bileşenin miktarına bağlı olarak sitotoksitesinin değiştiği rapor edilmiştir [133]. Qin ve çalışma arkadaşları ise guanidin takılmış N-3-aminopropil metakrilamit (APMA) ve N-hidroksi propil metakrilamit (HPMA) monomerlerinin serbest radikal polimerizasyonu ile kopolimerlerini sentezlemiş ve viral olmayan vektör olarak etkinliklerini incelemişlerdir. Statik ışık saçılımı yöntemi ile molekül ağırlıklarını incelenen ve toplam amin yüzdesi sabit olacak şekilde farklı mol oranlarında APMA ve HPMA içeren kopolimerlerin, pDNA ile polielekslerini oluşturup HeLa hücresindeki transfeksiyon etkinlikleri değerlendirilmiş ve yapıdaki APMA oranı arttıkça hücresel alımın arttığı, molekül ağırlığı ve kasyonik yük oranı ile sitotoksitesinin ters orantılı olduğu rapor edilmiştir [134].



Şekil 2.11 : Gen terapisinde kullanılan bazı doğal ve sentetik katyonik polimerler ve pKa değerleri.

Viral olmayan vektörlerde kullanılan en popüler sentetik polimerlerden bir tanesi altın standart olarak da adlandırılan PEI'dir ve 1995'ten beri gen terapisinde kullanılmaktadır [17]. PEI hacimli bir organik moleküldür ve yapısındaki amin grupları sayesinde yüksek katyonik yük yoğunluğuna sahiptir. PEI, amin grupları sayesinde fizyolojik ve asidik koşullarda pKa'ya ($pK_a \approx 4,3/6,4/8,2 - 9,9$) sahip olduğu için daha önce de ifade edildiği gibi yüksek proton sünger özelliği bulunmaktadır ve yapılan çalışmalar özellikle 25kDa'dan büyük molekül ağırlığına sahip olan PEI'nin transfeksiyon etkinliğinin yüksek olduğunu göstermektedir. PEI içeren polipeksler, galaktoz, mannoz, transferin ve antibiyotik gibi ligantlarla konjugasyonu ile farklı hücre tiplerinde de kullanılabilmektedir [135–137]. Yapılan in vivo çalışmalarda PEI polipekslerinin, böbrek, akciğer, tümör ve sinir sistemi gibi farklı organ ve dokularda gen transferini başarı ile gerçekleştirdiği ifade edilmektedir [77]. PEI'nin proton sünger özelliği doğrusal ve dallanmış olmasına göre değişmektedir. Doğrusal polimerde sadece ikincil amin grubu ($pK_a \approx 8,2 - 9,9$), dallanmış PEI'de ise hem birincil hem de ikincil ve üçüncül amin grupları bulunmaktadır ve zincirlerdeki üç atomdan bir tanesi azot atomudur. PEI'nin yüksek transfeksiyon etkinliği göstermesinin başlıca nedeni olan bu durum, asidik endozom/lizozom ortamında (pH 4-6) yeterli protonlanmamış amin grubu kalması ve malzemenin güçlü bir proton sünger etkisi ortaya koyması ile sonuçlanır [138]. Ayrıca dallanmış PEI, DNA ile daha kuvvetli elektrostatik etkileşim kurduğu için daha küçük

boyutlu polipleksler oluşmasına olanak sağlar [139]. Choosakoonkriang ve çalışma arkadaşları dallanmış ve doğrusal PEI'nin endozomal kaçış davranışlarını incelemek için HCl ile titrasyon yöntemini kullanarak polimerlerin tampon kapasitelerini belirlemiş ve pH 6,5-10 aralığında her iki PEI'nin de benzer davranış gösterirken pH 4-6 aralığında dallanmış yapının daha yüksek tampon kapasitesine sahip olduğunu rapor etmişlerdir [140].

PEI tüm bu özellikleri ile altın standart olarak ifade edilse de bu yüksek katyonik yük yoğunluğu hücrelerde büyük oranda sitotoksositeye sebep olmaktadır ve polipleks hücreye girebilmesine, endozomdan kaçabilmesine rağmen hücrenin parçalanmasına sebep olduğu için etkin olarak kullanılamamaktadır. PEI'in bu problemini aşmak için benzer tampon kapasitesine sahip farklı doğal ve sentetik polimerler araştırılmaktadır.

PDMAEMA ve poliamidoamin dendrimerleri gibi katyonik polimerler yeni nesil taşıyıcılar olarak ifade edilmektedir. Özellikle, 1996 yılında ilk kez COS-7 hücrelerinde nükleik asit transferi için kullanılan PDMAEMA hakkında yıllar içerisinde birçok araştırma yapılmıştır [141]. Yapısında üçüncül amin bulunan, suda çözünebilen zayıf katyonik bir polimer olan PDMAEMA pKa'sı ($pK_a \approx 7,5$) ile pH, hidrofobik grupları sayesinde ise sıcaklığa duyarlı davranış gösterdiğinden gen terapisinin yanı sıra kontrollü ilaç taşıma sistemleri içinde kullanılmaktadır. Doğrusal, dallanmış ve yıldız şeklinde sentezlenebilen PDMAEMA polimerlerinden özellikle yıldız şeklinde olanlarının pDNA ve siRNA için başarılı taşıyıcılar oldukları ifade edilmektedir [142–144]. Mendrek ve çalışma arkadaşları DMAEMA ve di(etilen glikol)metileter metakrilat (DEGMA) monomerlerini kullanarak atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP) yöntemi ile farklı oranlarda DMAEMA ve DEGMA içeren yıldız polimerler sentezlemişlerdir. DLS ile boyutlarını belirlenen yıldız polimerlerin HT-1080 hücrelerindeki pDNA transfeksiyon etkinliklerini incelenmiş ve yapıdaki N/P ve DEGMA oranına bağlı olarak boyutların ve sitotoksitenin değiştiği ve genel olarak polimerlerin transfeksiyon etkinliklerinin yüksek olduğu ifade edilmiştir [145].

PDMAEMA, PEI kadar olmasa da sorun yaratacak ölçüde sitotoksositeye sahiptir. Bu sebeple, PDMAEMA'nın türevleri sentezlenerek veya benzer polimerler seçilerek PDMAEMA içeren poliplekslerle kıyaslanmaktadır. Örneğin, Zuidam ve çalışma arkadaşları PDMAEMA'nın üçüncül amin grubunun, kuaterner amin ile değiştirildiği poli(2-trimetilamino)etil metakrilat (PTMAEMA) polimerlerini sentezleyerek iki homopolimer arasındaki transfeksiyon etkinliği değişimini incelemişlerdir. Elde

edilen sonuçlardan, PTMAEMA'nın pH duyarlı amin grubu olmadığı için proton süngerı özelliği gösteremediği, transfeksiyon etkinliğinin PDMAEMA'den daha düşük olduğu bulgulanmıştır [146]. PDMAEMA homopolimerinin ve türevlerinin sentetik gen taşıyıcı olarak incelendiği birçok çalışma mevcuttur [147]. Bu konudaki en detaylı araştırmalardan bir tanesi Wetering ve çalışma arkadaşlarının PDMAEMA'in hidrofobik etil grubunu, amino grubuna bağlı metil gruplarının sayısını veya grupların türünü ve akrilat yerine akrilamit türevlerini kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmadır. PDMAEMA, PDMAPMAAm, poli(2-(dimetilamino)-etil metakrilamit) (PDMAEMAm), poli(3-(dimetilamino) propil metakrilamit) (PDMAPMAm), poli(2-(trimetilamino)etil metakrilat klorür) (PTMAEMA), poli(2-(dietilamino)etil metakrilat) (PDEAEMA), poli(2-(dimetilamino)propil metakrilat) (PDMAEMA) ve poli(2-(dimetilamino)etil akrilat) (PDMAEA) homopolimerlerinin pDNA ile poliplekslerini oluşturup OVCAR-3 hücrelerindeki (insan ovarin kanser hücresi) transfeksiyon etkinliği incelendiğinde, PDMAEMA'in türevlerine göre daha etkin gen transferi gerçekleştirdiği ancak etil yerine propil içeren eşleniği PDMAEMA, bu polimerlerin akrilamit türevi olan PDMAPMAAm, PDMAEMAAm ve PTMAEMA'in sitotoksisitelerinin daha düşük olduğu bulgulanmıştır [22]. Ayrıca yapılan alışmalar, DMAEMA monomerinin yapısındaki ester gruplarından kaynaklanan hemotoksisitenin ve hidroliz olabilme özelliğinin azaltılabilmesi için, ester grubunun amit grubu ile değiştirildiği ve monomerik birim üzerindeki hidrofobikliğin ayarlanabilmesi için ise üçüncül amin grubu ile amit grubu arasına propil grubunun yerleştirildiği DMAPMAAm monomerinin gen terapisinde için potansiyel sahibi olduğunu göstermektedir. Buna ek olarak, PDMAPMAAm homopolimerinin ~8,8 olan pKa değerı, PDMAEMA polimerine kıyasla daha yüksektir ve bu durumda fizyolojik koşullarda protonlanma oranı PDMAEMA'den daha fazladır yani daha geniş pH aralığında tampon kapasitesine sahiptir [24, 25].

DMAPMAAm suda çözünebilen, biyoyumlu ve toksisitesi düşük bir monomerdır. Yapısında üçüncül amin grubu bulunan DMAPMAAm monomeri ile sentezlenen polimerler zayıf katyonik karaktere sahiptir. DMAPMAAm pH, sıcaklık duyarlı veya antibakteriyel özelliğe sahip doğrusal/çapraz bağlı polimerlerin tasarlanmasında, ilaç taşıma/ viral olmayan gen taşıma ve protein tanıma gibi sistemlerde sıklıkla kullanılmaktadır [19–22, 148]. PDMAEMAAm'in katyonik karakterine karşılık sitotoksisitesinin düşük olması ve yüksek tampon kapasitesine sahip olması ile

PDMAEMA'ye alternatif olabilir. Örneğin, Singhsa ve çalışma arkadaşları tersinir eklenme-parçalanma zincir transferi (RAFT) yöntemiyle DMAPMAAm HCl'in homopolimerini ve 2-aminoetil metakrilamid ve/veya N(3-aminopropil) morfolin metakrilamid monomerleri varlığında blok ve istatistik kopolimerlerini sentezleyerek siRNA salımını incelemişlerdir. Elde edilen sonuçlar %90'dan daha yüksek biyoyumluluğa sahip olan polimerlerin siRNA salımı için gelecek vadeden malzemeler olduğu ortaya konmuştur [149]. Scales ve çalışma arkadaşları ise N-2-hidroksipropil metakrilamit (HPMA) ve DMAPMAAm monomerleri ile sentezledikleri blok kopolimerlerin siRNA ile komplekslerini hazırlamış, taneciklerin kararlılıklarını ve salım etkinliklerini incelemişlerdir. Asetik tampon içinde 70 °C'de RAFT polimerizasyonu ile sentezlenen polimerler, siRNA ile kompleksleştirilmiş ve 3-11 nm boyutlarında siRNA/kopolimer kompleksleri elde edilmiştir. Komplekslerin enzimatik bozulma deneyleri sonucunda, yapıların ribonukleaz A enzimine karşı korunduğu ve blok polimerlerin gelecekte siRNA kararlılığı ve salımı için potansiyel bir sistem oluşturabileceği rapor edilmiştir [150].

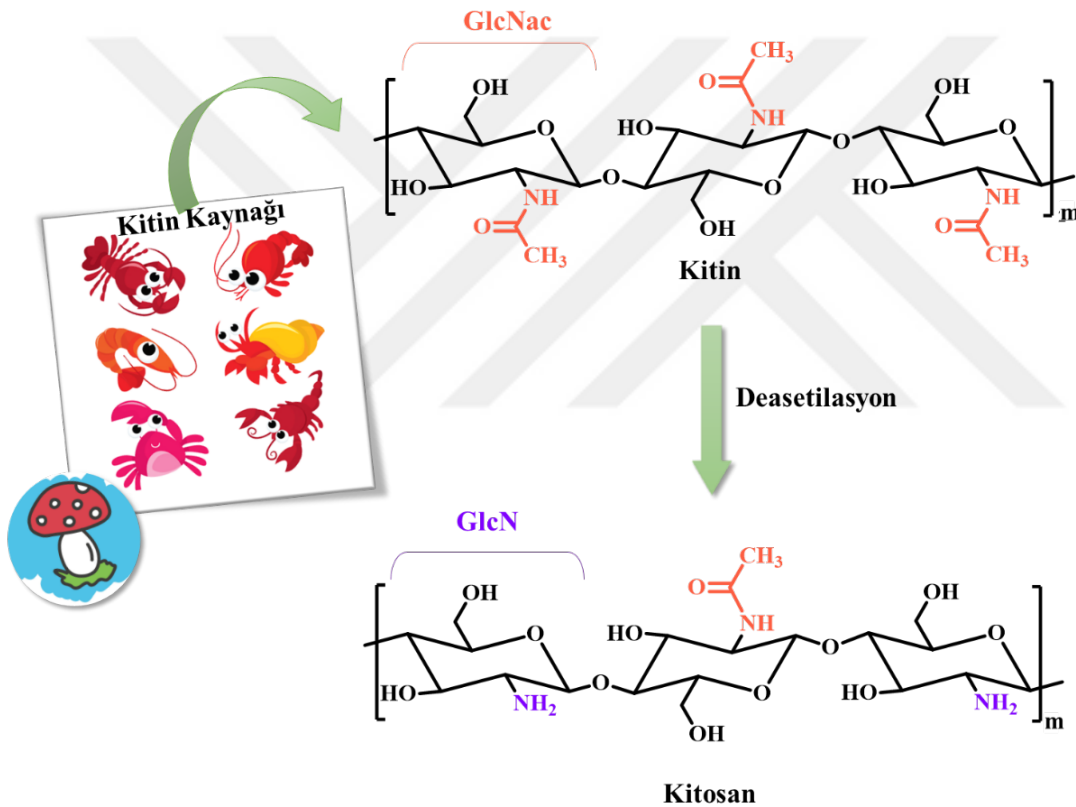
PEI'ye alternatif olan tercih edilen en önemli polimerlerden bir tanesi de doğal katyonik bir polisakkarit olan kitosandır. Kitosanın daha önce de ifade edilen biyoyumlu, biyobozunur olması ve toksik olmaması ile gen terapisinde sıklıkla tercih edilen polimerlerdendir [132].

Bu tez çalışmasının viral olmayan vektör tasarlama kısmında, kitosanın biyomedikal alanlardaki başarısı baz alınarak, literatürde hakkında daha önce herhangi bir bulguya rastlanmamış olan doğrusal Cs-g-PDAPMAAm aşılı polimerleri sentezlendi ve anti-GAPDH siRNA ile polipleksleri oluşturularak transfeksiyon etkinliği incelendi. Bu sebeple, kitosan ve aşılı polimerleri ile ilgili detaylı bilgiler ayrı bir başlık altında verilecektir.

2.2 Kitosan ve Aşılı Polimerleri

N-asetilglukoz amin (GlcNac) ve glukozamin (GlcN) birimlerinin β -(1,4) bağları ile bağlanması sonucu oluşan ve doğrusal katyonik bir heteropolimer olan kitosan, kitinin asetil gruplarının en az %40'ının deasetilasyon işlemi sonuca birincil amin gruplarına dönmesi ile elde edilir. Kitin, selülozdan sonra doğada en çok bulunan ikinci biyopolimerdir ve bazı böceklerin, akreplerin, yengeç, ıstakoz gibi kabuklu deniz hayvanlarının kabuklarında ve bazı mantarlarda bulunmaktadır (Şekil 2.12).

Kullanılmayan bu doğal polimer kıyı kesimlerdeki kirliliğin büyük bir bölümüne sebep olur. Bu yüzden yemek endüstrisinde kullanılan kabuklu deniz canlılarından atık olarak alınan kitinin değerlendirilmesi hem ekonomiktir ve hem de çevre kirliliği açısından fayda sağlar [151, 152]. Kitin, doğada bu kadar bol bulunmasına rağmen hiçbir çözücü içerisinde çözünmediği için kullanım alanı oldukça kısıtlıdır. Öte yandan, kitosan yapısındaki birincil amin grupları sayesinde asidik ortamlarda protonlanabilir ve sulu asidik çözeltiler içerisinde çözünmektedir [153, 154]. Kitin'in asetilglukozamin gruplarının glukoz amin gruplarına dönüşme oranı deasetilasyon derecesi (DDA) olarak tanımlanır ve DDA kitosanın protonlanma yüzdesini ve çözünürlüğünü keskin bir şekilde değiştirmektedir.



Şekil 2.12 : Kitin ve kitosan.

Zayıf katyonik karaktere sahip olan Cs ($pK_a \approx 6,3 - 6,5$) pH'a duyarlı bir davranış gösterir, hedefe yönelik taşıyıcı sistem oluşturabilmek için kolayla fonksiyonlandırılabilir ve vücut içerisindeki enzimlerle parçalanması sonucunda elde edilen küçük moleküller biyoyumlu ve biyobozundur. Cs tabanlı nanojeller/mikrojeller, ilacın toksisitesini ve kan dolaşımındaki temizlenme (drug clearance) oranını düşürmek, kontrollü salım yapmak ve ilacın terapötik indeksini

arttırmak gibi birçok avantaja sahiptir. Azadi ve çalışma arkadaşları, kan-beyin bariyerinde kullanmak amacıyla Cs tabanlı ilaç taşıyıcı sistemler tasarlamışlardır. Bu amaç doğrultusunda, sodyum tripoli fosfat (TPP) anyonik çapraz bağlayıcısı varlığında iyonotropik jelleşme yöntemiyle ile sentezlenen Cs nanojellerine yaygın bir kanser ilacı olan metatreksat (MTX) yüklenmiş ve nano taşıyıcıların hem boyutları hem de ilaç salım etkinlikleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, Cs nanojellerinin tanecik boyutlarının ortalama olarak 118 nm'dir ve ilaç yükleme kapasitesinin yüksektir. Hedeflenen bölgeye ilaç salımı yaptığı belirlenen kitosan bazlı nanojellerin, beyin-kan bariyerini geçmekte zorlanan ilaçların salımı içinde iyi bir nano taşıyıcı sistem olabileceği rapor edilmiştir [155].

Ayrıca kitosanın yapısındaki katyonik gruplar negatif yüklü DNA, RNA veya hücre zarı ile etkileşebilir ve bu özelliği sayesinde hem kontrollü ilaç salımında hem de viral olmayan DNA/RNA taşıma çalışmalarında kullanımı yaygınlaşmaktadır [153, 154]. Kitosan, yapısındaki glukozamin birimlerinden kaynaklı, mukoz yüzeyine yapışma özelliğine sahip olması sayesinde sıkı bağlarla birbirine bağlanmış epitel hücrelerinin arasına girebilmektedir [156, 157]. Pan ve çalışma arkadaşları, kitosanın biyoyapışma özelliğini kullanarak insülin salımını incelemişlerdir. Kitosan ve TPP polianyonunun iyonotropik jelleşmesi yani, polielektrolitik kompleksleşme ile elde edilen nanojellerin insülin tutulumunu yüksek oranda arttırdığı ve vücuttaki diyabetik glikoz seviyesini uzun sürede normal seviyeye düşürdüğü gözlemlenmiştir [158]. Son yıllarda, kanser tedavisi için geliştirilen aşılarda kullanılan kitosanın bağışıklık sistemini destekleyici özellikleri olduğu da rapor edilmiştir [159, 160].

Kitosanın gen terapisinde viral olmayan vektör olarak kullanımı ilk kez 1995 yılında Mumper ve çalışma arkadaşları tarafından rapor edilmiştir [161]. 1998 yılında yapılan in vivo uygulamalar sonucunda kitosanın mukozal dokularda nükleik asit taşıyıcısı olarak kullanılabileceği ifade edilmiştir [162]. Ayrıca yapılan farklı çalışmalar sonucunda kitosan/DNA polielektrolit komplekslerinin B16 melanoma hücreleri, afrikalı yeşil maymunların karaciğer hücreleri (COS-1), insan epitel kolorektal adenokarsinom hücreleri (Caco-2), HEK293, HeLa gibi çeşitli hücrelere transfeksiyonu etkin bir şekilde gerçekleştirilmiştir [163].

Kitosanın uygulama alanlarının belirlenmesi için en önemli iki parametre deasetilasyon derecesi ve molekül ağırlığıdır. DDA ve M_w değişimine göre özel, hedefe yönelik viral olmayan vektörler sentezlenebilmektedir. Bu sebeple, kitosan

tabanlı bir taşıyıcı tasarlarken ilk önce DDA ve molekül ağırlığının kitosanın yapısı üzerindeki etkisi hakkında bilgi sahibi olmak gerekmektedir.

2.2.1 Deasetilasyon derecesi ve molekül ağırlığının vektör tasarımına etkisi

Ticari olarak satın alınan Cs geniş bir molekül ağırlığı ve deasetilasyon derecesi aralığına sahiptir. Biyomedikal alanlarda kullanılan kitosanın polidispersite indeksinin (PDI) 1'e yakın olması istenmektedir ancak ticari kitosanların PDI değerleri genellikle yüksektir. Bunun sebebi, deniz kabukları veya böceklerden toplanan kitinin geniş bir molekül ağırlığına sahip olması ve farklı molekül ağırlığındaki polimerlerin birbirinden ayrımının tam olarak sağlanamamasıdır. Bu durum, Cs hakkında yapılan klinik çalışmalarda istenmeyen biyolojik etkilerin ortaya çıkmasına sebep olur [164]. Ayrıca molekül ağırlığı ve deasetilasyon derecesi değişimi kitosanın biyobozunurluk ve biyoyumluluk olmak üzere birçok özelliğini değiştirmektedir [165].

Cs ile ilgili yapılan çalışmaların başında ilk olarak sentezlenen veya satın alınan polimerin detaylı şekilde karakterize edilmesi gerekmektedir. Molekül ağırlığı tayininde HPLC, ışık saçılımı gibi cihazların kullanılması ile beraber en basit ve doğruluğu yüksek yöntemlerden birisi kapiler viskozimetredir [166–170]. Kitosanın literatürde, farklı çözücü, sıcaklık, molekül ağırlığı ve deasetilasyon derecesi aralıklarında birçok Mark-Houwink-Sakurada denklemi bulunmaktadır [171].

Bu tez çalışması içerisinde de Cs polimerlerinin molekül ağırlıkları hem jel geçirgenlik kromatografisi hem de kapiler viskozimetre yöntemi ile belirlendi.

Doğada kitin ve kitosan sırasıyla kitinaz ve kitosanaz enzimleri ile parçalanmakta ve ilk önce oligosakkarite sonra da N-asetil glukozamin ve N-glukozamin birimlerine dönüşmektedir. İnsan vücudunda ise kitosan, lizozom ve kolonda bulunan bakteriyel enzimlerle parçalanabilir. Ayrıca bazı insan kitinaz, glukosidaz ve proteaz enzimleride kitosanı farklı miktarlarda parçalayabilmektedir [172]. Kitosanın enzimatik parçalanmasını etkileyen en önemli faktörler deasetilasyon derecesi ve polimer zincirindeki N-asetil glukozamin birimlerinin sayısıdır. *In vitro* çalışmalar sonucunda parçalanma hızının, deasetilasyon derecesi %50'nin altında olduğu durumlarda, hidrofobikliğe ve enzimlerin polimerlere ulaşmasının artışına bağlı olarak yükseldiği, DDA %50'nin üstüne çıktığında ise polimerin kristalinitesi ve N-asetil glukozamin sayıları azaldığı için hızın düştüğü ifade edilmektedir [172–174]. Ayrıca kitosanın zincir uzunluğunun da biyobozunurluğu keskin şekilde etkilediği, molekül ağırlığı

arttıkça parçalanmanın azaldığı ifade edilmektedir [175]. Khoulenjani ve çalışma arkadaşları, kitosanın yapısal özelliklerinin biyobozunurluğa etkisi incelemek amacıyla farklı DDA ve molekül ağırlıklarına sahip kitosanları simule edilmiş mide sıvısı (SIF, pH 7.5) içerisinde 150 rpm’de karıştırmış ve kapiler viskozimetre ile molekül ağırlıklarını belirlemişlerdir [176]. Li ve çalışma arkadaşları ise benzer şekilde farklı kitosanların proteaz enzimi içerisindeki parçalanma miktarlarını araştırmış ve polimerlerin DDA ve molekül ağırlıklarını sırasıyla potansiyometrik titrasyon ve kapiler viskozite ile tayin etmişlerdir. Her iki çalışmada da elde edilen bulgular DDA ve molekül ağırlığı arttıkça enzimatik parçalanmanın keskin bir şekilde düştüğünü göstermiştir [177].

Kitosanın gen terapisinde kullanılmasının en önemli sebeplerinden bir tanesi PEI’ye göre toksisitesinin çok düşük olmasıdır. Kitosan yüksek biyoyumluluğa sahiptir, immunojenik değildir ve yapılan çalışmalar sitotoksitesinin olmadığını göstermektedir [178]. Geçmişte, kitosanın biyoyumluluğu hakkında miyokard, nöron, endotel ve epitel hücreleri, fibroblastlar, hepatositler kullanılarak birçok çalışma yapılmış ve toksik olmadığı kanıtlanmıştır [179–181]. Biyoyumluluk polimerlerin molekül ağırlıkları ve katyonik yük yoğunlukları ile değişirken kitosan özelinde deasetilasyon derecesi de toksisiteyi etkilemektedir. Yapılan araştırmalar sonucu, DDA arttıkça biyoyumluluğun yükseldiği, inflamatuvar etkilerin azaldığı rapor edilmiştir [179].

Antibakteriyel özellik gösteren polimerler günümüzde üzerinde çok sık araştırma yapılan malzemelerdir ve kitosan da bu polimerlerden bir tanesidir. Literatürde, kitosanın iki farklı mekanizma ile antibakteriyel etki gösterdiği ifade edilmektedir. Bunlardan ilki, kitosanın katyonik yüklerinin, mikroorganizmaların hücre zarındaki negatif yüklü proteinleri ve lipopolisakkaritleri ile etkileşime girmesi ve bunun sonucunda hücre zarının geçirgenliğinin değişmesidir. Bu durumun sonucunda, hücre içi parçalar dışarıya doğru sızmaya başlar ve hücre ölür. İkinci mekanizma da ise, kitosan bakterilerin çekirdeklerine difüzlenerak RNA’larını ve buna bağlı protein sentezlerini inhibe edebilir ve hücrenin ölümünü sağlar. Tıpkı diğer özelliklerde olduğu gibi molekül ağırlığı ve deasetilasyon derecesi kitosanın antibakteriyel davranışı etkilemektedir. Genel olarak DDA ve molekül ağırlığı arttıkça hücre zarına bağlanma, geçirgenlik ve çekirdeğe girme yüzdesi de doğru orantılı olarak artar. Örneğin, Kim ve çalışma arkadaşları kuvaternize grupların ve deasetilasyon

derecesinin kitosanın antibakteriyel özelliklerine etkisini incelemek amacıyla %75–85 DDA’ye ve 1747,5 g/mol molekül ağırlığına sahip kitosanı, kuvaternize etmiş ve deasetilasyon derecesini %100’e çıkarmışlardır. *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* ve *Aspergillus flavus* bakteri ve mantarları üzerinde yapılan çalışma sonucunda hem kuvaternize edilmiş hem de %100 deasetile edilmiş kitosanın diğer eşleniklerine göre daha yüksek antibakteriyel ve antifungal davranışa ve düşük toksisiteye sahip olduğu rapor edilmiştir [182].

Kitosanın deasetilasyon derecesi arttıkça, birincil amin gruplarının sayısı ve buna bağlı olarak protonlanma yüzdesi artmaktadır. Bu durum, kitinin α -heliks kararlılığını bozar ve çözücü moleküllerinin polimer ile daha fazla etkileşmesini ve daha yüksek katyonik etkileşimi sağlar. Eğer, kitosanın deasetilasyon derecesi %40’ın altındaysa veya çok yüksek molekül ağırlığına sahip ise molekül içi hidrojen bağları ve metil gruplarının hidrofobik etkileşimleri polimerin su/sulu asidik çözelti içerisinde çözünmesini engeller. DDA arttıkça, kitinin sterik etkisi baskılandığı ve molekül içi etkileşimler azaldığı için kitosan düşük pH’larda hazırlanan sulu çözeltiler içerisinde çözünebilir hale gelir [183, 184].

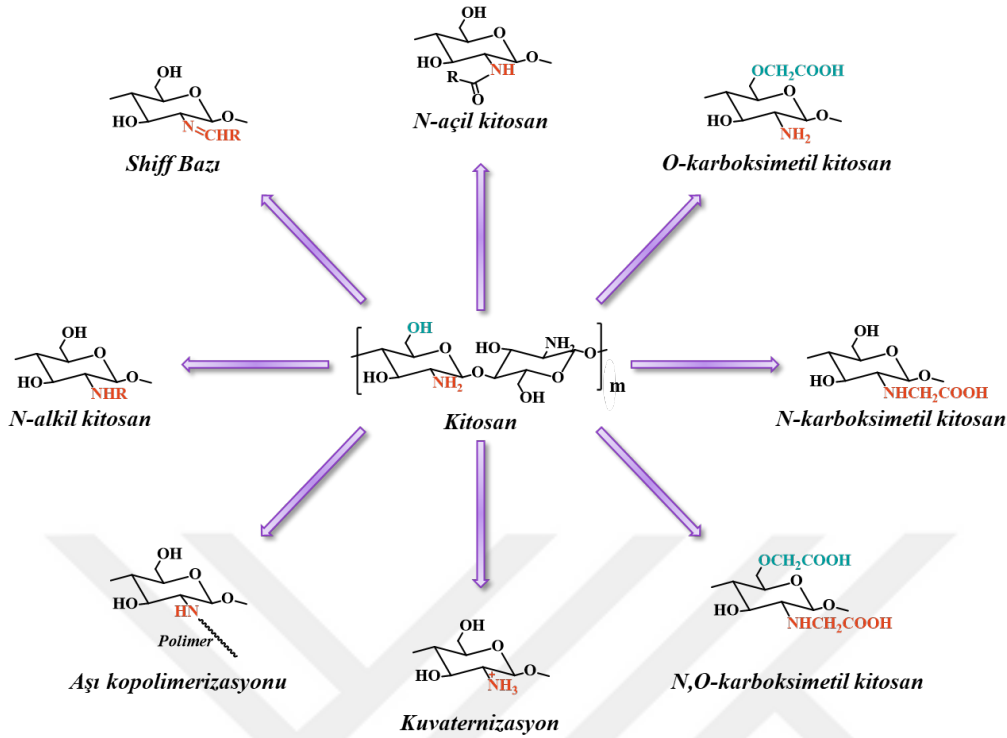
Kitosanın deasetilasyon derecesi ve molekül ağırlığı yukarıdaki özelliklerde de görüldüğü gibi polimer zincirinin katyonik yükünü ve hidrofobik etkileşimlerinin oranını değiştirdiği için viral olmayan vektör tasarlanmasında da önemli parametrelerdir. Yıllar içerisinde, kitosan tabanlı taşıyıcıların geliştirilmesinde DDA ve molekül ağırlığının etkisini inceleyen çeşitli araştırmalar yapılmış ve transfeksiyon etkinliğinin molekül ağırlığı ile ters, DDA ile doğru orantılı şekilde değiştiği bulgulanmıştır [184, 185]. Örneğin, Aranda-Barradas ve çalışma arkadaşları DDA $\geq$ 85%, molekül ağırlığı 20,6 ve 57,5 kDa olan kitosanları ve geliştirilmiş yeşil floresan protein plasmid (pEGFP-N1) kullanarak farklı N/P oranlarında (8-43 arası) polileksler sentezlemiş ve HeLa hücrelerindeki transfeksiyon etkinliklerini incelemişlerdir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, en düşük molekül ağırlığı ve N/P oranına sahip polilekslerin, GFP ekspresyonlarının diğer yapılara kıyasla daha yüksek olduğu rapor edilmiştir [186].

Kitosan tüm bu özellikleri ile gen terapisinde yüksek potansiyele sahip olmasına rağmen sadece pH <5,5 olan sulu asidik çözeltilerde çözünebildiği için tampon kapasitesi ve dolayısıyla transfeksiyon etkinliği en sık kullanılan sentetik vektörlerden biri olan PEI’ye göre oldukça düşüktür [187–189]. Öte yandan, daha önce de

belirtildiği gibi PEI'nin katyonik yapısı ve suda çözünürlüğünün yüksek olması kitosana göre daha yüksek transfeksiyon etkinliğine sahip olmasını sağlasa da toksik özelliği ve biyobozunur olmaması önemli sakıncalarındandır [190–192]. Bu sebeple, doğal bir polimer olan kitosanın ilaç/gen taşıma alanlarındaki kullanımını genişletmek için polietilen imin kadar etkili ancak o kadar toksik olmayan, biyobozunur ve/veya biyoyumlu sentetik katyonik monomer/polimerler ile modifikasyonu üzerine yoğun araştırmalar yapılmakta ve elde edilen bulgular da katyonik monomerler/polimerler ile modifiye edilen kitosanların transfeksiyon etkinliklerinin yüksek olduğunu göstermektedir [18, 157, 193, 194]. Ancak, bu tür modifikasyonlarda kullanılan monomer/polimerler kitosan taşıyıcı sisteminin toksisitesini ve sitotoksitesini arttırabilmektedir. Bu nedenle, yük yoğunluğu/etkinliği, sitotoksosite ve vücut tarafından tolere, yani telafi edilebilirliği arasında doğru dengeyi bulabilmek için katyonik polimerlerin yapısının optimize edilmesi zorlu bir görev olarak ele alınabilir [195].

2.2.2 Kitosanın modifikasyonu ve aşı (graft) polimerleri

Kitosan sahip olduğu düşük bağışıklık sistemi tepkileri, biyoyumluluk, biyobozunurluk gibi avantajlarının yanı sıra değişik fonksiyonel gruplarla modifiye edilerek farklı biyolojik ve fizikokimyasal özellikler kazanabildiği için biyomedikal alanlarda sıklıkla kullanılmaktadır [196]. Gen terapisi özelinde, kitosanın hidrofobik modifikasyonları polipleks kararlılığını, nükleik asitlerin korunmasını ve hücre alımı, hidrofilik modifikasyonlar ise çözünürlüğü arttırmaktadır [197]. Kitosanın C-6 karbonlarına bağlı -OH ve C-2 karbonuna bağlı -NH₂ grupları, asetilasyon, alkilasyon, kuvaternizasyon, açılasyon ve aşı kopolimerizasyonu gibi birçok yöntemle fonksiyonlandırılabilir (Şekil 2.13) [157, 163, 198–200]. Öte yandan, C3-OH grubu sterik etkilerden dolayı modifiye edilmeye uygun değildir. C2-NH₂ grubunun yüksek reaktiviteye sahip olduğundan, amino gruplarının fonksiyonlandırılması (özellikle aşı reaksiyonları) en popüler modifikasyon türlerinden bir tanesidir. Amino grupları nükleofil olarak hidroksil grubuna göre daha reaktifken, her iki grupta açıl klorür, asit, alkan gibi reaktantlar ile kolaylıkla elektrofilik reaksiyona girebilmektedir. Bu sayede, kitosanın hem çözünürlük problemi aşılabilir hem de hücre alımın geliştirilmesi, katyonik karakterinin arttırılması gibi transfeksiyon etkinliğini etkileyen faktörlerin iyileştirilmesi sağlanabilmektedir [199, 201].



Şekil 2.13 : Kitosana farklı yöntemlerle modifikasyonu.

Karboksümetil kitosan (CMCs), çözünürlük sorununu aşmak için kullanılan en popüler kitosan türevlerinden bir tanesidir. Monokarboksil asitin farklı koşullar altında reaksiyonları sonucunda, kitosanın amino veya hidroksil gruplarının karboksümetilasyonu gerçekleştirilerek farklı özelliklere sahip N-karboksümetil kitosan ve O-karboksümetil kitosan sentezlenebilmektedir. Amino gruplarının karboksümetilasyonu sonucu, zincirleri üzerinde hem pozitif hem negatif gruplar taşıyan pH duyarlı polimerler sentezlenebilir ve karboksil taşıyan grupların substitisyon derecesine bağlı olarak polimerlerin pH'a karşı davranışı değiştirilebilmektedir. Ayrıca N-karboksümetil kitosan, yüksek viskozite ve hidrodinamik hacime sahip olduğu için hidrojel sentezlerinde de kullanılabilir. N-karboksümetil kitosan ile süper porlu hidrojel üretilerek protein salımında kullanılmaktadır. Öte yandan, O-karboksümetil kitosan yüksek antibakteriyel özelliğe sahiptir [157, 163]. CMCs, alkilasyon ve açılasyon gibi yöntemler veya inorganik malzemeler ile tekrardan modifiye edilebilmektedir [202]. Örneğin, O-karboksümetil kitosanın organo silika ile hibritleri oluşturularak yapılan çalışmalar, bu nanoparçacıkların DNA'yı DNAaz 1 enzimine karşı koruduğu ve HeLa hücrelerindeki transfeksiyon etkinliğinin yüksek olduğunu göstermiştir [203].

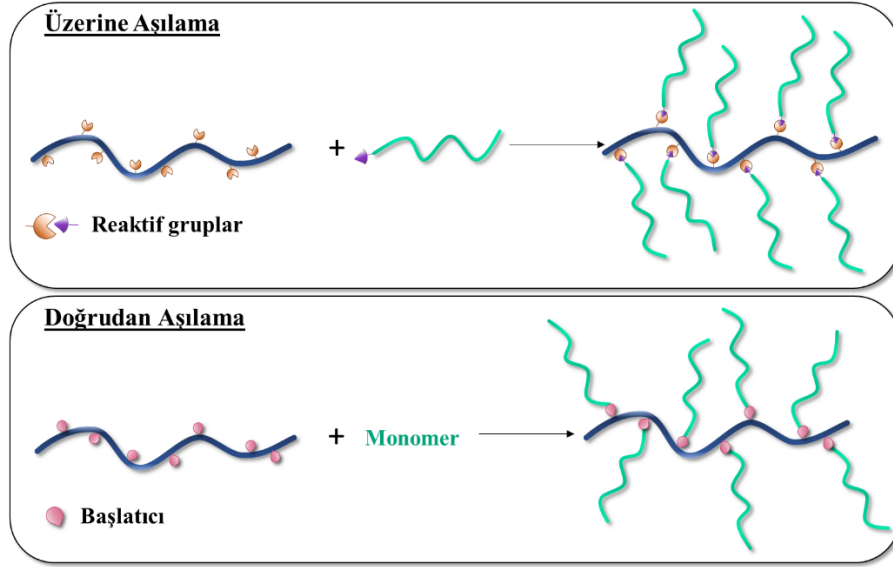
Bir diğ er popüler kitosan türevidir ise N-metilasyon ile amino grubuna trimetil grubu takılan ve kuvaternize edilen N,N,N trimetil kitosan klor r d r (TMCs). Kuvaternizasyon yöntemi sonucu kitosanın farklı tuzları sentezlenebilmektedir ve bu türevler protein ve peptit gibi biyomakromoleküllerin absorpsiyonunu arttırmaktadır. Ancak, kitosan tuzları fizyolojik koşullarda (pH 7.4) pKa'larına yakın değerlerde olmadıkları için yeterince     nememektedirler ve bu durum kullanımlarını kısıtlamaktadır. TMCs, kuvaternize edilmiş kitosanlar içerisinde geniş bir pH aralığında     nebilir, su içerisinde       rl ğ  en yüksek olan kitosan türevidir ve çeşitli ilaçların tutulumunu artırır. Ayrıca TMCs kuvaternizasyon derecesine göre yüksek katyonik yüke sahip olduğundan mukozanın negatif yüklü yüzeyine daha çok tutunabilir, nükleik asitlerle daha çok elektrostatik etkileşim kurabilir ve bu sebeple hem mukoza yapışma özelliği hem de DNA/RNA bağlama kapasitesi modifiye edilmemiş kitosana göre yüksektir [198]. Thonou ve çalışma arkadaşlarının düşük molekül ağırlıklı TMCs (polimerizasyon derecesi <20) kullanarak epitel hücreleri üzerine yaptıkları gen terapisi araştırmaları sonucunda, TMC'nin viral olmayan vektör olarak yüksek potansiyele sahip olduğunu bulgulamı lardır [204, 205]. Zhao ve çalışma arkadaşları ise TMC-sistein konėugasyonları sentezleyerek pEGFP proteinin kodlarına sahip pDNA ile poliplekslerler olu turmu  ve HEK293 hücrelerindeki transfeksiyon etkinliği incelemişlerdir. Elde edilen bulgular ile TMC-sistein konėugasyonunun ticari taşıyıcı olan Lipofektamin 2000'den daha yüksek DNA salımı ve transfeksiyon etkinliği gösterdiği rapor edilmiştir [206]. Öte yandan, TMC katyonik karakteri sebebiyle sitotoksiktir ve bu sorunu a mak için çeşitli yöntemlerle modifiye edilmektedir. Örneğin, Mao ve çalışma arkadaşları ve TMCs'nin  zerine RAFT polimerizasyonu ile sentezledikleri PNIPAAm homopolimerlerini a ılayarak hem sıcaklık duyarlı hem düşük sitotoksisiteye sahip gen taşıyıcı sistem geli tirmi lerdir [207]. Ren ve çalışma arkadaşları ise P(EGMA-*ko*-DMAEMA) kopolimerlerini RAFT ile sentezleyerek TMCs'a a ılamı lar ve yaptıkları biyolojik testler sonucunda TMC-g-P(EGMA-*ko*-DMAEMA) a ı kopolimerlerinin TMCs'ye kıyasla daha yüksek tampon kapasitesine ve transfeksiyon etkinliğine sahip olduğu ifade etmişlerdir [208].

N-açılasyon yöntemiyle farklı biyomedikal alanlarda kullanılabilecek hidrofobik veya yüksek oranda katyonik kitosanlar sentezlenebilmektedir. Yüksek oranda katyonik kitosan türevleri, kitosanın biyoadezyonunu, transfeksiyon etkinliğini, anti tümör,

antimikrobiyal ve anti-inflamatuar gibi biyolojik özelliklerini geliştirebilmektedir. Öte yandan, N-dietilaminoetil, N-dimetilaminoetil ve N-dimetilaminoizopropil gibi diallil amino alkil klörürler ile sentezlenen kitosan türevleri, sahip oldukları yüksek katyonik yükten dolayı sitotoksik etki göstermektedir. Bu sebeple, bu tarz kitosanolara ayrıca modifikasyon yapılmaktadır [209]. Örneğin, Liang ve çalışma arkadaşları CMCs'a oktadesil gruplara takarak sentezledikleri polimerlerin (OQCMC) sitotoksitelerini ve ilaç salım etkinliklerini sadece kuvaternize edilmiş kitosan (QC) ile kıyaslamış ve OQCMC polimerlerinin ilaç salım kapasitelerinin daha yüksek, sitotoksitelerinin daha düşük olduğunu rapor etmişlerdir [210]. Anhidrit ve uzun zincirli açıl klorürler ile sentezlenen hidrofobik kitosanolar ise kendiliğinden düzenlenme (self-assembly) sayesinde miseller oluşturabilmekte ve bu sayede ilaç salımda taşıyıcı olarak kullanılmaktadırlar ancak yüksek oranda hidrofobik özellikte toksik etkiye sebep olabilmektedir [199].

Kitosanın tüm modifikasyon yöntemleri içerisinde en yaygın olanı aşıl kopolimerizasyonudur. Daha önce de ifade edildiği gibi TMCs gibi foksionlandırılan kitosanoların özelliklerini iyileştirmek için de aşıl kopolimerizasyonu ile ikincil bir modifikasyon yapılmaktadır. Kitosana özellikle sentetik polimerlerin aşılınması, hem ucuz ve çevre dostu bir sentez yöntemi olduğu hem de toksisiteyi düşürdüğü için sıklıkla tercih edilen bir modifikasyon türüdür [209, 211].

Aşıl kopolimerleri, monomerlerin var olan bir polimerin üzerine (zincir uçları haricinde bir noktaya) kovalent bağlarla bağlanarak polimerleşmesi ile elde edilen dallanmış polimerlerdir. Hem ana zincir hem de dallar homopolimer veya kopolimerlerden oluşabilmektedir. Aşıl kopolimerlerinin üzerindeki fonksiyonel grupların sayısı ve türü arttıkça farklı uygulamalar için daha ilgi çekici hale gelmektedir. Doğrudan (grafting from) ve üzerine (grafting to) aşılama olarak iki farklı aşıl kopolimerizasyonu mevcuttur (Şekil 2.14). Doğrudan aşılama ana polimer zincirinde aktif noktalar oluşur ve dallanma burada başlarken, üzerine aşılama dallar başka bir ortamda monomerlerin polimerleştirilmesi ile sentezlenir, ardından ana polimere nükleofilik noktalarından aşılır. Kitosan gibi polisakkaritlerin modifikasyonunda genellikle doğrudan aşılama yöntemi kullanılmaktadır [212].



Şekil 2.14 : Aşı polimerizasyonunda üzerine ve doğrudan aşılama mekanizmaları

Aşı polimerizasyonu ile oluşturulan dalların kitosanın sudaki çözünürlüğünün yanı sıra antibakteriyel ve antioksidan özelliklerini de arttırabildiği belirlenmiştir. Ayrıca kitosanın kompleks oluşturma, adsorpsiyon gibi özelliklerini arttırmak için de sıklıkla aşı polimerizasyonu kullanılmaktadır [213, 214]. Örneğin, kitosanın katyonik monomerler/polimerlerle modifikasyonu sonucunda yapıdaki pozitif yük taşıyan gruplar arttığından DNA'ya bağlanma etkinliği yükselmektedir. Daha katyonik yapıya sahip kitosanın, hücre içindeki endozomal kaçış ve transfeksiyon etkinliği artmaktadır [215, 216]. Ayrıca yapıdaki katyonik grupların artması malzemenin antibakteriyel özelliklerini de kuvvetlendirmektedir. Fakat, bu tip modifikasyonlarda kullanılan monomerler taşıyıcı sistemin toksisitesini ve sitotoksitesini arttırabilmektedir. Örneğin, PEI katyonik yapısı ve suda çözünürlüğünün yüksek olması sayesinde transfeksiyon etkinliğini arttırırsa da, oldukça toksik bir malzeme olduğu için Cs-g-PEI aşı kopolimerleri kitosana kıyasla daha sitotoksiktir [193]. Bu sebeple, kitosanın kimyasal modifikasyonlarında polietilen imin kadar etkili, toksik olmayan, biyobozunur, sentetik katyonik monomer/polimerlerin kullanımı üzerine araştırmalar yapılmaktadır [18].

Kitosana aşılacak polimerin türü, konsantrasyonu, reaksiyon süresi, sıcaklık başlatıcı türü ve miktarı gibi parametreler değiştirilerek farklı aşılama yüzdesine (grafting percentage), aşılama verimine (grafting yield), ana ve yan zincir uzunluğuna sahip aşı kopolimerleri sentezlenmektedir. Bu sayede, özgün bir hastalık, hücre veya

doku/organ için vektör olarak kullanılabilen bir çok farklı fizikokimyasal ve biyolojik özelliğe sahip kitosan aşısı kopolimerleri tasarlanabilmektedir.

Kitosanın vinil monomerleri ile aşısı kopolimerizasyonu kitosanın biyobozunur doğasını bozmadan yapıya yeni özellikler kazandırarak biyokimyasal uygulamalarda istenilen karaktere sahip malzemeler geliştirmek için gelecek vadeden bir yöntemdir. Özellikle akrilat ve akrilamit türevleri ile modifiye edilen kitosanın kanser ve gen terapisi çalışmalarında önemli bir yeri bulunmaktadır [155, 217–220]. Örneğin, Qian ve çalışma arkadaşları, meme kanser hücrelerinde kontrollü ilaç salımı için K237-peptidi ile fonksiyonlandırılmış kitosan-g-poli(N-izopropilakrilamit) nano parçacıklarını (K237-Cs-g-PNIPAAm) sentezlemişlerdir. Ardından, K237-Cs-g-PNIPAAm nano parçacıklarına paksitaksel yükleyerek hazırlanan malzemenin ilaç salımı, hücre içine alımı ve sitotoksitesi incelenmiş ve nanoparçacıkların hedefli kanser terapisinde büyük bir potansiyele sahip olduğunu rapor edilmiştir [155]. Bahramzadeh ve çalışma arkadaşları ise kitosanın biyolojik alanlarda kullanımını geliştirmek amacıyla serbest radikal polimerizasyonu ile Cs-g-(N-hidroksietilakrilamit) aşısı kopolimerlerini ve metilen bis akrilamit (BIS) çapraz bağlayıcı varlığında filmlerini sentezleyerek polimerlerin kan uyumluluklarını incelemişlerdir. Yapılan karakterizasyonlar ve *in vitro* testler sonucu polimerlerin kitosana göre daha yüksek çözünürlüğe ve yüksek kan uyumluluğuna sahip olduğu, ilaç salım ve doku mühendisliği gibi alanlarda kullanılabileceği rapor edilmiştir [219].

Kitosanın aşısı kopolimerizasyonu genellikle amonyum persülfat (APS), potasyum persülfat (KPS), serik amonyum nitrat (CAN), azobisisobutirilonitril (AIBN) ve ferrik amonyum sülfat (FAS) gibi başlatıcılar kullanılarak gerçekleştirilir. Ayrıca polimerizasyon γ -rasyasyonu ve enzimlerle de başlatılabilmektedir [221]. Tüm bu başlatıcı yöntemlerinin farklı avantajları ve dezavantajları bulunmakla beraber birbirlerine üstünlükleri yoktur. Uygulama alanına ve amaca göre farklı başlatıcılar kullanılabilir.

γ -rasyasyonu ile yapılan reaksiyonlarda herhangi bir çapraz bağlayıcı, katalizör veya sonuç ürününü saflaştırmak adına çözücü kullanılmadığı için “yeşil kimya” yöntemlerinden biri olarak gösterilmektedir. Kitosanın bu yöntemle genellikle vinil ve akrilat monomerleri kullanılarak aşısı kopolimerleri sentezlenmektedir [222–224]. Kumar ve çalışma arkadaşları, akrilik asit ve akrilonitril monomerleri ile mikrodalga kullanarak kitosan aşısı kopolimerlerini sentezlemiş ve çapraz bağlamışlardır. Hem aşısı

kopolimerlerin hem de hidrojenlerin antibakteriyel özelliklerinin yüksek olduğu rapor edilmiştir [225]. Fotobaşlatıcı ile çapraz bağlanma oldukça verimli olmasına rağmen, başlatıcı, üretilen ağ yapıda sitotoksositeye sebep olabileceğinden kullanım alanı kısıtlıdır.

Enzimler, sağlık açısından güvenli olmaları, reaktif bileşiklerden ileri gelen zararları engellemeleri ile polimer sentez ve modifikasyonunda kullanılan başlatıcılardan biridir. Ayrıca enzimlerin seçicilikleri yüksek olduğu için, bu yöntemde polimerlere koruma grubu takma/kaldırma adımlarına ihtiyaç duyulmayabilir, bu da kimyasal sarfiyatını engelleyerek çevre açısından fayda sağlar ve polimerlerin özellikleri daha hassas şekilde kontrol edilebilir [226, 227]. Örneğin, kitosanın enzimatik modifikasyonu sonucu yüksek pH duyarlılığına sahip, suda çözünürlüğü yüksek ve biyoyapışma özelliği geliştirilmiş polimerler elde edilebilmektedir [224].

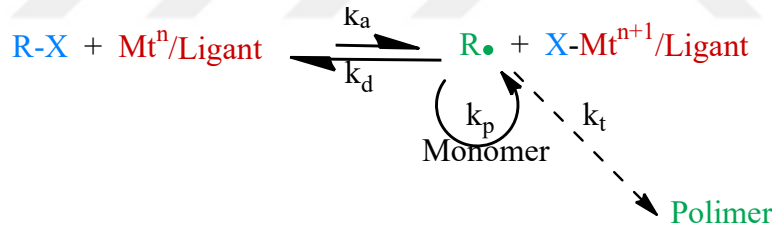
Her iki polimerizasyon yöntemi de büyük avantajlara sahip olsa da daha çeşitli aşı kopolimerler sentezlemek için en sık kullanılan yöntem radikal polimerizasyondur.

2.2.2.1 Radikal Polimerizasyonu

Literatürde, kontrollü ve serbest radikal polimerizasyonu ile birçok kitosan aşı kopolimeri mevcuttur. ATRP ve RAFT gibi kontrollü polimerizasyon yöntemlerinde aşılacak dalların uzunlukları kontrol edilebildiği için daha özgün polimerler sentezlemek mümkündür [155, 207, 208, 228]. Örneğin, Ping ve çalışma arkadaşları kitosanın transfeksiyon etkinliği arttırmak amacıyla ATRP yöntemiyle kitosan-aşı-PDMAEMA (PDCS) aşı polimerlerini sentezleyerek pDNA ile polipeksler oluşturmuşlardır. PDCS/pDNA polipekslerinin transfeksiyon etkinliklerini PDMAEMA'nın dal uzunluğu ile aşı polimerinin katyonik yüküne (azot/fosfat oranına) bağlı olarak incelenmiştir. Elde edilen bulgulardan aşı polimerlerinin zincir uzunluğu arttığında ve azot/fosfat (N/P) oranı 6'dan düşük veya yüksek olduğunda transfeksiyon etkinliğinin düştüğü rapor edilmiştir [16]. Mahmoodzadeh ve çalışma arkadaşları da, tümör dokularını hedefleyen, kan dolaşımında uzun süre kalabilen ve ilaç çözünürlüğü yüksek kitosan tabanlı nano taşıyıcı sistem tasarlamayı amaçlamış ve bu doğrultuda kuvaternize DMAEMA (DMAEMAQ) ve itakonik asit (IA) kullanarak RAFT polimerizasyonu yöntemi ile Cs-g-P(IA-ko-DMAEMAQ) aşı kopolimerlerini sentezlemişlerdir. Aşı kopolimerlerinden oluşan nano misellere MTX ilacını yüklendikten sonra taşıyıcıların, meme kanser hücreleri kullanılarak kan uyumluluğu

(hemoliz), sitotoksosite ve ilaç salım testleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, Cs-g-P(IA-*ko*-DMAEMAQ) nano misellerinin kanser terapisi için potansiyele sahip olduğu rapor edilmiştir [229].

Kitosanın kontrollü radikal polimerizasyonunda genel olarak ATRP yöntemi kullanılmaktadır. ATRP yönteminde alkil halojenür (RX) başlatıcıları ile beraber katalizör olarak Cu, Fe, Ru gibi geçiş metalleri kompleksleri ($Mt^m/Ligant$) kullanılmaktadır. Radikal oluşma mekanizmasında, alkil halojenürlerin katalizör ile aktive edilmesi sonucu R-X bağının homolitik olarak kırılır ve oluşan $\bullet X$ radikali, $Mt^m/Ligant$ kompleksine transfer olur. Bunun sonucunda, $Mt^m/Ligant$ yükseltgenerek $X-Mt^{m+1}/Ligant$ haline dönüşürken alkil halojenürden orataya çıkan $R\bullet$ serbest radikalleri monomere katılır ve $R-M\bullet$ radikali oluşturur. Bu şekilde, monomer birimleri birbirlerine bağlanmaya başlar ve sürecin devamında $X-Mt^{m+1}/Ligant$ kompleksi indirgenerek $\bullet X$ radikalini R-M radikaline transfer eder ve deaktivasyon gerçekleşir. Deaktive olmuş türler tekrardan katalizöre $\bullet X$ radikallerini transfer ederek aktive olabilir. Bu tersinir mekanizma, monomer tükenene kadar devam ettiğinden, polimerlerin zincirlerinin uzunluğu kontrol edilerek benzer molekül ağırlığında polimerler sentezlenebilmektedir (Şekil 2.15) [230, 231].



Şekil 2.15 : ATRP'nin reaksiyon mekanizması.

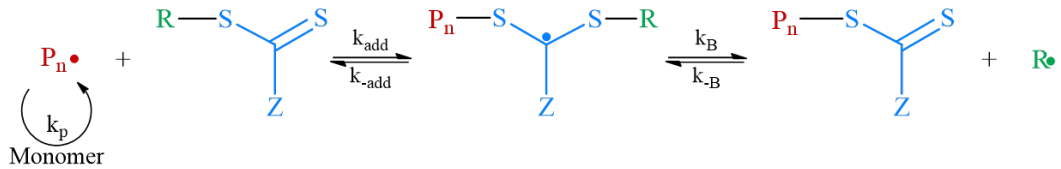
Bir diğer kontrollü polimerizasyon yöntemi olan RAFT'ta ise ATRP'deki katalizör yerine tiyokarboniltiyo fonksiyonel grubu bulunan zincir transfer ajanları (CTA) kullanılır. Bu CTA'lar ($S=C(Z)S-R$) sayesinde düşük PDI'a sahip ve benzer molekül ağırlığında polimerler sentezlenebilmektedir. RAFT yönteminde polimerizasyon, geleneksel serbest radikal polimerizasyonunda olduğu gibi redoks veya termal bir başlatıcıdan (I_2), $I\bullet$ radikalleri oluşması ile başlar. Bu başlatıcı radikalleri monomere (M) atak eder ve monomerler büyüyerek oligomerik boyutta polimerik zincir radikallerini ($P_n\bullet$) oluşturur. Reaksiyonun ikinci basamağı olan tersinir zincir transferi/büyüme adımı ise uzayan polimer zinciri monomere uygun olarak seçilmiş RAFT ajanına ait tiyokarbonil ($C=S$) bağına atak ederek RAFT ajanına

bağlanır ($S=C(Z)S-P_n$) ve RAFT ajanına bağlı R grubunda $R^\bullet$ serbest radikalleri üretilir. Bu denge reaksiyonu sonucunda P_n polimer zinciri tekrar serbest kalıp uzamaya devam edebileceği gibi RAFT ajanına bağlı halde bulunan pasif polimer zincirine dönüşebilir. Burada, oluşan $R^\bullet$ radikalleri de monomere atak ederek farklı oligomerik polimer zincir radikalleri ($P_m^\bullet$) üretir (tekrar başlama basamağı). RAFT mekanizmasının en önemli basamağı zincir dengesi/büyüme adımıdır. Burada, uzamaya devam eden aktif polimer zinciri ($P_m^\bullet$) ile ucuna tiyokarboniltiyo grubu bağlanmış olan molekül ($S=C(Z)S-P_n$) arasında bir yer değiştirme reaksiyonu gerçekleşir ve hali hazırda CTA'a bağlı olan P_n polimeri radikal formunda serbest kalır. Son aşamada, oluşan radikalik polimer zincirleri birleşir ve sonlanma gerçekleşir (Şekil 2.16). RAFT polimerizasyonu aynı zincir uzunluğunda polimerler sentezlemek için yaygın bir yöntem olmasıyla beraber zincir transfer ajanları oldukça pahalıdır ve laboratuvar koşullarda sentezlenmeleri oldukça zordur. Bu durum, RAFT yönteminin kullanımını kısıtlamaktadır [232].

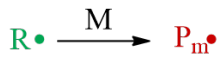
1. Başlama



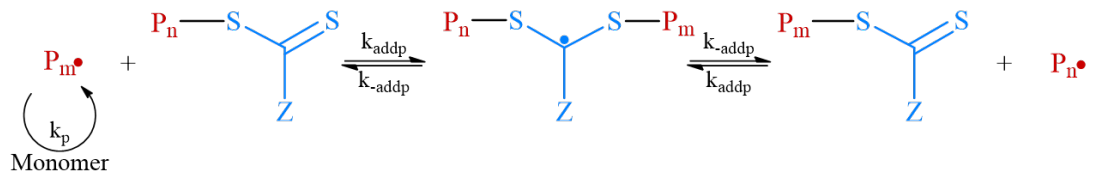
2. Tersinir Zincir Transferi/ büyüme



3. Yeniden Başlama



4. Zincir Dengesi/ büyüme



5. Sonlanma



Şekil 2.16 : RAFT polimerizasyonun reaksiyon mekanizması.

CAN, APS, KPS gibi başlatıcılar kullanılarak gerçekleştirilen serbest radikal polimerizasyonunun RAFT ve ATRP'ye kıyasla en büyük dezavantajı polimer zincirinin büyümesini (molekül ağırlığının artmasını) kontrol edilememesidir [233–235]. Öte yandan, ATRP'de Cu gibi katalizörlerin, RAFT'ta ise kükürt içerikli CTA kullanımı çevre ve insan sağlığı açısından sorun teşkil etmektedir. Serbest radikal polimerizasyonunda bu tür bileşenler bulunmadığından elde edilen polimerlerin toksisitesi daha düşüktür ve biyomedikal alanlarda kullanımları daha güvenlidir.

Serbest radikal polimerizasyonu ile aşı kopolimerleri sentezlenirken farklı türdeki başlatıcılar, değişik mekanizmalar ile kitosanın ana iskeleti üzerinde radikal oluşturur ve vinil monomerleri bu aktif bölgeye kovalent olarak bağlanır ve polimerizasyon başlar [233]. Mino ve Kaizerman'nın 1958 yılında CAN redoks başlatıcısı kullanarak gerçekleştirdikleri aşı kopolimerleri sentezi, vinil monomerlerinin serbest radikaller ile biyopolimerlere aşılması yaklaşımına ait ilk çalışmadır [236]. CAN, başta kitosan olmak üzere birçok biyopolimerin aşı kopolimerinin sentezinde kullanılan popüler başlatıcılardan bir tanesidir [237–239]. Örneğin, Pati ve çalışma arkadaşları CAN başlatıcısı varlığında Cs-g-akrilik asit aşı kopolimerleri sentezleyerek kitosanın antibakteriyel ve antifungal özelliklerini geliştirmeyi hedeflemişlerdir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, akrilik asitin CAN varlığında kitosana aşılabilirdiği ve aşı kopolimerlerinin yüksek antibakteriyel ve antifungal özellik gösterdiği rapor edilmiştir [240].

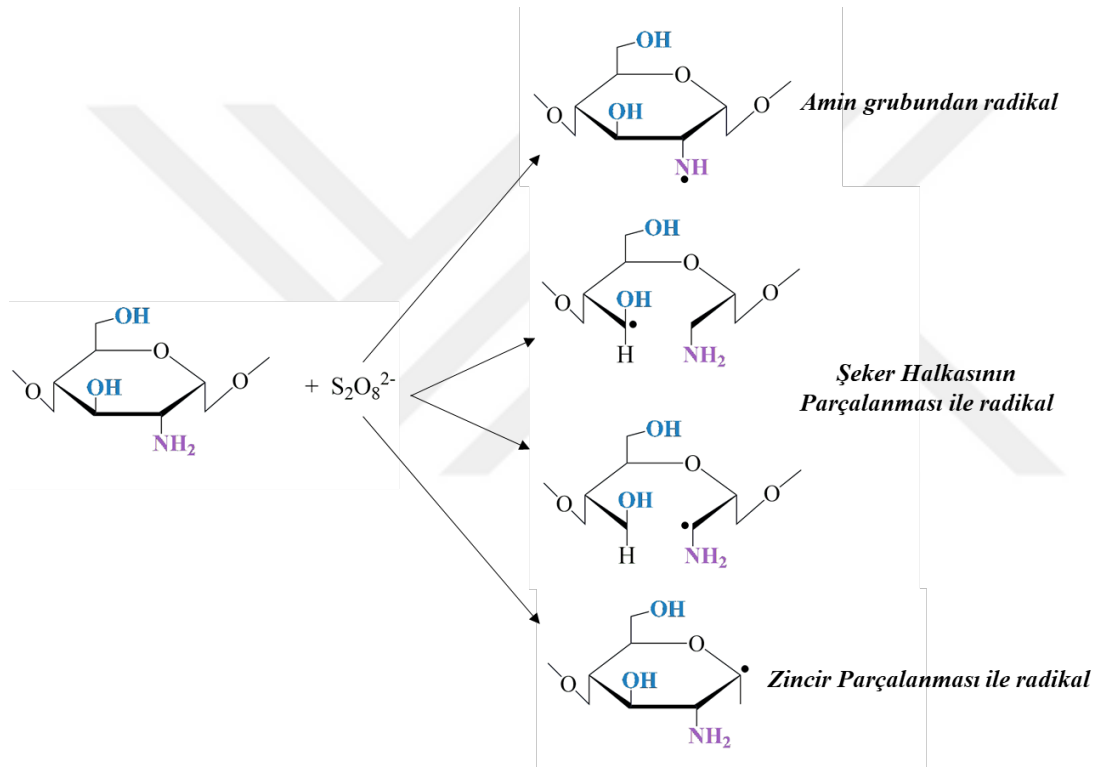
Kitosanın aşı polimerlerinin sentezinde KPS ve APS en sık kullanılan termal başlatıcılar olarak ifade edilmektedir. Uygun başlatıcı konsantrasyonu ile yeterli oranda monomer/polimerin ana zincir üzerine aşılmasıyla etkinliği yüksek polimerler sentezlenebilmektedir [221]. Kitosan aşı kopolimerleri persülfat başlatıcıları ile basit ve yüksek verimle sentezlenebildiğinden, gen terapisi başta olmak üzere birçok biyomedikal alanda kullanılan bir yöntemdir [241–244]. Ziminska ve çalışma arkadaşları, sıcaklığa duyarlı ve yüksek gen salım etkinliğine sahip taşıyıcılar tasarlamak için APS başlatıcısı ve farklı Cs konsantrasyonları kullanarak Cs-g-PNIPAAm aşı kopolimerlerini sentezlemiş ve bu aşı kopolimerlerinin genipin ile çapraz bağlayarak elde ettikleri hidrojenlerin yapısal karakterizasyonlar ile fiziksel özelliklerini incelemişlerdir. Bu adımın ardından, hidrojenlerin RALA (amfifilik 30-mer uzunluğunda protein) ve pEGFP proteinleri ile komplekslerini oluşturmuşlar ve hem boyut ve yüzey yüklerini hem de hücre kültürü testlerini gerçekleştirmişlerdir.

Elde edilen bulgular, serbest radikal polimerizasyonu ile kararlı, yüksek verimli ve sıcaklığa duyarlı Cs-g-PNIPAAm aşI kopolimerlerinin sentezlendiğı ve polimerin içerisindeki kitosan yüzdesine bağılı olarak hidrojellerin mekanik özelliklerinin, şişme ve degradasyon derecesi ile protein salım etkinliğinin değıştiğini göstermiştir. Ayrıca hidrojellerin fare fibroblast (NCTC-929) hücrelerine RALA/pEGFP proteinlerini transfeksiyonunu sağlayabildiğı ve uzun süre salım yapabildiğı ifade edilmiştir [245].

Hanna ve çalışma arkadaşları, kanser ilaçları için kontrollü salım yapabilecek taşıyıcı geliştirmek amacıyla poli(3-hidroksi bütirat)/kitosan-g-poliakrilik asit aşI kopolimerlerini (PHB-Cs-g-PAA) KPS termal başlatıcısı ile sentezlemiş ve kütlece farklı oranlarda sodyum hyaluronat ile konjuge etmişlerdir. MTX kanser ilacı yükledikleri komplekslerin Caco-2 hücrelerindeki ilaç salım ve sitotoksite çalışmaları sonucunda, PHB-Cs-g-PAA/NaHA konjugasyonlarının pH 7.4 PBS koşullarında, içerisine yüklenen MTX'ın %98,6'sını salabildiğı, ilaç yüklenmemiş polimerin toksik etki göstermediğı ancak MTX yüklü konjugasyonların apoptotik etkiye sahip olduğı yani PHB-Cs-g-PAA/NaHA konjugasyonlarının kanser terapisi için güçlü ve kontrollü bir taşıyıcı olabileceğı rapor edilmiştir [246].

Polimer zincirine aşılama -OH, -NH₂ gibi reaktif fonsiyonel gruplar üzerinde gerçekleşir. Kitosan üzerine vinil monomerlerinin persülfat başlatıcıları ile aşılmasının da genel olarak birincil amin grubu üzerinden yürüdüğü ifade edilmektedir [211, 247, 248]. Polimer çözeltisine eklenen persülfat başlatıcısı öncelikle ayrışarak olarak SO₄•⁻ radikali oluşturur. Ayrıca SO₄•⁻ radikali su ile reaksiyona girerek •OH radikalleri de üretebilmektedir. Ardından, bu radikaller kitosanın birincil amin gruplarına atak ederek •NH makro başlatıcılarının oluşmasını sağlar ve bu gruplar vinil monomerleri ile reaksiyona girerek polimerizasyonu başlatır [249]. Kitosanın aşI kopolimerizasyonu için amin grubu üzerinden dalların büyümesi genel mekanizma olarak ifade edilse de yapılan çalışmalar persülfat başlatıcıları varlığında kitosanın farklı noktalarında radikaller oluştuğunu göstermiştir. SO₄•⁻ ve •OH radikalleri birincil amin grubu yerine kitosanın C-2 ve C-3 karbonlarına atak ederek şeker halkasının parçalanmasına sebep olur ve bu noktalardan makro başlatıcı oluşur [221, 250]. Örneğin, Najjar ve çalışma arkadaşları 2-akriloamido-3-metilpropansülfonik asit (AMPS) monomeri ve Cs polimerini kullanarak KPS başlatıcı varlığında sentezledikleri Cs-g-PAMPS aşI kopolimerlerinin aşılama yüzdesi ve verimlerini monomer/polimer konsantrasyonuna, reaksiyon süresi ve sıcaklığına bağılı

olarak incelemiş ve çalışma içerisinde AMPS'nin kitosanın C-2 ve C-3 karbonları üzerine aşılandığını ifade etmişlerdir [251]. Kumar ve çalışma arkadaşları ise doku mühendisliğinde kullanmak için Cs-g-PAAm aşısı kopolimerlerini sentezlemiş ve KPS'in hem kitosan hem de PAAm'in moleküler degradasyonu üzerine etkisini incelemişlerdir. Bu çalışmada, şeker halkasının parçalanmasının yanı sıra, kitosanın eterik bağlarının kırıldığı ve depolimerizasyona uğradığı (zincirlerin parçalandığı) da ifade edilmiştir [250]. Yani, persülfat başlatıcılar varlığında gerçekleşen aşısı kopolimerizasyonunda dört farklı noktadan radikal üretilmektedir ve radikalın oluşacağı nokta kontrol edilememektedir (Şekil 2.17).

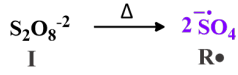


Şekil 2.17 : Kitosanın radikal oluşum noktaları.

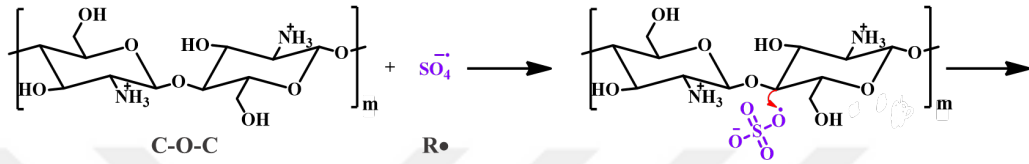
Zincir parçalanması diğer üç mekanizmadan daha farklıdır çünkü bu koşullar da kitosanın molekül ağırlığı değişmektedir. Literatürde kitosanın persülfat başlatıcılar ile sentezlenen aşısı polimerleri hakkında yapılan çalışmalarda da başlatıcı konsantrasyonunun sadece polimerizasyon etkinliğini değil kitosanın molekül ağırlığını da keskin bir şekilde değiştirdiği ifade edilmektedir [252–254]. Don ve çalışma arkadaşları kitosanın KPS ile indirgenmesi üzerine yaptıkları çalışmada, KPS'in termal ayrışması ile elde edilen sülfat radikallerinin ($R^\bullet$) kitosanın katyonik amino grupları ile etkileştiğini ve bu sayede amino grubunun yakınında bulunan C-4 karbonuna atak ederek radikalini aktardığı ve C-4 karbonun üzerindeki radikalinde

C-O-C bağının kırılmasına ve kitosanın parçalanmasına sebep olduğu rapor edilmektedir. (Şekil 2.18) [255]. Bu durumda, persülfat başlatıcıları sadece aşı kopolimeri sentezlenmesine olanak sağlamaz, kitosanların depolimerizasyonunda da sebep olduğundan eter bağları üzerinde oluşan radikaller üzerinden blok polimerler de sentezlenebilmektedir.

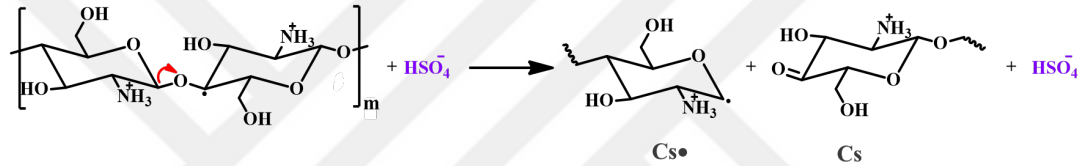
(1) KPS'in termal parçalanması



(2) Persülfat iyonlarının radikalini C-4 karbonuna aktarması



(3) C-O-C bağı üzerinden zincir kırılması

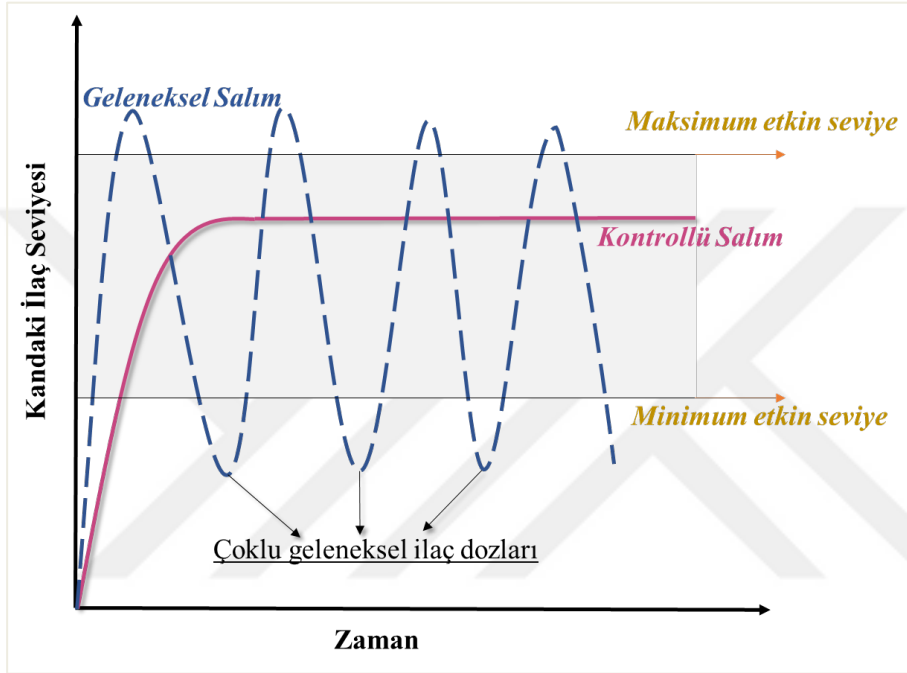


Şekil 2.18 : Kitosanın eter bağının kırılması ve zincir parçalanması mekanizması.

2.3 İlaç Taşıma/Salım Sistemleri

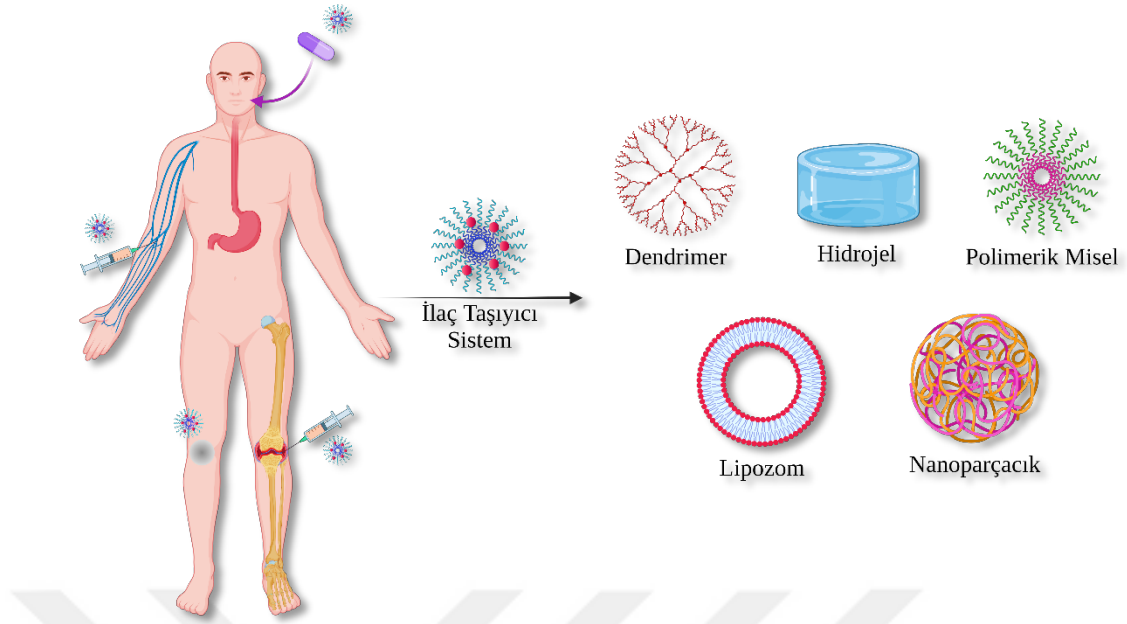
İnsanlık tarihi boyunca bilim insanlarının ilk önceliği, kişilerin yaşam kalitesini azaltan veya ölümüne sebep olan hastalıkları tedavi etmek ve insan ömrünü uzatacak yöntemleri araştırmak olmuştur. Yüzyıllar önce insanlar hastalıkları iyileştirmek için çeşitli bitkileri ve alternatif tıp yöntemlerini kullanırken ilaçların keşfi sonucunda daha etkin tedavi teknikleri ortaya çıkmış ve geleneksel ilaç salım sistemleri kullanılmaya başlanmıştır. Tablet, kapsül, kemoterapi gibi geleneksel ilaç salım sistemleri başlangıçta tedavi için yeterli olarak kabul edilse de zaman içerisinde bu ilaçların vücutta spesifik olmayan bir şekilde dağıldığı ve hem hastalıklı hücrelere hem de sağlıklı hücrelere zarar verdiği, uzun süreli kullanımları sonucu vücutta kimyasal maddelerin birikmesine sebep olduğu bulgulanmıştır [256, 257]. Şeker, tansiyon, tiroit, artrit, kanser gibi sistemik hastalıklar, ilaçların vücutta sabit konsantrasyonda ve uzun süre etkin kalması ile tedavi edilebildiği için hastalar ilaçları sık ve tekrarlanan dozlarda kullanmak zorundadır. Bu durum, vücudun etken maddelere karşı bağışıklık geliştirmesine ve ilacın tedavi edici özelliğinin azalmasına sebep olduğundan sistemik

hastalıklara sahip kişileri tedavi etmek amacıyla aynı etkiye sahip yeni ilaçların geliştirilmesi gerekmektedir. Öte yandan, yeni ilaç geliştirmek hem zaman hem de ekonomik açıdan dezavantajlıdır ve bu yüzden hazır olarak kullanılan ilaçların etkinliğini arttırmak için yeni yollar arayışına girilmiştir. Günümüzde, ilaçların hedeflenen bölgeye hızlı bir şekilde ulaşabileceği, kontrollü ve hedefe yönelik salım yapabilecek ilaç taşıma/salım sistemleri üzerine yoğun araştırmalar yapılmaktadır (Şekil 2.19) [1, 258].



Şekil 2.19 : Geleneksel ve kontrollü salım esnasında vücuttaki ilaç konsantrasyonunun zamana bağlı değişimi.

Kontrollü ve hedefe yönelik ilaç salım sistemlerinin en büyük avantajı, daha düşük dozlarda ilaç kullanılması ve sadece hastalıklı bölgede salım yapmasıdır. Bu sistemlerde, vücutta ilaç konsantrasyonu hızlı bir şekilde değişmez, daha düşük dozlarla yüksek tedavi etkinliği sağlanabilir ve vücuttaki yan etkiler azaltılabilir [258]. Belirli bir hastalığı tedavi etmek için hedef bölgeye/hücreye gidebilecek, yüksek ilaç tutulumuna sahip ve uzun süre salım yapabilecek özel taşıyıcı sistemler geliştirilmesi gerekmektedir. Bu sistemler için, genellikle hidrojel, nano-/mikro/parçacıklar, dendrimerler ve polimer tabanlı miseller gibi doğal ve sentetik polimer esaslı malzemeler kullanılmaktadır (Şekil 2.20). Ayrıca bu taşıyıcı sistemler, ilacın başka bir makro/mikro çevrede salınması engeller ve ilacı enzimatik degradasyondan korur [258, 259].

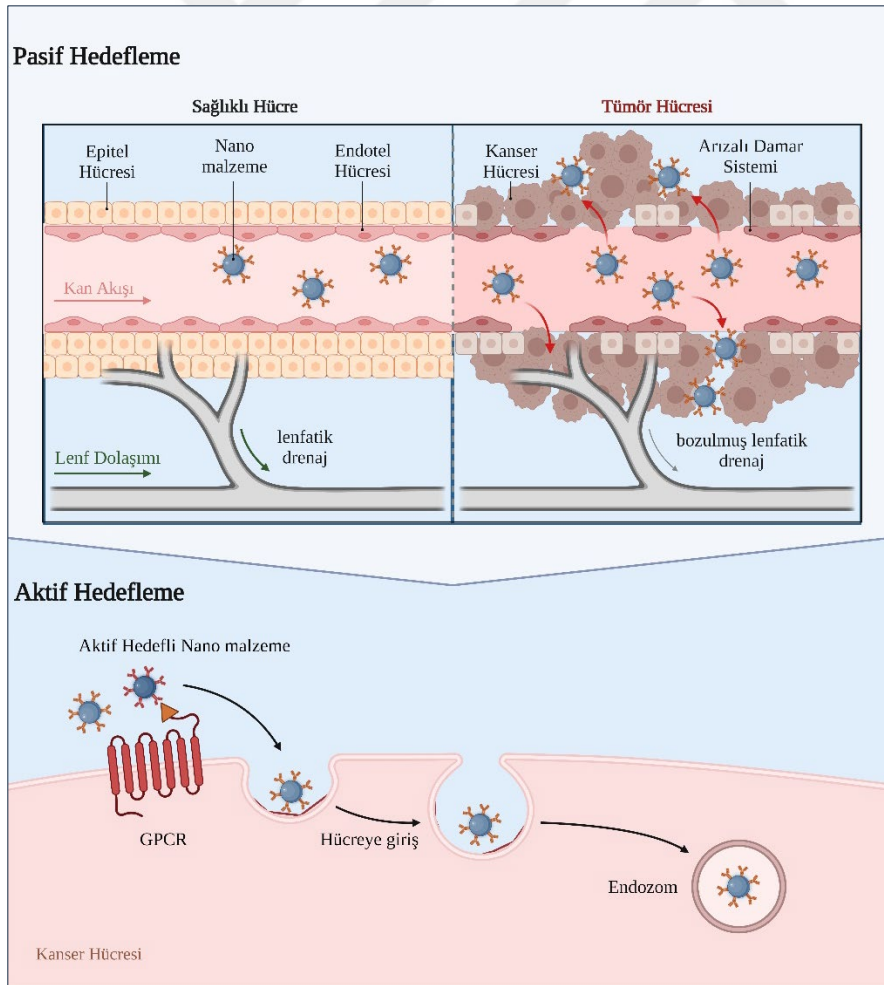


Şekil 2.20 : İlaç taşıyıcı olarak kullanılan malzemeler.

Kontrollü salım sistemlerinde ilaç taşıma süreci aktif ve pasif olmak üzere ikiye ayrılır. Aktif hedeflemede ilaç, istenen organ ya da dokuya glikoprotein, lipoprotein, karbonhidrat ve peptitler gibi özel ligantlar yardımıyla gönderilir. Örneğin, kanser hücrelerinde folik asit gibi reseptörler ve Bcl-2 gibi proteinler normal hücrelerden daha fazla üretilir. Bilim insanları kanser hücreleri ve tedavisi için yaptıkları araştırmalarda, bu reseptörlerin ve proteinlerin aktif olarak kanser hücrelerini hedeflemek için kullanılabileceğini keşfetmişlerdir. Milstein ve Köhler yaptıkları çalışmada, çeşitli sağlıklı veya kanserli hücrelerden antikor oluşumunu sağlayacak proteinleri ayırtmış ve kanser terapisi için tedavi edici ajan olarak kullanmışlardır. Günümüzde, FDA tarafından onaylı 20'den fazla antikor farklı kanser türlerinin tedavisinde kullanılmaktadır. Bu antikorlar kanserli bölgenin yüzeyinde bulunan proteinlere bağlanarak hücre büyümesini ve tümör mikro çevresindeki kan damarlarının oluşumunu engelleyip istemli hücre ölümünü (apoptoz) tetikler ve kanserli hücrelerin yok edilmesini sağlar. Öte yandan, biyolojik makromoleküllerden oluşan ligantların sentetik polimerler veya biyopolimerler ile biyokonjugasyonlarından elde edilen hidrojel, nanoparçacık veya lipozom gibi yapılar da aktif hedeflemede kullanılmaktadır. Örneğin, Kim ve çalışma arkadaşları süper paramanyetik özellikli manyetit nanopartiküller (MNP) içeren sıcaklığa duyarlı PNIPAAm hidrojellerini, heterojen (çökelme) polimerizasyon yöntemi sentezlemiş ve serviks HeLa hücre hattı için spesifik hedefleme ligandı olan folik asidi hidrojel yüzeyinde konjuge ederek

ligant-konjuge hibrit hidrojelere elde etmişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre doksorubisin (DOX) yüklü hidrojellerin hem manyetik alan hem de reseptör aracılı endositoz sayesinde HeLa hücrelerini hedeflediği, hücre içine girerek sitotoksiteyi düşürdüğü ve apoptozu sağladığı gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda geliştirilen çift hedefli biyokonjuge hibrit hidrojellerin, yeni nesil akıllı ilaç taşıma sistemleri için umut vadettiğini rapor edilmiştir [260, 261].

Pasif hedeflemede ise belirlenen dokuya özel olarak ulaşan bir ligant yoktur. Bu yöntemde, iltihaplı ya da tümörlü dokulardaki endotel dokuların (kan damarlarının içerisindeki hücre dizilimi ile oluşan epitel tabaka) daha geçirgen olmasından yararlanılır. Burada endotel doku daha geçirgen ve geniş olduğu için misel, lipozom, nanojel gibi boyutları 100-500 nm arasında değişen ilaç taşıyıcılar dokunun içerisinde birikebilir. Hastalıklı bölgenin mikro çevresindeki bu değişim, ilacın pasif olarak o bölgede hedeflenmesini sağlar. Pasif olarak ilaçların hastalıklı bölgeye ulaştırılmasına artırılmış geçirgenlik ve tutma etkisi (EPR) adı verilir (Şekil 2.21) [260–263].



Şekil 2.21 : Pasif ve aktif hedefleme ile taşıyıcının hücreye gönderilmesi.

İlaç, protein ve gen gibi terapötiklerin polimerlerle konjugasyonları olarak ifade edilen polimer terapötikleri hem aktif hem de pasif hedefleme de kullanılmaktadır. Bu konjugasyonlar biyolojik makromoleküllerin farmakokinetik özelliklerini geliştirirken, vücut içerisinde enzimler tarafından parçalanmasını engeller, immunojenik etkiyi azaltır, protein kararlılığını, düşük molekül ağırlığındaki ilaçların çözünürlüğünü arttırır. Polimer konjugasyonları genellikle antikanser terapötikleri için tasarlanırsa da romatoid artrit, diyabet, hepatit B ve C gibi hastalıkları hedefleyecek taşıyıcılar da geliştirilmektedir [264–266].

Matsumura ve Maeda, EPR etkisi üzerinden pasif tümör hedefleme olgusunu ortaya koymuş ve bu sayede antikanser terapötikleri için polimer konjugasyonların kullanılmasını yaygınlaştırmıştır [267]. Ardından yapılan çalışmalar tümör hedefli sistemlerde tek başına pasif hedeflemenin kullanılamayacağını, aktif ve pasif hedefleme yöntemlerinin sinerjik etkisine ihtiyaç duyulduğunu göstermiştir. Polimer tabanlı ilaç salım sistemleri her iki stratejiyi de birleştirebildiğinden kontrollü ilaç taşıma/salım sistemlerinde önemli bir yere sahiptir. Bu sistemler içerisinde en önemli sınıf çapraz bağlı polimerlerdir ve biyolojik sıvılar sulu çözeltiler olduğu için hidrojeller, hakkında en çok araştırma yapılan polimer sınıfıdır.

2.3.1 Hidrojeller

Hidrojeller, suda çözünmeden ağırlıklarının yüzlerce katına kadar şişebilen 3 boyutlu çapraz bağlı ağ yapılardır. Hidrojellerin su içerisindeki şişme yetenekleri yapılarını oluşturan polimerin ana zincirinde veya yan zincirlerde bulunan fonksiyonel (-OH, -COOH, -NH₂) gruplardan, çözünmeye karşı olan dirençleri ise yapılarındaki çapraz bağlardan kaynaklanmaktadır. Bu ağ yapılarda kovalent bağlardan kaynaklanan kimyasal (birincil etkileşim) veya iyonik etkileşimlerden kaynaklanan fiziksel çapraz bağlanmaların yanı sıra hidrojen bağları ve van der Waals etkileşimleri gibi ikincil etkileşimler ile oluşan fiziksel çapraz bağlarda bulunmaktadır [268]. Hidrojeller yüksek su tutma kapasiteleri, yumuşak ve esnek yapıları ile canlı dokulara benzediğinden doku mühendisliği, rejeneratif tıp, ilaç salım sistemleri gibi biyomedikal alanlarda sıklıkla kullanılmaktadırlar.

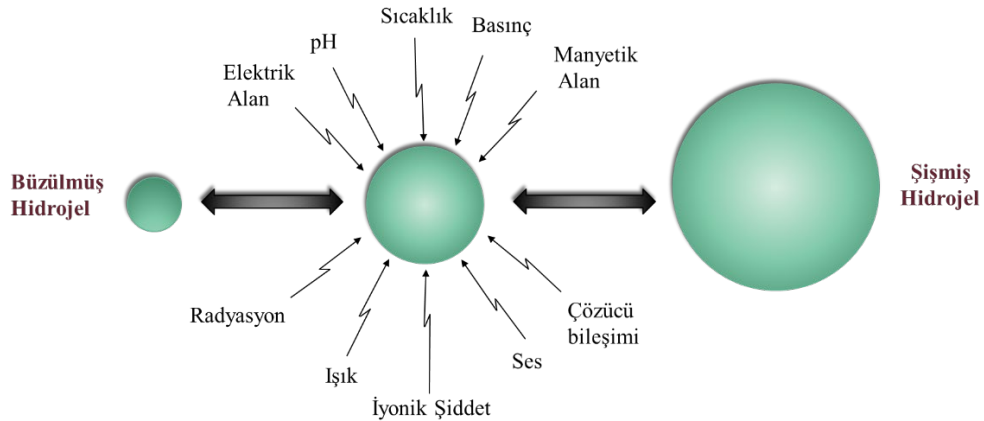
Ayrıca hidrojeller farklı boyutlarda, yapılarda ve fonksiyonel özelliklerde sentezlenebilmeleri de ilaç salım sistemlerinde önemli bir yere sahip olmalarını sağlar. Hidrojeller boyutlarına göre nanojel (20-250 nm), mikrojel (0.3-350 µm) ve

makroskopik jeller (mm/cm boyutunda) olarak üç sınıfa ayrılırlar, farklı fiziksel özelliklere sahiptirler ve vücutta kullanıldığı bölgeye göre farklı şekillerde tasarlanabilmektedirler. Örneğin, nanojeller/mikrojellerin makroskopik yapılara göre daha geniş yüzey alanına sahip olmaları, çevre uyaranlarına karşı verdikleri yanıtların daha hızlı olmasını sağlar. Ayrıca küçük boyutları ile damar içerisinde kolaylıkla hareket ederek biyomakromolekülleri/ilaçları hedeflenen bölgelere kolaylıkla ulaştırabilmektedirler. Bu sebeple, hücre içerisine gönderilmesi planlanan ilaçlar için küçük boyutlu jeller kullanılırken, yara örtüsü gibi sistemlerde makroskopik jeller tercih edilmektedir. Örneğin, Duan ve çalışma arkadaşları, BIS çapraz bağlayıcısı ve APS termal başlatıcısı varlığında serbest radikal polimerizasyonu ile CS-g-PNIPAAm nanojelleri sentezleyerek bir antikanser ilacı olan oridonin yüklemişler ve kanser terapisinde kullanımını incelemişlerdir. İlaç salım testleri sonucunda oridonin salım etkinliğinin asidik ortamda yüksek olduğu ve sitotoksikite testleri sonucunda ise sentezlenen nanojellerin antitümör aktivite gösterdiği bulgulanmıştır. Nanojel bazlı ilaç salım sistemlerinin hidrofobik kanser ilaçlarını, asidik tümör mikro çevreye taşımak için kullanılabileceği rapor edilmiştir [269]. Bo ve çalışma arkadaşları ise antibakteriyel özelliği olan DMAPMAAm'i yara örtüsü olarak kullanmak amacıyla diaseton akrilamit (DAAm) ve N,N-dimetilakrilamit (DMAm) monomerleri ile beraber P(DMAPMAAm-*ko*-DMAm-*ko*-DAAm) kopolimerlerini sentezlemişlerdir. RAFT polimerizasyonu ile sentezlenen P(DMAPMAAm-*ko*-DMAm-*ko*-DAAm) kopolimerlerinin katyonik karakterini artırılması amacıyla DMAPMAAm grupları kuvaternize edilmiş ve ardından ditiyodipropiyonik asit dihidrazin ile çapraz bağlanmıştır. Kendi kendini iyileştirme özelliği bulunan hidrojellere fare epidermal büyüme faktörü yüklenerek in vivo testleri gerçekleştirilmiş ve sonucunda ağ yapıların bakteriyel enfeksiyonu engellediği, yaranın iyileşme sürecini hızlandırdığı rapor edilmiştir [270].

Hidrojeller sahip oldukları farklı fonksiyonel gruplar sayesinde ilaçlarla çeşitli kimyasal etkileşimler kurabilir ve gözenek boyutları hem bu gruplara hem de çapraz bağ yoğunluğuna göre değiştirilebilir. Bu sayede, yapı içerisine hapsedilmek istenen biyolojik makromoleküllerin ve ilaçların özelliklerine, boyutlarına uygun farklı ağ yapılar sentezlenebilmektedir.

Canlıların organ ve dokuları doğal polimerler olarak tanımlanır ve çevre uyaranlarındaki değişik karşısında yapıları ve işlevsellikleri değişir. Laboratuvar

koşullarında sentezlenen hidrojel­ler de bu biyolojik sistemleri taklit edebilmektedir ve akıllı hidrojel olarak ifade edilen bu ağ yapıların pH, sıcaklık, basınç, ışık ve elektrik alan gibi fiziksel/kimyasal uyarılara karşı konformasyonları, çözücü etkileşimleri, şekilleri, iletkenlikleri, hidrofilik/hidrofobik dengesi, şişme/büzülme ve ilaç salım davranışları tersinir şekilde değişmektedir (Şekil 2.22) [271]. Akıllı hidrojel­ler bu özellikleri ile biyolojik makromolekül ve ilaçları kontrollü bir şekilde salabilmektedirler. Özellikle, uygun dozda ilaç kullanımı için tasarlanan farklı boyutlardaki hidrojel­ler, hedeflenen bölgenin pH, sıcaklık gibi uyarılarının değişimine bağlı şişme/büzülme davranışı göstererek ilaçların/biyomakromoleküllerin salınmasında kolaylık sağlamaktadır. Örneğin, tümörlü dokuların mikro çevrelerinde belirli enzimler ve glutatyon antioksidanının seviyesi sağlıklı hücrelere göre daha yüksek, oksijen oranı daha düşüktür, farklı sıcaklık (~40°C) ve pH'a (~pH 5.5) sahiptir. Tümör hücresinin bu özel fizyolojik karakterine uygun, bu uyarılarına duyarlı hidrojel­ler sentezlenerek tümör hedefli tedavilerde kullanılabilmektedir. Özellikle, hem sıcaklık hem de pH duyarlı ilaç taşıyıcılar en çok araştırma yapılan sistemlerdir [272]. Salehi ve çalışma arkadaşları BIS çapraz bağlayıcısı varlığında serbest radikal çözelti polimerizasyonu ile sentezledikleri P(NIPAAm-*ko*-MAA-*ko*-DMAEMA) nanojel­lerine iki farklı kanser ilacı (DOX ve MTX) yükleyerek ilaç salım ve anti-tümör etkilerini incelemişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre, ilaç yüklü nanojel­lerin akıllı bir şekilde tümörlü bölgeyi tespit ettiği, sıcaklık/pH duyarlı davranış göstererek ilacı devamlı ve kontrollü bir şekilde saldı­ğı ve iki ilacın beraber kullanılması ile anti-tümör etkinliğinin artırıldığı rapor edilmiştir. Yapılan bu çalışma sonucunda, nanojel­lerin gelecekte kanser terapisinde kullanılabilecek iyi bir alternatif olduğu ifade edilmiştir [273].



Şekil 2.22 : Hidrojel­lerin çevre uyarılarına karşı davranışları.

2.3.1.1 Sıcaklık duyarlı hidrojeller ve ilaç salım sistemleri

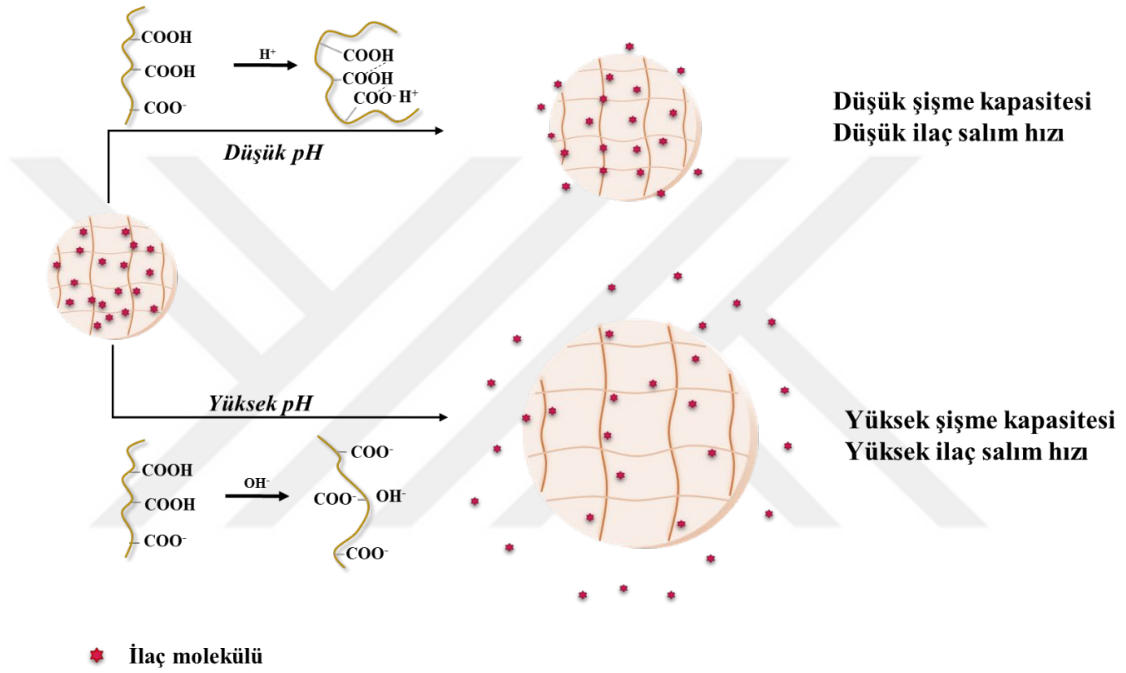
Sıcaklığa duyarlı hidrojeller, ilaç salım uygulamalarında en çok çalışılan çevreye duyarlı polimer sınıflarından bir tanesidir ve bu ağ yapılar kritik çözelti sıcaklıklarına bağlı olarak şişme/büzülme davranışı gösterirler (Şekil 2.23). Kritik çözelti sıcaklığı, bir polimer çözeltisinin tek fazlı sistemden iki fazlı sisteme geçiş yaptığı sıcaklık olarak tanımlanır ve alt kritik (LCST) ve üst kritik çözelti sıcaklığı (UCST) olmak üzere ikiye ayrılır. Özellikle, LCST'ye sahip polimerler ilaç salım sistemlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Birçok polimerin sudaki çözünürlüğü sıcaklıkla doğru orantılı olarak artarken LCST gösteren polimerlerin, sıcaklık arttıkça çözünürlükleri azalır. Bu özelliğe sahip polimerlerde sıcaklık LCST'nin üstüne çıkartıldığında polimer zincirindeki hidrofobik etkileşimler, hidrofilik etkileşimlere baskın gelir ve polimer zincirleri çözücünden ayrılarak çöker. UCST'ye sahip olan polimerlerde ise LCST'nin tersine polimer kritik sıcaklığın üzerinde tamamen çözünürken bu sıcaklığın altında çözücü moleküllerinden uzaklaşarak çöker. Bu tür polimerler hem hidrofobik etkileşimleri tetikleyecek miktarda hidrofobik, hem de su içerisinde çözünürlüğü sağlayacak oranda hidrofilik grup içermelidir. Polimerin hidrofilik/hidrofobik dengesi de LCST ve UCST değerini etkiler. Hidrofilik grubun eklenmesi LCST'nin artmasına/UCST'nin azalmasına sebep olurken, hidrofobik grubun eklenmesi tam ters etkiye sebep olur. Kritik çözelti sıcaklıkları bulutlanma noktası tayini ile tespit edilebilmektedir [28, 274–276]. Hidrojeller yapılarındaki çapraz bağlardan dolayı çözünmez, hacim değişimi gösterirler. Bu sebeple, sıcaklığa duyarlı ağ yapılarıdaki kritik sıcaklık noktasına hacim faz geçiş sıcaklığı (VPTT) adı verilmektedir ve VPTT'ye sahip hidrojellerin biyomedikal alanlarda kullanımı oldukça yaygındır. Poli(N-vinilkaprolaktam), PDMAEMA ve PNIPAAm hidrojelleri, VPTT'ye sahip polimerlere örnek olarak verilebilir. Özellikle, PNIPAAm hidrojelleri fizyolojik sıcaklığa oldukça yakın bir noktada (32-34°C) VPTT'ye sahip olduğu ve mekanik özellikleri elastik biyolojik malzemelerle benzerlik gösterdiği için enzim immobilizasyonunda, biyoteknolojide, medikal ve farmakolojik alanlarda da sıklıkla kullanılmaktadır [252, 277]. PNIPAAm hidrojellerinin VPTT üzerindeki sıcaklıklarda büzülmesi ve yan zincirlerde bulunan izopropil gruplarının arasındaki hidrofobik etkileşimler, ağ yapının çevresinde deri benzeri film oluşmasına sebep olur [278, 279]. Bu film, PNIPAAm'ın ilaç salım hızını düşürdüğü için bu etkiyi azaltmanın yolları araştırılmaktadır.

Hidrojellerin VPTT'si, yapıya hidrofilik/hidrofobik polimer ilavesinin yanı sıra çözücü ortamına eklenen tuzlar, yüzey aktif maddeler ve ko-çözücüler de değiştirilmektedir. Çözücüye eklenen katkı maddeler, hidrojellerin çözücü-polimer etkileşimini, polimerlerin arasındaki hidrofilik/hidrofobik dengesini ve dolayısıyla su ile polimer zincirlerinin etkileşimlerini değiştirmektedir. İlaç taşıyıcı sistemler vücuda gönderildiğinde farklı tuzlar ve proteinleri içeren kan ve fizyolojik sıvılar içerisinde hareket eder ve bu katkılar VPTT'yi etkilediği için ilaç salım mekanizması da değişebilmektedir. Kan içerisindeki tuz ve proteinlerin polimer ile kovalent olmayan etkileşimlerde bulunması ve bu biyomoleküllerin polimerin çevresini taç şeklinde sarması, hidrojinin yüzey yükünün, boyutlarının değişmesine ve dolayısıyla küçük boyutlu ağ yapılar da agregasyona sebep olmaktadır [283]. Taha ve çalışma arkadaşları PNIPAAm'ın fizyolojik sıvı içerisindeki davranışını belirlemek amacıyla farklı biyolojik tamponlar kullanmış ve bunların LCST'ye etkisini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda, tampon çözeltilerin polimerin hidrasyon kabuğunu (polimeri saran 3 boyutlu su moleküllü küreleri) değiştirdiği ve LCST'nin daha aşağı düştüğü rapor edilmiştir [284].

2.3.1.2 pH duyarlı hidrojeller ve ilaç salım sistemleri

Ana veya yan zincirleri üzerinde yüksek oranda iyonlaşabilen grup taşıyan polimerler polielektrolit, çapraz bağlı ağ yapılar ise polielektrolit hidrojel olarak tanımlanır ve bu gruplar zayıf asidik (karboksilik asit vb.) ve/veya zayıf bazik (birincil, ikincil ve üçüncül amin) olduğu durumda hidrojeller pH duyarlı davranış göstermektedir. Bu iyonik grupların asidik ve bazik grup olmasına göre ağ yapılar sırasıyla polianyonik ve polikasyonik hidrojeller olarak iki gruba ayrılmaktadır. Polianyonik hidrojeller, asidik koşullarda nötral yapıda oldukları için büzülmüş durumdadırlar ancak bazik koşullarda ($pH > pK_a$) protonlarını kaybederek iyonlaşırlar ve polimer zincirleri arası oluşan elektrostatik itme kuvvetleri sonucunda şişerler. Öte yandan, polikasyonik hidrojeller asidik koşullarda ($pH < pK_a$) amin gruplarının protonlanması sonucunda şişerken bazik koşullarda büzülmüş halde bulunurlar. Polielektrolit hidrojeller ile tasarlanan ilaç taşıyıcı sistemlerin farklı pH bölgelerindeki şişme dereceleri ve dolayısıyla ilaç salım hızları değişmektedir. Polianyonik hidrojellerin kan, ince bağırsak gibi daha bazik, polibazik hidrojellerin ise mide, kanserli hücre gibi daha asidik koşullarda ilaç salım yüzdesi yüksektir (Şekil 2.24) [285]. Örneğin, Mishra ve çalışma arkadaşları farklı oranlarda katyonik DMAPMAAm ve anyonik IA

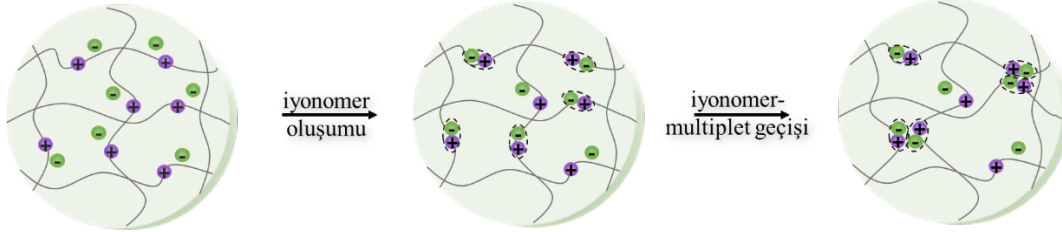
monomerlerini kullanarak BIS ile çapraz bağlı P(DMAPMAAm-*ko*-IA) hidrojellerini sentezlemiş ve yapıları 5-aminosalisik asit yükleyerek kolon (pH 7,4) ve mide (pH 1,2) koşullarını taklit eden sıvılar içerisindeki kontrollü salım deneylerini gerçekleştirmişlerdir. IA (pKa1~3,85 ve pKa2 ~5,44) pH 7,4'te, DMAPMAAm ise pH 1,2'de iyonik halde bulunduğu için bu bölgelerde şişme derecelerinin ve buna bağlı olarak ilaç salım yüzdelерinin daha yüksek olduğu, IA oranı yüksek P(DMAPMAAm-*ko*-IA) hidrojelinin 5-aminosalisik asidin kolonda salınması için kullanılabileceği rapor edilmiştir [286].



Şekil 2.24 : Anyonik hidrojin şişme ve ilaç salım davranışı.

Polielektrolit hidrojellerde şişme sadece elektrostatik itme kuvvetlerinden değil, oluşan iyonik grupların ağ yapıdaki ozmotik basıncı ve dolayısıyla su difüzyonunu arttırmasından da kaynaklanmaktadır [287]. Hidrojellerin hem şişme derecesi hem de mekanik özellikleri polimerin yük yoğunluğu, çözücünün içerisindeki tuzların/karşıt iyonların konsantrasyonu ve çapraz bağ yoğunluğuna bağlı olarak değişmektedir. Hidrojellerin ozmotik basıncını etkileyen en önemli faktörlerden bir tanesi çözücüdeki hareketli karşıt iyonlardır. Bu iyonlar polielektrolit hidrojelilerin iyonik grupları ile elektrostatik etkileşim kurarak iyon çiftleri oluşturur ve nötralizasyona sebep olur. Bu durum, hidrojin içerisindeki iyonik grupların konsantrasyonunu azalttığı için ozmotik basınç düşer. Ayrıca bu iyon çiftleri birbirleri ile etkileşerek (dipol-dipol etkileşimleri) multipler adı verilen yapıları oluştururlar ve bu şekilde ağ yapı içerisinde

ikincil çapraz bağlanmalar oluşur (Şekil 2.25). İyon çiftlerinden kaynaklanan bu değişiklikler polielektrolit hidrojinin büzülmesine sebep olur. Fizyolojik sıvılar içerisinde birçok farklı tuz ve protein türünü barındırdığı için bahsedilen bu etkiler daha önce de bahsedildiği gibi ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmesi için oldukça önemli parametrelerdir [288, 289].



Şekil 2.25 : Polielektrolit hidrojellerde iyonmer-multiplet oluşumu.

Multiplet ifadesi, iyonmer teorisinden ortaya çıkan bir kavramdır. Polimer zincirlerinin üzerindeki iyonik grupların oranı az olduğu durumda polimerler polielektrolit yerine iyonmer olarak tanımlanmaktadır. İyonmerler de şişme elektrostatik itme kuvvetlerine değil iyonik gruplar arasındaki dipol-dipol etkileşimlerine bağlı olarak değişmektedir ve birçok polimer, kompozisyonlarına bağlı olarak hem polielektrolit hem de iyonmer olarak davranabilmektedir. Örneğin, yüksek yük yoğunluğuna sahip bir polimerin nötral bir polimerle beraber sentezlenen kopolimerleri (iyonik polimer:nötral polimer oranı düşük olduğu durumda) iyonmer/polielektrolit özelliği göstermektedir. Polimerler genellikle polielektrolit kavramının altında sınıflandırılmaktadır [290–292].

Poli(metakrilik asit) (PMAAc), poli(akrilik asit) (PAAc), poli(2-etilakrilik asit) (PEAAc) gibi karboksilik asit grubu taşıyan ve poli(2-akrilamido-2-metilpropan sülfonik asit) (PAMPS) ve poli(4-stirensülfonik asit) (PSSA) gibi sülfonik asit grubuna sahip olan polimerler polianyonik hidrojelere örnek verilebilir. Cs, PEI, PDMAEMA ve PDMAEMA gibi yapısında birincil, ikincil ve üçüncül amin grupları bulunduran polimerlerden sentezlenen ağ yapılar ise polikasyonik hidrojeller olarak ifade edilmektedir [293].

Günümüzde, özellikle de kanser tedavisinde kullanılan ilaç taşıyıcı sistemler hücre içerisine girebilecek boyut ve özellikler de tasarlanmaktadır. Bu sebeple, gen terapisi prensip ve mekanizması anlatılırken bahsedilen hücresel alım ve endozomal çevrim adımlarının ilaç taşıyıcı sistemler için de önemli parametrelerdir. Hücre zarının yağ tabakasının negatif yüklü olması ve hücre içi çalışmalarda endozomun yabancı

bileşenleri asidik ortamda parçalamasından dolayı vücut/hücre içi kullanılan taşıyıcı sistemlerde, tıpkı gen terapisinde olduğu gibi genellikle katyonik polimerler (polikatyonik hidrojeller) tercih edilmektedir ve seçilen polimerler de benzerlik göstermektedir. İlaç taşıyıcı sistemlerde de genellikle PEI, PDMAEMA ve PDMAPMAAm gibi biyouyumluluğu yüksek, fizyolojik koşullarda pH duyarlı davranış gösterebilen polimer kullanılmaktadır [20, 294]. Örneğin, Chang ve çalışma arkadaşları, toksisitesi düşük ve biyobozunur fototermal bir ajan olan sodyum bakır klorofil (SCC) ile PDMAPMAAm polimerlerini kullanarak farklı özelliklerde nanojeller sentezlemişlerdir. Lazer ışığına maruz bırakılan bu nanojellerin fototermal terapiyle kanser hücrelerini öldürmede etkili olduğu ve bu uygulamanın kanser terapisinde kullanılabileceği rapor edilmiştir [295].

Deen ve Loh ise PDMAEMA-PCL-PDMAEMA üçlü blok kopolimerlerini sentezleyerek polimerik miseller oluşturmuş ve biyolojik olarak parçalanabilen misel formundaki katyonik polimerlerin ilaç taşıyıcıları olarak kullanıldığını rapor etmişlerdir. İçerisine hidrofobik bir kanser ilacı olan paklitakselin (PTX) yüklenen PDMAEMA-PCL-PDMAEMA polimerik miselleri tümör hücrelerine gönderilmiş ve *in vitro* siRNA transfeksiyonuna aracılık ettiği, PEI ve PDMAEMA homopolimerinden daha yüksek bir transfeksiyon etkinliğine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Böylece, PTX'in katyonik polimer miselleri ile kanser hücrelerine verimli bir şekilde gönderilebildiği ve polimer-ilaç konjugatın fizyolojik pH'da iyi bir kararlılık gösterdiği ifade edilmiştir [296].

2.3.1.3 Akıllı hidrojeller ile ilaç taşıma sistemlerinin tasarlanması

İlaç taşıyıcı olarak kullanılacak hidrojellerin yapısı, ilacın türü, hedef organ/doku ve hücrelerin özelliklerine bağlı olarak değişmektedir. Bu hidrojellerin taşıyacağı ilaçla olan etkileşimleri, biyouyumlulukları, hedeflenen bölgedeki taşıma/salın ve mekanik özelliklerinin tespit edilerek ideal ilaç taşıyıcı sistemlerin tasarlanması gerekmektedir.

Hidrojeller hedeflenen bölgeye ulaşana kadar yapılarındaki ilacı dışarıdaki enzim vb. biyolojik malzemelerden korumaları, immunojenik moleküllerin ağ yağının içerisine ilacın ise dışarıya difüzenmesini engellemeleri gerekmektedir. İlaç hedef bölgeye ulaştığında ise iyileşme süreci boyunca etkin ve kontrollü şekilde salınmalıdır. Bu aşamaların tamamını etkileyen en önemli faktör hidrojelın porlarının yeteri kadar açılmasıdır. İlacın taşınımı sırasında hidrojellerin büzülmüş halde bulunması ve

enzimatik olarak parçalanmaması gerekirken salım esnasında ağ yapının şişmesi veya polimer zincirlerinin degradasyona uğraması gerekir. İlaç salımı temel olarak difüzyon, şişme ve kimyasal kontrollü olarak üçe ayrılmaktadır [297, 298].

Kimyasal kontrollü sistemlerde, polimer zincirleri enzimatik olarak parçalanır veya çapraz bağlı ağ yapının ilaç ile arasında tersinir/tersinmez reaksiyonlarının gerçekleşir ve hidrojelin yüzeyi veya tamamı aşınarak ilaç salınır. Burada, hedeflenen bölgenin enzim, pH ve sıcaklık gibi parametrelerine bağlı olarak zaman içerisinde kontrollü şekilde parçalanabilecek/aşınabilecek bir polimer seçilmesi gerekmektedir yani, salım süreci porların açılmasına bağlı değildir. Öte yandan, difüzyon ve şişme kontrollü sistemler ağ yapının porlarının salım sırasındaki büyüklüğüne bağlıdır ve birbirine zıt iki mekanizma olarak tanımlanabilirler [298].

Difüzyon kontrollü sistemlerde, porlar ilaç moleküllerinin boyutlarından daha büyüktür ve ilacın dışarıya salınması suyun ağ yapıya difüzyonu, ilaç ile polimer zincirleri arasında etkileşimlere (elektrostatik etkileşimler, H bağları vb.) ve ilacın çözünürlüğüne bağlıdır. Bu sistemlerde, ilacın difüzyon hızının, hidrojelin zincirlerinin genişleme (relaksasyon) hızından küçük olduğu ifade edilmektedir ($R_{relax} \gg R_{diff}$). Çapraz bağlı polimer zincirleri, çözücü ortamında hızlı bir şekilde açıldığı için porlar kısa süre içerisinde büyür ve salım mekanizmasını ilacın dışarıya difüzyon hızı kontrol eder [299].

Difüzyon kontrollü sistemlerde Fick'in difüzyon teorisi kullanılmaktadır. Hidrojel tabanlı taşıma sistemi, ilacın salınacağı bölgedeki sıvı ile etkileştiği zaman ağ yapıdaki ilaç ve salım ortamı arasında konsantrasyon farklı ortaya çıkar. Bu durumda, ilaç yüksek konsantrasyondaki hidrojelin içerisinden, düşük konsantrasyondaki sıvıya doğru difüzyonlanır. Fick yasaları üzerinden ilacın difüzyon katsayısı (D , cm^2/s) ve hız sabiti (k), hesaplanabilir ve böylelikle taşıyıcı sistemlerin hedef ilaç/bölge için uygunluğu değerlendirilebilmektedir. Silindirik ve disk şeklinde malzemeler için difüzyon denklemi (denklem 2.1):

$$D = \pi r^2 (k / 4)^{1/2} \quad (2.1)$$

şeklinde ve burada r , yarı çapı ifade etmektedir. Taşıyıcı ince film olduğu durumda yarı çap yerine l , yani çözücü ile etkileşen alanın boyu kullanılır. Eğer, ilaç taşıyıcı sistem difüzyon kontrollü değil şişme kontrollü ise difüzyon denkleminde değişiklik meydana gelir (denklem 2.2) [300].

$$D = \pi r^2 (k / 4)^{1/n} \quad (2.2)$$

Burada, difüzyon katsayısının hesaplanması için ilk kez Korsmeyer ve Peppas tarafından tanımlanan difüzyon üsteline (n) ihtiyaç duyulmaktadır.

Şişme kontrollü sistemlerde, difüzyon kontrolünden farklı olarak ilacın salım ortamına difüzyonu hidrojelın şişme derecesine bağılı olarak değişmektedir. Hidrojel salım ortamı ile etkileştiğı ilk anda por büyüklükleri ilaç molekülünden küçüktür, polimer zincirleri zaman içerisinde yavaş yavaş hareket etmeye başlar ve porlar buna bağılı olarak büyür. Burada porlar, difüzyon kontrollü sistemlerin tersine yavaş yavaş büyüdüğü için ilaç dışarıya ağ yapının genişlemesine bağılı olarak difüzlenir. Şişme kontrollü sistemlerde, polimer zincirlerinin relaksasyon hızı, ilacın difüzyon hızından daha küçüktür ve salım relaksasyon kontrollü şekilde gerçekleşir ($R_{relax} < R_{diff}$) [301].

Korsmeyer, Peppas ve Ritger polimerik ağ yapıların difüzyon mekanizmasını açıklamak için yaptıkları çalışmalar sonucu Power-Law olarak ifade edilen bir empirik formül türetmişlerdir (denklem 2.3).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (2.3)$$

Burada, M_t ve M_∞ , t ve sonsuz zamanda salınan ilacın kütlesini, k taşıyıcının yapısal özelliklerine ait sabiti, n ise daha önce de ifade edildiğı gibi difüzyon üstelini ifade etmektedir. n, difüzyon üsteli 0.5 değerine yakın olduğı zaman salım mekanizmasının Fick yasasına uyduğı ve difüzyon kontrollü olduğı, 0.89'a yakın olduğı zaman Durum II olarak tanımlanan salımın relaksasyon kontrollünde gerçekleştiğı, $0.5 < n < 0.89$ durumunda sistemin hem difüzyon hem de relaksasyon kontrollü olduğı ifade edilmektedir [302, 303].

Salım mekanizmaları ilacın türüne göre değişmektedir. Örneğın, suda çözünen ilaçların birinci mertebe kinetiğine, kalp ve kanser ilaçlarının sıfırncı mertebe kinetiğine uyması, hidrofilik ilaçların ise difüzyon kontrollü salım gerçekleştirmesi beklenmektedir. Power Law eşitliğı ise ağ yapının salım mekanizmasını daha detaylı incelemek için kullanılır. Akıllı hidrojeller kullanılarak tasarlanan taşıyıcı sistemler ise uyarılara karşı şişme/büzölme davranışı gösterdiğı için biyobozunur bir polimer/çapraz bağlayıcı kullanılmadığı sürece genellikle şişme kontrollülerdir.

İlaç taşıyıcı sistemleri tasarlarken taşıma/salım mekanizmaları kadar önemli olan bir diğér parametre de biyoyumluluklarıdır. Taşıyıcı malzeme hastanın vücuduna

gönderildiğinde bağışıklık sistemini tetiklememesi gerekmektedir çünkü bu durum hücre canlılığına, hidrojin kararlılığına ve ilacın salınma sürecine zarar verir. Eğer hidrojin biyouyumlu değilse, vücudun savunma hücreleri olan makrofajlar ve nötrofiller tetiklenir ve şiddetli bir iltihaplanmaya ve hücre ölümüne sebep olur. Ayrıca hidrojinler bu tepki sonucunda enzimler ve dışarıdan uygulanan mekanik güç tarafından parçalanabilir ya da fibroblast içeren fibroz kapsüllerinin içerisine hapsolabilir ve taşıdığı ilacın salamaz. Bu sebeple, hidrojin sentezinde PEG, PNIPAAm, PDMAEMA ve PDMAEMA gibi biyouyumlu polimerlerin tercih edilmesi oldukça önemlidir. Kullanılan polimerler biyolojik olarak immunojenik etkiye sahipse hidrojinin yüzeyi de biyouyumlu bir malzeme ile kaplanabilir [304, 305]. Hidrojinlerin yüzeyinin aljinat, kitosan gibi doğal polimerler ile kaplanması veya bu polimerlerin sentetik polimerler ile kopolimerinin sentezlenmesi oldukça yaygın yöntemlerdir [306, 307].

Son olarak, ilaç taşıyıcıların mekanik özellikleri de uygulama alanına göre değişiklik göstermektedir. Genel olarak hidrojinlerin, esnek ve vücut içi basınca karşı dayanıklı olmaları gerekmektedir. Nanojel ve mikrojeller kan dolaşımının içindeki ve hedef bölgedeki komşu hücrelerin yarattığı basınca, makroskopik hidrojinlerin ise oral yolla alındıklarında mide, bağırsak gibi organların iç kuvvetlerine, yara örtüsü olarak kullanıldığında çevre koşulları ve darbelere karşı dayanımları yüksek olmalıdır. Mekanik özelliklerde deformasyona karşı direnç (sertlik) ve çatlaklara karşı direnç (tokluk) oldukça önemlidir. Vücuda gönderilen hidrojinin zaman içerisinde mekanik dayanımı azalmaya başlar ve yapısal kusurlar ortaya çıkabilir. Bu sebeple, hidrojinlerin esneklikleri ve dayanımların geliştirilmesi ve özelleştirilmesi ilaç taşıyıcı sistem tasarlanmasında önemli bir parametredir [304]. Hidrojinlerin mekanik özellikleri, polimer konsantrasyonunu, çapraz bağlayıcı:polimer oranını değiştirerek veya komonomer kullanımı ile değiştirilebilmektedir. Öte yandan, polimer ve çapraz bağlayıcı konsantrasyonunu arttırmak sertliği ve dolayısıyla kırılabilirliği artırabilirken ideal sertlik durumunda vücut içi basınca dayanımı sağlar. İyonik bir çapraz bağlayıcı kullanıldığında ise, daha önce polielektrolit hidrojinlerde bahsedilen iyonomer/multipler etkileşimleri ile ikincil çapraz bağlanmalar oluşabilir ve uygun pH koşullarında taşıyıcının mekanik dayanımı artar [308–310]. Hidrojinin şişme derecesi de mekanik özellikleri etkileyen faktörlerden bir tanesidir. Şişme derecesi çok yüksek olan ağ yapılarında, polimer zincirlerinin gerginliği arttığı için hidrojin daha kırılabilir

hale gelebilirken uygun şişme derecesindeki yapılarda polimer zincirleri hareketli halde bulunduğu için sağlam ve esnek malzemeler elde edilebilir. Örneğin, Şimşek ve çalışma arkadaşları BIS çapraz bağlayıcısı ile çapraz bağlı katyonik P(NIPAAm-*ko*-DMAPMAAm), anyonik P(NIPAAm-*ko*-AMPS) ve P(NIPAAm-*ko*-IA) ve amfoterik P(NIPAAm-*ko*-DMAPMAAm-*ko*-AMPS) ve P(NIPAAm-*ko*-DMAPMAAm-*ko*-IA) hidrojellerini serbest radikal çözelti polimerizasyonu ile sentezleyerek ağri kesici/yangı önleyici bir ilaç olan diklofenak sodyum (DFNa) ilacının ağ yapılarından salım mekanizmasını incelemişlerdir. Sentezlenen hidrojellerin öncelikle mekanik ve şişme testleri gerçekleştirilerek ilaç salım için uygun kompozisyonlar seçilmiştir. Bu süreçte gerçekleştirilen tek eksenli sıkıştırma testleri sonucunda şişme derecesi daha düşük olan P(NIPAAm-*ko*-DMAPMAAm) hidrojellerinin özellikle P(NIPAAm-*ko*-AMPS) hidrojeline göre daha esnek ve dayanıklı olduğu, yapıdaki hidrofilik komonomer oranı arttıkça daha çok şişen ağ yapıların esnekliğinin ve dayanımının azaldığı, amfoterik yapılarda oluşan ikincil çapraz bağların (elektrostatik etkileşimler ile) daha küçük ve sağlam yapılar oluşmasını sağladığı rapor edilmiştir [25].

Makroskopik hidrojellerin esneklikleri ve mekanik dayanımları genellikle tek eksenli çekme/sıkıştırma testlerinden elde edilen elastiklik (Young, E) veya kayma (shear, G) modülleri üzerinden belirlenmektedir. E ve G modülleri, hidrojele uygulanan kuvvete (F) karşı hidrojelin gösterdiği deformasyonun oranını ifade etmektedir. Malzemenin birim alanına uygulanan çekme veya sıkıştırma kuvveti (F/A) gerilim (τ veya σ , stress) olarak, malzemenin uzama ($\lambda = l/l_0$) ve sıkıştırma ($\lambda = -l/l_0$) oranı yani oluşan deformasyon oranı ($\lambda - \lambda^{-2}$) da gerinim olarak tanımlanmaktadır. Hidrojele uygulanan kuvvet yüzey alanına dik ise ve malzemenin boyutları değişiyorsa “normal gerilme” (σ), kuvvet malzeme de açış değişimine sebep oluyorsa “kesme gerilmesi” (τ) adı verilir ve normal gerilmeden E, kesme gerilmesi üzerinden G modülü hesaplanır (denklem 2.4 ve 2.5) [311, 312].

$$\sigma = E.(\lambda - 1) \quad (2.4)$$

$$\tau = G\left(\lambda - \frac{1}{\lambda^2}\right) \quad (2.5)$$

Özetle, hidrojellerin hemoliz, MTT gibi toksisite/sitotoksisite testleri, ilaç salım deneyleri sonucunda kontrollü salım mekanizmasının tespiti ve çekme/sıkıştırma testleri ile belirlenen mekanik dayanım/esneklikleri sonucunda ideal taşıyıcı sistemler tasarlanabilmektedir.



3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Kullanılan Kimyasallar

Çalışmanın her iki kısmında ortak olarak DMAPMAAm (≥ 99 saflıkta, Sigma-Aldrich, St Louis, USA) monomeri ve KPS (Merck, Darmstadt, Almanya) termal başlatıcısı kullanıldı ve herhangi bir saflaştırma yapılmadı. Tüm sentezler, Habaş A.Ş.'den satın alınan azot gazı (%99,9) altında gerçekleştirildi.

Katyonik PNIPAAm hidrojellerinin sentezinde ayrıca NIPAAm ana monomer, MAPTAC (suda ağırlıkça %50), ve DMAEMA (≥ 99 saflıkta) ise diğer komonomerler olarak seçildi ve Aldrich (St Louis, USA) firmasından temin edildi. Monomerlere sentez öncesi herhangi bir saflaştırma işlemi uygulanmadı. BIS çapraz bağlayıcısı Merck (Darmstadt, Germany) firmasından satın alınırken, TAB literatürdeki prosedüre göre sentezlendi. Termal başlatıcı olarak ayrıca AIBN (Merck, Darmstadt, Almanya), hızlandırıcı olarak TEMED (Sigma-Aldrich, Steinheim, Almanya) kullanıldı. 1,4-dioksan (Aldrich, St Louis, USA) polimerizasyon çözücülerinden biri olarak seçildi. Model ilaç olarak ise L-askorbik asit (L-AA, BDH Chem., İngiltere) tercih edildi.

Aşı kopolimerlerinin diğer ana bileşeni olan düşük (viskozite= 20-300 cPs, deasetilasyon derecesi: %75-85) ve orta molekül ağırlıklı kitosan (viskozite= 200-800 cPs, deasetilasyon derecesi: %75-85) Sigma-Aldrich (St Louis, USA) firmasından temin edildi. Asetik asit (AA, 100%, Merck, Darmstadt, Almanya) polimerizasyon çözültisi olarak kullanıldı.

Sodyum hidroksit (NaOH, 20-40 mesh, >97%, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), hidroklorik asit (HCl, Merck, Darmstadt, Germany), tetrahidrofuran (THF, ≥ 99 , Merck, Darmstadt, Almanya), metanol (≥ 99 , Merck, Darmstadt, Almanya), aseton (≥ 99 , Merck, Darmstadt, Germany) CsgD aşı kopolimerlerinin sentez ve saflaştırma çözücülerini olarak seçildi. Döteryum oksit (D₂O, ≥ 99.9 , Merck, Darmstadt, Almanya), trifloroasetik asit (TFA, ≥ 99 , Sigma-Aldrich, St.Louis, USA), sodyum asetat trihidrat

(NaAc, Merck, Darmstadt, Almanya) CsgD aşı kopolimerlerinin karakterizasyonunda kullanıldı.

L-Glutamin (200 mM), nonesansiyel amino asit çözeltileri (100x), Tripsin/EDTA (%0.25), penisilin/streptomisin çözeltisi (10,000 U/mL), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, yüksek glikoz) Gibco™ firmasından temin edildi. Tripan mavisi (%0.4, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), agaroz (biyolojik çalışmalara uygun, VWR Life Science), EDTA soydum tuzu dihidrat (VWR Life Science), CellTiter 96® AQueous one çözeltisi isimli hücre canlılığı tahlili (cell proliferation assay, MTS, Promega Corporation), fetal bovin serum (FBS, Capricorn Scientific GmbH), triton X-100 (Biomatic), DNA jel yükleme boyası (6x, Thermo Scientific), DNA merdiveni (DNA ladder, 1 Kb, Goldbio), RedSafe™ nükleik asit boyama çözeltisi (20.000x, iNtRON), tris baz tampon tozu (Multicell), tuzlu fosfat tamponu tabletleri (VWR Life Science) biyolojik çalışmalarda kullanıldı.

Lipofektamin™ RNAiMAX transfeksiyon ajanı (13778030, Invitrogen), susturucu (Silencer™) GAPDH siRNA pozitif kontrol (insan) (AM4633, Invitrogen), susturucu (Silencer™) negatif kontrol No. 1 siRNA (AM4635, Invitrogen), KDAlert™ GAPDH Tahlil Kiti (AM1639, Invitrogen), Pierce™ Coomassie (Bradford) Protein Tahlil Kiti (23200, Thermo Fisher Scientific) satın alındıkları yerin protokollerine uygun şekilde kullanıldı.

Destile deiyonize su (DDS; pH ≈ 5,5) Millipore RiOs-DI 3 UV marka su saflaştırma sisteminden temin edildi.

3.2 Kullanılan Cihazlar

PNIPAAm tabanlı katyonik hidrojelilerin tek eksenli sıkıştırma testleri 5 N'luk yük hücresi ile donatılmış Hounsfield H5K-S Model mekanik test cihazıyla, ilaç salım deneyleri ise WTW marka iletkenlik cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. pH ölçümlerinde WTW- pH523 model pHmetre kullanıldı. Hidrojel hacimce şişme dereceleri, 0-150 mm ölçüm aralığına sahip INSIZE marka dijital kumpas (0,01mm'ye duyarlı) ile belirlendi.

CsgD aşı kopolimerlerinin karakterizasyonunda kullanılan ¹H-NMR spektrumları Agilent marka VNMRs 500 model NMR (500 MHz) cihazı, FTIR spektrumları ise Agilent marka Cary 630 model FTIR spektrofotometresi (4000-600 cm⁻¹ aralığında)

ile kaydedildi. Tüm ^1H -NMR analizleri D_2O /trifloroasetik asit çözücüsü içerisinde gerçekleştirildi. Polimerlerin molekül ağırlıkları, TOSOH EcoSEC (HLC-8320) marka refraktif indeks (RI), WYATT miniDAWN Treos II marka çoklu açılı (multi angle, MALS) ışık saçılım (light scattering, LS) detektörlerine ve hidrofilik vinilik polimer tabanlı Mixed bed TSKgel GMPWXL model kolona ($13\mu\text{m}$ patikül boyutu, 30 cm uzunluk) sahip Agilent marka jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) cihazı ile belirlendi.

Sentezlenen CsgD/siRNA poliplekslerine siRNA bağlanma oranların tespiti için Jel Bio-Rad ChemiDoc XRS+ marka görüntüleme sistemi ve BD ImageLab yazılımı kullanılırken, polipleksleri boyutları şeffaf polistiren küvetlerde, zeta potansiyelleri ise DTS1070 model kapiler küvetlerde 633 nm dalga boyundaki lazer kaynağına sahip Malvern marka Zetasizer Ultra DLS cihazı ile tayin edildi. Oluşturulan CsgD/siRNA poliplekslerinin hemolitik aktiviteleri ve sitotoksisiteleri SpectraMax® i3x marka çoklu mikrolaka okuyucusu ile belirlendi. Sentez ve biyolojik çalışmalar sırasında yapılan çöktürme işlemlerinde Eppendorf marka 5804R model soğutmalı santrifüj kullanıldı.

3.3 Deneysel Yöntemler

3.3.1 Katyonik PNIPAAm hidrojellerin sentezi

pH ve sıcaklık duyarlı ilaç taşıyıcı sistemlerin sentezinde nötral, iyonik ve iyonlaşabilen monomerler ve/veya çapraz bağlayıcılar kullanıldı. Hidrojelleri sıcaklık duyarlı hale getirmek için NIPAAm (2 mol/L) monomeri seçilirken, ağ yapılarına farklı oranlarda katyonik karakter kazandırmak amacıyla DMAPMAAm, DMAEMA ve MAPTAC monomerleri tercih edildi. Nötral dört fonksiyonlu BIS veya iyonik sekiz fonksiyonlu TAB çapraz bağlayıcı varlığında yapılan sentezler, üç farklı polimerizasyon çözeltisi ve buna bağlı olarak farklı başlatıcılar, sıcaklıklarda gerçekleştirildi.

Tüm hidrojellerin sentezlerinde katyonik monomerlerin konsatrasyonu NIPAAm'in mol cinsinden %5'ine karşılık gelirken, çapraz bağlayıcıların konsantrasyonu $2,5 \times 10^{-2}$ mol/L olarak seçildi. NIPAAm tabanlı katyonik ağ yapılar **(i)** 1,4-dioksan ortamında AIBN termal başlatıcısı (5×10^{-3} mol/L) ile $50\text{ }^\circ\text{C}$ 'de **(ii)** 0,1N NaOH sulu çözeltisi içerisinde KPS başlatıcısı (5×10^{-3} mol/L) varlığında $25\text{ }^\circ\text{C}$ 'de veya **(iii)** DDS ortamında

KPS/TEMED ($1,5 \times 10^{-2}$ mol/L ve $1,5 \times 10^{-2}$ mol/L) redoks çifti kullanılarak 25°C’de serbest radikal çözelti polimerizasyonu ile sentezlendi (Çizelge 3.1).

Polimerizasyon çözeltileri oda koşullarında hazırlanmalarının ardından ~ 10 mm iç çapı olan cam tüplere aktarıldı ve şırınga iğnesi ile ~15 dakika oksijensiz azot gazı geçirildi. AIBN içeren polimerizasyon çözeltileri 50 °C’deki, KPS içerenler ise 25 °C’deki etüvde 3 gün boyunca jelleşme tamamlanana kadar bekletildi. Ardından, cam tüpler kırıldı ve hidrojel yüzeylerinde herhangi bir hasar olmayacak şekilde çıkartılarak diskler halinde kesildi. Hidrojeller, reaksiyona girmemiş monomer, homopolimer vb. yapıların uzaklaştırılması amacıyla DDS içerisinde 1 hafta boyunca her gün suları değiştirilerek saflaştırıldı. Tüm sentezler en az iki kez tekrarlandı.

Çizelge 3.1 : PNIPAAm katyonik hidrojellerin sentez parametreleri.

Örnek Kodu	BIS	TAB	AIBN (1,4-Dioksan)	KPS (0,1N NaOH)	KPS+TEMED (DDS)
P(NIPAAm-ko-DMAEMA)					
S1	+	-	+	-	-
S2	-	+	+	-	-
S3	+	-	-	+	-
S4	+	-	-	-	+
P(NIPAAm-ko-DMAEMA)					
S5	+	-	+	-	-
S6	-	+	+	-	-
P(NIPAAm-ko-MAPTAC)					
S7	+	-	+	-	-
S8	-	+	+	-	-
S9	+	-	-	+	-
S10	-	+	-	+	-

3.3.2 Katyonik PNIPAAm hidrojellerin mekanik dayanımlarının belirlenmesi

Disk şeklindeki P(NIPAAm-ko-DMAEMA), P(NIPAAm-ko-DMAEMA) ve P(NIPAAm-ko-MAPTAC) hidrojellerinin, tek eksenli sıkıştırma testleri öncesinde, DDS ve HCl/NaOH ile hazırlanmış pH 4, pH 9 sulu çözeltileri içerisinde şişme dengesine gelmeleri sağlandı. 25 °C ve 37 °C’de denge şişme değerine ulaşan hidrojellerin ilk önce çap ve yükseklikleri ölçülerek kütlece ve hacimce şişme dereceleri aşağıdaki formüller yardımıyla hesaplandı (denklem 3.1 ve 3.2):

$$Q_V = (1/v_{2r})(d_{\infty}/d_r)^3 = v_{2\infty}^{-1} \quad (3.1)$$

$$Q_G = w_{\infty}/w_d \quad (3.2)$$

Burada, d_{∞} ve w_{∞} şişme dengesindeki, d_r ve w_d ise kuru haldeki hidrojinin çap ve ağırlığını ifade etmektedir. v_{2r} , sentezden hemen sonra hidrojeldeki polimerin hacim kesri olarak tanımlanır ve polimerizasyon çözeltisinin bileşimi ile hacmine bağlıdır. Denge durumundaki polimerin hacim kesrini gösteren $v_{2\infty}^{-1}$ 'in tersi ($Q_v = v_{2\infty}^{-1}$) ise hidrojinin tuttuğu suyun hacmine karşılık gelir.

Destile deiyonize suda, pH 4 ve pH 9'da bekletilerek denge şişme değerine ulaşmış hidrojel disklerinin 25 °C ve 37 °C'de mekanik sıkıştırma testleri yapıldı. Tek eksenli sıkıştırma deneyleri mekanik test cihazı ile 5N'luk kuvvet altında 1.0 cm/dakika hızında gerçekleştirdi. Sıcaklığa duyarlı hidrojeller ile çalışıldığı için ortamın sıcaklığı, deney koşullarına göre ayarlandı. Tek eksenli sıkıştırma deneyleri 1 dakikadan kısa sürede gerçekleştiğinden, ölçümler sırasında herhangi bir su kaybı olmadığı ve sıcaklığın değişmediği varsayıldı. Tüm ölçümler en az iki kez tekrarlandı ve cihazın yazılımı kullanılarak çizilen sıkıştırma gerilimi-gerinim grafiklerinin düşük gerinim bölgesindeki eğimlerinden elastiklik (E) modülü hesaplandı.

3.3.3 Katyonik PNIPAAm hidrojellerinin dinamik şişme ve büzülme ölçümleri

Şişme/büzülme deneylerinde kullanılacak hidrojel diskler öncelikle vakum etüvünde 30 °C'de sabit ağırlığa gelen kadar kurutuldu. Ardından, disk örneklerinin kuru ağırlıkları ölçüldü ve 25 °C'de DDS içerisine yerleştirilerek zamana bağlı ağırlıkları belirlendi. Bunun için, diskler belirli zaman aralıklarında DDS içerisinden çıkartılarak kurulandı ve tartı yardımıyla ağırlıkları kaydedilerek şişmesi için tekrardan DDS içerisine konuldu. Diskler şişme dengesine gelene kadar aynı işleme devam edildi ve elde edilen değerler üzerinden her bir örneğin dinamik şişme dereceleri (Q_s) hesaplandı (denklem 3.3):

$$Q_s(\%) = [(w_t - w_d)/w_d] \times 100 \quad (3.3)$$

Burada, w_t ve w_d örneklerin sırasıyla t anında ve kuru haldeki ağırlıklarını ifade etmektedir.

Dinamik büzülme deneylerinde ise, 25 °C'de şişme deneyleri gerçekleştirilen ve şişme dengesinde bulunan disk örnekleri kullanıldı. Hidrojel diskleri 37 °C'deki DDS içerisine yerleştirildi ve dinamik şişme deneylerinde olduğu gibi belirli zaman aralıklarında ağırlıkları kaydedildi. Örnekler sabit ağırlığa gelene kadar devam edilen deneyler sonucunda elde edilen ağırlıklardan büzülme derecesi (Q_{DS}) hesaplandı (denklem 3.4):

$$Q_{DS}(\%) = [(w_t - w_d)/(w_\infty - w_d)] \times 100 \quad (3.4)$$

Burada, w_∞ şişme dengesindeki hidrojinin 25 °C'deki ağırlığını, w_t ise büzülmüş hidrojinin t zamanında 37°C'deki ağırlığını ifade etmektedir.

3.3.4 L-AA yükleme/salın deneyleri

İlaç salım çalışmalarında, model ilaç olarak kanser ve gen terapisinde de sıklıkla kullanılan anyonik karaktere sahip L-AA seçildi. Katyonik PNIPAAm hidrojjellerinin salım mekanizmalarında yapısal faktörlerin etkisini incelemek amacıyla ağ yapıya yüklenen L-AA, katyonik ilaç/gen taşıyıcıları ile anyonik terapötiklerin arasındaki etkileşimler hakkında bilgi sahibi olmak için tercih edildi. İlaç salım çalışmalarında, mekanik ve şişme deneyleri sonucunda uygun özelliklere sahip olduğu belirlenen S1, S5, S6 ve S7 örnekleri kullanıldı.

İlaç yükleme deneylerinde, saflaştırılmış hidrojel diskleri vakum etüvünde sabit tartım değerine gelene kadar kurutuldu ve ağırlıkları kaydedildi. Ardından, 0,5 g/L konsantrasyonda hazırlanan L-AA stok çözeltisinden L-AA:polimer kütle oranı 0,5'e (w/w) karşılık gelecek hacimde alındı ve kuru hidrojel diski bu ilaç çözeltisinin içerisine konuldu. Şişme dengesine gelmesi için 2 gün boyunca ilaç çözeltisinde bekletilen katyonik PNIPAAm diskleri, daha sonra çözeltiden çıkartılarak 25°C'de vakum etüvünde kurutuldu. Kuru ilaç yüklü disk örneklerinin ağırlıkları kaydedilerek enkapsülasyon etkinlikleri (EE) hesaplandı (denklem 3.5):

$$EE(\%) = \frac{\text{Diske yüklenmiş L-AA miktarı (g)}}{\text{Total L-AA ağırlığı (g)}} \times 100 \quad (3.5)$$

İlaç salım deneylerinde, kurutulmuş katyonik PNIPAAm diskleri 37 °C'deki 40 mL DDS içerisine yerleştirildi. İlaç salım çözeltilerinin belirli zaman aralıklarındaki spesifik iletkenlik ($\mu\text{S/cm}$) değerleri iletkenlik cihazı ile belirlenerek zamana bağlı salınan ilacın konsantrasyonunun hesaplanmasında kullanıldı. Kalibrasyon grafiği oluşturmak için L-AA (1,76 g/L) stok çözeltisinin farklı miktarlarda DDS ile seyreltilmesi sonucunda bir dizi seyreltik L-AA çözeltileri hazırlandı ve iletkenlik değerleri kaydedildi. Elde edilen L-AA'ya ait spesifik iletkenlik (y)- konsantrasyon (x) denklemi ($y = 1,0951x + 2,2353$; $R^2 = 0.9902$) üzerinden BIS ve TAB ile çapraz bağlı P(NIPAAm-ko-DMAEMA), P(NIPAAm-ko-DMAEMA) ve P(NIPAAm-ko-MAPTAC) hidrojjellerinin L-AA salım profilleri incelendi.

3.3.5 Hidrojellerin difüzyon mekanizmasının belirlenmesi

Kuru hidrojellerin 25 °C’de DDS içerisindeki dinamik şişmeleri ve 37°C’de DDS ortamındaki L-AA salımları sırasındaki difüzyon mekanizmaları Power-Law denkleminin bağlı denklemler ile kullanılarak belirlendi (denklem 3.6 ve 3.7):

$$F_S = (w_t - w_d)/(w_\infty - w_d) = k_{DDS}t^n \quad (3.6)$$

$$F_R = M_t/M_\infty = k_{L-AA}t^n \quad (3.7)$$

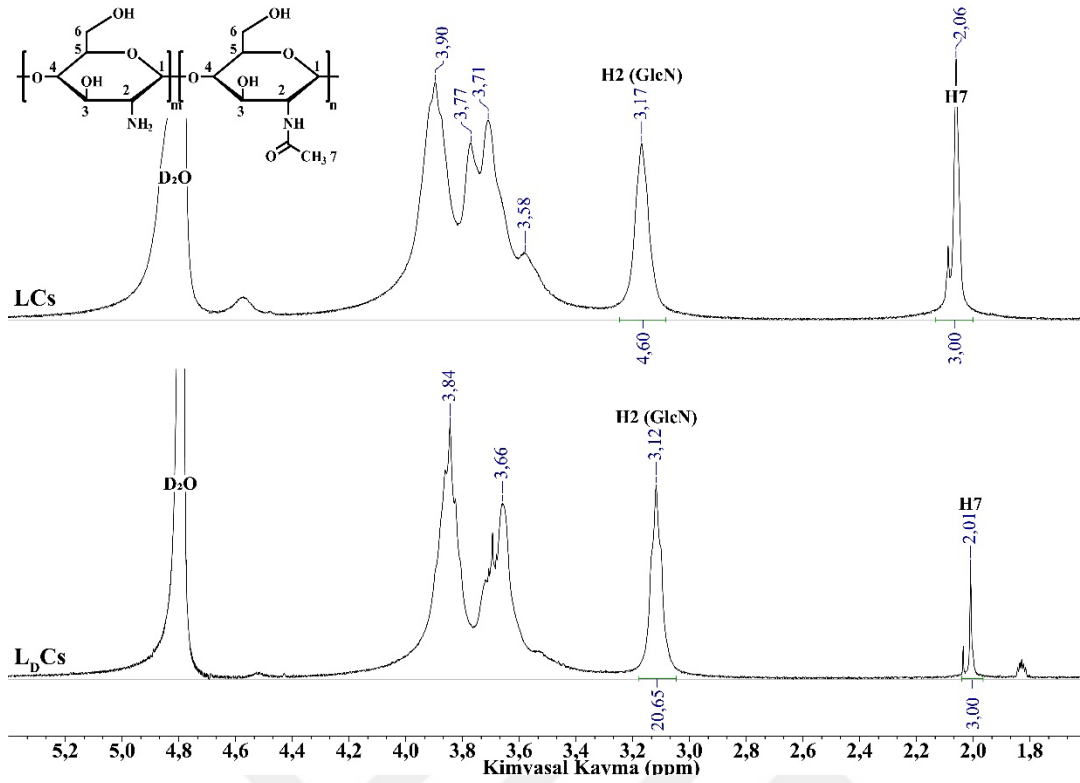
Burada, F_S ve F_R sırasıyla, t anında su içerisinde şişme ve L-AA salım kesrini ifade etmektedir.

Ayrıca F_S ve F_R değerleri kullanılarak hesaplanan ve katyonik PNIPAAm hidrojellerinin yapısal özelliklerine bağlı olan sabitler (sırasıyla k_{DDS} ve k_{L-AA}) üzerinden suyun ağ yapının içine (D_{DDS}) ve ilacın ise dışarıya (D_{L-AA}) difüzyonuna ait katsayıları belirlendi.

Bundan sonraki kısımda Cs-g-PDMAPMAAm aşısı kopolimerlerine ve ana bileşenlerine ait sentez, karakterizasyon deneyleri ve *in-vitro* çalışmalar anlatılacaktır.

3.3.6 Kitosanın deasetilasyonu

Aşısı polimerlerinin sentezinde ana bileşen olan ve $^1\text{H-NMR}$ spektrumları üzerinden deasetilasyon derecelerinin (DDA%) sırasıyla %78 ve %88 olduğu belirlenen düşük (LCs) ve orta (MCs) molekül ağırlıklı kitosanların içerisindeki amin yüzdesini arttırmak için Mima yöntemi kullanılarak deasetilasyon deneyleri gerçekleştirildi [313]. Bu işlem için, %50’lik (w/v) NaOH çözeltisi içerisinde %1’lik (w/v) kitosan çözeltisi hazırlandı ve 2 saat süresince 110 °C’de ve azot ortamında karıştırıldı. Ardından, kitosan karışımı süzülerek NaOH çözeltisinden uzaklaştırıldı, kitosanın pH’ı yaklaşık 7 olana kadar DDS ile yıkandı ve oda sıcaklığında 24 saat vakum etüvü içerisinde kurutuldu. Deaetilasyon deneyleri gerçekleştirilen düşük ($L_D\text{Cs}$) ve orta ($M_D\text{Cs}$) molekül ağırlıklı kitosanların deasetilasyon derecesinin $\text{D}_2\text{O}/\text{TFA}$ çözeltisi içerisinde gerçekleştirilen $^1\text{H-NMR}$ analizlerine ait spektrumların alanları kullanılarak belirlendi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 : LCs ve LD-Cs'nin ¹H-NMR spektrumları.

¹H-NMR (D₂O/trifloroasetik asit) spektrumunda bulunan karakteristik kitosanın sinyalleri: 1,9 ppm'de asetil glukoz amit (GlcNAc) segmentinde bulunan metil grubu (-CH₃) H7 atomları, 3,0 ppm'de glukozamidin (GlcN) H2 atomu, 3,4-4,0 ppm arası glukopiranoz halkasında bulunan anomerik olmayan C3-C6 karbonlarına bağlı H3-H6 atomları ve 4,9 ppm'de anomerik H1 atomu.

DDA hesaplamalarında kitosanın asetilglukoz amit segmentine ait -CH₃ protonları ve H2-GlcN protonlarına ait piklerin alan değerleri kullanıldı (denklem 3.8).

$$DDA \% = \left[1 - \left(\frac{1}{3} \times I_{CH_3} \right) / I_{H2-GlcN} \right] \times 100 \quad (3.8)$$

Hesaplamalar sonucunda ticari olarak satın alınan düşük (LCs) ve orta (MCs) molekül ağırlıklı ve deasetilasyon işlemi sonucunda elde edilen LD-Cs ve MD-Cs kitosanların deasetilasyon derecelerinin sırasıyla, %78, %88, %96 ve % 93 olduğu, yapıdaki amin yüzdelерinin istenilen seviyede arttırıldığı belirlendi.

3.3.7 CS-g-PDMAPMAAm aşı kopolimerlerinin sentezi

CS-g-PDMAPMAAm aşı kopolimerleri, KPS termal başlatıcı varlığında serbest radikal çözelti polimerizasyonu ile sentezlendi ve deneylerde farklı deasetilasyon derecelerine ve molekül ağırlıklarına sahip (LCs, MCs, LD-Cs, MD-Cs) ve farklı

konsantrasyonlardaki (%1 ve %2 w/v) kitosan polimerleri ile birlikte kitosanın mol oranına bağılı olarak (D:Cs) değişen konsantrasyonlarda DMAPMAAm kullanıldı (Çizelge 3.2).

Aşı polimerlerinin sentezi için öncelikle, hacimce %2'lik sulu asetik asit içerisinde 70 °C'de azot ortamında geri soğutucu altında kitosan çözeltisi hazırlandı. Ardından, karışımın içerisine değişen konsantrasyonlarda ($4,75 \times 10^{-3}$, $9,00 \times 10^{-3}$ ve $7,20 \times 10^{-2}$ mol/L) KPS ilave edilerek çözelti 30 dakika boyunca karıştırılmaya devam edildi ve kitosan zincirleri üzerinde radikaller oluşması sağlandı. Bu sürecin sonunda, azot altındaki çözeltiye damla damla DMAPMAAm monomeri eklenerek senteze 8 saat boyunca devam edildi. Elde edilen CsgD aşı kopolimerlerinin içerisindeki homopolimer yapılarını uzaklaştırmak için çöktürme ile saflaştırma yöntemi kullanıldı. Bu sebeple, sentez sonrasında aşı kopolimerleri birkaç kez asetik asitli su içerisinde çözülerek yüksek miktarda THF içerisinde çöktürüldü, süzüldü ve kurutuldu. Elde edilen sarımsı beyaz CsgD kopolimer çöktürmeleri 48 saat boyunca THF içerisinde oda sıcaklığında karıştırılarak polimerin tamamen saflaşması sağlandı. Ardından, aşı kopolimerleri vakum etüvünde kurutularak karakterizasyon işlemleri için hazır hale getirildi.

Çizelge 3.2 : CsgD aşı kopolimerlerinin sentez koşulları

Örnek No	Cs Türü	Cs (w/v%)	KPS (10^3 ;mol/L)	D:Cs(t)
CsgD-1	L _D Cs	1	4,75	6,0
CsgD-2	L _D Cs	1	4,75	8,0
CsgD-3	L _D Cs	2	4,75	8,0
CsgD-4	L _D Cs	1	9,00	6,0
CsgD-5	L _D Cs	1	9,00	8,0
CsgD-6	L _D Cs	2	9,00	8,0
CsgD-7	L _D Cs	1	72,0	6,0
CsgD-8	L _D Cs	1	72,0	8,0
CsgD-9	L _D Cs	2	72,0	8,0
CsgD-10	L _D Cs	3	72,0	8,0
CsgD-11	L _D Cs	1	72,0	10,0
CsgD-12	LCs	1	4,75	8,0
CsgD-13	LCs	2	4,75	8,0
CsgD-14	LCs	1	72,0	8,0
CsgD-15	M _D Cs	1	4,75	8,0
CsgD-16	M _D Cs	2	4,75	8,0
CsgD-17	M _D Cs	1	7,20	8,0
CsgD-18	MCs	1	4,75	8,0
CsgD-19	MCs	2	4,75	8,0
CsgD-20	MCs	1	72,0	8,0

3.3.8 Kitosanın degradesyonu

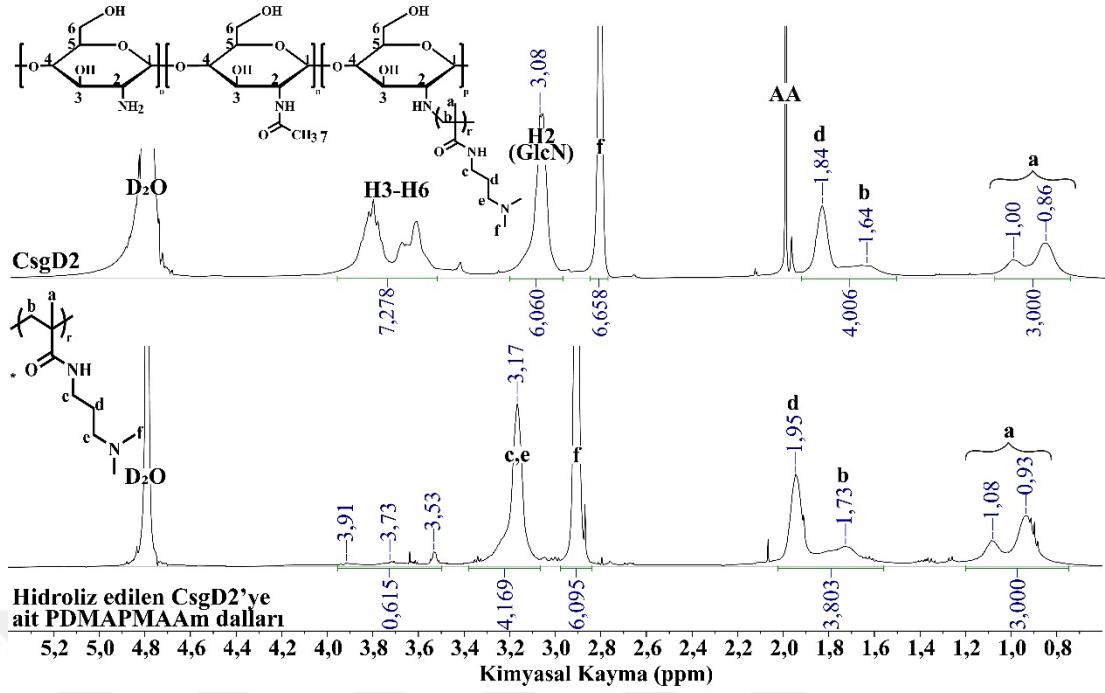
Degredasyon deneylerinde hem ticari olarak satın alınan %78 deasetilasyon derecesine sahip düşük moleköl ağırlıklı kitosan hem de deasetilasyon deneyi ile deasetilasyon derecesi yükseltilem düşük (DDA: %96) moleköl ağırlıklı kitosan polimerleri kullanıldı. Degredasyon deneyleri, CsgD aşı kopolimerlerinin sentez koşulları ile aynı olacak şekilde belirlendi ve sentez sırasında KPS'ın konsantrasyonu $4,75 \times 10^{-3}$ mol/L – $7,2 \times 10^{-2}$ mol/L aralığında seçildi.

Öncelikle kitosan polimeri hacimce %2'lik sulu asetik asit çözeltisi içerisinde 70°C 'de azot atmosferinde ve geri soğutucu altında karıştırıldı ve polimerin tamamen çözünmesi sağlandı. Ardından, çözelti içerisinde belirli konsantrasyonda KPS ilave edilerek 30 dakika azot ortamında karıştırıldı ve parçalanam kitosan polimerleri yüksek miktarda aseton içerisinde çöktürüldü. Elde edilen, beyaz çökeltiler süzölüp aseton ile yıkanarak saflaştırıldı ve vakum etüvünde kurutuldu.

3.3.9 CsgD aşı kopolimerlerinin hidrolizi ve PDMAPMAM saçaklarının eldesi

CsgD aşı kopolimerlerinin üzerindeki PDMAPMAM dallarının uzunluklarını belirleyebilmek amacıyla aşı kopolimerleri asidik koşullar altında yüksek sıcaklıkta hidroliz edilerek PDMAPMAM dallarının ana zincirden ayrılması sağlandı. Hidroliz edilecek CsgD polimerleri (%50 w/v), 6 mol/L HCl içerisinde 90°C 'de azot atmosferinde ve geri soğutucu altında 20 dakika boyunca karıştırıldı. Ardından, oluşan katı-sıvı karışımlar filtre kağıdı kullanılarak soğuması beklenmeden süzölüldü ve 0.1 mol/L NaOH ve DDS ile yıkandı. Elde edilen süzölüntü santrifüj tüplerine aktararak 25°C 'de 1000 g'de 5 dakika santrifüjlendi. Bu işlem sonrasında süzölüntünün içerisinde kalan hidroliz olmamış CsgD polimeri çöktürölerek ayrıldı ve aşı polimerlerinden ayrılan PDMAPMAM dallarının bulunduğı süpernatam sıvı kurutuldu ve $^1\text{H-NMR}$ ile karakterize edildi.

Şekil 3.2'de gösterilen ve $4,75 \times 10^{-3}$ mol/L KPS varlığında sentezlenen CsgD aşı kopolimeri ile hidroliz sonucunda elde edilen PDMAPMAM dallarına ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumları incelendiğinde, CsgD2 aşı kopolimerinde bulunan kitosamın C3-C6 karbonlarına ait H3-H6 sinyallerinin PDMAPMAM dallarına ait spektrumda gözükmediğı yani hidroliz işleminin başarıyla gerçekleştirildiğı bulguları.



Şekil 3.2 : CsgD2 aşısı kopolimeri ile PDMAPMAAm dallarına ait ¹H-NMR spektrumları.

3.3.10 PDMAPMAAm homopolimerlerinin sentezi

CsgD aşısı kopolimerlerinin hidrolizi sonucunda elde edilen PDMAPMAAm dallarının molekül ağırlıklarının çalışmanın seyrine uygun şekilde Ubbelohde viskozimetresi ile belirlenebilmesi için PDMAPMAAm homopolimerinin belirli bir sıcaklık ve çözücüdeki Mark-Houwink-Sakurada denkleminin olması gerekmektedir. Ancak, literatürde PDMAPMAAm homopolimerine ait herhangi bir çözücü koşulunda K ve a sabiti bulunmamaktadır. Bu sebeple, çalışma içerisinde yeni bir Mark-Houwink-Sakurada denklemi oluşturması hedeflendi ve bu amaç doğrultusunda farklı molekül ağırlıklarında PDMAPMAAm doğrusal homopolimerleri serbest radikal çözelti polimerizasyonu yöntemi ile sentezlendi.

Polimerizasyonun sentez koşulları, CsgD aşısı kopolimerlerinde kullanılan şartlar ile aynı olacak şekilde belirlendi ve sentez sırasında DMAPMAAm'in konsantrasyonu, 0,25 mol/L – 1,00 mol/L aralığında seçildi. Bu doğrultuda, DMAPMAAm monomeri hacimce %2'lik asetik asit çözeltisi içerisinde çözüldükten sonra polimerizasyon karışımı üzerine aşısı polimerlerinin sentezinde kullanılan miktarlarda KPS eklenerek 3.5 saat boyunca azot altında karıştırıldı. Belirlenen deney süresinin sonunda metanol içerisinde çöktürülen PDMAPMAAm polimerleri saflaştırılarak vakum etüvünde

kurutuldu. Elde edilen PDMAA homopolimerleri FTIR ve ¹H-NMR ile karakterize edildi.

3.3.11 (L/L_D/M/M_D)Cs, PDMAA ve CsgD aşı kopolimerlerinin karakterizasyonu

3.3.11.1 Kapiler viskozimetresi ile intrinsik viskozite ve molekül ağırlıklarının belirlenmesi

Kitosan, deşre edilmiş kitosan, PDMAA homopolimerleri ve hidroliz ile ayrılmış PDMAA dallarının molekül ağırlıkları kapiler viskozimetre metodu ile tayin edildi. Ayrıca CsgD aşı kopolimerlerinin de bu yöntem ile intrinsik viskoziteleri belirlendi ve elde edilen değerler dal sayılarının hesaplanmasında kullanıldı.

Viskozite ölçümleri, Schott marka 525 10/ I tipinde, ISO/DIS 3105 ve ASTM D/2515/D 446'ya göre kalibre edilmiş ve viskozite sabiti 0,008946 mm²/s² olan Ubbelohde viskozimetresi ile yapıldı. Ölçümü gerçekleştirilecek polimerler, 0,2 mol/L sodyum asetat (NaAc, CH₃COONa) içeren hacimce %2'lik asetik asit içerisinde çözüldü, 0,2 g/dL – 0,4 g/dL konsantrasyon aralığında hazırlanan kitosan, deşre kitosan ve CsgD aşı kopolimerlerinin 25 °C, PDMAA homopolimerleri ile hidroliz ile ayrılmış PDMAA dallarının ise 35°C'de akış süreleri ölçüldü. Seyreltilerek elde edilen 5 farklı konsantrasyondaki kitosan çözeltisinin ve çözücünün akış süreleri belirlendikten sonra indirgenmiş viskoziteye (η_{sp}/c) karşı konsantrasyon (c) grafikleri çizildi. Elde edilen doğrunun kayım değerleri ile intrinsik viskoziteleri [η] verdiği bilinmektedir.

Intrinsik viskozite ile viskozite ortalama molekül ağırlığı (M _{η}) arasındaki ilişkiyi veren Mark-Houwink-Sakurada denklemindeki (denklem 3.9),

$$[\eta] = K \cdot M_{\eta}^a \quad (3.9)$$

K ve a sabitleri kitosan durumunda ve 25 °C'deki 0,2 mol/L NaAc içeren %2'lik (v/v) asetik asit çözeltisinde sırasıyla, $13,8 \times 10^{-5}$ dL/g ve 0,85 olarak alınmıştır [314].

Öte yandan, PDMAA polimerlerinin ölçümlerinin 35°C'de yapılmasının sebebi, yeni bir Mark-Houwink-Sakurada denklemi oluşturmak için gereken molekül ağırlıklarının GPC cihazı ile tayin edilmesi ve kullanılan cihazın en düşük sıcaklık sınırının 35 °C'de olmasıdır.

3.3.11.2 Jel geçirgenlik kromatografisi ile molekül ağırlığı ölçümleri

CsgD aşısı kopolimerlerinin, kitosanın, degrades kitosanın, PDMAAAm homopolimerlerinin ve CSgD aşısı kopolimerlerinin hidrolizinden elde edilen PDMAAAm saçaklarının sayıca ve ağırlıkça ortalama molekül ağırlıkları ve polidispersite indeksleri (PDI) GPC cihazı ile belirlendi. Ölçümler, 0,2 mol/L NaAc içeren %2'lik (v/v) asetik asit çözeltisi taşıyıcı çözeltisinde, 1.0 mL/dk akış hızında ve 35°C'de gerçekleştirildi.

3.3.11.3 Gravimetrik analizler

CsgD aşısı kopolimerlerin aşısı verimi (grafting yield, GY) ve aşısı etkinliği (grafting efficiency, GE) aşağıdaki denklemler kullanılarak hesaplandı (denklem 3.10 ve 3.11).

$$\%GY = [(w_2 - w_1)/w_1] \times 100 \quad (3.10)$$

$$\%GE = [(w_2 - w_1)/w_3] \times 100 \quad (3.11)$$

Burada, w_1 , reaksiyon ortamına eklenen kitosanın (LCs, MCs, LDs veya MDs), w_2 , CSgD aşısı kopolimerinin ve w_3 ise sentez sırasında kullanılan DMAPMAAm monomerinin kütlesini ifade etmektedir.

Sentez sırasında polimerizasyon ortamına eklenen DMAPMAAm ve kitosanın molar oranı D:Cs(t) olarak ifade edilmektedir. Sentez sonrasında elde edilen CSgD aşısı kopolimeri içerisinde oransal olarak ne kadar DMAPMAAm monomeri bulunduğunu tayin etmek için pratik D:Cs (e veya f) oranları da hesaplandı. Pratik D:Cs değerleri hem gravimetrik hesaplamalar hem de $^1\text{HNMR}$ spektrumlarından elde edilen alanların oranları ile belirlendi. $^1\text{HNMR}$ analizlerinde glukozamin ünitelerine (GAU) ait, H3-H6 protonlarını işaret eden 3,4-3,8 ppm'deki pikler ve PDMAAAm polimerinin dimetilamino grubuna ait H(f) protonunun 2,8 ppm'de bulunan piki kullanıldı.

Yukarıda ifade edilen gravimetrik analizlerin ve molekül ağırlığı hesaplamalarının ardından çalışmanın ilerleyen sürecinde kullanılabilecek uygun CSgD aşısı kopolimerleri seçildi ve aşısı frekansları (grafting frequency, GF), substitüsyon dereceleri (SD), dal sayıları (grafting number, G_N) ve uzunlukları (length, L) hesaplandı.

Aşısı frekansı, iki aşısı noktası arasındaki glukozamin ünitelerinin sayısını (N_{GAU}) ifade etmektedir (denklem 3.12).

$$GF = M_{PDMAPMAAm}(1 - gy)/(GAU) gy \quad (3.12)$$

Burada, $M_{PDMAPMAAm}$, CsgD aşısı kopolimerinden hidroliz ile ayrılan PDMAPMAAm dallarının molekül ağırlığını, gy , GY'nin kütle kesrini ifade etmektedir. GAU değeri olarak, seçilen kitosanın bir ünitesinin molekül ağırlığı (~165 g) kullanılmıştır. SD ise her bir mol GAU ünitesine aşıl原因 PDMAPMAAm zincirinin molünü ifade etmektedir ve GF'nin tersi olarak tanımlanır ($1/GF$).

CsgD aşısı kopolimerlerinin dal sayısı ve uzunluklarının hesaplanmasında ise üç farklı yöntem kullanıldı ve formüller ayrı bir başlık altında verildi.

3.3.11.4 CsgD aşısı polimerlerinin dal sayısının ve uzunluğunun belirlenmesi

Dal sayısı ve uzunluğunun hesaplamasında hidroliz ve kapiler viskozite metodlarına dayalı deneysel ve polisakkaritlerin persülfat (APS, KPS gibi) başlatıcıları varlığında sentezlenen aşısı kopolimerleri için teorik olarak türetilen bir formül kullandı.

Deneysel dal sayısının hesabı, Zimm ve Stockmayer'ın 1949 yılında kantitatif olarak ölçümü mümkün olmayan dallanmış uzun polimer zincir uçlarının kareleri ortalamasını $\langle s^2 \rangle$ hesaplamak için zincir konfigürasyonu istatistiğini kullanarak geliştirdiği yöntemeye dayalıdır. Bu yöntemde, dallanmış polimerlerin jirasyon yarı çapını belirlemek için doğrusal polimerlerin jirasyon yarı çapları ve dallanmış yapının segment sayısına bağlı bir bağıntı üzerinden, 1000 karbon başına düşen dal sayısını gösteren g faktörü tanımlanmıştır. Bu faktör, dallanmış zincirlerin jirasyon yarıçapının doğrusal polimerin jirasyon yarıçapına oranını ifade eder. Dolayısıyla, g faktörü yardımı ile dallanmış yapıların sadece jirasyon yarıçapları değil dal sayıları da hesaplanabilir (denklem 3.13) [315].

$$g = \left[\frac{\langle s^2 \rangle_{aşıl}}{\langle s^2 \rangle_{doğrusal}} \right] = \left[\left(1 + \frac{G_N}{7} \right)^{1/2} + \frac{4}{9} \frac{G_N}{\pi} \right]^{-1/2} \quad (3.13)$$

Doğrusal zincirler için g faktörü 1'e eşittir ve aşıl原因ma derecesi ile ters orantılı olarak değişmektedir. 1959 yılında Zimm ve Kilb, dallanmış polimerlerin intrinsik viskozitelerinin aynı molekül ağırlığındaki doğrusal eşdeğerlerine göre daha düşük olmasından hareketle, dallanmış yapılara ışık tutmak için intrinsik viskozitenin ($[\eta]$) hidrodinamik teorisi üzerine çeşitli hesaplamalar yapmışlardır. Polimer çözeltilerinin intrinsik viskoziteleri, polimer zincirlerinin hidrodinamik hacimlerinin bir ölçüsüdür

ve Flory- Fox denklemindeki zincir uçlarının kareleri ortalamasını ile bağlantılıdır (denklem 3.14 ve 3.15).

$$[\eta] = \varphi 6^{3/2} (< s^2 >_{aşı}^{3/2}) / M = \varphi' (< s^2 >_{aşı}^{3/2}) / M \quad (3.14)$$

$$< s^2 >_{aşı} = ([\eta] M / \varphi')^{2/3} \quad (3.15)$$

Flory-Fox eşitliklerinden yola çıkılarak yapılan bu hesaplamalarda akışa direnci olan (nondraining) ve olmayan (drainig) polimerler için ayrı denklemler türetilirken, akışa dirençli polimerler için g' ile gösterilen yeni bir faktör tanımlanmıştır (denklem 3.16).

$$g' = ([\eta]_{aşı} / [\eta]_{doğrusal}) \quad (3.16)$$

Aşağıdaki eşitlikler, üç fonksiyonlu dallanma noktaları bulunan polimerlerin dal sayılarının intrinsik viskozite oranı ile hesaplanan g ve g' faktörlerine bağlı olduğu göstermektedir (denklem 3.17 ve 3.18) [316].

$$g' = ([\eta]_{aşı} / [\eta]_{doğrusal}) = [(1 + [G_N / 7])^{1/2} + (4G_N / 9\pi)]^{-1/4} \quad (3.17)$$

$$g = ([\eta]_{aşı} / [\eta]_{doğrusal})^{2/3} = [(1 + [G_N / 7])^{1/2} + (4G_N / 9\pi)]^{-1/2} \quad (3.18)$$

Bu iki bağıntı, çok sayıda aşı noktası içeren polimerler için iç viskozitelerin oranına bağlı olarak G_N değerinin g' ve g'ye bağımlılığını göstermektedir.

Bu tez çalışmasında kitosan zincirleri üzerine aşılansmış PDMAAPMAAm polimerlerine ait dal sayıları, kapiler viskozimetre ile belirlenen intrinsik viskoziteleri üzerinden üç fonksiyonlu dallanma noktaları taşıyan polimerler için türetilmiş olan eşitlik kullanılarak hesaplandı. Elde edilen g' parametreleri üzerinden hesaplanan G_N değerleri, 1000 GAU başına düşen dal sayısını göstermektedir.

Deneyssel dal uzunluklarında ise CsgD aşı kopolimerlerinin hidrolizinden elde edilen PDMAAPMAAm dallarının kapiler viskozimetre ile belirlenen molekül ağırlıkları ile hesaplandı.

Teorik dal sayısı ve uzunluğu, persülfat başlatıcısı ile polisakkarit ve aşılansacak monomerin mol sayılarını kullanarak oluşturulan denklemler yardımıyla hesaplanmaktadır (denklem 3.19 ve 3.20) [317–319]:

$$G_{N,t} = \frac{2.f.m_{persülfat}.M_{polisakkarit}}{M_{persülfat}.m_{polisakkarit}} = 2.f.n_{KPS} / n_{CS} \quad (3.19)$$

Burada, G_{N,t} teorik dal sayısını, 2 sayısı her bir KPS molekülünün ürettiği serbest radikal miktarı, f persülfat başlatıcısının homolitik parçalanması sonucu zincir

büyümesini başlatabilecek serbest radikallerinin oranını, $m_{\text{persülfat}}$ ve $m_{\text{polisakkarit}}$, sırasıyla persülfat başlatıcıların ve polisakkaritin sentez sırasında kullanılan ağırlıklarını, $M_{\text{persülfat}}$ ve $M_{\text{polisakkarit}}$ ise persülfatın ve şeker halkasının molekül ağırlıklarını ifade etmektedir.

$$L_t = \frac{m_{\text{monomer}} \cdot M_{\text{monomer}}}{(m_{\text{polisakkarit}} / M_{\text{polisakkarit}}) \times G_N} = n_{\text{DMPMAAm}} / n_{\text{CSx}} G_N \quad (3.20)$$

L_t teorik dal uzunluğu, m_{monomer} ve M_{monomer} ise sırasıyla monomerin sentez sırasında kullanılan ağırlığı ile molekül ağırlığıdır.

Teorik dal sayısı hesabına ait denklem kullanırken en önemli parametre KPS'in f değeridir ve belirli bir t zamanında reaksiyon ortamında parçalanmadan kalan KPS ve başlangıçtaki KPS konsantrasyonu kullanılarak hesaplanmaktadır ($f = 1 - [\text{KPS}] / [\text{KPS}]_0$). Parçalanmadan kalan KPS'in t zamanında konsantrasyonu literatürde bulunan birinci mertebe kinetik denklemi ile hesaplanabilir ($\ln ([\text{KPS}] / [\text{KPS}]_0) = -k_d t$) [320, 321]. Bu tez çalışmasında, aşı kopolimerlerinin sentez süresi 8 saat olduğu için parçalanmadan kalan KPS konsantrasyonu ve f değeri bu zaman aralığı baz alınarak belirlendi. Hız sabiti (k_d) olarak, CsgD aşı kopolimerlerinin polimerizasyon sıcaklığı olan 70 °C'deki k_d değeri kullanıldı ($9,23 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$) [322].

3.3.12 CgD aşı kopolimerlerinin pH'a bağlı çözünürlüklerinin araştırılması

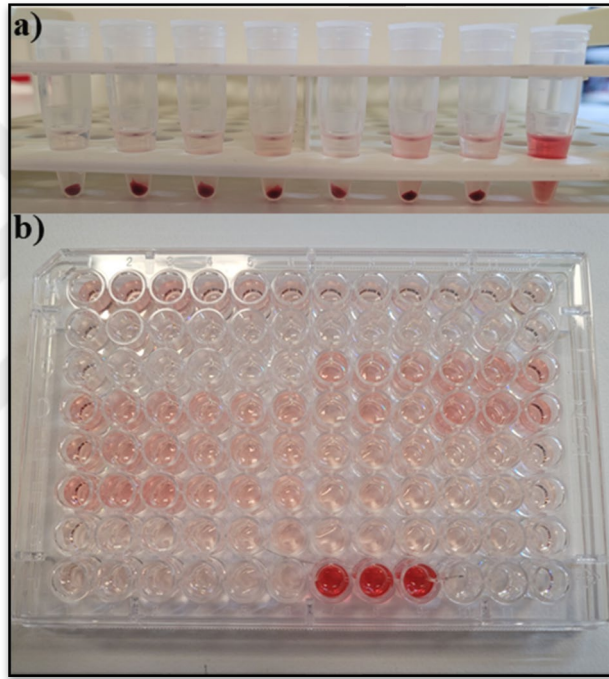
5 mg/mL konsantrasyonda CgsD aşı kopolimerleri pH 7.4 PBS çözeltisi içerisine ilave edilerek 25 °C'de karıştırıldı. Çözünmeyen örneklerin, çözelti içerisinde homojen olarak dağılmalarını sağlamak için Bandeln marka ultrasonik homojenizatör (%50 genlik, 2 dakika) kullanıldı. Ardından, polimer çözeltileri içerisine 0.1 M HCl çözeltisi damla damla ilave edilerek polimerlerin tamamen çözüldüğü pH değeri belirlendi.

3.3.13 CsgD aşı kopolimerlerinin hemolitik aktivitelerinin incelenmesi

Hemoliz testlerinde, sağlıklı bir gönüllüden EDTA'lı tam kan tüpüne alınan 5 mL kan, 500 g kuvvetinde 5 dakika boyunca santrifüjlenerek eritrositlerin (kırmızı kan hücreleri) plazmadan ayrılması sağlandı. Elde edilen eritrositler, pH 7,4 PBS çözeltisi ile iki defa yıkanarak pH 7,4 PBS çözeltisi ile mikrolitre başına 5×10^5 eritrosit olacak şekilde seyreltilti. Hemoliz testlerini gerçekleştirmek için, 3 tekrar olacak şekilde 0,5, 1, 2, 3, 4 ve 5 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan düşük molekül ağırlığına sahip deasetillenmiş kitosan ($L_D\text{Cs}$), PDMPMAAm homopolimeri, CsgD kopolimerleri mikro tüplere alınarak üzerine 100 µL eritrosit içeren çözelti ilave edildi ve toplam

hacim PBS ile 500 µL tamamlandı. Ayrıca hemolitik aktivitenin olmadığını ifade eden negatif kontrol için polipeksler yerine PBS, tüm kan hücrelerinin parçalanması ile en yüksek hemolitik aktiviteyi işaret eden pozitif kontrol için ise %1 (v/v) Triton X-100 çözeltisi kullanıldı. Kırmızı kan hücresi eklenen test grupları 37 °C’de 1 saat inkübe edilerek eritrositleri ayırmak amacıyla 2000 g kuvvetinde 5 dakika santrifüjlendi (Şekil 3.3a) ve 200 µL süpernatant çözeltileri 96 kuyucuklu plakalara aktarıldı (Şekil 3.3b). Çözeltilerin marka çoklu mikropilaka okuyucusu ile 541 nm’deki UV absorbansları kaydedilerek hemoliz yüzdeleri hesaplandı (denklem 3.21).

$$\% \text{ Hemolitik Aktivite} = \frac{(\text{Örnek Abs.} - \text{Negatif Kontrol Abs.})}{(\text{Pozitif Kontrol Abs.} - \text{Negatif Kontrol Abs.})} \times 100 \quad (3.21)$$

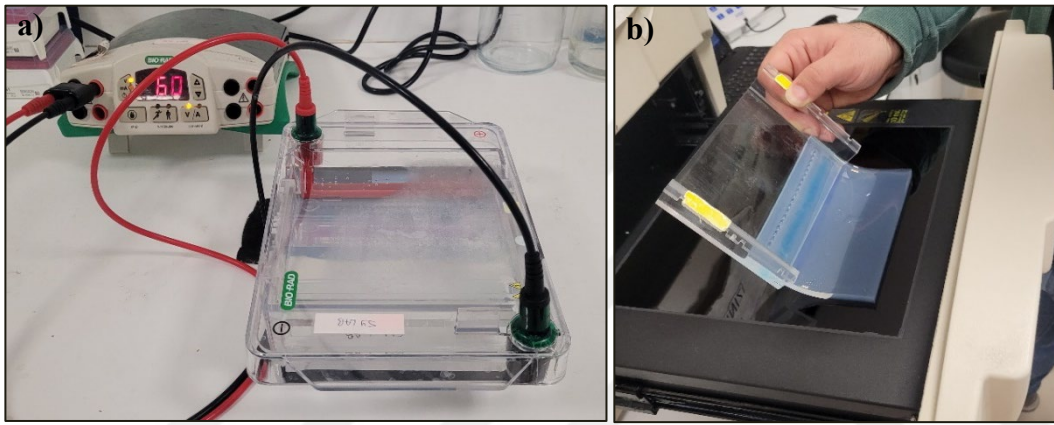


Şekil 3.3 : a) Santrifüj sonrasında çöken ve/veya patlayan kırmızı kan hücreleri b) 96 kuyucuklu plakalara aktarılan süpernatant çözeltileri.

3.3.14 CsgD/ anti-GAPDH siRNA polipekslerinin hazırlanması ve agaroz jel elektroforez yöntemi ile taşıyıcıların siRNA yükleme kapasitelerinin belirlenmesi

CsgD aşısı kopolimerleri ve anti-GAPDH siRNA’nın elektrostatik etkileşimleri ile 1:1, 2,5:1, 5:1, 7,5:1, 10:1, 20:1, 30:1 ve 40:1 polimer:siRNA kütle oranlarına sahip nano boyutlu polipeksler hazırlandı. Bunun için, nükleaz içermeyen su içerisinde hazırlanan anti-GAPDH siRNA ve katyonik yapıya sahip CsgD aşısı kopolimerleri farklı polimer:siRNA kütle oranlarında karıştırılıp kompleksleşmenin tamamlanması

yani, polipekslerin oluşması için oda sıcaklığında (~23 °C-24 °C) 20 dakika boyunca inkübe edildi. Ardından, katyonik polimerlerin siRNA bağlama etkinlikleri agaroz jel elektroforez ile incelendi. Bunun için, elektroforez tankı tris baz, asetik asit ve EDTA ile hazırlanan TAE tamponu ile doldurulup 5 µL Red Safe™ içeren 100 mL TAE tamponu ile (%1.0'lik w/v) hazırlanmış agaroz jel tank içerisine daldırıldı ve sırasıyla markör DNA, serbest siRNA ve polipeksler jel kuyularına eklenerek sisteme 60 V gerilimde 1 saat boyunca yürütüldü (Şekil 3.4a). Jel, Bio-Rad ChemiDoc XRS+ marka görüntüleme sistemi ile fotoğraflandı ve BD ImageLab yazılımı ile analiz edildi (şekil 3.4b).



Şekil 3.4 : a) Agaroz jel elektroforez sistemi b) ChemiDoc XRS+ görüntüleme sistemi.

3.3.15 CsgD/ anti-GAPDH siRNA polipekslerinin boyut ve zeta potansiyellerinin belirlenmesi

Agaroz jel elektroforez yöntemi ile tam kompleksleşmenin belirlendiği en düşük polimer:siRNA kütle oranında DLS cihazı ile ölçüldü. Boyut analizlerinde 173° saçılım açısında (geri saçılım) bulunan dedektör kullanılmış olup sonuçlar şiddete bağlı olarak (by intensity) PDI değerleri ile raporlandı. Polipekslerin bağlanma etkinlikleri, boyutları ve zeta potansiyelleri değerlendirilerek *in vitro* çalışmalar için kullanılacak en uygun yük, boyut ve polimer:siRNA kütle oranına sahip örnekler belirlendi. Tüm ölçümler üç kez tekrarlandı.

3.3.16 *In vitro* çalışmalar

3.3.16.1 Hücre kültürü prosedürü

Yapılan *in vitro* çalışmaların ilk aşamasında testlerde kullanılan hücrelerin büyütülmesi ve kullanılacak plakalara tutunmasının sağlanması gerekmektedir. Bunun için, hücrelerin kuyulara ekimi için hazırlanması ve hücre konsantrasyonu belirlenmelidir. Genel hücre pasajlama prosedürü aşağıdaki gibi gerçekleştirildi:

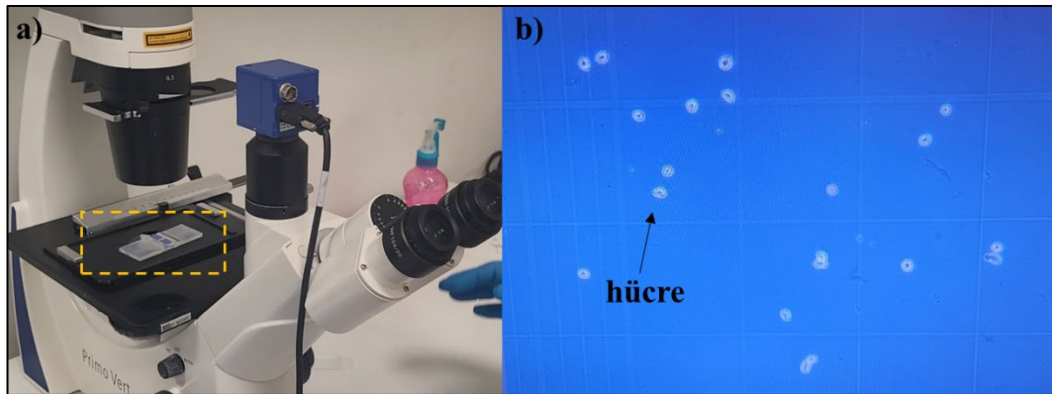
Kullanılacak insan dirençli meme kanseri hücre hattı “MDA-MB-231”, %10 fetal bovin serum (FBS), %1 MEM nonesansiyel amino asit, ve %1 penisilin/streptomisin takviyesi içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ilave edilmiş T75 petri kabı içerisinde 37 °C, %5 CO₂ atmosferinde inkübe edilerek çoğaltıldı.

T75 petri kabı %70-%80 hücre doluluk oranına ulaştığında PBS ile yıkandı ve üzerine serin proteaz enzimi olarak ifade edilen tripsin EDTA eklenerek 37 °C’de etüvde bekletildi ve hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlandı.

Ardından, petri içerisindeki çözelti santrifüj tüpüne aktararak 5 dk 2000 rpm’de santrifüjlendi, dibe çöken hücreler toplandı ve hemositometre (Şekil 3.5a) üzerine aktararak tripan mavisi ile boyandı.

Boyalı hücreler mikroskop altında sayılarak hücre konsantrasyonu (hücre sayısı/mL) belirlendi ve kuyulara ekilecek toplam hücre miktarı için gerekli çözelti hacmi hesaplandı (Şekil 3.5b).

DMEM içerisinde hazırlanan MDA-MB-231 hücreleri, 24 veya 96 kuyucuklu plakalara kuyu başına 10⁴ hücre olacak şekilde ekilerek gece boyunca 37°C’de inkübe edilip hücrelerin yüzeye tutunması sağlandı.



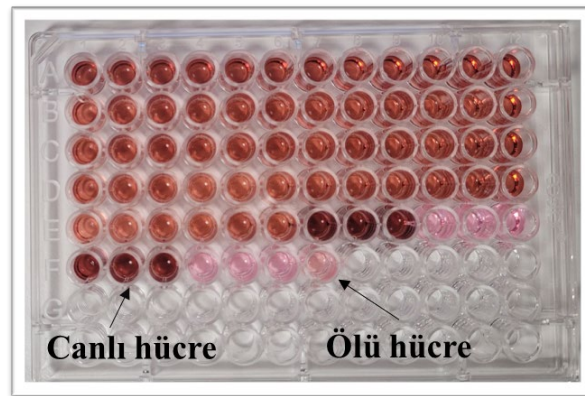
Şekil 3.5 : a) hemositometrenin b) mikroskop altındaki hücrelerin görüntüsü.

3.3.16.2 CsgD/ anti-GAPDH siRNA poliplekslerinin hücre canlılığına etkisinin incelenmesi

Sitotoksosite çalışmalarında, agaroz jel elektroforez yöntemi ile belirlenen en düşük polimer:siRNA kütle oranına sahip poliplekslerin (CsgD2,CsgD5 ve CsgD8 için sırasıyla kütlece 5:1, 7.5:1 ve 2.5:1) ve bu poliplekslere karşılık gelen CsgD aşı kopolimerlerinin hücre canlılığına olan etkileri “CellTiter96 AQueousOne Solution Cell Proliferation Assay” (MTS) yöntemi ile belirlendi.

MDA-MB-231 hücreleri 96 kuyucuklu plakalara, kuyu başına 10^4 hücre olacak şekilde besiyeri içinde ekildi ve gece boyunca kuyu yüzeyine tutunmaları için fizyolojik koşullarda inkübe edildi. Ertesi gün yüzeye tutunan hücrelerin besiyeri uzaklaştırılıp üzerlerine farklı konsantrasyonlara sahip CsgD/ anti-GAPDH siRNA polipleksleri (0,5, 1.5, 10 ve 25 $\mu\text{g/mL}$) veya CsgD kopolimerleri (25 $\mu\text{g/mL}$) üç tekrar olacak şekilde ilave edilerek 24 saat 37 °C’de inkübasyonu sağlandı. Ardından, hücreler ile uzun süre etkileşen polipleksleri/kopolimerleri içeren çözelti uzaklaştırıp yerine 100 μL serum içermeyen besiyeri ve 10 μL MTS çözeltisi eklenerek 2 saat süresince 37 °C’de inkübe edildi.

MTS bileşiği, (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolyum), fenazin metosülfat varlığında canlı hücreler tarafından biyolojik olarak indirgenir ve yapıda formazon oluştuğu için hücre çözeltisinin rengi pembeden bordoya döner (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 : CsgD aşı kopolimerleri ile etkileşen hücrelerin MTS testi sonrasında oluşturdukları formazona bağlı renk değişimleri.

MTS çözeltisi ile inkübe edilen hücrelerde oluşan suda çözünür renkli formazon varlığını/miktarını tayin edebilmek için çoklu mikropilaka okuyucusu ile UV absorpsanları 490 nm’de kaydedildi. Pozitif kontrol olarak işlem görmemiş hücreler

kullanılırken negatif kontrol için MTS çözeltisi ilave edilmemiş hücreler kullanıldı ve test kuyularından elde edilen bulgular ile aşağıda verilen denkleme bağlı olarak hücre canlılıkları belirlendi (denklem 3.22).

$$\% \text{ Hücre Canlılığı} = \frac{(\text{Örnek Abs.} - \text{Negatif Kontrol Abs.})}{(\text{Pozitif Kontrol Abs.} - \text{Negatif Kontrol Abs.})} \times 100 \quad (3.22)$$

3.3.16.3 CsgD/ anti-GAPDH siRNA polipekslerinin transfeksiyon etkinliğinin belirlenmesi

CsgD aşı kopolimerlerinin transfeksiyon etkinliklerini belirlemek için hem anti-GAPDH siRNA hem de kontrol amaçlı olarak CsgD/ anti-GAPDH siRNA polipeksleri ile polimer:siRNA kütle oranında ve ‘karıştırılmış dizilimde’ (scrambled, SCR) GAPDH siRNA ile hazırlanan polipeksler kullanıldı. Polipekslerin taşıma kapasitelerini, etkinliklerini belirlemek ve ticari bir taşıyıcı olan lipofektamin ile kıyaslamak için Invitrogen™ firmasından temin edilen “KDalert™ GAPDH Assay Kit” kullanıldı ve hücre içerisindeki GAPDH protein düzeyleri tayin edildi. İnsan, fare ve sıçan hücrelerinden hızlı bir şekilde GAPDH protein seviyelerinin tayinini, enzimatik aktivitedeki değişimin florometrik olarak ölçülmesi ile olanak sağlayan bu kit siRNA etkinliği ve taşıyıcı veriminin tayininde sıkça kullanılan bir yöntemdir. Üretici tarafından sağlanan protokol takip edilerek deneyler gerçekleştirildi.

Süreç kısaca özetlenecek olursa 4×10^4 MDA-MB-231 hücresi 24-kuyulu plakalara besi yeri içinde ekilip gece boyunca kuyu yüzeyine tutunmaları beklendi. Ardından, anti-GAPDH siRNA ve SCR GAPDH siRNA ile hazırlanan CsgD/siRNA polipeksleri ile lipofektamin kompleksleri, CsgD2, CsgD5 ve CsgD8 için sırasıyla 5:1, 7,5:1 ve 2,5:1 polimer:siRNA kütle oranında hazırlanarak FBS içermeyen besi yeri içinde bulunan hücrelerin üzerine 4 saat boyunca uygulandı. İnkübasyon ardından kuyular PBS ile yıkanarak hücreler üzerine taze besi yeri eklendi ve transfeksiyonun tamamlanması için 48 saat boyunca fizyolojik koşullarda inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler PBS ile yıkanıp kit içeriğinde bulunan liziz tampon çözeltisi (KDalert Lysis Buffer) ile parçalanıp her bir kuyudaki toplam protein konsantrasyonu Bradford yöntemi ile belirlendi. Her gruptan eşit miktarda total protein çözeltisi 96-kuyulu şeffaf tabanlı, siyah duvarlı plakaya aktarıldı ve üzerine taze hazırlanmış KDalert master karışımı eş zamanlı eklenerek plaka okuyucuya yerleştirildi. Kinetik modda dakikada 1 ölçüm alacak şekilde çözeltiler 560 nm’de uyarılıp 590 nm’de floresans şiddetleri 16

dakika boyunca kaydedildi. GAPDH protein seviyelerindeki değişim örneklerin floresans şiddetindeki artışın hiçbir işlem görmemiş hücrelerdeki (untreated, UT) artış ile kıyaslanarak hesaplandı.



4. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Günümüzde, hastalıkların etkin bir şekilde tedavi edilebilmesi için hem ilaç hem de gen salımı gerçekleştirebilen nano boyutlu ikili sistemlerin tasarlanması oldukça yaygındır ve katyonik polimerler de sahip oldukları başarılı özellikler ile bu alanda özel bir yere sahiptir. Katyonik polimerler özellikle çevre uyaranlarına duyarlı ve biyoyumluluğu yüksek doğal ve sentetik polimerlerle beraber kullanıldığında hedef hücre, organ ve hastalığa göre özelleştirilmiş ilaç/gen taşıyıcı sistemler oluşturulmaktadır. Örneğin, tümör hücrelerinin pH ve sıcaklığı sağlıklı dokulardan farklı olduğu için kanser terapisinde taşıyıcı olarak hem sıcaklık hem de pH duyarlı polimerik sistemler tercih edilmektedir. PNIPAAm sahip olduğu vücut sıcaklığına yakın VPTT'si, kitosan ve PDMAEMA gibi doğal ve sentetik katyonik polimerler ise aynı zamanda pH duyarlı davranış göstermeleri sayesinde ilaç/gen taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Literatürde, kitosan/PNIPAAm, PNIPAAm/PDMAEMA (veya P(NIPAAm-*ko*-DMAEMA)) ve kitosan/PDMAEMA aşırı kopolimerleri ve çapraz bağlı ağ yapıları hakkında birçok çalışma mevcuttur.

Hücreye gönderilecek taşıyıcının küçük boyutlu olması, katyonik yükünün dengeli olması, endozomdan kaçabilmesi ama hepsinden önemlisi biyolojik olarak uyumlu ve zararsız olması gerekmektedir. Sentetik katyonik polimerler, yük yoğunlukları sebebiyle genellikle sitotoksik etkiye sahipken katyonik biyopolimer olan kitosan ise biyobozunur ve biyoyumlu yapısıyla ilaç/gen taşıyıcısı geliştirilirken en çok kullanılan polimerlerden bir tanesidir. Öte yandan, kitosanın çözünürlük problemi ve özellikle gen terapisindeki etkinliğinin düşük olması kullanımını kısıtlamaktadır. Bu durum, sentetik polimerler ve kitosanın bir arada kullanıldığı ilaç/gen taşıyıcı sistemler geliştirilmesi gerekliliğini ortaya çıkartmıştır.

Doğrusal ve çapraz bağlı katyonik polimer tabanlı taşıyıcıların biyoyumlu olmalarının yanı sıra vücut içerisindeki iyonik şiddete, basınca ve komşu hücrelerin kuvvetine karşı dayanıklı olmaları da gerekmektedir. Mekanik özellikler sadece vücut içi dengelere/kuvvetlere değil malzemenin pH ve sıcaklık gibi çevre uyaranlarına karşısındaki şişme/büzülme davranışlarına da bağlı olarak değişmektedir. Örneğin, vücut içerisine yerleştirilebilen (implant) veya oral yolla alınabilen (tablet) makro yapıları kontrollü salım sistemlerinin fizyolojik faktörlerin değişimi karşısında bütünlüklerini korumaları çok önemlidir. Bu nedenle, şişme/büzülme davranışları ve

mekanik özellikleri malzemenin uygulanabilirliğini gösteren en önemli fiziksel özelliklerdendir. Özellikle, ilaç taşıyıcı ve yara örtüsü olarak kullanılan sistemlerde malzemelerin mekanik dayanımlarının belirlenmesi için yapılan sıkıştırma/çekme testleri nano/mikro sistemlere göre yukarıda tanımlanan makroskopik ağ yapılarında daha hızlıdır ve kolay uygulanabilir.

Bu tez çalışmasının esas amacı, ilaç ve gen taşıyabilecek, biyomedikal alanlarda kullanımı yaygınlaşmaya başlamış, PDMAAm içeren doğrusal veya çapraz bağlı yeni katyonik polimerler tasarlamak, karakterize etmek ve uygun kombinasyonları belirleyerek literatüre bu konuda kapsamlı bir bilgi sunmaktır. Bu noktadan hareket ederek, tez çalışması, ilaç salım için tasarlanan pH ve sıcaklık duyarlı PNIPAAm tabanlı DMAEMA, DMAPMAAm ve MAPTAC komonomerlerini içeren katyonik hidrojellerin ve gen terapisi için tasarlanan Cs-g-PDMAAm aşılı kopolimerlerinin sentezi, biyofiziksel ve biyokimyasal özelliklerinin belirlenmesi ile uygulama alanlarına bağlı salım/transfeksiyon çalışmalarını içeren, iki kısımdan oluşmaktadır.

Bu çalışmanın ilk kısmını oluşturan PNIPAAm tabanlı makro yapıları hidrojellerin temel ve ikincil bileşenleri olan NIPAAm, DMAEMA, DMAPMAAm ve MAPTAC'ın biyolojik çalışmalar açısından güncel önemleri tek tek ele alınacak olursa;

PNIPAAm vücut sıcaklığına yakın faz geçiş sıcaklığı sayesinde yıllardır özellikle, biyomedikal alanlardaki sıcaklığa duyarlı polimerik malzemelerin hazırlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Öte yandan, PNIPAAm'in geleneksel hidrojellerinin mekanik dayanımlarının düşük olduğu bilinmektedir. Biyomedikal alanlarda en çok kullanılan katyonik monomerlerden biri DMAEMA'dır. Son zamanlarda DMAPMAAm'in kuvaternize edildiği ve pH duyarlı davranış göstermediği türevlerinin kullanımı da yaygınlaşmaktadır. Öte yandan, kuvaternize edilmemiş DMAPMAAm'in özellikle gen terapisinde kullanımı hakkında literatürde çok fazla bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışmada, DMAEMA, DMAEMA'nın ester gruplarının amit grupları ile yer değiştirdiği DMAPMAAm ve DMAPMAAm'in kuvaternize türevi MAPTAC katyonik komonomerler olarak kullanıldı ve PNIPAAm tabanlı hidrojellerinin mekanik özelliklerine, şişme/büzülme davranışlarına ve anyonik terapötikleri salım mekanizmalarına moleküller arası etkileşimlerin diğer bir deyişle ikincil kuvvetlerin etkileri incelendi. PNIPAAm bazlı katyonik hidrojellerinin

sentezinde, çalışmanın ikinci kısmında da olduğu gibi, çeşitli başlatıcı/çözücü kombinasyonlarının ürün yapıları üzerindeki etkileri araştırıldı.

4.1 Katyonik PNIPAAm Hidrojellerinin Hazırlanması

Hem sıcaklık hem pH duyarlı katyonik PNIPAAm hidrojelleri iki farklı kimyasal çapraz bağlayıcı (BIS ve TAB) ve üç tür komonomer (DMPMAAm, DMAEMA ve MAPTAC) kullanılarak hazırlandı. Temsili jelleşme reaksiyonları Şekil 4.1’de gösterilen hidrojellerin sentezleri, polimerizasyon sıcaklığına (25°C ve 50°C) ve çözeltiye (0,1 N NaOH, DDS ve 1,4-dioksan) bağlı olarak, redoks çiftleri olan KPS/NaOH, KPS-TEMED veya AIBN termal başlatıcısı varlığında gerçekleştirildi. Saflaştırma aşamaları, tek eksenli sıkıştırma testleri ve şişme süreçleri esnasında, malzemenin şişme derecesi ve sıkıştırma modülü gibi özelliklerini sadece polimerizasyon çözücüsünün ve başlatıcının türünün değil, şişme ortamının sıcaklığı/pH’ı, katyonik komonomerlerin ve çapraz bağlayıcıların kimyasal yapılarının da önemli ölçüde etkilediği gözlemlendi. Jelleşme reaksiyonlarının üç büyük hedefi çapraz bağlı polimerik malzemenin homojenliğini, şişme derecesini ve mekanik özelliklerini iyileştirmektir. Uygun polimerizasyon çözücü/başlatıcı sistemini seçmek, yukarıda belirtilen temel fiziksel özellikleri kontrol eden reaksiyon koşullarından sadece bir tanesidir. Şekil 4.2’de DDS/KPS-TEMED, 0,1 N NaOH/KPS ve 1,4-dioksan/AIBN kullanılarak sentezlenen P(NIPAAm-ko-DMPMAAm)/BIS hidrojellerin gerilim-gerinim eğrileri, sıkıştırma modülleri ve fiziksel görünüşleri, Şekil 4.3’te ise çözücü/başlatıcı çiftlerinin ve çapraz bağlayıcıların, hem sıcaklık hem pH’a duyarlı P(NIPAAm-ko-MAPTAC) hidrojellerinin DDS içinde 25 °C’deki kütlece şişme derecelerine etkisi gösterilmektedir. Bu tez çalışmasında, DMPMAAm, şişme-mekanik dayanım-şeffaflık üçlüsü için uygun koşulları elde etmek amacıyla model komonomer olarak seçildi. Bu sebeple, DMPMAAm’in kopolimerizasyon reaksiyonlarından ikisi 25 °C’de DDS/KPS-TEMED ve 0,1 N NaOH/KPS çözücü/başlatıcı çifti kullanılarak gerçekleştirildi.

$$\begin{array}{c} \text{NIPAAm} \\ \text{HC}=\text{CH}_2 \\ | \\ \text{C}=\text{O} \\ | \\ \text{NH} \\ | \\ \text{CH} \\ | \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CH}-\text{CH}_3 \end{array}$$

Komonomer: DMAEMA DMAPMAAm MAPTAC

Çapraz Bağlayıcı:

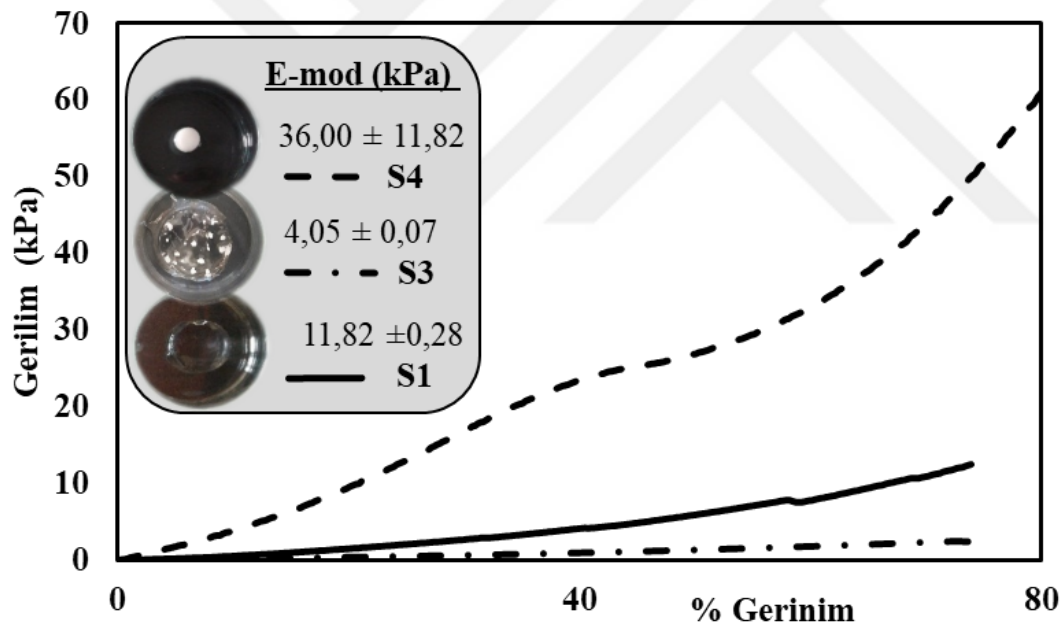
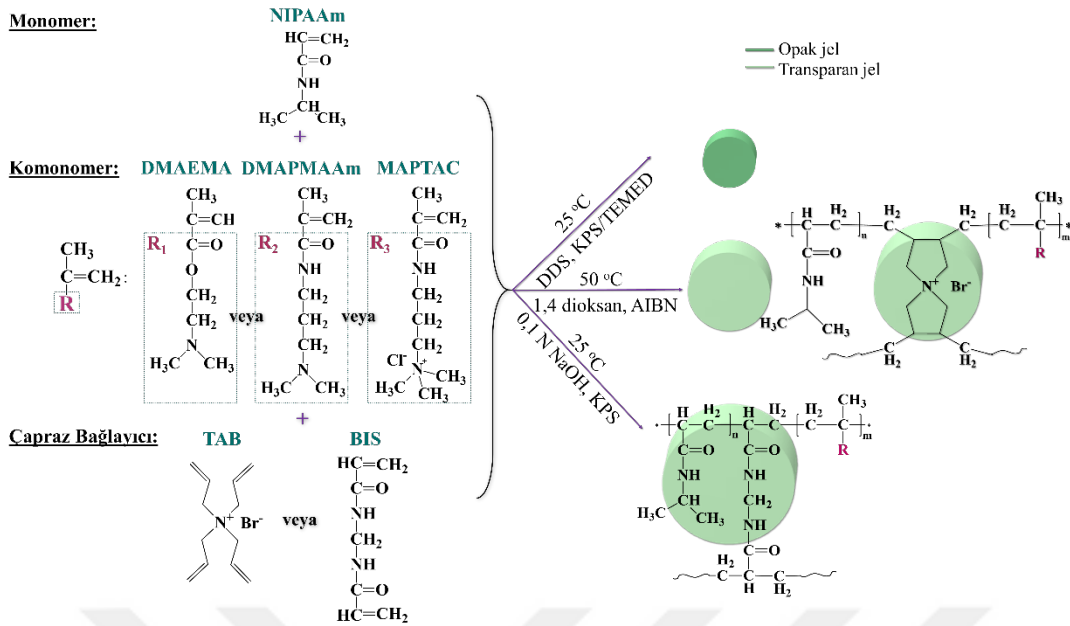
TAB

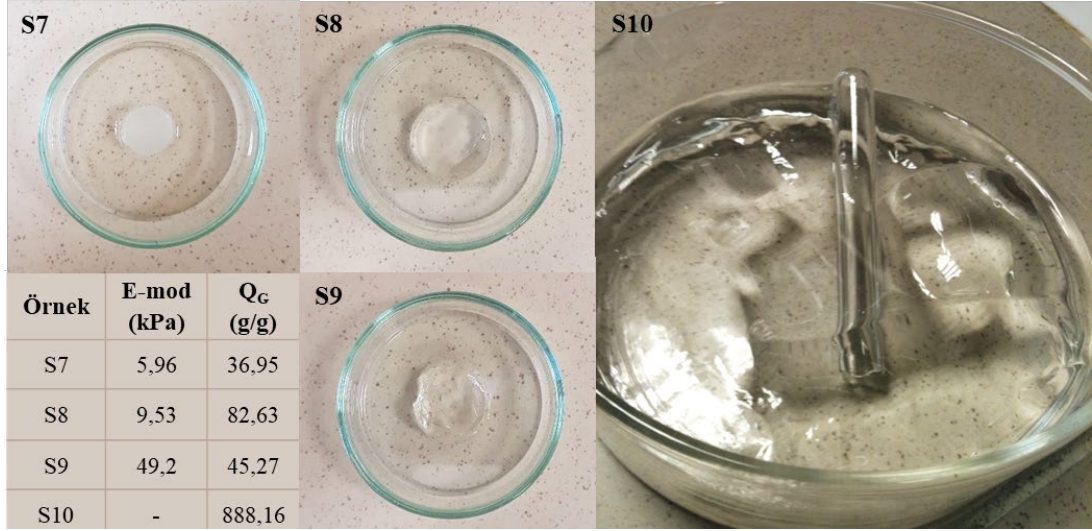


BIS

$$\begin{array}{c} \text{HC}=\text{CH}_2 \\ | \\ \text{C}=\text{O} \\ | \\ \text{NH} \\ | \\ \text{CH}_2 \\ | \\ \text{NH} \\ | \\ \text{C}=\text{O} \\ | \\ \text{HC}=\text{CH}_2 \end{array}$$

veya





Şekil 4.3 : S7-S10 no.lu örneklerin E modülleri, kütlece şişme dereceleri ve görünüşleri.

KPS-TEMED (veya APS-TEMED) redoks çifti ile başlatılan geleneksel P(NIPAAm-*ko*-BIS) hidrojellerinin, polimerizasyonlarının doğaları gereği, su içerisinde faz geçiş sıcaklığından daha düşük sıcaklıklarda sentezlendiği bilinmektedir. Ayrıca geleneksel sentez prosedürü ile hazırlanan PNIPAAm hidrojellerinin yüksek şişme derecesi, opaklığı ve mekanik dayanımlarının düşük olması uygulama alanlarını sınırlandırmaktadır. Geleneksel P(NIPAAm-*ko*-BIS) hidrojelinin, fizyolojik sıcaklıkta dış yüzeyinde yoğun deri benzeri tabakanın oluşması, su difüzyonu ve ilaç salım süreçlerinin yavaşlatmakta ve biyomedikal uygulamalarda kullanılma ihtimalini de azaltmaktadır. Daha önce araştırma grubumuz yapmış olduğu bir çalışmada, polimerlerinin zincir uçlarındaki hidrofobikliği değiştirmek amacıyla hızlandırıcı olarak, TEMED (ve SO₄^{•-} grupları nedeniyle kısmen anyonik) yerine hidroksil grupları taşıyan NaOH kullanmışlardır [323]. Bu PNIPAAm hidrojelerin sentezinde NaOH kullanımının ilk hedefi zincir uçlarını hidrofilik hale getirerek ağ yapının şişme derecelerini arttırmaktı. Öte yandan, yapılan testler sonucunda hidrojellerin 33 °C'in üzerindeki sıcaklıklardaki sıkıştırma modüllerinde güçlü bir iyileşme olduğu ve hacimce şişme derecelerinin keskin bir şekilde değiştiği belirlendi. Hidrojellerin mekanik dayanımlarındaki bu yüksek orandaki iyileşmenin (37 °C'de ~150 kPa) nedeni PNIPAAm'in zincir uçlarında bulunan hidroksil grupları arasındaki hidrojen bağları olabilir. Bu tez çalışmasında da, P(NIPAAm-*ko*-DMPMAAm)/BIS hidrojelleri hem KPS-TEMED hem de KPS/NaOH kullanılarak sentezlendi. Ancak, KPS-TEMED redoks çifti ile sentezlenen S4 no.lu örneğin, KPS/NaOH redoks çifti kullanılarak hazırlanan S3 no.lu örneğe kıyasla daha yüksek mekanik dayanıma ve

daha düşük şişme derecesine sahip olduğu ve opak bir malzeme elde edildiği bulguları (Şekil 4.2). Bunun sebebi, DDS içerisindeki KPS/DMAEMA sisteminin bir redoks çifti gibi davranması ve böylece bu iki başlatıcı sistemden (KPS-TEMED+KPS/DMAEMA) bir sinerji oluşturarak polimerizasyon reaksiyonunun hızını arttırması olabilir.

Üçüncül amin gruplarına sahip diaminlerin vinil polimerizasyonunda, birincil veya ikincil amin grupları taşıyan türevlerine göre, daha yüksek aktivite gösterdiği bilinmektedir. Bu bulgulara dayanarak, persülfat ile etkileşime giren DMAEMA'nın ve DMAEMA'nın DDS'deki ve sodyum hidroksit çözeltisindeki polimerizasyon reaksiyonları sırasında, KPS/TEMED çiftine benzer bir şekilde, yük transfer kompleksleri (CTC) oluşturabileceği düşünülmektedir [324–326]. Bir sonraki adımda, DMAEMA ve DMAEMA'nın kuvaterner amonyum tuzları (QAS) vinil polimerizasyonlarının başlatma adımlarından sorumlu olan TEMED[•] ve SO₄^{•-} (veya HO₃SO[•]) ile birlikte, DMAEMA[•] ve DMAEMA[•] radikalleri üretebilir. Bu aşamalardan sonra, genelde amin uç gruplarına sahip daha hidrofobik bir yapının oluşabileceği düşünülmektedir.

Öte yandan, KPS/DMAEMA redoks çifti varlığının KPS/NaOH sistemiyle ilerleyen reaksiyonları negatif etkilediği gözlemlendi. Hidrofilik hidroksil ve hidrofobik amin radikallerinin üretimine sebep olan bu iki başlatıcı çiftlerinin birbirine zıt olan yapısal etkilerinin ve reaktivite farklılıklarının, oldukça şişmiş, transparan, düşük mekanik dayanıma sahip ve içerisinde beyaz noktalar bulunan heterojen görünümlü hidrojellerin oluşmasına sebep olduğu bulguları (S3, Şekil 4.2). S3 no.lu örneğin fiziksel özellikleri, 0,1 N NaOH çözeltisinde KPS ile başlatılan PNIPAAm/BIS hidrojelleri ile kıyaslandığında, sentezin başlangıcında KPS'den türeyen hidroksil radikallerinin DMAEMA'den ortaya çıkan radikallerle beraber bu görünüme sebep olabilecekleri ifade edildi [323, 325, 327].

Ayrıca AIBN ile sentezlenen S1 no.lu örneğin şişme derecesi-sıkıştırma modülü-homojenlik üçlüsünün S3 ve S4 no.lu hidrojellerden çok farklı olması, polimerizasyon çözücüsü/başlatıcı çiftinin çapraz bağlı polimerik malzemelerin üç temel fiziksel özelliği için oldukça önemli olduğunu göstermektedir. P(NIPAAm-*ko*-DMAEMA)/BIS hidrojel için en tercih edilebilir bulgular 1,4-dioksan/AIBN sistemi kullanılarak sentezlenen örneklerde gözlemlendi. Bu nedenle DMAEMA ve DMAEMA içeren diğer tüm PNIPAAm hidrojellerinde, polimerizasyon çözelti

olarak DDS ve sulu NaOH çözeltisi yerine 1,4-dioksan kullanıldı. Ayrıca serbest radikal başlatıcı olarak KPS-TEMED ve KPS/ NaOH redoks çiftleri yerine AIBN seçildi.

MAPTAC içeren hidrojeller ise hem 1,4-dioksan/AIBN hem de NaOH/KPS çözücü başlatıcı çifti ile sentezlendi. Yapısında kuvaterner amonyum grubu bulunan MAPTAC'ın KPS ile yük transferi oluşturması ve KPS/NaOH redoks çifti varlığındaki sentezlerinin reaktivitesi hakkında herhangi bir bilgi mevcut değildir. Kullanılan bu sentez koşulları sayesinde hidroksil grupları ile beraber kuvaterner yapıdaki MAPTAC ve TAB'ın yapısal etkileri de belirlendi. Şekil 3'ten de görüldüğü gibi, 0,1 N NaOH çözeltisinde sentezlenen P(NIPAAm-ko-MAPTAC)/TAB hidrojelinin (S10) şişme derecesi oldukça yüksektir ve hidrojel süperabsorban davranışı göstermektedir. Ayrıca 25 °C'de DDS içerisindeki kütlege şişme dereceleri BIS ile sentezlenen S7, S9 no.lu örneklerden yaklaşık 20 kat daha yüksektir. Öte yandan, AIBN kullanılarak 1,4-dioksan içerisinde hazırlanan P(NIPAAm-ko-MAPTAC)/TAB hidrojelinin (S8) sıkıştırma modülü ve kütlege şişme derecesi S7 no.lu örnek ile kıyaslandı ve her ikisi de iyonik komonomer içermesine ve zincir uçları hidrofilik karaktere sahip olmasına rağmen şişme derecelerinin oldukça farklı olduğu, çapraz bağlayıcının moleküler yapısının, materyal özellikleri üzerinde belirleyici role sahip olduğu gözlemlendi (Şekil 4.3). Elde edilen bulgular, reaksiyon koşullarının, bileşenlerin jelleşme sırasındaki kimyasal reaktivitelerini değiştirdiği ve hidrojellerin fiziksel parametrelerinin kontrolünde oldukça önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir.

Bu sebeple, bir sonraki adımda belirlenen mekanik özellikler ve dinamik şişme/büzülme davranışları, farklı komonomer, çapraz bağlayıcı ve polimerizasyon ortamı kullanılarak sentezlenen hidrojellerin yüklü grupları arasında elektrostatik etkileşimler ve yük dengesi göz önüne alınarak incelendi.

4.2 Komonomer ve Çapraz Bağlayıcı Türünün PNIPAAm Katyonik Hidrojellerinin Sıkıştırma Kuvveti ve Denge Şişme Derecelerine Etkisi

Üç katyonik komonomer ve/veya katyonik çapraz bağlayıcı ile sentezlenen PNIPAAm tabanlı hidrojellerin farklı sıcaklık ve/veya pH'taki (pH 4 ve pH9) sıkıştırma modülleri ve denge durumunda hacimce şişme dereceleri Şekil 4.4 ve Çizelge 4.1'de detaylı şekilde verilmektedir. HCl ve NaOH ile hazırlanan pH 4 ve pH 9 çözeltileri, polimer

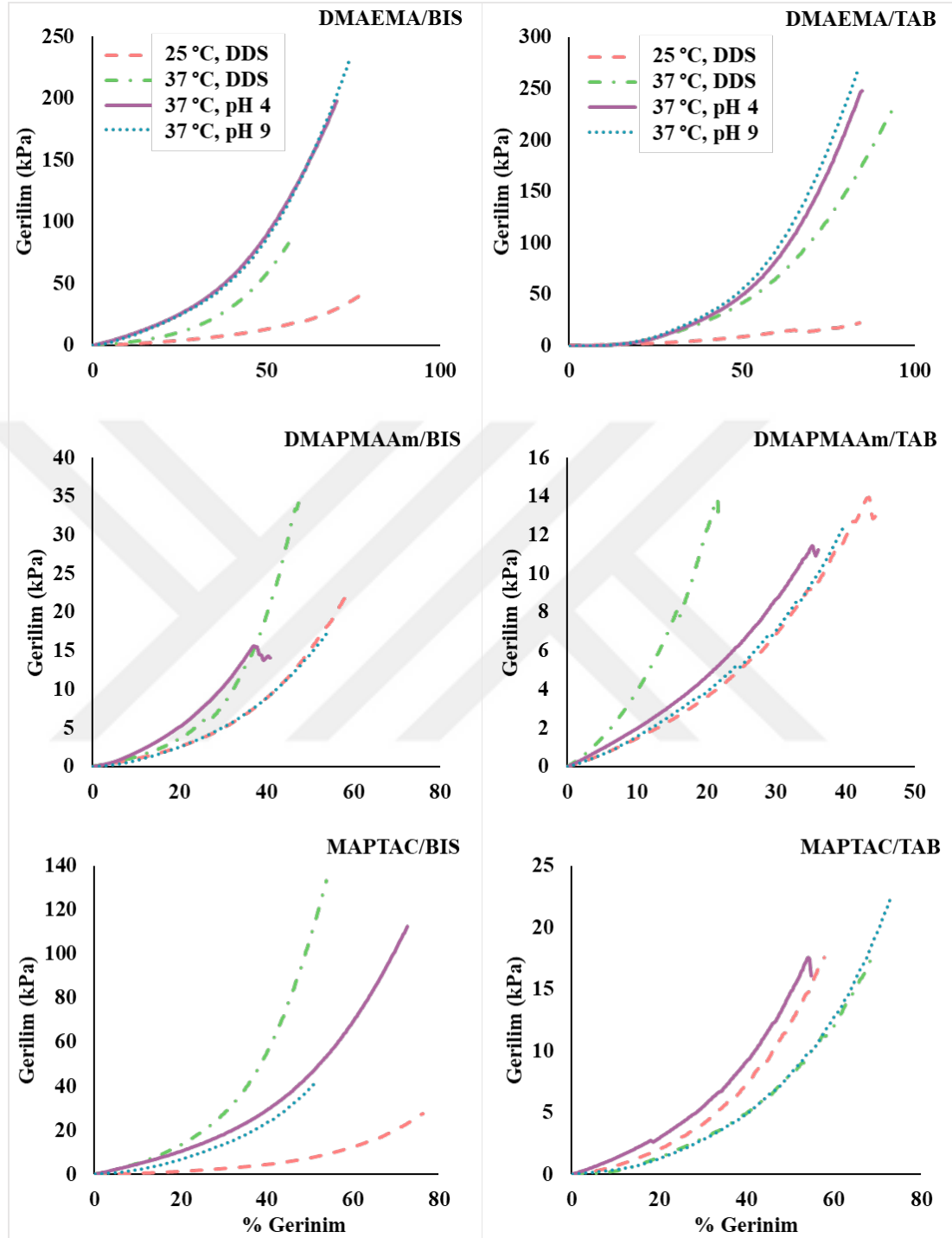
zincirlerindeki DMAPMAAm ve DMAEMA ünitelerinin nötral ve protonlanmış halde bulunduğu bölgelerdeki mekanik ve şişme davranışlarını incelemek amacıyla iki sınır nokta olarak seçildi. DMAEMA'nın ve DMAPMAAm'in dimetilamino gruplarının protonlanma derecesi pH 4'ün altında çok fazla değişmezken pH 9'un üzerinde tamamen nötral durumda bulunurlar ve PNIPAAm tabanlı hidrojel büzülmüş hale geçerler. Öte yandan, MAPTAC kuvaternize amonyum gruplarına sahip olduğu için pH'a bağlı protonlanma özelliği bulunmamaktadır. PNIPAAm hidrojel oda koşullarında tamamen şişmiş durumdayken, sıcaklık PNIPAAm'in VPTT'sinin üstüne çıkartıldığında polimer zincirlerinin arasında hidrofobik kuvvetler baskın hale gelir ve büzülürler. Sıcaklığın PNIPAAm katyonik hidrojellerinin mekanik özelliklerine etkisini incelemek için 25 °C ve 37 °C'de sıkıştırma testleri gerçekleştirildi. Ayrıca hidrojellerin ilaç taşıyıcı olarak kullanması planlandığından fizyolojik sıcaklıktaki mekanik dayanımı ve şişme davranışları tespit edildi.

Çizelge 4.1 : PNIPAAm tabanlı katyonik hidrojellerin mekanik özellikleri.

Örnek No	T _{şişme} /Şişme Ortamı /Çapraz Bağlayıcı	Komonomer	% Gerinim (10 kPa'daki)	E (kPa)
S1	25°C/DDS/BIS	DMAPMAAm	42	11,82±0,28
S1	37°C/DDS/BIS	DMAPMAAm	32	15,24±5,01
S1	37°C/pH 4/BIS	DMAPMAAm	30	10,72±4,57
S1	37°C/pH 9/BIS	DMAPMAAm	42	6,58±0,98
S2	25°C/DDS/TAB	DMAPMAAm	37	10,55±5,01
S2	37°C/DDS/TAB	DMAPMAAm	18	16,17±2,80
S2	37°C/pH 4/TAB	DMAPMAAm	33	21,83±0,46
S2	37°C/pH 9/TAB	DMAPMAAm	36	12,66±1,34
S5	25°C/DDS/BIS	DMAEMA	44	13,59±1,74
S5	37°C/DDS/BIS	DMAEMA	24	19,10±1,55
S5	37°C/pH 4/BIS	DMAEMA	13	84,48±30,15
S5	37°C/pH 9/BIS	DMAEMA	13	37,48±7,10
S6	25°C/DDS/TAB	DMAEMA	54	11,96±6,30
S6	37°C/DDS/TAB	DMAEMA	26	13,30±0,91
S6	37°C/pH 4/TAB	DMAEMA	26	5,26±1,20
S6	37°C/pH 9/TAB	DMAEMA	26	6,45±0,92
S7	25°C/DDS/BIS	MAPTAC	56	5,96±3,05
S7	37°C/DDS/BIS	MAPTAC	17	28,56±3,85
S7	37°C/pH 4/BIS	MAPTAC	20	51,62±2,52
S7	37°C/pH 9/BIS	MAPTAC	25	19,29±7,38
S8	25°C/DDS/TAB	MAPTAC	46	9,53±4,33
S8	37°C/DDS/TAB	MAPTAC	55	3,90±1,98
S8	37°C/pH 4/TAB	MAPTAC	42	11,48±3,32
S8	37°C/pH 9/TAB	MAPTAC	55	7,42±3,60

AIBN/1,4-dioksan başlatıcı çözücü çifti varlığında sentezlenen S1, S2, S5, S6, S7 ve S8 no.lu hidrojellerin şekil 4.4'te verilen gerilim-gerinim grafikleri kullanılarak 10kPa

gerilim'deki gerinim değerleri ve buna bağlı olarak tüm örneklerin aynı kuvvet altındaki davranışları belirlendi.



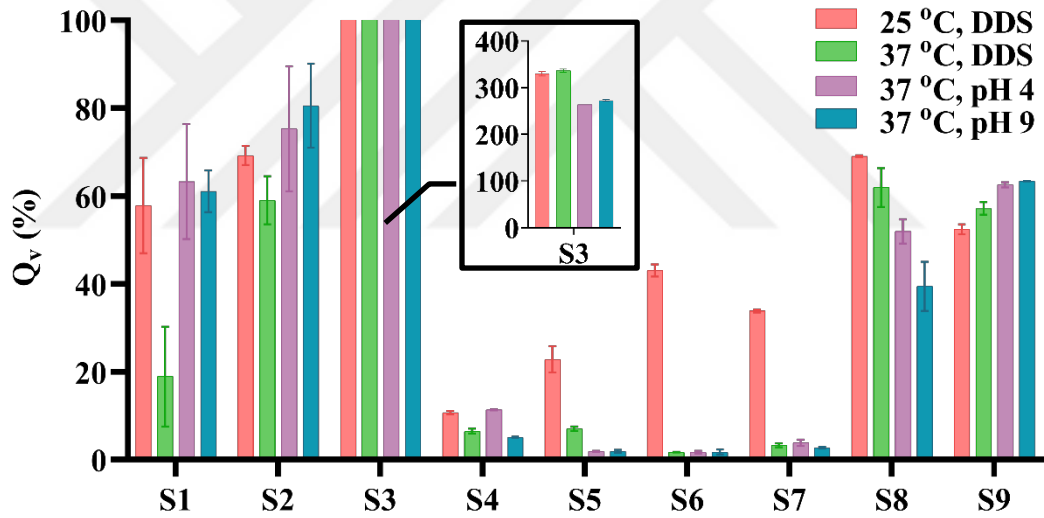
Şekil 4.4 : S1, S2, S5-S8 rneklerinin farklı sıcaklık ve pH'lardaki sıkıştırma gerilim-gerinim grafikleri

P(NIPAAm-*ko*-DMAPMAAm)/BIS (S1) ve P(NIPAAm-*ko*-DMAPMAAm)/TAB (S2) hidrojellerin şekil 4.4'teki grafikleri, ağ yapıların 5 N kuvvet altındaki mekanik davranışları arasında büyük bir değişim olmadığını göstermektedir.

DMAPMAAm katyonik bir monomer olmasına rağmen, ne şişme ortamının pH/sıcaklık değişiminin ne de çapraz bağlayıcı türünün E modüllere ve aynı gerilim altındaki gerinim değerleri üzerinde belirgin bir etkiye sebep olmamaktadır. Öte yandan, DMAEMA içeren S5 ve S6 no.lu örneklerin 10 kPa ve 37°C'deki gerinim değerleri 25 °C'deki değerlerin yarısı kadardır. Bu durum, metakrilat fonksiyonel grubuna sahip olan DMAEMA'nın hidrofobik doğasından ve NIPAAm birimlerinin sıcaklığa bağlı hidrofobikliğinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca S5 no.lu örneğin 37 °C pH 9 durumunda %50 gerinim değerine ulaşması için uygulanan gerilimin S1 no.lu örnekten çok daha fazla olduğu (sırasıyla 84 ve 15 kPa), PNIPAm tabanlı hidrojelde %5 mol metakrilat monomer kullanmanın, amit türevlerine kıyasla, zincir sertliğini beş kat arttırdığı bulgularıdır.

1,4-dioksan içerisinde 50 °C'de sentezlenen P(NIPAAm-*ko*-MAPTAC)/BIS (S7) hidrojelinde ise, yapısında her koşulda iyonik halde bulunan MAPTAC olmasına rağmen, yüksek sıkıştırma modülleri ile en çarpıcı sonuçları göstermiştir. MAPTAC'ın kuvaterner amonyum grupları, polimerin hacimli yapısı sebebiyle, düşük yük yoğunluğuna sahiptir ve klor iyonları ile iyonik etkileşimi zayıftır. Karşıt iyonlar ve su molekülleri arasındaki çekim kuvvetleri (klor iyonlarının hidrasyonu), MAPTA⁺ üniteleri ile klor iyonları arasındaki elektrostatik etkileşimlerden daha güçlüdür, Cl⁻ iyonlarının P(NIPAAm-*ko*-MAPTAC) zincirleri boyunca serbestçe hareket edebilir. Bu yük dalgalanmalarının, hidrojellerin polielektrolit-iyonomer davranışı göstermesine sebep olabileceği düşünülmektedir [290–292]. MAPTA⁺ ve Cl⁻ iyonları kısa, iyonmerlerin ise uzun mesafeli etkileşimleri, polimerik ağlarının üzerinde çapraz bağ olarak davranan multiplerin oluşumunu sağlar. S7 no.lu örneğinin tek eksenli sıkıştırma testleri sonucunda gözlenen bu beklenmeyen mekanik davranışlar, farklı P(NIPAAm-*ko*-MAPTAC) zincirleri üzerinde oluşan ek çapraz bağlanmalardan kaynaklanabilir. Bahsedilen bu olasılıklara rağmen 1,4-dioksan ortamında AIBN başlatıcısı ile sentezlenen S7 no.lu P(NIPAAm-*ko*-MAPTAC)/BIS hidrojelinin neden böyle bir sinerjik etkiye sebep olduğu net bir şekilde açıklanamamaktadır. Bu yüzden, diğer deneysel parametrelerin de mekanik özelliklere etkisi kıyaslandı. Katyonik yapıya sahip TAB ile çapraz bağlı P(NIPAAm-*ko*-MAPTAC) (S8) hidrojelinin mekanik özellikle S7 no.lu örnekle kıyaslandığında, %50 gerinimdeki gerilim değerinin 6-10 kat daha düşük olduğu gözlemlendi. Öte yandan, S7 no.lu örneğin 37 °C/pH 4'deki E modülü hidrofobik ester gruplarına sahip ve kısmen protonlanmış

dimetilamino grupları bulunan S5 no.lu P(NIPAAm-*ko*-DMAEMA)/BIS hidrojeline oldukça yakındır. Bu durum, MAPTAC ve DMAEMA ünitelerinin hidrasyonu sırasında ortaya çıkan, klor-su, MAPTA+ (veya DMAEMA+)-su ve klor-MAPTAC+ (veya klor-DMAEMA+) olarak tanımlanan, üç ana etkileşimden kaynaklanabilir. Bu moleküler etkileşimler pH 4'teki Cl⁻ iyonları, MAPTA+Cl⁻ iyonmerleri ve DMAEMA'nın hidrofobik ester grupları ile desteklenmektedir. Bu yüzden, bu hidrojellerin pH 4'teki sıkıştırma modüllerinin iyileşmesine, şişme ortamının asitliğinden (yüksek HCl konsantrasyonu) daha çok, klor iyonlarının yük perdeleme etkisinin (charge screen effect) katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Bıçak ve çalışma arkadaşları da benzer iyon etkilerinin sentezledikleri poli(N,N-dialil-N,N-dimetilamonyum klorür) (PDADMAC) jelinin HCl içeren çözeltideki şişme derecelerini etkilediğini rapor etmişlerdir. Bu etkileşimlere ayrıca tuz etkisi olarak da ifade edilir [328].



Şekil 4.5 : Katyonik PNIPAAm hidrojellerinin hacimce şişme dereceleri.

Şekil 4.5, S1, S2, S5, S6, S7 ve S8 no.lu hidrojellerin 25 °C DDS'deki ve 37 °C'de DDS, pH 4 ve pH 9 çözeltileri içerisindeki hacimce şişme derecelerini göstermektedir. S1 ve S2 no.lu örneklerin şişme derecelerinde (S1'in 37 °C DDS'deki değeri hariç) herhangi bir sıcaklık ve pH koşulunda belirgin bir değişiklik olmadığı, S5 ve S7 no.lu örneklerin ise 37 °C'deki tüm çözücüler içerisinde keskin bir şekilde büzüldüğü gözlemlendi. Burada, DMAPMAAm'in hidrofilik karakteri S1 no.lu örneğinin 37 °C DDS içerisindeki hidrofilik/hidrofobik geçişini bir miktar etkilerken BIS ile çapraz bağlı MAPTAC ve DMAEMA içeren PNIPAAm hidrojellerinde bu geçiş çok daha

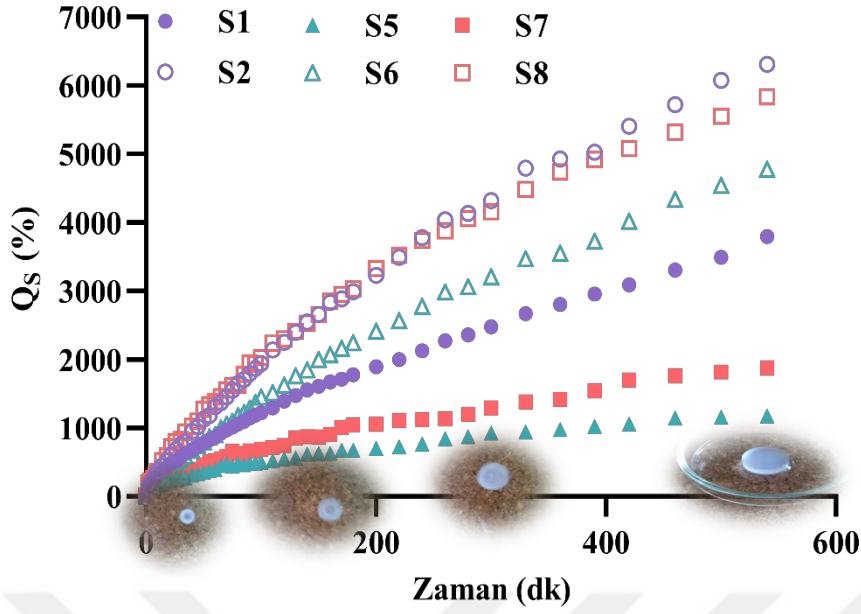
belirgindir. DMAPMAAm ve MAPTAC aynı kimyasal yapıya sahip olmalarına rağmen, S7 örneğinin DDS, pH 4 ve pH 9 37 °C'deki şişme derecelerinin S1 no.lu örnekten oldukça düşük olması dikkat çekicidir. Öte yandan, DMAEMA'in 37 °C/DDS ve 37 °C/pH 9 de hidrofobik yapısı, 37 °C/pH 4'de ise katyonik dimetilamino grupları üzerindeki klor iyonlarının yarattığı yük perdeleme etkisi, DMAPMAAm içeren eşleniğine göre daha sert hidrojenlerin oluşmasına sebep olmaktadır.

Çözelti kopolimerizasyonu ile sentezlenen hidrojenlerin içerisindeki toplam monomer konsantrasyonu hidrojenin yapısını ve mekanik özelliklerini değiştirebilir. Prausnitz ve çalışma arkadaşları DDS içerisinde şişme dengesinde bulunan P(AAm-ko-MAPTAC) hidrojenlerinin sıkıştırma testleri ile gerilim-gerinim davranışlarını incelemiş ve monomer konsantrasyonu ağırlıkça %10'un altında olduğu durumda çapraz bağların zayıf olduğunu ve kırılabilir yapılar oluştuğunu rapor etmişlerdir. Öte yandan, P(AAm-ko-MAPTAC) hidrojenlerinin hidrofilik AAm ve iyonik MAPTAC ünitelerinin rastgele dağılması ile elde edildiği, toplam monomer konsantrasyonu arttıkça oluşan zincir dolanmalarının çapraz bağlayıcı olarak davrandığı ve bu durumun sıkıştırma modüllerinin yükselmesini sağladığı ifade edilmiştir [329]. Bu tez çalışmasında da, PNIPAAm katyonik hidrojenlerinin toplam monomer konsantrasyonu %20'nin üzerindedir ancak sadece S7 no.lu P(NIPAAm-ko-MAPTAC)/BIS hidrojeninin, yük perdeleme etkisi olmamasına rağmen, DDS içerisindeki sıkıştırma modülünde yükselme gözlemlendi. Tüm bu gözlemler, komonomerin kimyasal yapısına ve şişme ortamının bileşimine bağlı olan fiziksel çapraz bağlanma noktalarının ve yük perdeleme etkisinin oluşumunu desteklemektedir. Ayrıca bu etkilerin monomer konsantrasyonuna bağlı olmadığı, klor iyonlarının varlığından kaynaklandığı ifade edilmektedir.

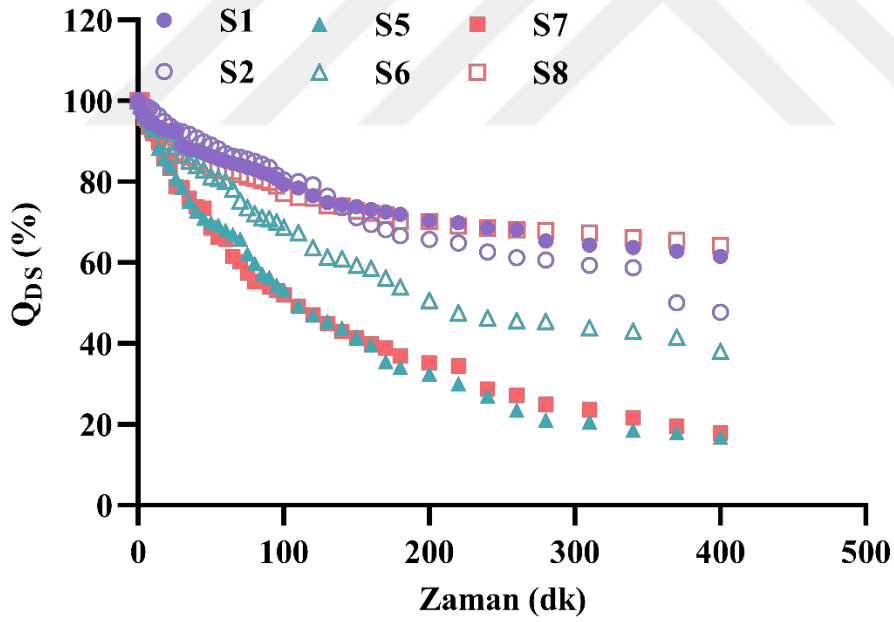
Kuvaterner amonyum gruplarına sahip TAB molekülünün, BIS yerine çapraz bağlayıcı olarak kullanıldığı, S6 ve S8 no.lu sırasıyla DMAEMA ve MAPTAC içeren örneklerin E modüllerinin eşlenik P(NIPAAm-ko-DMAPMAAm)/TAB hidrojeninden (S2) daha düşük olduğu bulguları. Öte yandan, S8 no.lu örneğin hacimce şişme dereceleri S2 gibi oldukça yüksekken, S6 no.lu örneğin daha az şiştiği belirlendi. Tüm bu sonuçlar, yük dengesinin ve moleküller arası etkileşimlerin, mekanik dayanım ve şişme dereceleri üzerinde büyük bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

4.3 Komonomer ve Çapraz Bağlayıcı Türünün PNIPAAm Katyonik Hidrojellerinin Dinamik Şişme Ve Büzülme Davranışlarına Etkisi

Katyonik PNIPAAm hidrojellerinin sıkıştırma modülleri, ağ yapıdaki birincil ve ikincil moleküler arası etkileşimlerden kaynaklanan etkin çapraz bağ yoğunluğuna bağlı olarak değişmektedir. Bu sebeple, hidrojellerin şişme ve büzülme süreçlerinin de polimerlerin bileşimleri ile doğrudan ilişkili olduğu düşünülmektedir. Hidrojel bileşimlerinin 25 °C ve 37 °C DDS içerisindeki şişme ve büzülme davranışlarına etkisi incelendiğinde, S5 ve S6 no.lu örneklerin S1, S2, S7 ve S8 no.lu hidrojellerden daha düşük şişme ve daha yüksek büzülme derecesine sahip olduğu gözlemlendi (Şekil 4.6 ve 4.7). Bu durum, TAB veya BIS ile çapraz bağlı P(NIPAAm-*ko*-DMAEMA)'in P(NIPAAm-*ko*-DMAPMAAm) ve P(NIPAAm-*ko*-MAPTAC) hidrojellerinden daha hidrofobik olduğunu göstermektedir. Bunun asıl sebebi, ana zincirlerin üzerindeki amit gruplarının arasında rastgele dağılmış hidrofobik ester gruplarının varlığı olabilir. Öte yandan, zincirleri üzerinde sadece amit grupları bulunan (hidrofobik üniteleri olmayan) S7 no.lu örnek tıpkı mekanik dayanımlarda olduğu gibi şişme/büzülme dereceleriyle de beklenmedik sonuçlara sahiptir ve elde edilen bulgular S7'nin 25 °C, DDS içerisindeki şişme derecesinin ester grupları taşıyan S5 örneğine çok yakın olduğunu göstermektedir. Bu durum, P(NIPAAm-*ko*-MAPTAC)/BIS hidrojelindeki hareketli klor iyonları sonucunda oluşan multiplerlerden kaynaklanabilir. Benzer şekilde, S7 no.lu örneğin büzülme davranışı da P(NIPAAm-*ko*-DMAEMA)/BIS hidrojeli ile benzerdir ve bu sonuçlar ağ yapıdaki iyonik etkileşimlerden kaynaklanan iyonomer-multipler geçişlerinin varlığını kanıtlamaktadır.



Şekil 4.6 : S1, S2, S5-S8 hidrojenlerinin dinamik şişme grafikleri ile S7 örneğinin şişme görselleri (25 °C DDS).



Şekil 4.7 : S1, S2, S5-S8 hidrojenlerinin 37 °C DDS'deki dinamik büzülme grafikleri.

PNIPAAm katyonik hidrojenlerin şişme/büzülme davranışlarını etkileyen bir diğer parametrede çapraz bağlayıcının türüdür. BIS, su ile hidrojen bağı kurabilen iki adet ikincil amin grubuna, kuvaterner amonyum tuzu olan TAB ise çapraz bağlanma reaksiyonları öncesinde dört adet allil grubuna sahiptir. TAB sahip olduğu iki halkalı,

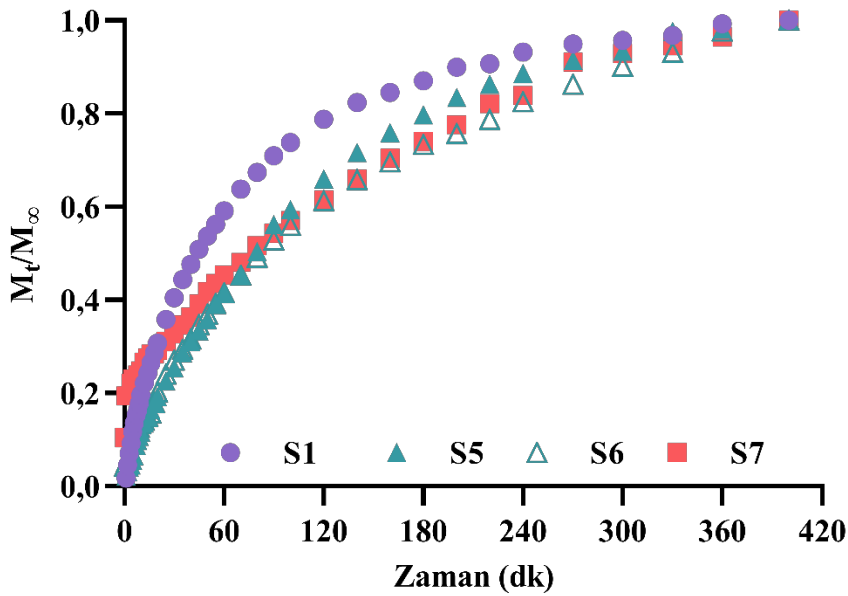
merkezinde kuvaternize azot atomu içeren yapısı ile hacimli ve katyonik karakterde çapraz bağları bulunan hidrojel oluşmasını sağlar. Bu sebeple, TAB ile çapraz bağlı katyonik PNIPAAm hidrojelleri 25 °C’de çok yüksek şişme derecelerine sahiplerdir.

4.4 Komonomer ve Çapraz Bağlayıcı Türünün PNIPAAm Katyonik Hidrojellerinin Su Difüzyonu ve L-AA Salım Mekanizmasına Etkisi

L-AA’in salım kinetiği genellikle pHmetre, kondüktometre ve UV spektrofotometresi kullanılarak gerçekleştirilen iletkenlik, pH ve absorpsiyon ölçümleri ile belirlenmektedir [330, 331]. Bu tez çalışmasında da, 1,4-dioksan içerisinde AIBN başlatıcı varlığında sentezlenen BIS ve TAB ile çapraz bağlı P(NIPAAm-*ko*-DMAEMA), P(NIPAAm-*ko*-DMAPMAAm) ve P(NIPAAm-*ko*-MAPTAC) hidrojellerinin 37 °C DDS içerisindeki ilaç salım davranışları kondüktometrik ölçümlerle tayin edildi. Ayrıca hidrojellerin zamana bağlı şişme deneyleri ile DDS içerisinde 25 °C’deki difüzyon kinetikleri incelendi.

Hidrojellerin enkapsülasyon etkinlikleri, ağ yapıları yükleme yapılmadan önceki ve sonraki ilaç çözeltisinin iletkenliği ölçülerek belirlendi. Yapılan hesaplamalar sonucunda, S1, S5, S6 ve S7 no.lu örneklerin enkapsülasyon etkinlikleri sırasıyla %44,98, %44,68, %49,63 ve %43,55 olarak bulundu ve katyonik monomerin yapısının ilaç yüklenmesinde etkin bir rol almadığı gözlemlendi. Öte yandan, BIS ve TAB ile çapraz bağlı DMAEMA içeren S5 ve S6 no.lu örneklerin enkapsülasyon etkinlikleri arasındaki %5 civarlarında fark olduğu, S6 no.lu örneğinin teorik değerlere (%50) yakın olduğu bulgulandı. DMAPMAAm, DMAEMA ve MAPTAC monomerlerinin yapısal özellikleri ve pH’a bağlı davranışları arasındaki farklar, kimyasal yapılarındaki reaktif ve fonksiyonel grupların türleri dikkate alınarak açıklanabilir. Ayrıca kolay iyonlaşabilen hidroksil grubuna sahip olan L-AA’nın sudaki çözünürlüğü oldukça yüksektir. Tüm bu bilgiler ve örneklerin enkapsülasyon etkinlikleri göz önüne alındığında, katyonik PNIPAAm hidrojellerin L-AA yükleme etkinliklerinin BIS ve TAB çapraz bağlayıcısının yapısına ve L-AA ile aralarındaki etkileşimlere bağlı olabileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak, S6 no.lu örneğin yüksek şişme derecesi L-AA ile TAB molekülleri arasındaki elektrostatik etkileşimleri arttırabileceği ve bu durumun enkapsülasyon etkinliğinin yüksek olmasını sağlayabileceği ifade edildi.

Hidrojellerin L-AA salım ve su difüzyonuna ait mekanizmalarını belirlemek için şekil 4.6 ve 4.8'deki veriler kullanıldı. Denklem 3.6 ve 3.7 ile hesaplanan n difüzyon üsteli ve k sabiti ile difüzyon katsayısı (D , cm^2/s) değerleri çizelge 4.2'de gösterilmektedir. Hidrojeller çapraz bağlayıcı türüne göre; nötral (BIS, S1, S3, S4, S5, S7 ve S9) ve iyonik (TAB, S2, S6, S8) olarak iki sınıfa ayrılabilir. Hidrojeller bu sınıflandırmaya göre değerlendirildiğinde, BIS ile çapraz bağlı hidrojellerin şişme prosesleri için hesaplanan n_{DDS} üstellerinin 0,5 civarlarında ve suyun ağ yapı içerisine taşınım mekanizmasının difüzyon kontrollü olduğu (Fick yasasına uyan), TAB durumunda ise mekanizmaların Fick yasasına uymadığı gözlemlendi. TAB ile çapraz bağlı katyonik PNIPAAm hidrojellerinin şişme süreçlerinin hem difüzyon hem de relaksasyon kontrollü olması, TAB molekülünün kuvaternize amonyum gruplarının, DMAPMAAm, DMAEMA ve MAPTAC monomerlerinin protonlanmış grupları ile arasındaki elektrostatik itme kuvvetlerinden kaynaklanmaktadır. Öte yandan, yapısında kuvaternize MAPTAC grupları bulunan S7 no.lu hidrojeli, S1 ve S5 no.lu örneklerle benzer n üsteline ve tamamen Fick yasasına uyan bir mekanizmaya sahiptir. Bunun sebebi, PNIPAAm zincirleri arasına dağılmış olan MAPTAC ünitelerinde oluşan iyonomer-multiplet yapılarının çapraz bağlayıcı gibi davranmasıdır.



Şekil 4.8 : S1, S5, S6 ve S7 örneklerinin zamana bağlı ilaç salım kesirleri.

Çizelge 4.2 : Katyonik PNIPAAm hidrojjellerin su difüzyon ve L-AA salım kinetikleri.

Örnek No	n _{DDS}	k _{DDS} (x10 ³)	D _{DDS} (x10 ⁷ , cm ² /s)	R ²	Örnek No	n _{L-AA}	k _{L-AA} (x10 ³)	D _{L-AA} (x10 ⁷ , cm ² /s)	R ²
S1	0,610	0,583	1,44	0,999	S1	0,713	1,895	47,2	0,988
S2	0,725	0,425	9,09	0,997					
S5	0,487	3,744	1,87	0,995	S5	0,753	0,881	44,0	0,994
S6	0,739	0,347	8,49	0,998	S6	0,607	2,794	13,5	0,994
S7	0,533	2,538	2,80	0,986	S7	0,283	42,796	0,34	0,949
S8	0,679	0,732	13,0	0,993					

Şekil 4.8 ve çizelge 4.2’de elde edilen bulgular katyonik PNIPAAm hidrojjellerinin L-AA salımına ait n üstelleri ile hacimce şişme derecelerinin ters orantılı olduğunu göstermektedir. S1 ve S5 no.lu sırasıyla, DMAPMAAm ve DMAEMA içeren, BIS ile çapraz bağlı hidrojjellerin L-AA salım mekanizmaları hem difüzyon hem de relaksasyon kontrollü iken yapısında daha fazla katyonik yük barındıran S7 no.lu örneğin Fick yasasına uyan bir davranışa sahip olduğu bulgulanıldı. Bu durum, daha önce de hidrojjellerin mekanik özellikleri, şişme/büzülme davranışları ve su difüzyonlarında da bahsedildiği gibi iyonomer-multiplet oluşumlarından kaynaklanabilir. Ayrıca S6 no.lu ve TAB ile çapraz bağlı P(NIPAAm-*ko*-DMAEMA) hidrojjelinin BIS varlığında sentezlenen S5 no.lu örneğe kıyasla daha difüzyon kontrollü olduğu belirlendi. TAB molekülünün kuvaterner amin gruplarının askorbat anyonları ile elektrostatik etkileşimleri hem salımın yavaşlamasını hem de n üstelinin Fick yasasına yaklaşmasını sağlar. S1 no.lu örneğin ilk 3 saatteki L-AA salım yüzdelерinin S5-S7 no.lu hidrojjellerden daha yüksek olduğu gözükmeştir. Bu durum, şekil 4.8’de görüldüğü gibi S6 ve S7 no.lu örneklerdeki moleküller arası etkileşimler sebebiyle 37 °C DDS’deki şişme derecelerinin düşmesinden, DMAPMAAm’in ise aynı koşullarda hidrofilik karakterinin ve dolayısıyla şişme derecelerinin daha yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. Elde edilen bu bulgular, DMAPMAAm içeren katyonik PNIPAAm hidrojjellerinin zincir genişlemelerinin yapıdaki iyonik etkileşimlerden daha kuvvetli olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.3'te S1, S5, S6 ve S7 no.lu örneklerin, DDS içerisinde 37 °C'deki L-AA salımı sırasında belirlenen sıkıştırma modülleri verilmektedir. E₀, hidrojellerin L-AA yüklendiği andaki, E_{2h}, E_{4h} ve E_{48h} ise sırasıyla salımın 2.,4. ve 48. saattindeki E-modüllerini (kPa) ifade etmektedir. E modüllerin zamana bağlı değişimleri hidrojellerin bileşimlerinin ve ilaç ile moleküler arası etkileşimlerinin önemini net bir şekilde göstermektedir. S1 no.lu örnek haricindeki tüm hidrojeller (S5, S6 ve S7) mekanik dayanımlarını korurken, S6 örneğindeki TAB ile L-AA arasındaki elektrostatik etkileşimler E modüllerde iyileşmeyi sağlamaktadır. Ayrıca S5 ve S7 no.lu örneklerdeki sırasıyla, hidrofobik etkileşimler ve iyonomer-multiplet geçişleri, salım sürecinde E modüllerin sabit kalmasını desteklemektedir. Sonuç olarak, L-AA salımı sonlandığında hidrojeller genel olarak yapısal bütünlüklerini korumaktadır.

Çizelge 4.3 : Hidrojellerin L-AA salımı sırasındaki E modülleri (kPa).

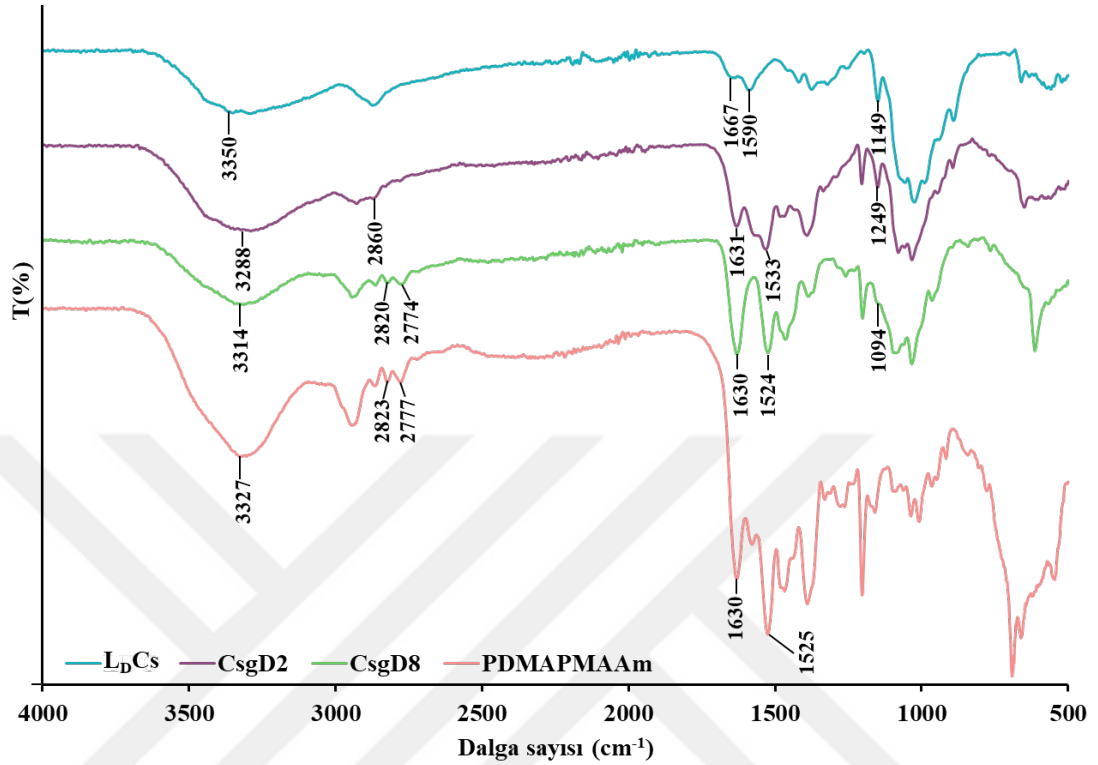
Örnek No	S1	S5	S6	S7
E ₀	15,2	19,1	13,3	28,6
E _{2h}	kırıldı	14,7	13,1	26,9
E _{4h}	-	13,7	18,7	26,3
E _{48h}	-	21,8	15,9	23,2

Katyonik komonomer ve çapraz bağlayıcı türünün PNIPAAm hidrojellerinin görünüşleri, mekanik özellikleri, şişme/büzülme, su difüzyonu ve ilaç salımlarına etkilerinin incelenmesinin ardından çalışmanın ikinci kısmında pH duyarlı DMAPMAAm monomeri ile doğal katyonik bir polimer olan Cs kullanılarak Cs-g-PDMPMAAm aşırı kopolimerleri sentezlendi, karakterizasyonları gerçekleştirilerek gen taşıyıcı sistem olarak uygunlukları araştırıldı.

4.5 Cs-g-PDMPMAAm Aşırı Kopolimerlerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

Farklı molekül ağırlıkları ve deasetilasyon derecelerine sahip L_DCS, LCs, M_DCS ve MCs polimerlerinin zincirlerine aşıl原因 PDMPMAAm dallarının varlığı FTIR spektrofotometresi ve ¹H-NMR spektrumları kullanılarak belirlendi. Aşıl原因 PDMPMAAm dallarının kitosanın FTIR ve ¹H-NMR spektrumunda yarattığı farkı

gözlemek amacıyla, ayrıca CsgD aşı kopolimerlerinin sentez koşulları kullanılarak PDMAAPMAAm homopolimeri sentezlendi ve CsgD aşı kopolimerleri ile kıyaslandı (Şekil 4.9 ve 4.10).



Şekil 4.9 : L_DCs, CsgD2, CsgD8 aşı kopolimerleri ile PDMAAPMAAm'ın FTIR spektrumları.

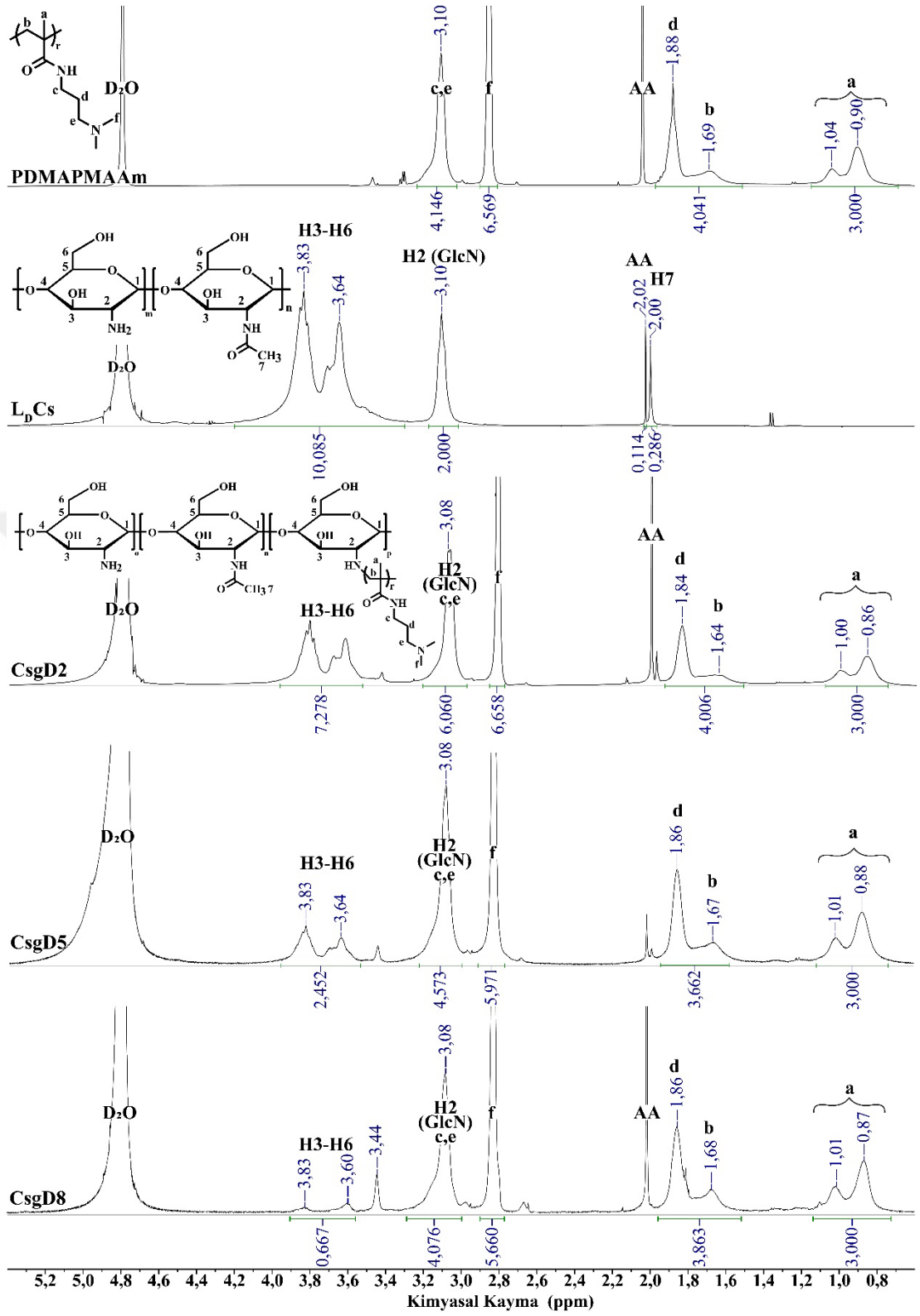
Kitosan ve PDMAAPMAAm'e ait FTIR pikler aşağıda sıralanmaktadır.

Kitosanın belirleyici pikleri: 3365- 3290 cm⁻¹ aralığındaki geniş band N-H ve O-H gerilme , 2920 ve 2861 cm⁻¹'deki band C-H simetrik ve asimetrik gerilme , 1653,4/1649,5 cm⁻¹'deki band C=O (amit I) gerilme bandı, 1544,1/1591 cm⁻¹'deki band N-H (amit II) eğilme. 1373 cm⁻¹'deki band C-N (amit III) gerilme [332].

PDMAAPMAAm belirleyici pikler: 3327 cm⁻¹'de N-H gerilme, 2800/2700 civarlarında dimetilamino gruplarından kaynaklanan C-H gerilme ve 1630 civarlarında amit grubundan ileri gelen C=O gerilme (amit I) [333].

L_DCs'ın 3350cm⁻¹'de geniş bant şeklinde N-H ve O-H gerilme, PDMAAPMAAm'in ise 3327 cm⁻¹'de N-H gerilme piki bulunmaktadır ve CsgD aşı kopolimerlerinde bu pikler belirgin şekilde gözükmemektedir. Ayrıca L_DCs ile sırasıyla 4,75 x10⁻³ ve 7,20 x10⁻² mol/L KPS varlığında sentezlenen CsgD2 ve CsgD8 aşı kopolimerlerine ait spektrumlarda bulunan, sırasıyla 2771 ve 2774 cm⁻¹'deki pikler PDMAAPMAAm'in

dimetilamino gruplarındaki $-CH_3$ gruplarının C-H gerilme piklerine ($2777/2823\text{ cm}^{-1}$) karşılık gelmektedir. Bununla birlikte, kitosanın deasetilasyon derecesi arttıkça azalan ve zayıf gözükten 1667 cm^{-1} 'deki C=O gerilme (amit I) piki, PDMAPMAAm'de 1630 cm^{-1} 'de kuvvetli bir şekilde görünmektedir. CsgD2 ve CsgD8 aşı kopolimlerinde sırasıyla 1631 ve 1630 cm^{-1} 'de mevcut olan ve şiddeti kitosana göre yüksek olan C=O gerilme pikleri kitosana PDMAPMAAm'in aşılandığının belirgin bir göstergesidir. Öte yandan, kitosanın birincil amin gruplarının ve PDMAPMAAm'in N-H eğilme (amit II) piki sırasıyla 1590 cm^{-1} ve 1525 cm^{-1} 'de gözükmemektedir. CsgD aşı kopolimerlerinin de PDMAPMAAm ile aynı yerde (1533 ve 1524 cm^{-1}) amit II piki mevcuttur ve KPS konsantrasyonu daha düşük olan CsgD-2 örneğinde bu pik kitosanın pikine doğru kaymıştır. Bu durum, KPS konsantrasyonunun aşı verimliliği üzerindeki etkisi hakkında öncü bilgi vermektedir.



Şekil 4.10 : PDMA PMAAm, LD Cs ve CsgD aşırı kopolimerlerinin ¹H-NMR spektrumları.

^1H -NMR spektrumları üzerinden hem aşı kopolimerlerinin varlığını tespit edildi, hem de D:Cs (e) oranlarının belirlendi. D:Cs (e) oranı kitosanın anomerik olmayan C3-C6 karbonlarına bağlı 5 proton (H3-H6) ile DMAPMAAm'in dimetil amino grubunda ($-\text{N}(\text{CH}_3)_2$) bulunan karakteristik 6 protona ait piklerinin alanlar oranlanarak hesaplandı (Şekil 4.10).

^1H -NMR ölçümleri $\text{D}_2\text{O}/\text{TFA}$ çözeltisi içerisinde yani PDMAPMAAm'in pK_a 'sının altında bir pH'ta gerçekleştirildiği için PDMAPMAAm'in karakteristik piki değerlendirilirken hem aşı kopolimerlerindeki dalların hem de PDMAPMAAm homopolimerlerinin tamamen katyonik halde bulunduğu var sayıldı. $\text{L}_\text{D}\text{Cs}$ ile sentezlenen CsgD aşı kopolimerlerinin ^1H -NMR ($\text{D}_2\text{O}/\text{TFA}$) spektrumunda bulunan 3,4-3,8 ppm arasındaki pikler glukopiranoz halkasında bulunan anomerik olmayan C3-C6 karbonlarına bağlı H3-H6 atomlarını temsil ederken 2,8 ppm'de gözükken sinyal PDMAPMAAm'in dimetilamino gruplarına ait karbonlara bağlı H(f) protonlarından kaynaklanmaktadır. Bu kitosanın orijinal spektrumunda bulunmayan yeni pik PDMAPMAAm dallarının kitosanın üzerine başarı ile aşılandığını göstermektedir. Ayrıca tıpkı FTIR sonuçlarında olduğu gibi burada da KPS konsantrasyonu daha düşük olan aşı kopolimerinin kitosan pikleri daha şiddetlidir yani konsantrasyon aşı verimliliğini etkilemektedir.

Gen terapisinde uygun taşıyıcının tasarlanması için kullanılacak polimerin iyi tanımlanmış olması gerekmektedir. Ayrıca yeni bir polimer sentezlendiğinde, polimerizasyon koşullarının belirlenmesi ve yüksek verimli yapılar elde etmek de oldukça önemlidir. Bu sebeple, CsgD aşı kopolimerlerinin sentez koşullarının kitosana aşılanan PDMAPMAAm dallarının oranına (D:Cs), aşı verimine ve etkinliğine (GY ve GE), molekül ağırlığına, aşı frekansına ve sübsitasyon derecesine etkisi, gravimetri, viskozite, hidroliz, GPC ve ^1H -NMR gibi karakterizasyon yöntemleri kullanılarak incelendi. Aşı verimi ile CsgD aşı kopolimerlerinin kitosana kütlece oranı, aşı etkinliği ise saflaştırılmış CsgD'deki PDMAPMAAm dallarının polimerizasyon çözeltisine eklenen DMAPMAAm monomerine oranını ifade etmektedir. Çizelge 4.4, 4.5 ve 4.6'da verilen sonuçlar, kitosanın ve KPS'in konsantrasyonunun, kitosanın molekül ağırlığı ve deasetilasyon derecesi ile reaksiyon sırasındaki D:Cs oranının GY ve GE üzerindeki etkisini göstermektedir. GY_e elde edilen ürünün ağırlığı üzerinden pratik , GY_t ise teorik olarak hesaplanan aşı verimini ifade etmektedir.

Çizelge 4.4 : %1 L_DCs varlığında sentezlenen CsgD aşı kopolimerlerinin zincir parametrelerine KPS konsantrasyonunun etkisi.

KPS (10 ³ ; mol/L)	D:Cs (t)**	Örnek No	D:Cs (e)**	D:Cs (f)**	GY _e (%)	GY _t (%)	GE (%)
4,75		CsgD-2 ₁ *	0,9	0,9	90	825	10
		CsgD-2 ₂	1,5	1,3	129	825	15
9,00	8	CsgD-5 ₁	2,0	1,8	193	825	22
		CsgD-5 ₂	2,4	2,9	300	825	39
		CsgD-8 ₁	6,0	5,9	611	825	74
72,0		CsgD-8 ₂	6,7	6,9	709	825	92
		CsgD-8 ₃	7,0	7,7	790	825	95

*alt indisler her aşı kopolimerinin tekrar sayısını göstermektedir. **(t) teorik, (e) 1H-NMR'dan belirlenen, (f) gravimetrik yöntemle hesaplanan D:Cs oranı.

Çizelge 4.5 : %1 L_DCs varlığında sentezlenen CsgD aşı kopolimerlerinin zincir parametrelerine D:Cs(t) oranının etkisi.

Örnek No	KPS (10 ³ ; mol/L)	D:Cs (t)**	D:Cs (e)**	D:Cs (f)**	GY _e (%)	GY _t (%)	GE (%)
CsgD-1	4,75	6	0,8	0,6	60	618	9
CsgD-2 ₁ *	4,75	8	0,9	0,9	90	825	10
CsgD-2 ₂	4,75		1,5	1,3	129	825	15
CsgD-4	9,00	6	1,3	1,2	120	618	5
CsgD-5 ₁	9,00	8	2,0	1,8	193	825	22
CsgD-5 ₂	9,00		2,0	2,9	300	825	39
CsgD-7	72,0	6	4,0	5,2	540	618	94
CsgD-8 ₁	72,0		6,0	5,9	611	825	74
CsgD-8 ₂	72,0	8	6,7	6,9	709	825	92
CsgD-8 ₃	72,0		7,0	7,7	790	825	95
CsgD-11 ₁	72,0	10	4,0	4,6	473	1032	46
CsgD-11 ₂	72,0		4,0	4,8	500	1032	65

*alt indisler her aşı kopolimerinin tekrar sayısını göstermektedir. **(t) teorik, (e) 1H-NMR'dan belirlenen, (f) gravimetrik yöntemle hesaplanan D:Cs oranı.

Çizelge 4.6 : 8:1 D:Cs(t) oranı ile sentezlenen CsgD aşı kopolimerlerinin zincir parametrelerine Cs konsantrasyonunun, molekül ağırlığının ve deasetilasyon derecesinin etkisi.

Örnek No	Cs Türü	Cs (w/v%)	KPS (10 ³ ; mol/L)	D:Cs (e)**	D:Cs (f)**	GY _e (%)	GY _t (%)	GE (%)
CsgD-21*	L _D Cs	1	4,75	0,9	0,9	90	825	10
CsgD-22	L _D Cs	1	4,75	1,5	1,3	129	825	15
CsgD-31	L _D Cs	2	4,75	0,2	0,1	10	820	2
CsgD-32	L _D Cs	2	4,75	1,0	0,9	90	820	9
CsgD-121	LCs	1	4,75	1,0	0,9	76	797	10
CsgD-122	LCs	1	4,75	1,5	1,1	78	797	10
CsgD-13	LCs	2	4,75	1,0	0,9	88	797	11
CsgD-15	M _D Cs	1	4,75	0,3	0,2	20	825	2
CsgD-16	M _D Cs	2	4,75	0,2	0,1	5	811	1
CsgD-18	MCs	1	4,75	1,8	1,4	144	812	18
CsgD-19	MCs	2	4,75	0,2	0,1	10	820	1
CsgD-51	L _D Cs	1	9,00	2,0	1,8	193	825	22
CsgD-52	L _D Cs	1	9,00	2,0	2,9	300	825	39
CsgD-6	L _D Cs	2	9,00	0,1	0,1	13	825	2
CsgD-81	L _D Cs	1	72,0	6,0	5,9	611	825	74
CsgD-82	L _D Cs	1	72,0	6,7	6,9	709	825	92
CsgD-83	L _D Cs	1	72,0	7,0	7,7	790	825	95
CsgD-91	L _D Cs	2	72,0	6,0	5,1	525	825	63
CsgD-92	L _D Cs	2	72,0	6,5	5,3	545	825	66
CsgD-10	L _D Cs	3	72,0	3,0	3,0	305	825	37
CsgD-141	LCs	1	72,0	5,3	4,9	511	810	61
CsgD-142	LCs	1	72,0	7,0	7,2	740	810	91
CsgD-171	M _D Cs	1	72,0	5,0	4,9	506	820	62
CsgD-172	M _D Cs	1	72,0	7,0	5,9	604	820	74
CsgD-201	MCs	1	72,0	5,4	6,9	715	812	88
CsgD-202	MCs	1	72,0	7,0	7,5	775	812	95

*alt indisler her aşı kopolimerinin tekrar sayısını göstermektedir. **(e) ¹H-NMR'dan belirlenen, (f) gravimetrik yöntemle hesaplanan D:Cs oranı.

Yapılan hesaplamalar ve analizler sonucunda, D:Cs(t) oranı sabit tutularak KPS konsantrasyonunu 4,75 x10⁻³ mol/L'den 7,2 x10⁻² mol/L'ye arttırıldığında kitosana bağlanan PDMAPMAM dallarının oranının arttığı, yüksek verimli aşı kopolimerlerinin elde edildiği ve bu durumun kitosanın molekül ağırlığı ile deasetilasyon derecesinden bağımsız olduğu bulgulandı. Öte yandan, 7,2 x10⁻² mol/L KPS konsantrasyonunda kitosanın C-O-C bağlarının serbest radikaller tarafından kırılması ve bu noktalardan radikal oluşma olasılığı yüksektir ve bu durumda

Cs/PDMAPMAAm kopolimerleri Cs-g-PDMAPMAAm aşı kopolimerleri yerine Cs-b-PDMAPMAAm (veya PDMAPMAAm-b-Cs-b-PDMAPMAAm) blok polimerleri oluşturabilir. Çizelge 4.7 ve 4.8'deki CsgD aşı kopolimerlerinin molekül ağırlıkları, GF değerleri ile çalışmanın devamında anlatılacak olan kitosanın KPS varlığında degradasyonundan elde edilen sonuçlar da bu bulguları desteklemektedir. Ayrıca en yüksek verime sahip CsgD aşı kopolimerlerinin D:Cs(t) oranı 8:1 olduğu durumda elde edilebildiği, 6:1 oranının aşı kopolimerizasyonu için yeterli olmadığı, 10:1 koşullarına çıkıldığında ise aşı kopolimeri yerine PDMAPMAAm homopolimeri olduğu rapor edildi. Benzer şekilde, kitosan konsantrasyonu 2 (veya 3) katına çıkartılması da homopolimer oluşumunu desteklemektedir. Tüm koşullar sabit tutularak L_D Cs, LCs, M_D Cs ve MCs ile gerçekleştirilen deneylerin sonucunda kitosanın molekül ağırlığı ve/veya deasetilasyon derecesinin değişiminin dal uzunluklarında büyük bir etkiye sahip olmadığı bulgularıdır.

Aşı kopolimerizasyonunda reaksiyonun süresi ve çözelti koşulları da aşı verimi/etkinliğini değiştiren faktörlerdendir. Bunun için, en yüksek GY, GE ve D:Cs (e,f) değerlerine sahip CsgD8 örneğinin koşulları baz alınarak, reaksiyon süresi veya çözeltideki asetik asit konsantrasyonu değiştirildi ve deneyler tekrarlandı. Elde edilen bulgular sonucunda, %1 AA içerisinde gerçekleşen sentezlerde (GY: %339, GE: %41) verimin düştüğü, reaksiyon süresini 13 saate çıkartmanın ise (GY: %696, GE: %84) herhangi bir etki yaratmadığı belirlendi.

Çizelge 4.4, 4.5 ve 4.6'da özetlenen tüm reaksiyon koşulları değerlendirildiğinde, polimerizasyon için en uygun D:Cs(t) oranının 8:1 olduğu, kitosanın molekül ağırlığının sentez üzerinde etkisi olmadığı net bir şekilde gözükmemektedir. Ayrıca kitosanın aşı kopolimerlerinin sentezlenmesinin sebeplerinden biri kitosanın çözünürlüğünü arttırmaktı ancak yapılan karakterizasyon deneyleri sırasında M_D Cs ve MCs ile sentezlenen CsgD aşı kopolimerlerinin çözünürlükleri ile ilgili sorunlar ortaya çıkmıştır. Bu sebeple, çalışmalara sadece düşük molekül ağırlıklı kitosan ile molce 8:1 D:Cs(t) oranı kullanılarak sentezlenen CsgD aşı kopolimerleri ile devam edildi.

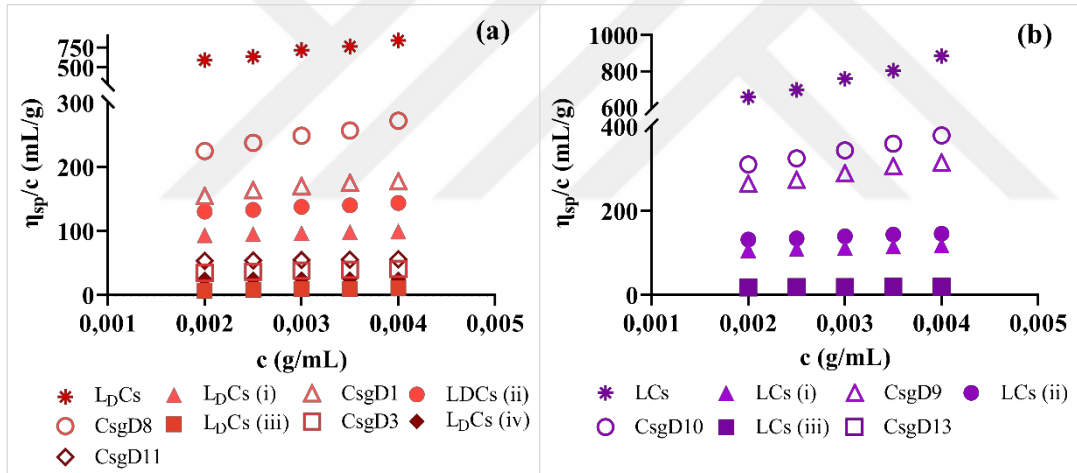
Çizelge 4.7'de seçilen CsgD aşı kopolimerlerinin kapiler viskozite ölçümü ile elde edilen intrinsik viskoziteleri ile GPC'den belirlenen sayıca ve ağırlıkça molekül ağırlıkları gösterilmektedir. Ayrıca şekil 4.11'de (a) L_D Cs ve (b) LCs'nin (i) 1.0 % (w/v) Cs ve $4,75 \times 10^{-3}$ mol / L KPS; (ii) 2.0 % (w/v) Cs ve $4,75 \times 10^{-3}$ mol / L KPS; (iii) 1.0% (w/v) Cs ve $7,20 \times 10^{-2}$ mol / L KPS; (iv) 2.0 % (w/v) Cs ve $7,20 \times 10^{-2}$

mol/L KPS koşullarındaki parçalanmış türlerinin ve ilgili CsgD kopolimerlerinin η_{sp}/c vs c grafikleri verilmektedir.

Çizelge 4.7 : CsgD aşısı kopolimerlerinin intrinsik viskoziteleri, sayıca ($\bar{M}_n$) ve ağırlıkça ($\bar{M}_w$) molekül ağırlıkları ile PDI değerleri.

<i>Cs Türü</i>	<i>Örnek No</i>	<i>Cs (w/v%)</i>	<i>KPS (10³; mol/L)</i>	<i>D:Cs*</i>	<i>[η]_{CsgD}</i>	<i>$\bar{M}_n$ (kg/mol)</i>	<i>$\bar{M}_w$ (kg/mol)</i>	<i>PDI</i>
<i>L_DCs</i>	CsgD-2	1	4,75	8(1,5)	133,7	260,8	461,2	1,77
	CsgD-3	2		8(1,0)	179,2	355,1	535,9	1,51
	CsgD-5	1	9,00	8(2,0)	90,0	243,6	467,1	1,92
	CsgD-8	1	72,0	8(7,0)	31,9	82,2	86,2	1,05
	CsgD-9	2		8(6,5)	51,4	64,5	70,0	1,07
<i>LCs</i>	CsgD-12	1	4,75	8(1,5)	209,0	527,4	906,1	1,72
	CsgD-13	2		8(1,0)	239,1	894,3	1,543,0	1,73
	CsgD-14	1	72,0	8(7,0)	17,2	61,1	65,6	1,08

*D:Cs oranları sırasıyla (t) ve (f) değerlerine karşılık gelmektedir.



Şekil 4.11 : L_DCs, LCs ve CsgD aşısı kopolimerlerine ait η_{sp}/c vs c grafikleri.

Çizelge 4.7’de verilen CsgD aşısı kopolimerlerine ait intrinsik viskoziteleri, GPC’den elde edilen molekül ağırlıkları ve şekil 4.11’deki viskozite grafikleri incelendiğinde, %1 Cs (w/v%) içeren örneklerde KPS konsantrasyonu arttıkça molekül ağırlıklarında ve intrinsik viskozitelerinde keskin bir düşüş olduğu, Cs konsantrasyonu artırıldığında veya kitosanın deasetilasyon derecesi düşürüldüğünde ([KPS]: $4,75 \times 10^{-3}$ mol/L durumunda) ise daha büyük molekül ağırlığına sahip yapılar oluştuğu görülmektedir. Buradan elde edilen sonuçlar kullanılarak CsgD aşısı kopolimerlerinin SD, GF değerleri, dal sayısı ve uzunlukları hesaplandı.

Çizelge 4.8 : CsgD aşı kopolimerlerinin zincir parametreleri.

Örnek No	Cs Türü	Cs (%w/v)	KPS (10^3 , mol/L)	D:Cs (f)*	SD (mol/mol)	GF	$L_H^{(i)}$	$L_t^{(ii)}$	$G_{N,t}^{(ii)}$	$G_{N,g}^{(iii)}$
CsgD2	L _D Cs	1	4,75	8,0 (1,5)	0,0039	258	316	231	35	17
CsgD3		2	4,75	8,0 (1,0)	0,0031	324	584	462	17	17
CsgD5		1	9,00	8,0 (2,0)	0,0037	269	494	116	69	18
CsgD8		1	72,0	8,0 (7,0)	0,0427	23	176	14	554	12
CsgD9	LCs	2	72,0	8,0 (6,5)	0,0268	37	234	29	277	15
CsgD12		1	4,75	8,0 (1,5)	0,0033	300	504	223	36	16
CsgD13		2	4,75	8,0 (1,0)	0,0020	502	915	445	18	15
CsgD14		1	72,0	8,0 (7,0)	0,0323	31	222	14	575	22

(i) Hidroliz edilen PDMAPMAAm dallarından hesaplandı (ii) denklem 3.19 ve 3.20 ile hesaplandı (iii) denklem 3.17 ile hesaplandı.

Çizelge 4.8'deki GF iki aşı noktası arası glukozamin ünitesinin sayısını, DS ise bir mol kitosan başına düşen PDMAPMAAm'in molünü ifade etmektedir. Öte yandan, DS aslında mol yerine her bir gram glukozamin başına düşen 10^4 gram PDMAPMAAm'e karşılık gelmektedir. Bu sebeple, mol/mol değerinin g/g'a çevrilmesi için 10^4 ile çarpılması gerekmektedir.

GF ve SD başlatıcı konsantrasyonu ile değişen en önemli zincir parametreleridir. Örneğin, KPS konsantrasyonu 10 katı arttırıldığında iki aşı noktası arasındaki glukozamin sayısı da benzer oranda düşmektedir. Bu beklenmeyen sonuç, KPS konsantrasyonu arttıkça kitosan zincirlerinin kırıldığını ve kitosanın degradasyona uğradığının bir diğer kanıtıdır. SD değeri incelendiğinde ise, KPS konsantrasyonu ile doğru orantılı bir değişim olduğu yani kitosan zinciri üzerinde daha çok aşılama noktası oluştuğunu ve daha fazla PDMAPMAAm'in kitosana bağlandığını gözükmemektedir. Bu sonuçlar, 1H -NMR ve gravimetrik yöntem ile hesaplanan D:Cs oranları ile de desteklenmektedir.

Teorik ve deneysel yöntemlerle hesaplanan dal sayıları (G_N) ve uzunlukları (L) da, KPS konsantrasyonuna bağlı olarak keskin şekilde değişmektedir. $[\eta]$ değerleri ile hesaplanan dal sayıları ($G_{N,g}$) düşük kitosan ve yüksek KPS konsantrasyonunda KPS ve Cs miktarına bağlı teorik dal sayılarından ($G_{N,t}$) daha düşükken, kitosan

konsantrasyonu arttığında teorik ve deneysel değerlerin birbirine yaklaştığı belirlendi. Bu durum KPS konsantrasyonu arttıkça kitosanın zincirlerinin parçalanma olasılığının artmasından kaynaklanmaktadır. Öte yandan, hidrolizden elde edilen (L_H) ve teorik (L_t) dal sayıları incelendiğinde, düşük KPS konsantrasyonunda elde edilen uzunlukların birbirine yakın olduğu ancak KPS konsantrasyonu arttıkça teorik değere kıyasla çok daha uzun dallar olduğu gözlemlendi. $4,75 \times 10^{-3}$ mol/L KPS konsantrasyonunda sentezlenen CsgD aşılı kopolimerlerinin GF ve L_H değerleri yani hem iki aşılı noktası arası glukozamin ünitesi hem de PDMAPMAAm dallarının uzunluğu beklenildiği gibi diğer örneklerden daha fazladır. Bu durum, düşük KPS konsantrasyonunda kitosan zincirleri üzerinde daha az radikal oluşmasından kaynaklanmaktadır. Teorik ve deneysel hesaplamalarda özellikle yüksek KPS konsantrasyonunda çıkan sonuçların birbirine ters olmasının sebebi, teorik denklemlerin homopolimer oluşumu ve kitosanın persülfat başlatıcıları varlığında parçalanması ihmal etmesidir. Tüm zincir parametreleri, KPS konsantrasyonu arttıkça Cs/PDMAPMAAm polimerlerinin aşılıdan blok kopolimere döndüğü işaret etmektedir.

CsgD aşılı polimerlerinin zincir parametrelerinin bulunması için hem hidrolizle elde edilen PDMAPMAAm dallarının hem de deşekerlenmiş kitosanların molekül ağırlıklarını tespit etmek gerekmektedir ve tez çalışması kapsamında bu polimerlerin molekül ağırlıkları hem GPC hem de kapiler viskozite metodu ile tayin edildi. Öte yandan, viskozite molekül ağırlıklarının hesaplanabilmesi için ölçümlerin gerçekleştirildiği sıcaklık ve çözücü ortamında (%2 (v/v) AA / 0,2 mol/L NaAc, 35°C) Mark-Houwink-Sakurada sabitlerinin bilinmesi gerekmektedir ancak literatürde PDMAPMAAm'ın herhangi bir çözücüde ve sıcaklıkta K ve a sabitleri bulunmamaktadır. Bu sebeple, üç farklı KPS ve DMAPMAAm konsantrasyonu kullanılarak 7 farklı PDMAPMAAm homopolimerleri sentezlendi ve diğer polimerlerin kapiler viskozite koşullarına uygun şekilde $[\eta]$ değerleri ve yine aynı koşullarda GPC cihazı ile sayıca ve ağırlıkça molekül ağırlıkları belirlendi. η_{sp}/c grafiklerinin kayımlarından belirlenen intrinsik viskozite değerleri ve sayıca molekül ağırlıkları kullanılarak çizilen log-log grafiğinin eğiminden ve kayımından PDMAPMAAm homopolimerlerinin 35°C'de, %2 (v/v) AA/ 0,2 mol/L NaAc çözücüsü içerisindeki Mark-Houwink-Sakurada sabitleri hesaplandı ve yeni bir denklem oluşturuldu (denklem 4.1).

$$[\eta] = 8,58 \times 10^{-4} \cdot M_n^{0,90} \quad (4.1)$$

K (mL/g) ve a sabitlerinin belirlenmesinde sayıca molekül ağırlıklarının kullanılmasının sebebi homopolimerlerin geniş molekül ağırlığı dağılımına sahip olmalarıdır (PDI: 1,5-2,2). Başlangıçta, hem sayıca hem de ağırlıkça molekül ağırlıkları kullanılarak iki farklı denklem üretildi ve PDMAAAm homopolimerlerinin intrinsik viskoziteleri kullanılarak viskozite cinsinden molekül ağırlıkları hesaplandı. Elde edilen bulgular, M_w üzerinden oluşturulan denklem ile hesaplanan M_n değerlerinin GPC sonuçları ile örtüşmediğini, M_n 'e bağlı eşitlik kullanıldığında ise her iki yöntemle elde edilen molekül ağırlıklarının birbirine yakın çıktığını gösterdi (Çizelge 4.9). Ayrıca a sabitinin 0,90 olması PDMAAAm zincirlerinin bu çözücü ve sıcaklık koşullarında doğrusal esnekliğe sahip olduğunu ifade etmektedir.

Çizelge 4.9 : PDMAAAm homopolimerlerinin intrinsik viskozite ve molekül ağırlıkları.

Örnek No	DMAPMAAm (mol/L)	KPS (10^3 , mol/L)	$[\eta]$ (mL/g)	M_n (kg/mol)	M_n (kg/mol)	M_w (kg/mol)	M_w/M_n
D1	0,25	4,75	124,0	441	637	1134	1,78
D2	0,49	4,75	117,5	510	579	1140	1,97
D3	1,00	4,75	95,0	417	348	677	1,94
D4	0,49	9,00	103,5	443	382	666	1,74
D5	1,00	9,00	61,0	246	305	458	1,50
D6	0,25	72,0	46,0	180	164	361	2,19
D7	1,00	72,0	25,0	91	106	217	2,05

Kitosanın serbest radikal çözelti polimerizasyonunda kullanılan persülfat başlatıcıları varlığında C-O-C bağlarının kırıldığı ve zincirlerin parçalandığı, molekül ağırlığının başlatıcı konsantrasyonuna bağlı olarak 100'lerce katına azalabildiği hatta oligomer oluşumuna kadar indirgenebildiği bilinmektedir [252, 253]. Çizelge 4.5, 4.6 ve 4.8'de verilen GY, GF, L ve G_N değerleri de KPS konsantrasyonu arttırıldığında LCs/L_DCs zincirlerinin parçalandığını açıkça göstermektedir. Bu tez çalışması içerisinde de, kitosanın KPS konsantrasyonuna bağlı molekül ağırlığı değişimini daha detaylı incelemek amacıyla LCs ve L_DCs'nin CsgD aşırı kopolimerlerinin sentez koşullarında degradasyon deneyleri gerçekleştirildi. Elde edilen degradasyona uğramış LCs/L_DCs zincirlerinin viskozite cinsinden molekül ağırlıkları Ubbelohde viskozitesi ile belirlendi (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10 : L ve L_D kitosanın ile degrede türevlerinin intrinsik viskoziteleri ve molekül ağırlıkları.

Cs Türü	Cs (%w/v)	KPS (10 ³ , mol/L)	[η]*	M _η (kg/mol)	M _n (kg/mol)	M _w (kg/mol)
L	-	-	419	188	168	182
L _D	-	-	337	145	156	234
L	1	4,75	95	33	46	223
L	2	4,75	117	42	58	249
L _D	1	4,75	87	30	20	66
L _D	2	4,75	117	42	53	116
L	1	72,0	8	1,7	-	-
L _D	1	72,0	2	0,4	-	-
L _D	2	72,0	25	6,8	-	-

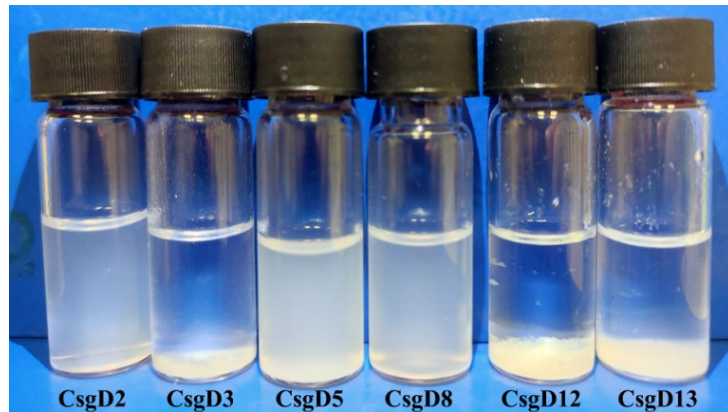
* tüm [η] değerleri mL/g cinsindendir.

Aynı örneklerin sayıca ve ağırlıkça molekül ağırlıkları ise GPC yöntemi ile tayin edildi. Elde edilen sonuçlar, KPS'in kitosan zincirlerinin parçalanmasında etkin bir rol oynadığını, $7,2 \times 10^{-2}$ mol/L KPS konsantrasyonlarında kitosan polimerlerinin oligomer boyutuna kadar parçalandığını göstermektedir. Ayrıca degrede edilmemiş LCs ve L_DCs'in molekül ağırlıklarının birbirinden farklı olduğunu yani deasetilasyon deneylerinde kullanılan NaOH'in kitosan zincirlerinin bir miktar parçalanmasına sebep olduğu bulguları. Kitosan zincirlerinin parçalanmasını etkileyen bir diğer faktör de polimerin konsantrasyonudur. Çizelge 4.10'da görüldüğü gibi kitosan konsantrasyonu arttırıldığında özellikle yüksek KPS konsantrasyonlarında zincirler daha az parçalanmaktadır.

CsgD aşısı kopolimerlerinin karakterizasyonlarına ait tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, aşısı kopolimerleri sentezinde özellikle KPS konsantrasyonunun oldukça önemli olduğu ve reaksiyon koşullarını değiştirerek farklı molekül ağırlığına, dal sayısı ve uzunluğuna sahip yapıların oluşturulabileceği bulguları. Ayrıca bu koşullarda hem kitosanın molekül ağırlığı kontrol edilebilir hem de uygulama alanına bağlı olarak blok veya aşısı kopolimeri sentezlenebilir. Daha önce de ifade edildiği gibi, gen/ilaç taşıma sistemlerinde kullanılacak polimerlerin iyi tanımlanmış olması gerekmektedir. Vücut içerisinde kullanılması planlanan bu malzemelerin fizyolojik koşullardaki (pH7,4 PBS) çözünürlüklerinin belirlenmesi de biyolojik sistemlerdeki uygunluğunun tespiti açısından oldukça önemlidir. Bu yüzden, CsgD aşısı kopolimerlerinin biyofiziksel özellikleri incelenmeden önce PBS içerisindeki çözünürlük sınırları incelendi.

4.6 CsgD Aşı Polimerlerinin Çözünürlük Sınırlarının Belirlenmesi

CsgD aşı kopolimerlerinin, L_D Cs, LCs ve PDMAAAm homopolimerinin pH 7,4 PBS içerisindeki çözünürlüğü incelendiğinde kitosanların ve aşı kopolimerlerinin bu koşullar altında çözünmediği gözlemlendi. Bu sebeple, pH 7,4 PBS içerisindeki polimer karışımlarının üzerine damla damla 0.1 mol/L HCl ilave edilerek çözünürlük sınırları incelendi. Homojen bir sistem oluşturmak amacıyla HCl ilavesi öncesinde örnekler, ultrasonik homojenizatör kullanılarak çözelti içerisinde dağıtıldı ancak bu işlemin bazı örnekler için başarılı olmadığı gözlemlendi. L_D Cs varlığında sentezlenen ve LCs içeren örnekler göre daha düşük molekül ağırlığı, dal uzunluğuna sahip olan CsgD aşı kopolimerleri çözelti içerisinde homojen bir şekilde dağılırken, diğer örneklerin büyük katı parçalar halinde dibe çöktüğü gözlemlendi (Şekil 4.12). Bu durum, yüksek molekül ağırlığı ve dal uzunluğuna sahip olan aşı kopolimerlerinin moleküler arası bağlarının ve hidrofobik etkileşimlerinin daha baskın olmasından kaynaklanabilir. Ayrıca çözünürlük testlerinde düşük molekül ağırlığına sahip (D7, $\bar{M}_n$:105,9 kg/mol) PDMAAAm homopolimeri kullanıldı. Yüksek molekül ağırlığına sahip homopolimerlerin ($< \bar{M}_n$: 300 kg/mol) çalışılan pH aralığında çözünmediği ve polimer zincirlerinin bir araya gelerek büyük jel parçaları oluşmasına yol açtığı bulguları. Bu durum, DMAAAm'ın yapısında bulunan hidrofobik propil zincirlerinin birbirleri ile etkileşmesi ve fiziksel jel oluşturması ile açıklanabilir.



Şekil 4.12 : CsgD aşı kopolimerlerin pH 7,4 PBS'teki görüntüleri.

CsgD aşı kopolimerlerinin, L_D Cs, LCs ve PDMAAAm'ın pH'a bağlı çözünürlükleri incelendiğinde, fizyolojik pH'ta protonlanmış dimetilamino gruplarına sahip PDMAAAm homopolimerinin (pKa 8,8) kolaylıkla çözündüğü, kitosanların (pKa 6,5) ise literatürde de ifade edildiği gibi ancak asidik koşullarda çözünebildiği

bulgalandı (Çizelge 4.11). Öte yandan, CsgD aşı kopolimerlerinde çözündükleri pH değerleri yapıların molekül ağırlıklarına bağlı olarak değişmektedir. Örneklerin molekül ağırlıkları arttıkça zincirlerin karmaşıklığı ve ikincil etkileşimler artmaktadır. Bu durum, protonlanabilen grupların zincir yumaklarının içerisinde kalmasına ve çözünürlüğün azalmasına sebep olduğundan bu etkileşimleri aşmak için daha düşük pH'lara inilmesi gerekmektedir.

Çizelge 4.11 : L_DCs'ın, LCs'ın, CsgD aşı kopolimerlerinin ve PDMAAPMAAm homopolimerinin çözünebildiği en yüksek pH değerleri.

<i>Cs Türü</i>	<i>Örnek No</i>	<i>pH</i>
<i>L_DCs</i>	CsgD2	5,9
	CsgD3	*
	CsgD5	6,1
	CsgD8	6,5
	CsgD9	6,6
<i>LCs</i>	CsgD12	*
	CsgD13	*
	CsgD14	*
-	L _D Cs	5,8
	LCs	5,6
	PDMAAPMAAm	7,4

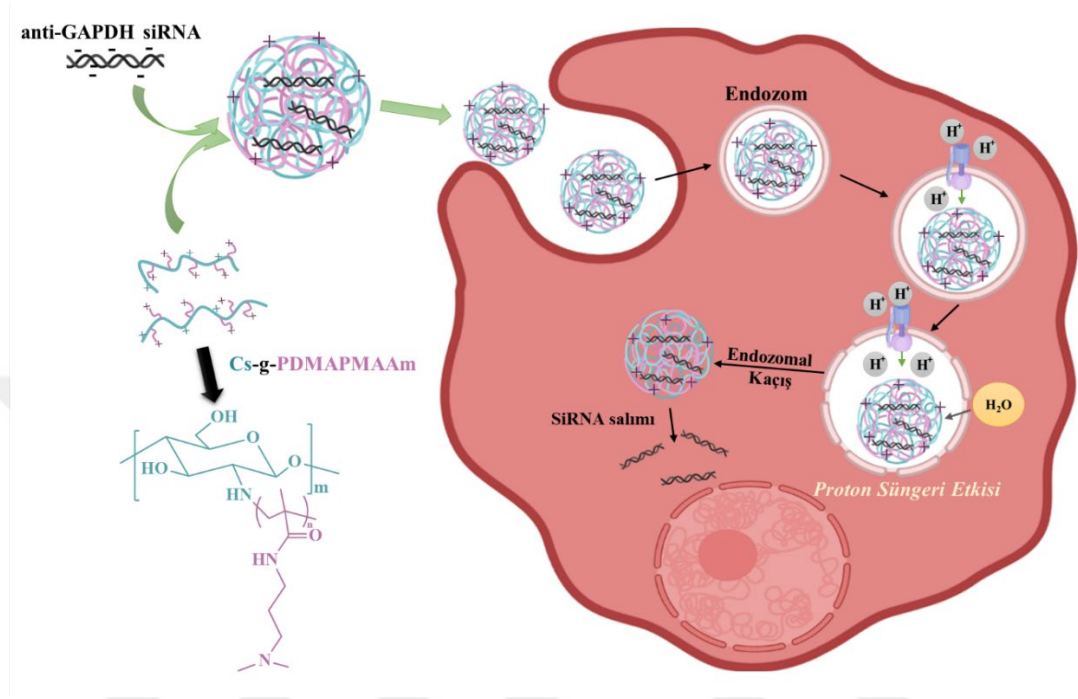
*Herhangi bir pH'ta çözünmedi.

Bu tez çalışmasının amaçlarından bir tanesi en az bir adet uygun gen/ilaç taşıyıcı malzeme oluşturabilmektir. Bu sebeple, katyonik sentetik vektör olarak tasarlanan malzemelerin yüzey yüklerinin, hemolitik aktivitelerinin, kullanılacak genetik materyal ile sayıca veya kütlece bağlanma oranlarının, sitotoksisitelerinin ve transfeksiyon etkinliklerinin yani biyofiziksel özelliklerinin belirlenerek gen taşıyıcı sistem olarak uygunluklarının araştırılması gerekmektedir.

DNA/RNA ve katyonik polimerin elektrostatik etkileşimleri ile elde edilen poliplekslerin hemolitik aktiviteleri düşük (<%5), hücre canlılıkları yüksek, boyutları hücre içerisine rahatlıkla girebilecek kadar küçük (300 nm'nin altında) ve zeta potansiyelleri (ζ) genel olarak pozitif olmalıdır [334–338]. Ayrıca kullanılan polimerin konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak toksik etki de arttığı için daha az malzeme ile yüksek oranda siRNA bağlanmalı yani, polimer:DNA/RNA bağlanma oranının düşük olmalıdır.

Taşıyıcı malzeme yukarıdaki tüm özelliklere sahip olsa bile hücre içerisinde ilacı/geni salamadığı takdir de başarılı olamaz. Hücre içerisinde terapötiklerin salınması

noktasında en önemli husus malzemenin endozomal çevrimden kaçabilmesidir. Bu çalışma içerisinde sentezlenen CsgD aşı kopolimerlerinin, yapılarında bulunan kitosanın ve PDMAPMAAm'in zayıf katyonik grupları sayesinde, proton sünger özelliği gösterdiği öngörülmektedir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13 : CsgD:anti-GAPDH siRNA polipekslerinin siRNA taşıma ve salım mekanizması.

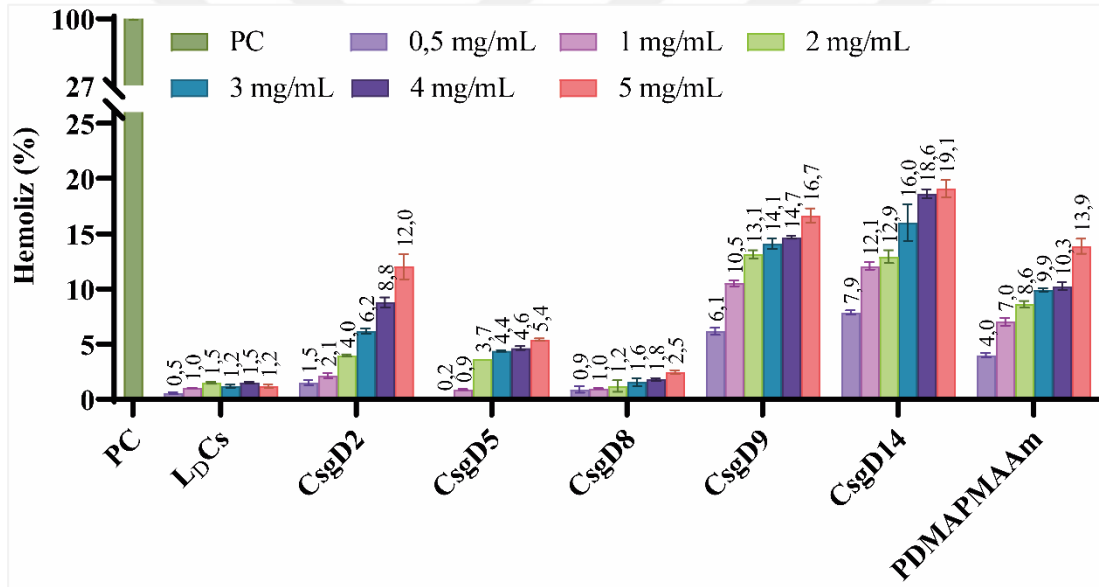
Çalışmanın bu kısmında, tüm karakterizasyon adımları tamamlanan ve en uygun taşıyıcı bileşimi olarak belirlenen CsgD aşı kopolimerlerinin sırasıyla hemolitik aktiviteleri, agaroz jel elektroforez yöntemi ile polimer:siRNA bağlanma oranları, hem polimerlerin hem de polimer/ anti-GAPDH siRNA komplekslerinin sitotoksisiteyi araştırılarak transfeksiyon etkinliği deneyleri için kullanılabilecek en uygun yapılar belirlendi. Ardından, seçilen CsgD aşı kopolimerlerinin anti-GAPDH siRNA ile oluşturduğu polipekslerin MDA-MB-231 (dirençli meme kanseri hücresi, triple negative) hücresindeki transfeksiyon etkinlikleri GAPDH protein seviyelerindeki değişimlere bağlı olarak incelenerek taşıyıcıların gen terapisi için uygunlukları araştırıldı.

4.7 CsgD Aşı Kopolimerlerinin Hemolitik Aktivitelerinin İncelenmesi

Sentetik malzemeler kan ile etkileşerek kırmızı kan hücrelerinin duvarlarının parçalanmasına (hemoliz) sebep olurlar. Bu sebeple, biyoteknoloji alanında

kullanılacak yapıların hemolitik aktivitelerinin belirlenmesi gerekmektedir. Genel olarak, çalışılan malzemenin hemolitik aktivitesi %2'nin altında ise hemolitik olmadığı, %2-5 arasında ise kabul edilebilir değerler arasında olduğu, %5'in üstünde ise biyolojik sistemler için uygun olmadığı ifade edilmektedir [334, 339].

Bu çalışmada, gen terapisinde kullanılabilecek uygun molekül ağırlığı, dal sayısı ve uzunluğuna sahip örneklerden, pH 7,4 PBS koşullarında çözünen veya çözelti içerisinde homojen olarak dağılan CsgD aşısı kopolimerleri seçilerek farklı konsantrasyonlardaki (0,5-5 mg/mL) hemolitik aktiviteleri incelendi (Şekil 4.14). Ayrıca aşısı kopolimerlerinin bileşenleri olan kitosan (LDs) ve PDMAEMA homopolimerinin de aynı konsantrasyon aralığındaki hemolitik aktiviteleri belirlenerek CsgD örnekleri ile kıyaslandı. Tüm örneklerin hemolitik aktivitesi tüm kırmızı kan hücrelerinin tahrip olduğu pozitif kontrol (PC) ile hesaplandı.



Şekil 4.14 : LDs, CsgD aşısı kopolimerleri ve PDMAEMA homopolimerinin hemolitik aktiviteleri (ortalama $\pm$ SD, n = 3).

Doğal bir polimer olan kitosanın beklendiği gibi çalışılan konsantrasyon aralığında herhangi bir hemolize sebep olmadığı, sentetik PDMAEMA homopolimerinin ise 1mg/mL konsantrasyonun üstünde kırmızı kan hücrelerinin tahrip olmasına yol açtığı tespit edildi. Bu çalışmada sentetik monomer olarak DMAEMA'nın seçilmesinin sebeplerinden biri gen terapisinde sıklıkla kullanılan DMAEMA'e göre biyouyumluluğunun daha yüksek, sitotoksitesinin daha düşük olmasıdır. Yancheva ve çalışma arkadaşları, PDMAEMA homopolimerinin, DMAEMA'nın dimetil amino gruplarının kuaternize ederek sentezlenen türevlerinin ve bu polimerlerin N-

karboksietil kitosan ile oluşturdukları komplekslerin kan ile etkileşimleri incelenmiştir. Elde edilen bulgulardan, %30 protonlanmış DMAEMA içeren PDMAEMA'in (5 mg/mL) kırmızı kan hücrelerin %60'ını parçaladığı, kuaternize PDMAEMA polimerlerinde ise hemolitik aktivitenin %20 civarlarında olduğu bulgulanmıştır [340].

Bu alışma içerisinde sentezlenen PDMAPMAAm homopolimerinin PDMAEMA ile aynı konsantrasyon aralığında (5 mg/mL) hemolitik aktivitesinin %13,9 olması PDMAPMAAm'in PDMAEMA'e göre biyoyuymumluluğunun daha yüksek olduğunu kanıtlamaktadır. Biyolojik testler için seçilen CsgD aşı kopolimerlerinin hemolitik aktiviteleri incelendiğinde ise %1 (w/v) L_DCs varlığında farklı KPS konsantrasyonlarında sentezlenen CsgD2, CsgD5 ve CsgD8 aşı kopolimerlerinin kırmızı kan hücrelerini PDMAPMAAm kadar tahrip etmediği, özellikle düşük polimer konsantrasyonlarında hemolitik aktivitelerinin olmadığı gözlemlendi. Öte yandan, CsgD8'in türevleri olan CsgD9 (%2 w/v; L_DCs) ve CsgD14 (%1 w/v; LCs) aşı kopolimerlerinin hemolize sebep olduğu bulgulandı. Bu durum, CsgD aşı kopolimerlerinin sentez koşullarına bağlı olarak değişen zincir parametreleri ve molekül ağırlıklarından kaynaklanmaktadır. Aşı kopolimerlerinin molekül ağırlıklarının, aşı frekanslarının, dal sayıları ve uzunluklarının yapıların hidrofobik ve katyonik karakterini keskin bir şekilde değiştirmektedir. Polimerin hidrofobik grupları hücre ile etkileştiğinde hücre zarını oluşturan fosfolipit gruplarının arasına girer ve yapının kararlılığını bozarak hücre zarının parçalanmasına sebep olur. Polimerin zerindeki katyonik yükler ise yapının negatif yüklü yağ tabakasına tutulmasını sağladığı için katyonik yk arttıka hidrofobik grup-zar etkileşimi de artar [341–343]. LCs'nin (DDA: %78) yapısında L_DCs'ye (DDA % 96) göre daha fazla asetil grubu bulunması yapının hidrofobik karakterinin arttırdığından beklendiği üzere daha yüksek oranda hemolize sebep olmuştur. Ayrıca CsgD aşı kopolimerlerinin pH 7,4 PBS içerisindeki DLS sonuçlarından elde edilen zeta potansiyelleri incelendiğinde ise %2 (w/v) kitosan varlığında sentezlenen CsgD9 örneğinin katyonik yükünün diğer kopolimerlere kıyasla daha yüksek olduğu görülmektedir (izelge 4.12). Bu durum, negatif yüklü hücre zarı ile katyonik polimerin iyonik etkileşimlerini arttırarak kırmızı kan hücrelerinin tahribatında artışa sebep olduğu düşünülmektedir.

Çizelge 4.12 : L_DCs'ın, CsgD aşı kopolimerlerinin ve PDMA_{PM}AAm homopolimerinin pH 7,4 PBS'deki zeta potansiyelleri.

Örnek Kodu	Zeta Potansiyeli (mV)
L _D Cs	28,0
CsgD2	34,3
CsgD5	27,8
CsgD8	30,2
CsgD9	40,4
CsgD14	29,7
PDMA _{PM} AAm	40,0

Aynı tür ve konsantrasyondaki kitosan varlığıyla sentezlenen CsgD2, CsgD5 ve CsgD8'ün hemolitik aktiviteleri ise dal sayılarına ve molekül ağırlıklarına bağlı olarak değişmektedir. Düşük KPS konsantrasyonunda sentezlenen CsgD2 aşı kopolimerinin hemolitik aktivitesinin blok kopolimer olarak da ifade edilen CsgD8'e göre daha yüksek olduğu, aşı kopolimerlerinin dal uzunluğu ve molekül ağırlığı arttıkça kırmızı kan hücrelerine verdiği hasarında arttığı gözlemlendi. Ayrıca üç aşı kopolimerinin ortak olarak hemolize sebep olmadığı en yüksek CsgD konsantrasyonunun 1 mg/mL olduğu tespit edildi. Elde edilen bulgular doğrultusunda, polipleks oluşturmak için uygun aşı kopolimerlerinin CsgD2, CsgD5 ve CsgD8 olduğu ve polimer:siRNA bağlanma oranlarının belirlenmesinde 1 mg/mL polimer konsantrasyonunun kullanılması gerektiği ifade edildi.

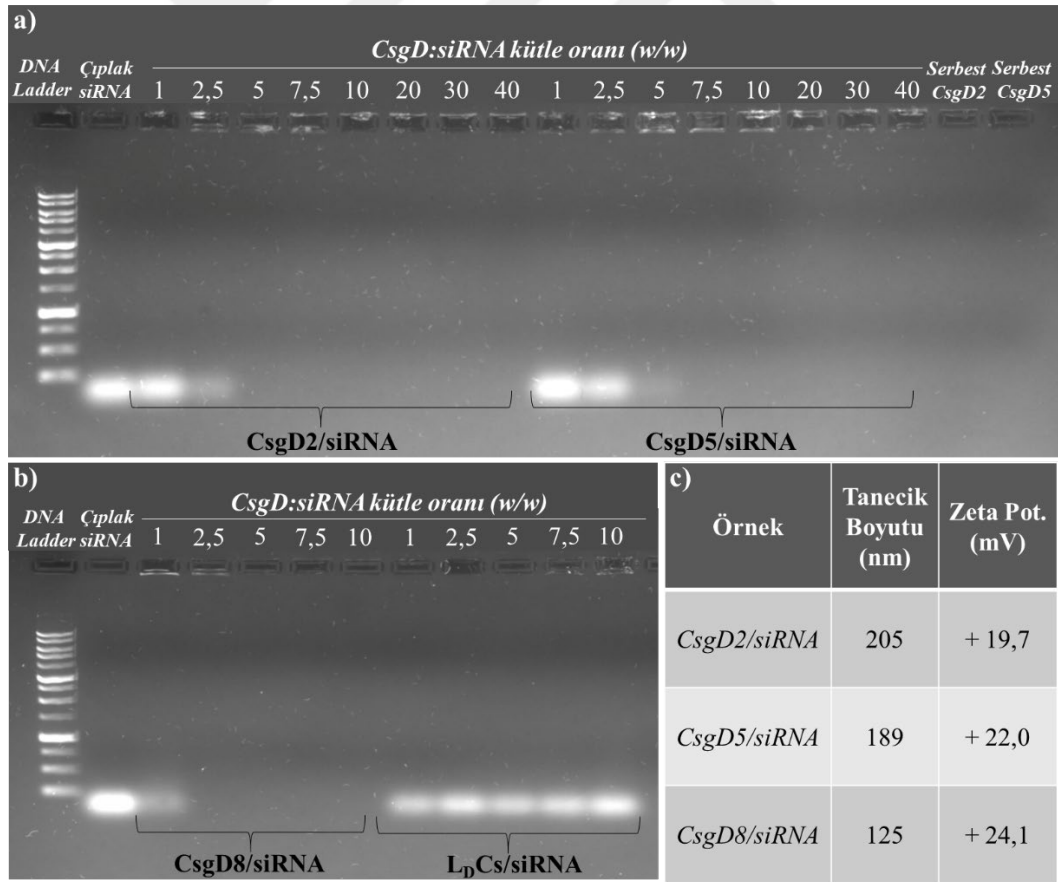
4.8 CsgD/ anti-GAPDH siRNA Poliplekslerinin Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi ile siRNA Yükleme Kapasitelerinin Belirlenmesi

Gen taşıyıcı sistemlerde genetik materyalin katyonik polimer ile hücreye girebilecek kadar küçük boyutlu polipleksler oluşturması gerekmektedir [336, 344]. Bu tez çalışmasında, CsgD aşı kopolimerleri ve L_DCs'in anti-GAPDH siRNA ile farklı polimer:siRNA (1:1, 2,5:1, 5:1, 7,5:1, 10:1, 20:1, 30:1 ve 40:1) kütle oranına sahip polipleksleri oluşturuldu ve yapıların agaroz jel elektroforez yöntemi ile bağlanma oranları, DLS spektrofotometresi ile boyut ve zeta potansiyelleri belirlendi.

Agaroz jel elektroforez yönteminde, CsgD/siRNA poliplekslerinin yanı sıra, kontrol olarak serbest siRNA ve siRNA ile bağlanmamış CsgD aşı kopolimeri kullanıldı. Böylece jel üzerindeki UV ışığı altında parlayan bantların sadece bağ yapmayan

siRNA'den kaynaklandığı, aşırı kopolimerlerinin bu koşullarda herhangi bir parlamaya sebep olmadığı belirlendi.

siRNA molekülü çözelti içerisinde 6 nm uzunluğunda ve sert çubuk (rigid rod) şeklinde bulunmaktadır. Polipekslerin boyutları ve bağlanma etkinlikleri katyonik polimer zincirlerinin morfolojilerine ait esneklik ve sertlik gibi parametrelere bağlı olarak değişmektedir [345]. Şekil 4.15'te a) CsgD2:siRNA, CsgD5:siRNA polipeksleri ile CsgD2 ve CsgD5 aşırı kopolimerlerine, b) CsgD8:siRNA ve L_DCs:siRNA polipekslerine, ait jel görüntülerini, c) ise aşırı kopolimerlerinin ve anti-GAPDH siRNA ile tam kompleksleşmenin gerçekleştiği en düşük polimer/siRNA oranında oluşturdukları polipekslerin pH 7,4 PBS'teki boyutları ve DDS içerisindeki zeta potansiyellerini göstermektedir. L_DCs:siRNA ve CsgD:siRNA polipekslerinin kütlece bağlanma oranları incelendiğinde, az miktarda aşırı kopolimerleri ile kompleks oluşturulabildiği, kitosanın ise çalışılan aralıkta siRNA'yı bağlayamadığı gözlemlendi (Şekil 4.15a ve Şekil 4.15b).



Şekil 4.15 : a) CsgD2 ve CsgD5 b) CsgD8 ve L_DCs polipekslerinin jel görüntüleri c) polipekslerin boyutları ve zeta potansiyelleri.

L_D Cs varlığında farklı KPS konsantrasyonlarında sentezlenen CsgD aşısı kopolimerlerinin siRNA ile L_D Cs'ye kıyasla daha kuvvetli etkileşim kurmaktadır. Öte yandan, düşük molekül ağırlığına sahip CsgD8 aşısı kopolimerinin oluşturduğu polileksler en düşük polimer:siRNA oranında ($\geq 2,5$) tam kompleksleşme gösterirken benzer molekül ağırlığı, dal sayısı ve uzunluğuna sahip CsgD2 ve CsgD5 örneklerinde bu oranın arttığı, sırasıyla ≥ 5 ve $\geq 7,5$ olduğu belirlendi. Ayrıca CsgD aşısı kopolimerlerinin pH 7,4 PBS içerisindeki tanecik boyutlarının ve DDS içerisindeki zeta potansiyellerinin de benzer şekilde değiştiği en yüksek KPS konsantrasyonunda sentezlenen CsgD8 aşısı kopolimerinin daha küçük boyutlu polileksler oluşturduğu yani siRNA'ı daha sıkı bağladığı ve daha katyonik olduğu gözlemlendi. Bu boyut ve yük değişiminin, PDMAAAm zincirlerinin moleküler ağırlıklarıyla ve aşısı/blok kopolimer oluşumundan kaynaklanan konformasyonel değişikliklerle ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Ayrıca hem CsgD aşısı kopolimerinin ve CsgD/siRNA polilekslerinin, boyutlarının gelişmiş geçirgenlik ve tutma etkisi ile pasif olarak tümör bölgesine hedeflenebilecek ve sonrasında hücre içerisine girebilecek kadar küçük boyutta olduğu ve uygun pozitif yüke sahip oldukları bulguları (Şekil 4.15c). Aşısı kopolimerleri siRNA ile elektrostatik etkileşimler sonucunda kompleks oluşturduğunda, yapıların zeta potansiyelleri ve boyutlarının genel olarak düşmektedir. Bu sonuçlarda, aşısı kopolimerlerinin siRNA'ı etkin şekilde bağladığını kanıtlamaktadır. Agaroz jel elektroforez ve DLS sonuçlarından elde edilen bulgular ışığında, *in vitro* çalışmalarda kullanılacak CsgD2, CsgD5 ve CsgD8 aşısı kopolimerleri ile polileks oluşturulurken polimer:siRNA kütle oranlarının sırasıyla 5:1, 7,5:1 ve 2,5:1 olmasına karar verildi.

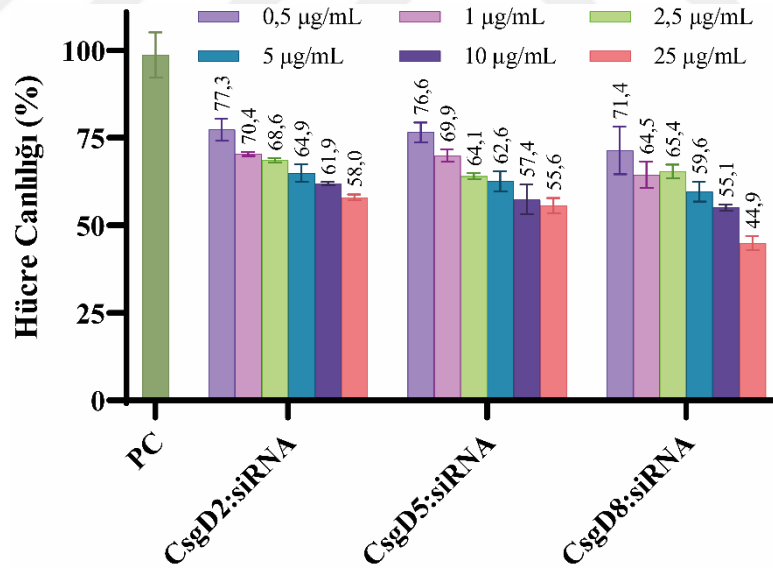
4.9 CsgD/ anti-GAPDH siRNA Polilekslerinin Sitotoksitelerinin İncelenmesi

Güvenilir gen taşıyıcı sistemler oluştururken en önemli kriter polimerik malzemelerin sitotoksiteleridir. Özellikle, katyonik yüke sahip yapılar hücre zarı ile etkileşime girerek apoptotik olmayan hücre ölümüne sebep olabilmektedir. Sitotoksite testlerinde hücre canlılığının %50'nin altında olması tüm hücrelerin öldüğüne işaret ederken, biyolojik alanlarda kullanılacak yapıların hücre canlılıklarının yüksek olması beklenmektedir.

Tüm karakterizasyon aşamalarının ve hemoliz testlerinin ardından seçilen CsgD aşısı kopolimerleri ve agaroz jel elektroforez yöntemi ile belirlenen en uygun kütlece

bağlanma oranlarında hazırlanan polipekslerin hücre canlılığı üzerine etkisi MDA-MB-231 meme kanseri hücresi kullanılarak belirlendi. Polipeksler için 0,5- 25 µg/mL aralığında, CsgD aşısı kopolimerleri için ise sadece 25 µg/mL polimer konsantrasyonunda çalışıldı.

MTS testi sonucunda elde edilen bulgular incelendiğinde, CsgD2, CsgD5 ve CsgD8 aşısı kopolimerlerinin hücre canlılıklarının sırasıyla %54,6 ±3,1, %50,4 ±2,1 ve %42,6 ±7,9 olduğu yani hücrelerin büyük bir çoğunluğunun ölümüne yol açtıkları belirlendi. Ayrıca 25 µg/mL konsantrasyonunda hazırlanan polipekslerin de benzer sonuçlar gösterdiği ve hücre canlılığının büyük oranda düştüğü bulgulandı (Şekil 4.16). Öte yandan, 0,5-1 µg/mL konsantrasyon aralığında test edilen polipekslerin 24 saatlik inkübasyonun sonrasında %70 oranında canlılığı koruduğu düşen dozla ters orantılı olarak hücre canlılığının arttığı belirlendi. Aşısı kopolimerlerinin ve 25 µg/mL konsantrasyondaki polipekslerin sitotoksik etki göstermesi katyonik yüklerinin fazla olmasından kaynaklanmaktadır [346]. Konsantrasyon azaldıkça hücre üzerine ekilen polimer çözeltisindeki toplam katyonik yük ve buna bağlı olarak sitotoksisite azalmaktadır.



Şekil 4.16 : CsgD/siRNA polipekslerinin MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin canlılığına etkisi (ortalama ± SD, n = 3) (PC: işlem görmemiş hücre).

Özetle, sitotoksik etkinin şiddetinin hem aşısı kopolimerlerinin konsantrasyonuna hem de Cs/PDMAPMAAm kopolimerlerinin molekül ağırlığı ve yapılarına (aşısı/blok) bağlı değiştiği, düşük polipeks konsantrasyonda (0,5 µg/mL) üç aşısı kopolimerinin de taşıyıcı olarak kullanılma potansiyeli olduğu ifade edilmektedir. Ayrıca diğer tüm

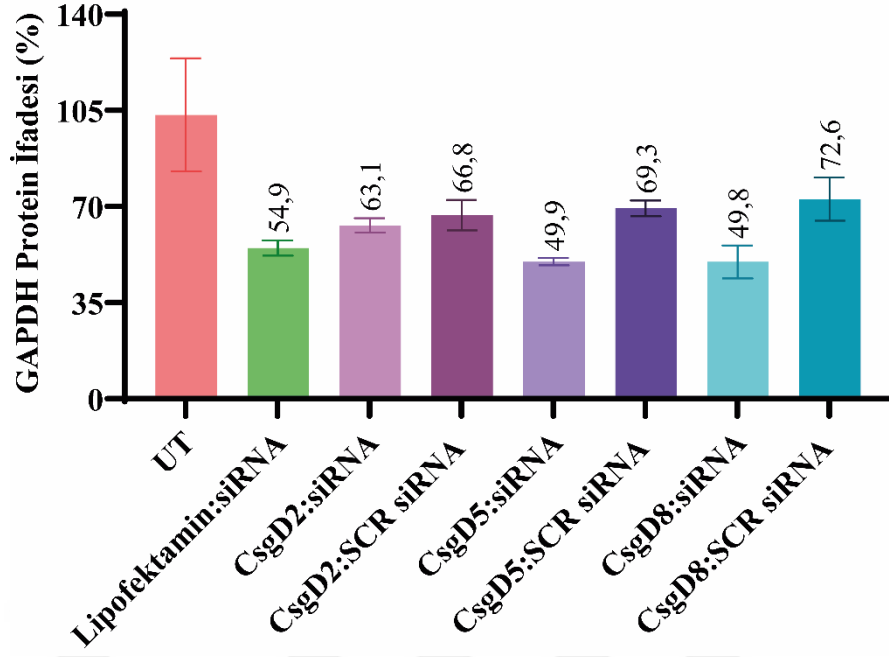
aşamalarda olduğu gibi, burada da zincir parametrelerindeki değişimlerin polimerlerin hücre zarı ile etkileşimi konusunda en önemli unsur olduğu görülmektedir.

4.10 CsgD/ anti-GAPDH siRNA Polipekslerinin Transfeksiyon Etkinliğinin Belirlenmesi

siRNA ile polipeks oluşturan CsgD aş/blok kopolimerlerinin MDA-MB-231 meme kanseri hücresi içerisine alınma ve ardından endozomdan kaçarak sitoplazma içerisine siRNA salma etkinliğinin belirlenmesi için model olarak anti-GAPDH geni seçildi. Transfeksiyon etkinliği, bu genin ekspresyonunun etkisiz hale getirilmesi ile oluşan GAPDH protein seviyelerindeki değişim miktarı tayin edilerek belirlendi.

Polipeksler hazırlanırken her bir aş kopolimeri için agaroz jel elektroforez üzerinden belirlenen en uygun polimer:siRNA kütle oranları (5:1, 7,5:1 ve 2,5:1) ve MTS testine göre en yüksek hücre canlılığına sahip polipeks konsantrasyonu (0,5 µg/mL) seçildi. Ayrıca hücrelerdeki protein seviyesi değişiminin sadece salınan anti-GAPDH siRNA'nın miktarına bağlı olması gerektiğinden, CsgD kopolimerlerinin protein seviyesi üzerindeki etkisini görebilmek için SCR siRNA kullanılarak negatif kontrolü sağlayacak CsgD/SCR siRNA polipeksleri de hazırlandı. Polipeksler sentezlenirken sabit olarak 50 nM anti-GAPDH siRNA ve SCR anti-GAPDH siRNA kullanıldı ve polimer:siRNA oranı, aş kopolimerinin miktarı değiştirilerek ayarlandı.

Yapılan testler sonucunda, hem CsgD/siRNA hem de CsgD/SCR siRNA polipekslerinin MDA-MB-231 hücrelerindeki GAPDH protein seviyelerini düşürdüğü belirlendi (Şekil 4.17). Scrambled siRNA ile yapılan komplekslerin GAPDH ekspresyonunu azaltmasının (~ %27- 34) CsgD aş kopolimerlerinin MDA-MB-231 hücrelerine karşı toksik etki göstermesinden kaynaklanabileceği, hücre ölümü sonucunda toplanan protein miktar ve kalitesinin azaldığı düşünülmektedir [347]. Bu durumun önüne geçmek amacı ile hücre lizatlarındaki toplam protein seviyeleri Bradford yöntemi ile tayin edilip her bir kuyuya eşit miktarda protein eklenerek deneyler gerçekleştirildi.



Şekil 4.17 : CsgD:siRNA, CsgD:SCR siRNA polipekslerin ve lipofektamin:siRNA kompleksinin MDA-MB 231 meme kanseri hücresindeki GAPDH protein seviyesi üzerine etkisi (ortalama $\pm$ SD, n = 6) (UT:işlem görmemiş hücre).

Şekil 4.17'deki değerler incelendiğinde, CsgD2/siRNA polipeksinin (~%37) GAPDH ekspresyonun azaltılmasında başarılı olmadığı, protein miktarının CsgD2/SCR-siRNA ile benzer seviyelerde kaldığı görülmektedir. Öte yandan, CsgD5 ve CsgD8 ile hazırlanan komplekslerin GAPDH ekspresyonunu %50 civarlarına düşürdüğü ve protein seviyelerindeki değişimin ticari olarak satılan lipofektamine (~%45) göre daha fazla olduğu belirlendi. Bu durum, CsgD aşırı kopolimerlerinin ticari taşıyıcı ile yarışabilecek başarıya sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca CsgD5 ve CsgD8 aşırı kopolimerlerinin scrambled anti-GAPDH siRNA ve anti-GAPDH siRNA ile hazırlanan polipekslerinin arasındaki protein seviyesi farkının yaklaşık %20 olması, CsgD5'in ve CsgD8'in siRNA'yı etkin bir şekilde taşıdığının ve salabildiğinin bir diğer göstergesidir.

Özetle, CsgD5 ve CsgD8 aşırı/blok kopolimerlerinin etkili bir siRNA taşıyıcısı olma potansiyele sahip oldukları ifade edilmektedir.



5. TARTIŞMA

Tez çalışmasının ilk kısmında yer alan katyonik PNIPAAm hidrojellerinden elde edilen sonuçlar, katyonik komonomerlerin (DMPMAAm, DMAEMA ve MAPTAC) ve çapraz bağlayıcının (TAB), ağ yapıların üç farklı çözelti ortamında (DDW, pH 4 ve pH 9) ve iki farklı sıcaklıktaki (25 ve/veya 37 °C) mekanik özelliklerini ve şişme/büzülme davranışlarını net bir şekilde etkilediğini ancak bu durumun sadece iyonik karakterlerinden kaynaklanmadığını gösterdi. Sentez koşullarının da, ağ yapılarda konformasyonların ve dolayısıyla, mekanik dayanımların değişmesinde etkin bir rol oynadığı belirlendi. Örneğin, 0,1 N NaOH çözeltisinde KPS başlatıcısı varlığında sentezlenen P(NIPAAm-*ko*-MAPTAC)/TAB hidrojelinin şişme derecesi çok yüksek ve dayanımı oldukça zayıfken, 1,4-dioksan ortamında AIBN kullanılarak hazırlanan P(NIPAAm-*ko*-MAPTAC)/BIS hidrojeli çalışmadaki en yüksek büzülme derecesine ve E modüle sahiptir. Bunun durum, muhtemelen farklı zincirler arasında çapraz bağlanma noktaları olarak davranan iyonomerlerin çekim kuvvetlerinden kaynaklanmaktadır. Çapraz bağlayıcı olarak, nötral BIS molekülleri yerine TAB kullanıldığında ise, MAPTAC ünitelerinin karşı iyonları tarafından ortaya çıkan iyonomer-multiplet geçişlerinin ve dolayısıyla ikincil çapraz bağlanmaların azaldığı, buna bağlı olarak hidrojellerin mekanik dayanımının zayıfladığı ifade edildi.

Hidrojellerin DDS içerisinde 25 °C'deki su difüzyon mekanizmaları ve 37 °C'deki L-AA salım kinetikleri de çapraz bağlayıcı ve katyonik monomerin türüne bağlı olarak değerlendirildi. S3 ve S5 no.lu örneklerde suyun ağ yapıya nüfus etmesinin difüzyon kontrollü bir şekilde gerçekleştiği ve bu durumun sırasıyla DMAEMA birimlerindeki ester gruplarının hidrofobik katkılarından ve MAPTA+Cl⁻ birimlerinin oluşturduğu iyonomer-multiplet geçişlerinden kaynaklandığı ifade edildi. Öte yandan, hidrofilik/iyonlaşabilen komonomer olarak DMAPMAAm ve/veya iyonik çapraz bağlayıcı olarak TAB içeren S1, S2 ve S4, S6 no.lu örneklerin su difüzyonu Fick yasasına uymadığı bulgulandı.

S6 ve S7 no.lu örneklerden L-AA salımının, sırasıyla TAB ve askorbat iyonlarının kuaterner amin grupları ile aralarındaki elektrostatik çekim kuvvetleri ve MAPTAC birimleri arasındaki multiplet oluşumları nedeniyle, difüzyon kontrollü olduğu ifade edildi. BIS çapraz bağlı hidrojeller S3 ve S1 no.lu hidrojeller de ise bu durumun

değiştirdiği ilaç salımın hem difüzyon hem de relaksasyon kontrollü gerçekleştiği belirlendi.

Katyonik PNIPAAm hidrojellerindeki farklı yapısal kombinasyonlar, aynı uyaranlara ve biyoaktif moleküle farklı tepkiler verebildiğinden, çeşitli polimerizasyon çözücüsü/başlatıcı sistemleri kullanılarak belirli bir hastalığın tedavisi için özel polimerik taşıyıcıların tasarlanabilir.

Tez çalışmasının ikinci kısmında sentezlenen CsgD aşısı kopolimerlerinin ise düşük hemolitik aktiviteleri, siRNA ile küçük boyutlu ve düşük polimer:siRNA bağlanma oranına sahip oluşturmaları, düşük polimer konsantrasyonunda (0,5 µg/mL) oluşturulan poliplekslerinin %70'in üzerinde hücre canlılığına sahip olmaları ve GAPDH protein seviyesini düşürebilmeleri, gen taşıyıcı sistem olarak umut vadeden yapılar olduğunu göstermektedir.

Başta KPS konsantrasyonu olmak üzere, kitosanın türünün/deasetilasyon derecesinin, D:Cs(t) mol oranının değiştirilmesi ile hem kitosanın parçalanma miktarı hem de sonuç ürünlerinin molekül ağırlıklarının, dal sayısı ve uzunluklarının gibi zincir parametrelerinin değiştirilebilmektedir. Bu sayede, farklı özelliklere ve katyonik karaktere sahip gen taşıyıcı sistem olarak kullanılabilecek aşısı kopolimerlerinin sentezlenmesi mümkündür. Yapılan karakterizasyon deneyleri sonucunda, özellikle KPS konsantrasyonunun CsgD aşısı kopolimerlerinin yapısal özellikleri üzerinde önemli bir etkisi olduğu gözlemlenirken, KPS konsantrasyonu arttıkça hem kitosan zincirlerinin kısaldığı hem de aşısı yerine blok kopolimerlerin (CsgD8) belirlendi.

Cs türü (L_D Cs) ve D:Cs oranı (8:1) aynı olacak şekilde sırasıyla $4,75 \times 10^{-3}$, $9,00 \times 10^{-3}$ ve $7,2 \times 10^{-2}$ mol/L KPS kullanılarak sentezlenen CsgD2, CsgD5 ve CsgD8 aşısı/blok kopolimerlerinin zeta potansiyelleri ve tanecik boyutlarının birbirinden farklı ve siRNA ile oluşturulan poliplekslerden daha yüksek olduğu belirlendi. Bu durum, CsgD kopolimerlerinin siRNA'yı güçlü bir şekilde bağlandığı ve enzimatik bozunmadan koruyabileceğini işaret etmektedir. Ayrıca örneklerin MDA-MB-231 hücrelerinin canlılığını %70 seviyelerinde tutabildiği ve CsgD5 ve CsgD8 kopolimerlerinin GAPDH protein seviyeleri lipofektamin ile benzer miktarlarda düşürdüğü, molekül ağırlığı ve dal uzunluğu arttıkça yapıların transfeksiyon etkinliğinin azaldığı bulgulandı.

Tüm bu bilgiler ışığında, bu çalışmada sentezlenen ve gen terapisi uygulama potansiyeline sahip olduğu bulguların CS-g-PDMAPMAAm aşısı kopolimerlerinin, başlangıç adımı olduğu düşünülerek devam eden süreçte sentez koşulları değiştirilerek, daha düşük molekül ağırlığına ve dal uzunluğuna sahip, hidrofobik etkileri ve katyonik yükleri dengelenmiş türevlerini sentezleyip karakterize ederek daha etkili gen taşıyıcı sistemler oluşturulması yönündeki çalışmalar devam edecektir.

Tez çalışmasının bu kısmından elde edilen bu bulgular ışığında, CS-g-PDMAPMAAm aşısı kopolimerleri RAFT polimerizasyonu ile sentezlenerek yukarıda işaret edilen zincir parametrelerinin kontrol edilebileceği ve gen terapisi için daha etkin vektörlerin tasarlanabileceği düşünülmektedir. Bu amaç doğrultusundaki çalışmalar TÜBİTAK 1001 projesi (Proje No: 122Z565) kapsamında devam etmektedir.

Ayrıca bu iki kısımdan ortaya çıkan bulgular sayesinde farklı doğal/sentetik polimer kombinasyonları ile hem ilaç hem de gen taşıyan sistemlerin tasarlanması hedeflenmektedir. Çalışmanın devamında, PNIPAAm tabanlı DMAPMAAm içeren hidrojeller ve kitosan tabanlı PDMAPMAAm içeren hibrit yapıları aşısı kopolimerlerinden elde edilen sonuçlar bir araya getirilerek, biyouyumlu, sıcaklık ve pH duyarlı ilaç ve/veya gen taşıyan (Cs-g-PNIPAAm-g-PDMAPMAAm gibi) aşısı kopolimerlerinin ve hidrojellerinin sentezi ve karakterizasyonu da planlanmaktadır.



KAYNAKLAR

- [1] **Adepu, S., & Ramakrishna, S.** (2021). Controlled drug delivery systems: Current status and future directions. *Molecules*, 26(19). <https://doi.org/10.3390/molecules26195905>
- [2] **Pan, X., Veroniaina, H., Su, N., Sha, K., Jiang, F., Wu, Z., & Qi, X.** (2021). Applications and developments of gene therapy drug delivery systems for genetic diseases. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 16(6), 687-703. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2021.05.003>
- [3] **Ashrafizadeh, M., Zarrabi, A., Bigham, A., Taheriazam, A., Saghari, Y., Mirzaei, S., ... Shen, M.** (2023). (Nano)platforms in breast cancer therapy: Drug/gene delivery, advanced nanocarriers and immunotherapy. *Medicinal Research Reviews*, 1-62. <https://doi.org/10.1002/med.21971>
- [4] **Chen, D., Liu, X., Lu, X., & Tian, J.** (2023). Nanoparticle drug delivery systems for synergistic delivery of tumor therapy. *Frontiers in Pharmacology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1111991>
- [5] **Qiu, C., Wu, Y., Shi, Q., Guo, Q., Zhang, J., Meng, Y., ... Xu, C.** (2023). Advanced strategies for nucleic acids and small-molecular drugs in combined anticancer therapy. *International Journal of Biological Sciences*, 19(3), 789-810. <https://doi.org/10.7150/ijbs.79328>
- [6] **Qiu, L. Y., & Bae, Y. H.** (2007). Self-assembled polyethylenimine-graft-poly(ϵ -caprolactone) micelles as potential dual carriers of genes and anticancer drugs. *Biomaterials*, 28(28), 4132-4142. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.05.035>
- [7] **Zhang, P., & Wagner, E.** (2017). History of Polymeric Gene Delivery Systems. *Topics in Current Chemistry*, 375(2). <https://doi.org/10.1007/s41061-017-0112-0>
- [8] **Yin, H., Song, C.-Q., Dorkin, J. R., Zhu, L. J., Li, Y., Wu, Q., ... Bizhanova, A.** (2016). Therapeutic genome editing by combined viral and non-viral delivery of CRISPR system components in vivo. *Nature biotechnology*, 34(3), 328-333.
- [9] **Hoban, M. D., Orkin, S. H., & Bauer, D. E.** (2016). Genetic treatment of a molecular disorder: gene therapy approaches to sickle cell disease. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 127(7), 839-848.

- [10] Nakamura, T., Yamada, Y., Sato, Y., Khalil, I. A., & Harashima, H. (2019). Innovative nanotechnologies for enhancing nucleic acids/gene therapy: controlling intracellular trafficking to targeted biodistribution. *Biomaterials*, 218, 119329.
- [11] Islam, M. A., Park, T. E., Singh, B., Maharjan, S., Firdous, J., Cho, M. H., ... Cho, C. S. (2014). Major degradable polycations as carriers for DNA and siRNA. *Journal of Controlled Release*, 193, 74-89. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.05.055>
- [12] Biswal, A., & Swain, S. K. (2023). Chitosan: A Smart Biomaterial. İçinde *Chitosan Nanocomposites: Bionanomechanical Applications* (ss. 1-25). Springer.
- [13] Guadarrama-Escobar, O. R., Serrano-Castañeda, P., Anguiano-Almazán, E., Vázquez-Durán, A., Peña-Juárez, M. C., Vera-Graziano, R., ... Escobar-Chávez, J. J. (2023). Chitosan Nanoparticles as Oral Drug Carriers. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5). <https://doi.org/10.3390/ijms24054289>
- [14] Tang, W., Wang, J., Hou, H., Li, Y., Wang, J., Fu, J., ... Tan, H. (2023). Review: Application of chitosan and its derivatives in medical materials. *International Journal of Biological Macromolecules*, 240. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124398>
- [15] Cherng, J.-Y., van de Wetering, P., Talsma, H., Crommelin, D. J. A., & Hennink, W. E. (1996). Effect of size and serum proteins on transfection efficiency of poly ((2-dimethylamino) ethyl methacrylate)-plasmid nanoparticles. *Pharmaceutical research*, 13, 1038-1042.
- [16] Ping, Y., Liu, C. De, Tang, G. P., Li, J. S., Li, J., Yang, W. T., & Xu, F. J. (2010). Functionalization of chitosan via atom transfer radical polymerization for gene delivery. *Advanced Functional Materials*, 20(18), 3106-3116. <https://doi.org/10.1002/adfm.201000177>
- [17] Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. Antoniet., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B., & Behr, J.-P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(16), 7297-7301.
- [18] Csaba, N., Köping-Höggård, M., Fernandez-Megia, E., Novoa-Carballal, R., Riguera, R., & Alonso, M. J. (2009). Ionically crosslinked chitosan nanoparticles as gene delivery systems: effect of PEGylation degree on in vitro and in vivo gene transfer. *Journal of biomedical nanotechnology*, 5(2), 162-171.
- [19] Suhag, G. S., Bhatnagar, A., & Singh, H. (2008). Poly(hydroxyethyl methacrylate)-based co-polymeric hydrogels for transdermal delivery of salbutamol sulphate. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 19(9), 1189-1200. <https://doi.org/10.1163/156856208785540118>
- [20] Das, A., & Ray, A. R. (2008). Synthesis and characterization of poly(acrylic acid-co-N-[3-(dimethylamino) propyl]-methacrylamide) hydrogel membranes for biomedical applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 108(2), 1273-1280. <https://doi.org/10.1002/app.27665>

- [21] **Das, A., Ghosh, S., & Ray, A. R.** (2011). Unveiling the self-assembly behavior of copolymers of AAc and DMAPMA in situ to form smart hydrogels displaying nanogels-within-macrogel hierarchical morphology. *Polymer*, 52(17), 3800-3810. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2011.05.051>
- [22] **Van De Wetering, P., Moret, E. E., Schuurmans-Nieuwenbroek, N. M. E., Van Steenberghe, M. J., & Hennink, W. E.** (1999). Structure-activity relationships of water-soluble cationic methacrylate/methacrylamide polymers for nonviral gene delivery. *Bioconjugate Chemistry*, 10(4), 589-597. <https://doi.org/10.1021/bc980148w>
- [23] **Paslay, L. C., Abel, B. A., Brown, T. D., Koul, V., Choudhary, V., McCormick, C. L., & Morgan, S. E.** (2012). Antimicrobial poly(methacrylamide) derivatives prepared via aqueous RAFT polymerization exhibit biocidal efficiency dependent upon cation structure. *Biomacromolecules*, 13(8), 2472-2482. <https://doi.org/10.1021/bm3007083>
- [24] **Singhsa, P., Manuspiya, H., & Narain, R.** (2017). Study of the RAFT homopolymerization and copolymerization of: N -[3-(dimethylamino)propyl]methacrylamide hydrochloride and evaluation of the cytotoxicity of the resulting homo- and copolymers. *Polymer Chemistry*, 8(28), 4140-4151. <https://doi.org/10.1039/c7py00837f>
- [25] **Şimşek, C., & Erbil, C.** (2022). Poly (N-isopropylacrylamide) based pH-and temperature-sensitive ampholytic hydrogels with tunable mechanical, swelling and drug release properties. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 71(15), 1148-1163.
- [26] **Fomenko, A., Sedlakova, Z., & Ilavský, M.** (2001). Phase transition in swollen gels 30. Temperature-induced phase transition in positively charged poly (N-isopropylacrylamide) hydrogels in water and aqueous NaCl solutions: 30. Temperature-induced phase transition in positively charged poly (N-isopropylacrylamide) hydrogels in water and aqueous NaCl solutions. *Polymer Bulletin*, 47, 367-374.
- [27] **Qiu, Y., & Park, K.** (2001). Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 53(3), 321-339. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00203-4](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00203-4)
- [28] **Schild, H. G.** (1992). Poly(N-isopropylacrylamide): experiment, theory and application. *Progress in Polymer Science*, 17(2), 163-249. [https://doi.org/10.1016/0079-6700\(92\)90023-R](https://doi.org/10.1016/0079-6700(92)90023-R)
- [29] **Mintzer, M. A., & Simanek, E. E.** (2009). Nonviral vectors for gene delivery. *Chemical reviews*, 109(2), 259-302.
- [30] **Valeur, E., Guéret, S. M., Adihou, H., Gopalakrishnan, R., Lemurell, M., Waldmann, H., ... Plowright, A. T.** (2017). New Modalities for Challenging Targets in Drug Discovery. *Angewandte Chemie International Edition*, 56(35), 10294-10323. <https://doi.org/10.1002/anie.201611914>
- [31] **Cevher, E., Demir, A., & Sefik, E.** (2012). Gene Delivery Systems: Recent Progress in Viral and Non-Viral Therapy. İçinde *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems*. InTech. <https://doi.org/10.5772/53392>

- [32] **Nayerossadat, N., Ali, P., & Maedeh, T.** (2012). Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Advanced Biomedical Research*, 1(1), 27. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.98152>
- [33] **Auffray, C., & Noble, D.** (2022). Gregor Mendel at the source of genetics and systems biology Celebrating the relevance of Gregor Mendel's experiments on the development of hybrid plants on the occasion of his bicentenary. *Biological Journal of the Linnean Society*, 137, 720-736. Geliş tarihi gönderen <https://academic.oup.com/biolinnean/article/137/4/720/6755506>
- [34] **Danylova, T. V., & Komisarenko, S. V.** (2020). Standing on the shoulders of giants: James watson, francis crick, maurice wilkins, rosalind franklin and the birth of molecular biology. *Ukrainian Biochemical Journal*, 92(4), 154-165. <https://doi.org/10.15407/ubj92.04.154>
- [35] **Sayed, N., Allawadhi, P., Khurana, A., Singh, V., Navik, U., Pasumarthi, S. K., ... Bharani, K. K.** (2022). Gene therapy: Comprehensive overview and therapeutic applications. *Life Sciences*, 294. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120375>
- [36] **Nilay, K. A., & Damke, S.** (2021). A Review on Gene Therapy. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 635-645. <https://doi.org/10.9734/jpri/2021/v33i60b34662>
- [37] **Verma, I. M., & Somia, N.** (1997). Gene therapy - promises, problems and prospects. *Nature*, 389(6648), 239-242. <https://doi.org/10.1038/38410>
- [38] **Flake, A. W.** (2003). Stem cell and genetic therapies for the fetus. *Seminars in Pediatric Surgery*, 12(3), 202-208. [https://doi.org/10.1016/S1055-8586\(03\)00024-6](https://doi.org/10.1016/S1055-8586(03)00024-6)
- [39] **Peddi, N. C., Marasandra Ramesh, H., Gude, S. S., Gude, S. S., & Vuppalapati, S.** (2022). Intrauterine Fetal Gene Therapy: Is That the Future and Is That Future Now? *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.22521>
- [40] **Zhang, W. W., Li, L., Li, D., Liu, J., Li, X., Li, W., ... Lam, D. M. K.** (2018). The First Approved Gene Therapy Product for Cancer Ad-p53 (Gendicine): 12 Years in the Clinic. *Human Gene Therapy*, 29(2), 160-179. <https://doi.org/10.1089/hum.2017.218>
- [41] **Seroogy, C. M., & Fathman, C. G.** (2000). The application of gene therapy in autoimmune diseases. *Gene Therapy*, 7, 9-13. Geliş tarihi gönderen www.nature.com/gt
- [42] **Ginn, S. L., Amaya, A. K., Alexander, I. E., Edelstein, M., & Abedi, M. R.** (2018). Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. *Journal of Gene Medicine*, 20(5), 1-16. <https://doi.org/10.1002/jgm.3015>
- [43] **Ansah, E. O.** (2022). Ethical Challenges and Controversies in the Practice and Advancement of Gene Therapy. *Advances in Cell and Gene Therapy*, 2022, 1-5. <https://doi.org/10.1155/2022/1015996>
- [44] **Shi, B.** (2013). *Enhancement of Gene Therapy by Exploring Functional Gene Vectors Based on Chitosan Modification* (Doktora Tezi). Mühendislik, Bilgisayar ve Matematik Bilimleri Fakültesi, Adealaide.

- [45] **Mosquera, J., García, I., & Liz-Marzán, L. M.** (2018). Cellular Uptake of Nanoparticles versus Small Molecules: A Matter of Size. *Accounts of Chemical Research*, 51(9), 2305-2313. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.8b00292>
- [46] **Backes, W. L.** (2015). Passive Diffusion of Drugs Across Membranes☆. *İçinde Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.05215-6>
- [47] **Douglas, R. G., Amino, R., Sinnis, P., & Frischknecht, F.** (2015). Active migration and passive transport of malaria parasites. *Trends in parasitology*, 31(8), 357-362.
- [48] **Foroozandeh, P., & Aziz, A. A.** (2018). Insight into Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Nanoparticles. *Nanoscale Research Letters*, 13. <https://doi.org/10.1186/s11671-018-2728-6>
- [49] **Juliano, R. L., Ming, X., & Nakagawa, O.** (2012). Cellular uptake and intracellular trafficking of antisense and siRNA oligonucleotides. *Bioconjugate Chemistry*, 23(2), 147-157. <https://doi.org/10.1021/bc200377d>
- [50] **Zuhorn, I. S., Kalicharan, R., & Hoekstra, D.** (2002). Lipoplex-mediated Transfection of Mammalian Cells Occurs through the Cholesterol-dependent Clathrin-mediated Pathway of Endocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(20), 18021-18028. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111257200>
- [51] **Rejman, J., Bragonzi, A., & Conese, M.** (2005). Role of clathrin-and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo-and polyplexes. *Molecular therapy*, 12(3), 468-474.
- [52] **Von Gersdorff, K., Sanders, N. N., Vandenbroucke, R., De Smedt, S. C., Wagner, E., & Ogris, M.** (2006). The internalization route resulting in successful gene expression depends on both cell line and polyethylenimine polyplex type. *Molecular therapy*, 14(5), 745-753.
- [53] **ur Rehman, Z., Hoekstra, D., & Zuhorn, I. S.** (2011). Protein kinase A inhibition modulates the intracellular routing of gene delivery vehicles in HeLa cells, leading to productive transfection. *Journal of controlled release*, 156(1), 76-84.
- [54] **Zuhorn, I. S., Kalicharan, D., Robillard, G. T., & Hoekstra, D.** (2007). Adhesion receptors mediate efficient non-viral gene delivery. *Molecular Therapy*, 15(5), 946-953.
- [55] **Kopatz, I., Remy, J., & Behr, J.** (2004). A model for non-viral gene delivery: through syndecan adhesion molecules and powered by actin. *The Journal of Gene Medicine: A cross-disciplinary journal for research on the science of gene transfer and its clinical applications*, 6(7), 769-776.
- [56] **Qiu, Y., Liu, Y., Wang, L., Xu, L., Bai, R., Ji, Y., ... Chen, C.** (2010). Surface chemistry and aspect ratio mediated cellular uptake of Au nanorods. *Biomaterials*, 31(30), 7606-7619.

- [57] **Wu, Y.-N., Yang, L.-X., Shi, X.-Y., Li, I.-C., Biazik, J. M., Ratinac, K. R., ... Braet, F.** (2011). The selective growth inhibition of oral cancer by iron core gold shell nanoparticles through mitochondria-mediated autophagy. *Biomaterials*, 32(20), 4565-4573.
- [58] **Buchmann, J. P., & Holmes, E. C.** (2015). Cell Walls and the Convergent Evolution of the Viral Envelope. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(4), 403-418. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00017-15>
- [59] **Varkouhi, A. K., Scholte, M., Storm, G., & Haisma, H. J.** (2011). Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *Journal of Controlled Release*, 151(3), 220-228. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.11.004>
- [60] **Ko, M., Quiñones-Hinojosa, A., & Rao, R.** (2020). Emerging links between endosomal pH and cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 39(2), 519-534. <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09870-1>
- [61] **Ma, D.** (2014). Enhancing endosomal escape for nanoparticle mediated siRNA delivery. *Nanoscale*, 6(12), 6415-6424. <https://doi.org/10.1039/c4nr00018h>
- [62] **Akita, H., Kudo, A., Minoura, A., Yamaguti, M., Khalil, I. A., Moriguchi, R., ... Kogure, K.** (2009). Multi-layered nanoparticles for penetrating the endosome and nuclear membrane via a step-wise membrane fusion process. *Biomaterials*, 30(15), 2940-2949.
- [63] **Kono, K., Torikoshi, Y., Mitsutomi, M., Itoh, T., Emi, N., Yanagie, H., & Takagishi, T.** (2001). Novel gene delivery systems: complexes of fusigenic polymer-modified liposomes and lipoplexes. *Gene therapy*, 8(1), 5-12.
- [64] **Selby, L. I., Cortez-Jugo, C. M., Such, G. K., & Johnston, A. P. R.** (2017). Nanoescapology: progress toward understanding the endosomal escape of polymeric nanoparticles. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 9(5), e1452.
- [65] **You, J.-O., & Auguste, D. T.** (2009). Nanocarrier cross-linking density and pH sensitivity regulate intracellular gene transfer. *Nano letters*, 9(12), 4467-4473.
- [66] **Yuhua, H., Litwin, T., Nagaraja, A. R., Kwong, B., Katz, J., Watson, N., & Irvine, D. J.** (2007). Cytosolic delivery of membrane-impermeable molecules in dendritic cells using pH-responsive core-shell nanoparticles. *Nano Letters*, 7(10), 3056-3064. <https://doi.org/10.1021/nl071542i>
- [67] **Smith, S. A., Selby, L. I., Johnston, A. P. R., & Such, G. K.** (2019). The Endosomal Escape of Nanoparticles: Toward More Efficient Cellular Delivery. *Bioconjugate Chemistry*, 30(2), 263-272. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00732>
- [68] **Manganiello, M. J., Cheng, C., Convertine, A. J., Bryers, J. D., & Stayton, P. S.** (2012). Diblock copolymers with tunable pH transitions for gene delivery. *Biomaterials*, 33(7), 2301-2309.
- [69] **Parente, R. A., Nir, S., & Szoka, F. C.** (1990). Mechanism of leakage of phospholipid vesicle contents induced by the peptide GALA. *Biochemistry*, 29(37), 8720-8. <https://doi.org/10.1021/bi00489a031>

- [70] **Liang, W., & W. Lam, J. K.** (2012). Endosomal Escape Pathways for Non-Viral Nucleic Acid Delivery Systems. İçinde *Molecular Regulation of Endocytosis*. InTech. <https://doi.org/10.5772/46006>
- [71] **Vermeulen, L. M. P., De Smedt, S. C., Remaut, K., & Braeckmans, K.** (2018). The proton sponge hypothesis: Fable or fact? *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 129, 184-190.
- [72] **Behr, J.-P.** (1997). The Proton Sponge: a Trick to Enter Cells the Viruses Did Not Exploit. *CHIMIA*, 51(1-2), 34. <https://doi.org/10.2533/chimia.1997.34>
- [73] **Roy, K., Ghosn, B., & Kasturi, S. P.** (2008). Enhancing polysaccharide-mediated delivery of nucleic acids through functionalization with secondary and tertiary amines. *Current topics in medicinal chemistry*, 8(4), 331-340.
- [74] **Patrick, N. G., Richardson, S. C. W., Casolaro, M., Ferruti, P., & Duncan, R.** (2001). Poly (amidoamine)-mediated intracytoplasmic delivery of ricin A-chain and gelonin. *Journal of controlled Release*, 77(3), 225-232.
- [75] **Lin, C., Zhong, Z., Lok, M. C., Jiang, X., Hennink, W. E., Feijen, J., & Engbersen, J. F. J.** (2007). Novel bio-reducible poly (amido amine)s for highly efficient gene delivery. *Bioconjugate chemistry*, 18(1), 138-145.
- [76] **Ofridam, F., Tarhini, M., Lebaz, N., Gagnière, É., Mangin, D., & Elaissari, A.** (2021). pH-sensitive polymers: Classification and some fine potential applications. *Polymers for Advanced Technologies*, 32(4), 1455-1484. <https://doi.org/10.1002/pat.5230>
- [77] **Pack, D. W., Hoffman, A. S., Pun, S., & Stayton, P. S.** (2005). Design and development of polymers for gene delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(7), 581-593. <https://doi.org/10.1038/nrd1775>
- [78] **Lukacs, G. L., Haggie, P., Seksek, O., Lechardeur, D., Freedman, N., & Verkman, A. S.** (2000). Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus. *Journal of biological chemistry*, 275(3), 1625-1629.
- [79] **Suh, J., Wirtz, D., & Hanes, J.** (2003). Efficient active transport of gene nanocarriers to the cell nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(7), 3878-3882.
- [80] **Steffens, R. C., & Wagner, E.** (2022). Directing the Way—Receptor and Chemical Targeting Strategies for Nucleic Acid Delivery. *Pharmaceutical Research*. <https://doi.org/10.1007/s11095-022-03385-w>
- [81] **Sahin, U., Muik, A., Derhovanessian, E., Vogler, I., Kranz, L. M., Vormehr, M., ... Maurus, D.** (2020). COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses. *Nature*, 586(7830), 594-599.
- [82] **Baden, L. R., El Sahly, H. M., Essink, B., Kotloff, K., Frey, S., Novak, R., ... Creech, C. B.** (2021). Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *New England journal of medicine*, 384(5), 403-416.
- [83] **Schoenmaker, L., Witzigmann, D., Kulkarni, J. A., Verbeke, R., Kersten, G., Jiskoot, W., & Crommelin, D. J. A.** (2021). mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines: Structure and stability. *International journal of pharmaceutics*, 601, 120586.

- [84] **Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., & Tuschl, T.** (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *nature*, 411(6836), 494-498.
- [85] **Zhang, B., & Farwell, M. A.** (2008). microRNAs: a new emerging class of players for disease diagnostics and gene therapy. *Journal of cellular and molecular medicine*, 12(1), 3-21.
- [86] **Xu, W., Jiang, X., & Huang, L.** (2019). RNA Interference Technology. İçinde *Comprehensive Biotechnology* (ss. 560-575). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00282-2>
- [87] **Gonçalves, C., Akhter, S., Pichon, C., & Midoux, P.** (2016). Intracellular availability of pDNA and mRNA after transfection: A comparative study among polyplexes, lipoplexes, and lipopolyplexes. *Molecular Pharmaceutics*, 13(9), 3153-3163. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00376>
- [88] **Dellar, E. R., Hill, C., Melling, G. E., Carter, D. R. F., & Baena-Lopez, L. A.** (2022). Unpacking extracellular vesicles: RNA cargo loading and function. *Journal of Extracellular Biology*, 1(5). <https://doi.org/10.1002/jex2.40>
- [89] **Nouri, A., Castro, R., Kairys, V., Santos, J. L., Rodrigues, J., Li, Y., & Tomás, H.** (2012). Insight into the role of N, N-dimethylaminoethyl methacrylate (DMAEMA) conjugation onto poly (ethylenimine): cell viability and gene transfection studies. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23, 2967-2980.
- [90] **Erbacher, P., Roche, A. C., Monsigny, M., & Midoux, P.** (1997). The reduction of the positive charges of polylysine by partial gluconoylation increases the transfection efficiency of polylysine-DNA complexes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1324, 27-36.
- [91] **Elouahabi, A., & Ruyschaert, J. M.** (2005). Formation and intracellular trafficking of lipoplexes and polyplexes. *Molecular Therapy*, 11(3), 336-347. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.12.006>
- [92] **Danielsen, S., Strand, S., de Lange Davies, C., & Stokke, B. T.** (2005). Glycosaminoglycan destabilization of DNA-chitosan polyplexes for gene delivery depends on chitosan chain length and GAG properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1721(1-3), 44-54. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.10.011>
- [93] **Kamimura, K., Suda, T., Zhang, G., & Liu, D.** (2011). Advances in Gene Delivery Systems. *Pharmaceutical medicine*, 25(5), 293-306. <https://doi.org/10.2165/11594020-000000000-00000>
- [94] **Yin, H., Kanasty, R. L., Eltoukhy, A. A., Vegas, A. J., Dorkin, J. R., & Anderson, D. G.** (2014). Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nature Reviews Genetics*, 15(8), 541-555. <https://doi.org/10.1038/nrg3763>
- [95] **Somia, N., & Verma, I. M.** (2000). Gene therapy: trials and tribulations. *Nature Reviews Genetics*, 1(2), 91-99. <https://doi.org/10.1038/35038533>

- [96] **Ramamoorth, M., & Narvekar, A.** (2015). Non viral vectors in gene therapy - An overview. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9(1), GE01-GE06. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/10443.5394>
- [97] **Patil, Gao, Lin, Li, Dang, Tian, ... Qian.** (2019). The Development of Functional Non-Viral Vectors for Gene Delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21), 5491. <https://doi.org/10.3390/ijms20215491>
- [98] **Walther, W., & Stein, U.** (2000). Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases. *Drugs*, 60, 249-271.
- [99] **Das, S. K., Menezes, M. E., Bhatia, S., Wang, X. Y., Emdad, L., Sarkar, D., & Fisher, P. B.** (2015). Gene Therapies for Cancer: Strategies, Challenges and Successes. *Journal of Cellular Physiology*, 230(2), 259-271. <https://doi.org/10.1002/jcp.24791>
- [100] **Dando, J. S., Roncarolo, M. G., Bordignon, C., & Aiuti, A.** (2001). A novel human packaging cell line with hematopoietic supportive capacity increases gene transfer into early hematopoietic progenitors. *Human gene therapy*, 12(16), 1979-1988.
- [101] **Gardlik, R., Pálffy, R., Hodosy, J., Lukács, J., Turna, J., & Celec, P.** (2005). Vectors and delivery systems in gene therapy. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 11(4), RA110-21.
Geliş tarihi gönderen <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15795707>
- [102] **Yu, Y., Gao, Y., He, L., Fang, B., Ge, W., Yang, P., ... Lei, L.** (2023). Biomaterial-based gene therapy. *MedComm*, 4(3). <https://doi.org/10.1002/mco2.259>
- [103] **Meneghini, V., Lattanzi, A., Tiradani, L., Bravo, G., Morena, F., Sanvito, F., ... Dufour, J. P.** (2016). Pervasive supply of therapeutic lysosomal enzymes in the CNS of normal and Krabbe-affected non-human primates by intracerebral lentiviral gene therapy. *EMBO molecular medicine*, 8(5), 489-510.
- [104] **Wang, D., Tai, P. W. L., & Gao, G.** (2019). Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nature reviews Drug discovery*, 18(5), 358-378.
- [105] **Naso, M. F., Tomkiewicz, B., Perry, W. L., & Strohl, W. R.** (2017). Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs*, 31(4), 317-334. <https://doi.org/10.1007/s40259-017-0234-5>
- [106] **Lundstrom, K., & Bouliskas, T.** (2003). Viral and non-viral vectors in gene therapy: technology development and clinical trials. *Technology in cancer research & treatment*, 2(5), 471-485.
- [107] **Szybalska, E. H., & Szybalski, W.** (1962). Genetics of human cell lines, IV. DNA-mediated heritable transformation of a biochemical trait. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 48(12), 2026-2034.
- [108] **Loh, X. J., Lee, T.-C., Dou, Q., & Deen, G. R.** (2016). Utilising inorganic nanocarriers for gene delivery. *Biomaterials science*, 4(1), 70-86.

- [109] **Liu, L., Li, M., Xu, M., Wang, Z., Zeng, Z., Li, Y., ... Guan, Y.-Q.** (2020). Actively targeted gold nanoparticle composites improve behavior and cognitive impairment in Parkinson's disease mice. *Materials Science and Engineering: C*, 114, 111028.
- [110] **De Smedt, S. C., Demeester, J., & Hennink, W. E.** (2000). Cationic polymer based gene delivery systems. *Pharmaceutical research*, 17, 113-126.
- [111] **Kim, H. J., Kim, A., Miyata, K., & Kataoka, K.** (2016). Recent progress in development of siRNA delivery vehicles for cancer therapy. *Advanced drug delivery reviews*, 104, 61-77.
- [112] **Yu, C., Li, L., Hu, P., Yang, Y., Wei, W., Deng, X., ... Ma, J.** (2021). Recent advances in stimulus-responsive nanocarriers for gene therapy. *Advanced Science*, 8(14), 2100540.
- [113] **Tortajada, L., Felip-León, C., & Vicent, M. J.** (2022). Polymer-based non-viral vectors for gene therapy in the skin. *Polymer Chemistry*, 13(6), 718-735.
- [114] **Monnery, B. D.** (2021). Polycation-mediated transfection: Mechanisms of internalization and intracellular trafficking. *Biomacromolecules*, 22(10), 4060-4083.
- [115] **Dass, C. R.** (2002). Biochemical and biophysical characteristics of lipoplexes pertinent to solid tumour gene therapy. *International journal of pharmaceutics*, 241(1), 1-25.
- [116] **McCutchan, J. H., & Pagano, J. S.** (1968). Enhancement of the infectivity of simian virus 40 deoxyribonucleic acid with diethylaminoethyl-dextran. *Journal of the National Cancer Institute*, 41(2), 351-357.
- [117] **Vaheri, A., & Pagano, J. S.** (1965). Infectious poliovirus RNA: a sensitive method of assay. *Virology*, 27(3), 434-436.
- [118] **Fraley, R., Subramani, S., Berg, P., & Papahadjopoulos, D.** (1980). Introduction of liposome-encapsulated SV40 DNA into cells. *Journal of Biological Chemistry*, 255(21), 10431-10435.
- [119] **Tai-Kin, W., Nicolau, C., & Hofschneider, P. H.** (1980). Appearance of β -lactamase activity in animal cells upon liposome-mediated gene transfer. *Gene*, 10(2), 87-94.
- [120] **Straubinger, R. M., & Papahadjopoulos, D.** (1983). [32] Liposomes as carriers for intracellular delivery of nucleic acids. İçinde *Methods in enzymology* (C. 101, ss. 512-527). Elsevier.
- [121] **Kawai, S., & Nishizawa, M.** (1984). New procedure for DNA transfection with polycation and dimethyl sulfoxide. *Molecular and Cellular Biology*.
- [122] **Zu, H., & Gao, D.** (2021). Non-viral Vectors in Gene Therapy: Recent Development, Challenges, and Prospects. *AAPS Journal*, 23(4). <https://doi.org/10.1208/s12248-021-00608-7>
- [123] **Ishida, T., Harashima, H., & Kiwada, H.** (2001). Interactions of liposomes with cells in vitro and in vivo: opsonins and receptors. *Current drug metabolism*, 2(4), 397-409.

- [124] **Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., ... Danielsen, M.** (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(21), 7413-7417.
- [125] **Fus-Kujawa, A., Prus, P., Bajdak-Rusinek, K., Teper, P., Gawron, K., Kowalczyk, A., & Sieron, A. L.** (2021). An Overview of Methods and Tools for Transfection of Eukaryotic Cells in vitro. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.701031>
- [126] **Al-Dosari, M. S., & Gao, X.** (2009). Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress. *The AAPS journal*, 11, 671-681.
- [127] **Gascón, A. R., del Pozo-Rodríguez, A., & Solinís, M. Á.** (2013). Non-viral delivery systems in gene therapy. İçinde *Gene therapy-tools and potential applications*. IntechOpen.
- [128] **Jones, C. H., Chen, C.-K., Ravikrishnan, A., Rane, S., & Pfeifer, B. A.** (2013). Overcoming nonviral gene delivery barriers: perspective and future. *Molecular pharmaceutics*, 10(11), 4082-4098.
- [129] **Coelho, F., Salonen, L. M., & Silva, B. F. B.** (2022). Hemiacetal-linked pH-sensitive PEG-lipids for non-viral gene delivery. *New Journal of Chemistry*, 46(32), 15414-15422. <https://doi.org/10.1039/d2nj02217f>
- [130] **Sanmartín, I., Sendra, L., Moret, I., Herrero, M. J., & Aliño, S. F.** (2021). Multicompartmental lipopolyplex as vehicle for antigens and genes delivery in vaccine formulations. *Pharmaceutics*, 13(2), 1-20. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020281>
- [131] **Wahane, A., Waghmode, A., Kapphahn, A., Dhuri, K., Gupta, A., & Bahal, R.** (2020). Role of lipid-based and polymer-based non-viral vectors in nucleic acid delivery for next-generation gene therapy. *Molecules*, 25(12). <https://doi.org/10.3390/molecules25122866>
- [132] **Rafael, D., Andrade, F., Arranja, A., Luís, S., & Videira, M.** (2015). Lipoplexes and Polyplexes: Gene Therapy. İçinde *Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials* (ss. 4335-4347). Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1081/e-ebpp-120050058>
- [133] **Correia, J. S., Mirón-Barroso, S., Hutchings, C., Ottaviani, S., Somuncuoğlu, B., Castellano, L., ... Georgiou, T. K.** (2022). How does the polymer architecture and position of cationic charges affect cell viability? *Polymer Chemistry*, 14(3), 303-317. <https://doi.org/10.1039/d2py01012g>
- [134] **Qin, Z., Liu, W., Guo, L., & Li, X.** (2012). Studies on guanidinated N-3-aminopropyl methacrylamide-N-2-hydroxypropyl methacrylamide copolymers as gene delivery carrier. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 23(1-4), 133-152. <https://doi.org/10.1163/092050610X545058>
- [135] **Zanta, M.-A., Boussif, O., Adib, A., & Behr, J.-P.** (1997). In vitro gene delivery to hepatocytes with galactosylated polyethylenimine. *Bioconjugate Chemistry*, 8(6), 839-844.

- [136] **Diebold, S. S., Kursa, M., Wagner, E., Cotten, M., & Zenke, M.** (1999). Mannose polyethylenimine conjugates for targeted DNA delivery into dendritic cells. *Journal of biological chemistry*, 274(27), 19087-19094.
- [137] **Wojda, U., & Miller, J. L.** (2000). Targeted transfer of polyethylenimine–avidin–DNA bioconjugates to hematopoietic cells using biotinylated monoclonal antibodies. *Journal of pharmaceutical sciences*, 89(5), 674-681.
- [138] **Köping-Höggård, M., Tubulekas, I., Guan, H., Edwards, K., Nilsson, M., Vårum, K., & Artursson, P.** (2001). Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure–property relationships and characteristics compared with polyethylenimine in vitro and after lung administration in vivo. *Gene Therapy*, 8(14), 1108-1121. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301492>
- [139] **Sonawane, N. D., Szoka, F. C., & Verkman, A. S.** (2003). Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine–DNA polyplexes. *Journal of Biological Chemistry*, 278(45), 44826-44831.
- [140] **Choosakoonkriang, S., Lobo, B. A., Koe, G. S., Koe, J. G., & Middaugh, C. R.** (2003). Biophysical characterization of PEI/DNA complexes. *Journal of pharmaceutical sciences*, 92(8), 1710-1722.
- [141] **Cherng, J.-Y., van de Wetering, P., Talsma, H., Crommelin, D. J. A., & Hennink, W. E.** (1996). Effect of Size and Serum Proteins on Transfection Efficiency of Poly ((2-dimethylamino)ethyl Methacrylate)-Plasmid Nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, 13(7), 1038-1042. <https://doi.org/10.1023/A:1016054623543>
- [142] **Georgiou, T. K., Phylactou, L. A., & Patrickios, C. S.** (2006). Synthesis, characterization, and evaluation as transfection reagents of ampholytic star copolymers: effect of star architecture. *Biomacromolecules*, 7(12), 3505-3512.
- [143] **Nakayama, Y.** (2012). Hyperbranched polymeric “star vectors” for effective DNA or siRNA delivery. *Accounts of Chemical Research*, 45(7), 994-1004.
- [144] **Dearnley, M., Reynolds, N. P., Cass, P., Wei, X., Shi, S., Mohammed, A. A., ... Thang, S. H.** (2016). Comparing gene silencing and physiochemical properties in siRNA bound cationic star-polymer complexes. *Biomacromolecules*, 17(11), 3532-3546.
- [145] **Mendrek, B., Sieroń, L., Zymelka-Miara, I., Binkiewicz, P., Libera, M., Smet, M., ... Dworak, A.** (2015). Nonviral Plasmid DNA Carriers Based on N,N'-Dimethylaminoethyl Methacrylate and Di(ethylene glycol) Methyl Ether Methacrylate Star Copolymers. *Biomacromolecules*, 16(10), 3275-3285. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00948>
- [146] **Arigita, C., Zuidam, N. J., Crommelin, D. J. A., & Hennink, W. E.** (1999). Association and dissociation characteristics of polymer/DNA complexes used for gene delivery. *Pharmaceutical research*, 16, 1534-1541.
- [147] **Layman, J. M., Ramirez, S. M., Green, M. D., & Long, T. E.** (2009). Influence of polycation molecular weight on poly (2-dimethylaminoethyl methacrylate)-mediated DNA delivery in vitro. *Biomacromolecules*, 10(5), 1244-1252.

- [148] Çaykara, T., Demiray, M., & Güven, O. (2005). Effect of type and concentration of surfactants on swelling behavior of poly[N-[3-(dimethylamino)propyl]methacrylamide-co-N,N-methylenebis(acrylamide)] hydrogels. *Colloid and Polymer Science*, 284(3), 258-265. <https://doi.org/10.1007/s00396-005-1365-7>
- [149] Singhsa, P., Diaz-Dussan, D., Manuspiya, H., & Narain, R. (2018). Well-Defined Cationic N-[3-(Dimethylamino)propyl]methacrylamide Hydrochloride-Based (Co)polymers for siRNA Delivery. *Biomacromolecules*, 19(1), 209-221. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01475>
- [150] Scales, C. W., Huang, F., Li, N., Vasilieva, Y. A., Ray, J., Convertine, A. J., & McCormick, C. L. (2006). Corona-stabilized interpolyelectrolyte complexes of SiRNA with nonimmunogenic, hydrophilic/cationic block copolymers prepared by aqueous RAFT polymerization. *Macromolecules*, 39(20), 6871-6881. <https://doi.org/10.1021/ma061453c>
- [151] Yadav, M., Goswami, P., Paritosh, K., Kumar, M., Pareek, N., & Vivekanand, V. (2019). Seafood waste: a source for preparation of commercially employable chitin/chitosan materials. *Bioresources and Bioprocessing*, 6(1), 1-20.
- [152] Santos, V. P., Marques, N. S. S., Maia, P. C. S. V, Lima, M. A. B. de, Franco, L. de O., & Campos-Takaki, G. M. de. (2020). Seafood waste as attractive source of chitin and chitosan production and their applications. *International journal of molecular sciences*, 21(12), 4290.
- [153] Ahmadi, F., Oveisi, Z., Samani, S. M., & Amoozgar, Z. (2015). Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications. *Research in pharmaceutical sciences*, 10(1), 1.
- [154] Ma, F., Wang, Y., & Yang, G. (2019). The modulation of chitosan-DNA interaction by concentration and pH in solution. *Polymers*, 11(4), 646.
- [155] Qian, Q., Niu, S., Williams, G. R., Wu, J., Zhang, X., & Zhu, L.-M. (2019). Peptide functionalized dual-responsive chitosan nanoparticles for controlled drug delivery to breast cancer cells. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 564, 122-130.
- [156] Nitta, S. K., & Numata, K. (2013). Biopolymer-based nanoparticles for drug/gene delivery and tissue engineering. *International journal of molecular sciences*, 14(1), 1629-1654.
- [157] Chuan, D., Jin, T., Fan, R., Zhou, L., & Guo, G. (2019). Chitosan for gene delivery: Methods for improvement and applications. *Advances in colloid and interface science*, 268, 25-38.
- [158] Pan, Y., Li, Y., Zhao, H., Zheng, J., Xu, H., Wei, G., & Hao, J. (2002). Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *International journal of pharmaceuticals*, 249(1-2), 139-147.
- [159] Babu, A., & Ramesh, R. (2017). Multifaceted applications of chitosan in cancer drug delivery and therapy. *Marine drugs*, 15(4), 96.

- [160] **Highton, A. J., Girardin, A., Bell, G. M., Hook, S. M., & Kemp, R. A.** (2016). Chitosan gel vaccine protects against tumour growth in an intracaecal mouse model of cancer by modulating systemic immune responses. *BMC immunology*, 17(1), 1-11.
- [161] **Mumper, R. J.** (1995). Novel polymeric condensing carriers for gene transfer. İçinde *Proc Natl Symp Control Rel Bioact Mater* (C. 22, ss. 178-179).
- [162] **MacLaughlin, F. C., Mumper, R. J., Wang, J., Tagliaferri, J. M., Gill, I., Hinchcliffe, M., & Rolland, A. P.** (1998). Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery. *Journal of controlled release*, 56(1-3), 259-272.
- [163] **Saranya, N., Moorthi, A., Saravanan, S., Devi, M. P., & Selvamurugan, N.** (2011). Chitosan and its derivatives for gene delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48(2), 234-238. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.11.013>
- [164] **Marques, C., Som, C., Schmutz, M., Borges, O., & Borchard, G.** (2020). How the lack of chitosan characterization precludes implementation of the safe-by-design concept. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 165.
- [165] **Al-Rooqi, M. M., Hassan, M. M., Moussa, Z., Obaid, R. J., Suman, N. H., Wagner, M. H., ... Ahmed, S. A.** (2022). Advancement of chitin and chitosan as promising biomaterials. *Journal of Saudi Chemical Society*, 26(6). <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2022.101561>
- [166] **Ravi Kumar, M. N. V.** (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46(1), 1-27. [https://doi.org/10.1016/S1381-5148\(00\)00038-9](https://doi.org/10.1016/S1381-5148(00)00038-9)
- [167] **Wu, A. C. M.** (1988). Determination of molecular-weight distribution of chitosan by high-performance liquid chromatography (ss. 447-452). [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)61055-X](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)61055-X)
- [168] **Muzzarelli, R. A. A., Lough, C., & Emanuelli, M.** (1987). The molecular weight of chitosans studied by laser light-scattering. *Carbohydrate Research*, 164, 433-442. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(87\)80146-5](https://doi.org/10.1016/0008-6215(87)80146-5)
- [169] **Khayrova, A., Lopatin, S., Shagdarova, B., Sinitsyna, O., Sinitsyn, A., & Varlamov, V.** (2022). Evaluation of Antibacterial and Antifungal Properties of Low Molecular Weight Chitosan Extracted from *Hermetia illucens* Relative to Crab Chitosan. *Molecules*, 27(2). <https://doi.org/10.3390/molecules27020577>
- [170] **Czechowska-Biskup, R., Wach, R. A., Rosiak, J. M., & Ulański, P.** (2018). Procedure for determination of the molecular weight of Chitosan by viscometry. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*, 23, 45-54. <https://doi.org/10.15259/PCACD.23.04>
- [171] **Kasaai, M. R.** (2007). Calculation of Mark-Houwink-Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent-temperature system using experimental reported viscometric constants data. *Carbohydrate Polymers*, 68(3), 477-488. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.11.006>

- [172] **Kean, T., & Thanou, M.** (2010). Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced drug delivery reviews*, 62(1), 3-11.
- [173] **Kurita, K., Kaji, Y., Mori, T., & Nishiyama, Y.** (2000). Enzymatic degradation of β -chitin: susceptibility and the influence of deacetylation. *Carbohydrate Polymers*, 42(1), 19-21. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(99\)00127-7](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(99)00127-7)
- [174] **Poth, N., Seiffart, V., Gross, G., Menzel, H., & Dempwolf, W.** (2015). Biodegradable chitosan nanoparticle coatings on titanium for the delivery of BMP-2. *Biomolecules*, 5(1), 3-19. <https://doi.org/10.3390/biom5010003>
- [175] **Huang, M., Khor, E., & Lim, L.-Y.** (2004). Uptake and Cytotoxicity of Chitosan Molecules and Nanoparticles: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation. *Pharmaceutical Research*, 21(2), 344-353. <https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000016249.52831.a5>
- [176] **Bagheri-Khoulenjani, S., Taghizadeh, S. M., & Mirzadeh, H.** (2009). An investigation on the short-term biodegradability of chitosan with various molecular weights and degrees of deacetylation. *Carbohydrate Polymers*, 78(4), 773-778. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.06.020>
- [177] **Li, J., Du, Y., & Liang, H.** (2007). Influence of molecular parameters on the degradation of chitosan by a commercial enzyme. *Polymer Degradation and Stability*, 92(3), 515-524. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2006.04.028>
- [178] **Richardson, S. W., Kolbe, H. J., & Duncan, R.** (1999). Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA. *International journal of pharmaceutics*, 178(2), 231-243.
- [179] **Jiang, T., James, R., Kumbar, S. G., & Laurencin, C. T.** (2014). Chitosan as a Biomaterial: Structure, Properties, and Applications in Tissue Engineering and Drug Delivery. İçinde G. S. Kumbar, T. C. Laurencin, & M. Deng (Ed.), *Natural and Synthetic Biomedical Polymers* (ss. 91-113). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396983-5.00005-3>
- [180] **Chung, T.-W., Lu, Y.-F., Wang, S.-S., Lin, Y.-S., & Chu, S.-H.** (2002). Growth of human endothelial cells on photochemically grafted Gly-Arg-Gly-Asp (GRGD) chitosans. *Biomaterials*, 23(24), 4803-4809. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00231-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00231-4)
- [181] **Howling, G. I., Dettmar, P. W., Goddard, P. A., Hampson, F. C., Dornish, M., & Wood, E. J.** (2001). The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro. *Biomaterials*, 22(22), 2959-2966. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00042-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00042-4)
- [182] **Kim, Y. H., Yoon, K. S., Lee, S. J., Park, E. J., & Rhim, J. W.** (2022). Synthesis of Fully Deacetylated Quaternized Chitosan with Enhanced Antimicrobial Activity and Low Cytotoxicity. *Antibiotics*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111644>

- [183] **Argin-Soysal, S., Kofinas, P., & Lo, Y. M.** (2009). Effect of complexation conditions on xanthan–chitosan polyelectrolyte complex gels. *Food Hydrocolloids*, 23(1), 202-209. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.12.011>
- [184] **Kiang, T., Wen, J., Lim, H. W., & Leong, K. W.** (2004). The effect of the degree of chitosan deacetylation on the efficiency of gene transfection. *Biomaterials*, 25(22), 5293-5301. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.12.036>
- [185] **Maclaughlin, F. C., Mumper, R. J., Wang, J., Tagliaferri, J. M., Gill, I., Hinchcliffe, M., & Rolland, A. P.** (1998). Chitosan and depolymerized chitosan oligomers as condensing carriers for in vivo plasmid delivery. *Journal of Controlled Release*, 56, 259-272.
- [186] **Aranda-Barradas, M. E., Trejo-López, S. E., Real, A. Del, Álvarez-Almazán, S., Méndez-Albores, A., García-Tovar, C. G., ... Miranda-Castro, S. P.** (2022). Effect of molecular weight of chitosan on the physicochemical, morphological, and biological properties of polyplex nanoparticles intended for gene delivery. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 4. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2022.100228>
- [187] **Lu, B., Wang, C.-F., Wu, D.-Q., Li, C., Zhang, X.-Z., & Zhuo, R.-X.** (2009). Chitosan based oligoamine polymers: Synthesis, characterization, and gene delivery. *Journal of Controlled Release*, 137(1), 54-62.
- [188] **Mao, H.-Q., Roy, K., Troung-Le, V. L., Janes, K. A., Lin, K. Y., Wang, Y., ... Leong, K. W.** (2001). Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *Journal of controlled release*, 70(3), 399-421.
- [189] **von Harpe, A., Petersen, H., Li, Y., & Kissel, T.** (2000). Characterization of commercially available and synthesized polyethylenimines for gene delivery. *Journal of controlled release*, 69(2), 309-322.
- [190] **Valente, J. F. A., Pereira, P., Sousa, A., Queiroz, J. A., & Sousa, F.** (2021). Effect of plasmid DNA size on chitosan or polyethyleneimine polyplexes formulation. *Polymers*, 13(5), 793.
- [191] **Yoshitomi, T., Karita, H., Mori-Moriyama, N., Sato, N., & Yoshimoto, K.** (2021). Reduced cytotoxicity of polyethyleneimine by covalent modification of antioxidant and its application to microalgal transformation. *Science and Technology of Advanced Materials*, 22(1), 864-874.
- [192] **Khansarizadeh, M., Mokhtarzadeh, A., Rashedinia, M., Taghdisi, S. M., Lari, P., Abnous, K. H., & Ramezani, M.** (2016). Identification of possible cytotoxicity mechanism of polyethyleneimine by proteomics analysis. *Human & experimental toxicology*, 35(4), 377-387.
- [193] **Kritchenkov, A. S., Andranovitš, S., & Skorik, Y. A.** (2017). Chitosan and its derivatives: Vectors in gene therapy. *Russian Chemical Reviews*, 86(3), 231.
- [194] **Qindeel, M., Ahmed, N., Khan, G. M., & Rehman, A. ur.** (2019). Ligand decorated chitosan as an advanced nanocarrier for targeted delivery: a critical review. *Nanomedicine*, 14(12), 1623-1642.

- [195] **Nicolle, L., Casper, J., Willimann, M., Journot, C. M. A., Detampel, P., Einfalt, T., ... Huwyler, J.** (2021). Development of covalent chitosan-polyethylenimine derivatives as gene delivery vehicle: Synthesis, characterization, and evaluation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 3828.
- [196] **Cai, X., Dou, R., Guo, C., Tang, J., Li, X., Chen, J., & Zhang, J.** (2023). Cationic Polymers as Transfection Reagents for Nucleic Acid Delivery. *Pharmaceutics*, 15(5). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15051502>
- [197] **Al-Absi, M. Y., Caprifico, A. E., & Calabrese, G.** (2023). Chitosan and Its Structural Modifications for siRNA Delivery. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 13(2), 275-282. <https://doi.org/10.34172/apb.2023.030>
- [198] **Harugade, A., Sherje, A. P., & Pethe, A.** (2023). Chitosan: A review on properties, biological activities and recent progress in biomedical applications. *Reactive and Functional Polymers*, 191. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2023.105634>
- [199] **Desai, N., Rana, D., Salave, S., Gupta, R., Patel, P., Karunakaran, B., ... Kommineni, N.** (2023). Chitosan: A Potential Biopolymer in Drug Delivery and Biomedical Applications. *Pharmaceutics*, 15(4). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15041313>
- [200] **Zaiki, Y., Iskandar, A., & Wong, T. W.** (2023). Functionalized chitosan for cancer nano drug delivery. *Biotechnology Advances*, 67, 108200. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108200>
- [201] **Abourehab, M. A. S., Pramanik, S., Abdelgawad, M. A., Abualsoud, B. M., Kadi, A., Ansari, M. J., & Deepak, A.** (2022). Recent Advances of Chitosan Formulations in Biomedical Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18). <https://doi.org/10.3390/ijms231810975>
- [202] **Chen, X.-G., & Park, H.-J.** (2003). Chemical characteristics of O-carboxymethyl chitosans related to the preparation conditions. *Carbohydrate Polymers*, 53(4), 355-359.
- [203] **Zhang, Y., Yin, P., Zhao, X., Wang, J., Wang, J., Wang, C., ... Zhang, Q.** (2009). O-Carboxymethyl-chitosan/organosilica hybrid nanoparticles as non-viral vectors for gene delivery. *Materials Science and Engineering: C*, 29(6), 2045-2049.
- [204] **Thanou, M. M., Kotze, A. F., Scharringhausen, T., Luessen, H. L., De Boer, A. G., Verhoef, J. C., & Junginger, H. E.** (2000). Effect of degree of quaternization of N-trimethyl chitosan chloride for enhanced transport of hydrophilic compounds across intestinal Caco-2 cell monolayers. *Journal of Controlled Release*, 64(1-3), 15-25.
- [205] **Kean, T., Roth, S., & Thanou, M.** (2005). Trimethylated chitosans as non-viral gene delivery vectors: cytotoxicity and transfection efficiency. *Journal of Controlled Release*, 103(3), 643-653.

- [206] **Zhao, X., Yin, L., Ding, J., Tang, C., Gu, S., Yin, C., & Mao, Y.** (2010). Thiolated trimethyl chitosan nanocomplexes as gene carriers with high in vitro and in vivo transfection efficiency. *Journal of Controlled Release*, 144(1), 46-54. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.01.022>
- [207] **Mao, Z., Ma, L., Yan, J., Yan, M., Gao, C., & Shen, J.** (2007). The gene transfection efficiency of thermoresponsive N,N,N-trimethyl chitosan chloride-g-poly(N-isopropylacrylamide) copolymer. *Biomaterials*, 28(30), 4488-4500. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.06.033>
- [208] **Ren, H., Liu, S., Yang, J., Zhang, X., Zhou, H., Chen, J., & Guo, T.** (2016). N, N, N-trimethylchitosan modified with well defined multifunctional polymer modules used as pDNA delivery vector. *Carbohydrate polymers*, 137, 222-230.
- [209] **Mourya, V. K., & Inamdar, N. N.** (2008). Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore. *Reactive and Functional Polymers*, 68(6), 1013-1051. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2008.03.002>
- [210] **Liang, X., Tian, H., Luo, H., Wang, H., & Chang, J.** (2009). Novel quaternized chitosan and polymeric micelles with cross-linked ionic cores for prolonged release of minocycline. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 20(1), 115-131. <https://doi.org/10.1163/156856208X393536>
- [211] **Karim, K. J. A., Ghapar, N. F. A., Azman, N. F. A., & Baharin, H.** (2023). Chitosan grafted synthetic polymer and its swelling studies. İçinde *The 8th International Conference And Workshop On Basic And Applied Science (Icowobas) 2021* (C. 2554, s. 070006). AIP Publishing. <https://doi.org/10.1063/5.0103764>
- [212] **Dave, P. N., & Gor, A.** (2018). Natural Polysaccharide-Based Hydrogels and Nanomaterials. İçinde C. M. Hussain (Ed.), *Handbook of Nanomaterials for Industrial Applications* (ss. 36-66). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813351-4.00003-1>
- [213] **Alves, N. M., & Mano, J. F.** (2008). Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications. *International journal of biological macromolecules*, 43(5), 401-414.
- [214] **Kim, S.** (2018). Competitive biological activities of chitosan and its derivatives: antimicrobial, antioxidant, anticancer, and anti-inflammatory activities. *International journal of polymer science*, 2018.
- [215] **Borchard, G.** (2001). Chitosans for gene delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 52(2), 145-150.
- [216] **Liu, W. G., & De Yao, K.** (2002). Chitosan and its derivatives—a promising non-viral vector for gene transfection. *Journal of controlled release*, 83(1), 1-11.
- [217] **Xu, C., Cao, L., Zhao, P., Zhou, Z., Cao, C., Zhu, F., ... Huang, Q.** (2018). Synthesis and characterization of stimuli-responsive poly (2-dimethylamino-ethylmethacrylate)-grafted chitosan microcapsule for controlled pyraclostrobin release. *International journal of molecular sciences*, 19(3), 854.

- [218] **Khan, S., & Anwar, N.** (2019). Highly porous pH-responsive carboxymethyl chitosan-grafted-poly (acrylic acid) based smart hydrogels for 5-fluorouracil controlled delivery and colon targeting. *International Journal of Polymer Science*, 2019.
- [219] **Bahramzadeh, E., Yilmaz, E., & Adali, T.** (2019). Chitosan-graft-poly(N-hydroxy ethyl acrylamide) copolymers: Synthesis, characterization and preliminary blood compatibility in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 1257-1266. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.023>
- [220] **Kumar, S., Garg, P., Pandey, S., Kumari, M., Hoon, S., Jang, K. J., ... Hoon Chung, J.** (2015). Enhanced chitosan-DNA interaction by 2-acrylamido-2-methylpropane coupling for an efficient transfection in cancer cells. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(17), 3465-3475. <https://doi.org/10.1039/c4tb02070g>
- [221] **Yu, C., Kecen, X., & Xiaosai, Q.** (2018). Grafting Modification of Chitosan. İçinde V. K. Thakur (Ed.), *Biopolymer Grafting: Synthesis and Properties* (ss. 295-364). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-48104-5.00007-X>
- [222] **Zhuang, S., Yin, Y., & Wang, J.** (2018). Removal of cobalt ions from aqueous solution using chitosan grafted with maleic acid by gamma radiation. *Nuclear Engineering and Technology*, 50(1), 211-215.
- [223] **Sokker, H. H., El-Sawy, N. M., Hassan, M. A., & El-Anadouli, B. E.** (2011). Adsorption of crude oil from aqueous solution by hydrogel of chitosan based polyacrylamide prepared by radiation induced graft polymerization. *Journal of hazardous Materials*, 190(1-3), 359-365.
- [224] **Drake, K., Mukherjee, I., Mirza, K., Ji, H.-F., Bradley, J.-C., & Wei, Y.** (2013). Novel diacetylinic aryloxysilane polymers: a new thermally cross-linkable high temperature polymer system. *Macromolecules*, 46(11), 4370-4377.
- [225] **Kumar, D., Pandey, J., & Kumar, P.** (2018). Synthesis and characterization of modified chitosan via microwave route for novel antibacterial application. *International journal of biological macromolecules*, 107, 1388-1394.
- [226] **Kumar, G., Smith, P. J., & Payne, G. F.** (1999). Enzymatic grafting of a natural product onto chitosan to confer water solubility under basic conditions. *Biotechnology and bioengineering*, 63(2), 154-165.
- [227] **Yamada, K., Chen, T., Kumar, G., Vesnovsky, O., Topoleski, L. D. T., & Payne, G. F.** (2000). Chitosan Based Water-Resistant Adhesive. Analogy to Mussel Glue. *Biomacromolecules*, 1(2), 252-258. <https://doi.org/10.1021/bm0003009>
- [228] **Yuan, W., Zhao, Z., Yuan, J., Gu, S., Zhang, F., Xie, X., & Ren, J.** (2011). Synthesis of pH- and temperature-responsive chitosan-graft-poly[2-(N,N-dimethylamino) ethyl methacrylate] copolymer and gold nanoparticle stabilization by its micelles. *Polymer International*, 60(2), 194-201. <https://doi.org/10.1002/pi.2926>

- [229] **Mahmoodzadeh, F., Jannat, B., & Ghorbani, M.** (2019). Chitosan-based nanomicelle as a novel platform for targeted delivery of methotrexate. *International Journal of Biological Macromolecules*, 126, 517-524. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.223>
- [230] **Bhavsar, C., Momin, M., Gharat, S., & Omri, A.** (2017). Functionalized and graft copolymers of chitosan and its pharmaceutical applications. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 14(10), 1189-1204. <https://doi.org/10.1080/17425247.2017.1241230>
- [231] **Thakur, V. K., & Thakur, M. K.** (2014). Recent advances in graft copolymerization and applications of chitosan: A review. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 2(12), 2637-2652. <https://doi.org/10.1021/sc500634p>
- [232] **Odian, G.** (2004). *Principles of polymerization* (4th bs). John Wiley & Sons.
- [233] **Jalal Zohuriaan-Mehr, M.** (2005). Advances in Chitin and Chitosan Modification through Graft Copolymerization: A Comprehensive Review. *Iranian Polymer Journal*, 14(3), 235-265. Geliş tarihi gönderen www.SID.ir
- [234] **Jenkins, D. W., & Hudson, S. M.** (2001). Review of vinyl graft copolymerization featuring recent advances toward controlled radical-based reactions and illustrated with chitin/chitosan trunk polymers. *Chemical Reviews*, 101(11), 3245-3274.
- [235] **Thakur, V. K., Thakur, M. K., & Gupta, R. K.** (2013). Development of functionalized cellulosic biopolymers by graft copolymerization. *International journal of biological macromolecules*, 62, 44-51.
- [236] **Mino, G., & Kaizerman, S.** (1958). A new method for the preparation of graft copolymers. Polymerization initiated by ceric ion redox systems. *Journal of Polymer Science*, 31(122), 242-243.
- [237] **Caner, H., Hasipoglu, H., Yilmaz, O., & Yilmaz, E.** (1998). Graft copolymerization of 4-vinylpyridine on to chitosan-1. By ceric ion initiation. *European Polymer Journal*, 34, 493-497.
- [238] **Zhang, J., Yuan, Y., Shen, J., & Lin, S.** (2003). Synthesis and characterization of chitosan grafted poly (N, N-dimethyl-N-methacryloxyethyl-N-(3-sulfopropyl) ammonium) initiated by ceric (IV) ion. *European Polymer Journal*, 39(4), 847-850.
- [239] **Pourjavadi, A., Mahdavinia, G. R., Zohuriaan-Mehr, M. J., & Omidian, H.** (2003). Modified chitosan. I. Optimized cerium ammonium nitrate-induced synthesis of chitosan-graft-polyacrylonitrile. *Journal of Applied Polymer Science*, 88(8), 2048-2054.
- [240] **Pati, M. K., & Nayak, P.** (2011). Grafting Vinyl Monomers onto Chitosan: IV: Graft Copolymerized of Acrylic acid onto Chitosan Using Ceric Ammonium Nitrate as the Initiator— Characterization and Antimicrobial Activities. *Materials Sciences and Applications*, 02(12), 1741-1748. <https://doi.org/10.4236/msa.2011.212232>

- [241] **Hassan, M. M.** (2018). Enhanced antimicrobial activity and reduced water absorption of chitosan films graft copolymerized with poly(acryloyloxy)ethyltrimethylammonium chloride. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, 1685-1695. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.013>
- [242] **Said, M., Atassi, Y., Tally, M., & Khatib, H.** (2018). Environmentally Friendly Chitosan-g-poly(acrylic acid-co-acrylamide)/Ground Basalt Superabsorbent Composite for Agricultural Applications. *Journal of Polymers and the Environment*, 26(9), 3937-3948. <https://doi.org/10.1007/s10924-018-1269-5>
- [243] **Kumari, V., Kumar, S., Kaur, I., & Bhalla, T. C.** (2017). Graft copolymerization of acrylamide on chitosan-co-chitin and its application for immobilization of *Aspergillus* sp. RL2Ct cutinase. *Bioorganic Chemistry*, 70, 34-43. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2016.11.006>
- [244] **Cabuk, M., Yavuz, M., & Unal, H. I.** (2014). Electrokinetic properties of biodegradable conducting polyaniline-graft-chitosan copolymer in aqueous and non-aqueous media. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 460, 494-501.
- [245] **Ziminska, M., Wilson, J. J., McErlean, E., Dunne, N., & McCarthy, H. O.** (2020). Synthesis and evaluation of a thermoresponsive degradable chitosan-grafted PNIPAAm hydrogel as a “smart” gene delivery system. *Materials*, 13(11). <https://doi.org/10.3390/ma13112530>
- [246] **Hanna, D. H., Hamed, A. A., & Saad, G. R.** (2023). Synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate)/chitosan-graft poly (acrylic acid) conjugate hyaluronate for targeted delivery of methotrexate drug to colon cancer cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 240. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124396>
- [247] **gounder Subramanian, K., & Vijayakumar, V.** (2012). Synthesis and evaluation of chitosan-graft-poly (2-hydroxyethyl methacrylate-co-itaconic acid) as a drug carrier for controlled release of tramadol hydrochloride. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 20(3), 263-271.
- [248] **Harish Prashanth, K. V., & Tharanathan, R. N.** (2003). Studies on graft copolymerization of chitosan with synthetic monomers. *Carbohydrate Polymers*, 54(3), 343-351. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(03\)00191-7](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00191-7)
- [249] **Sahdev, A. K., Raorane, C. J., Shastri, D., Raj, V., Singh, A., & Kim, S. C.** (2022). Update on modified chitosan frameworks and their applications for food, wastewater, toxic heavy metals, dyes treatment and cancer drug delivery. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(6). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.108656>
- [250] **Kumar, P., Choonara, Y. E., du Toit, L. C., Modi, G., Naidoo, D., & Pillay, V.** (2012). Novel high-viscosity polyacrylamidated chitosan for neural tissue engineering: Fabrication of anisotropic neurodurable scaffold via molecular disposition of persulfate-mediated polymer slicing and complexation. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(11), 13966-13984. <https://doi.org/10.3390/ijms131113966>

- [251] **Najjar, A. M. K., Yunus, W. M. Z. W., Ahmad, M. B., & Rahman, M. Z. A.** (2000). Preparation and characterization of poly (2-acrylamido-2-methylpropane-sulfonic acid) grafted chitosan using potassium persulfate as redox initiator. *Journal of Applied Polymer Science*, 77(10), 2314-2318.
- [252] **Chattopadhyay, D. P., & Inamdar, M. S.** (2010). Aqueous behaviour of chitosan. *International Journal of Polymer Science*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/939536>
- [253] **Hsu, S.-C., Don, T.-M., & Chiu, W.-Y.** (2002). Free radical degradation of chitosan with potassium persulfate. *Polymer Degradation and Stability*, 75(1), 73-83. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(01\)00205-1](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(01)00205-1)
- [254] **Nasreen, Z., Khan, R., Khan, M., & Mustafa, A. I.** (2009). Preparation and characterization of chitosan coated surgical gauze using potassium persulfate as thermal initiator. *Polymer - Plastics Technology and Engineering*, 48(2), 121-129. <https://doi.org/10.1080/03602550802539957>
- [255] **Hsu, S. C., Don, T. M., & Chiu, W. Y.** (2002). Synthesis of chitosan-modified poly(methyl methacrylate) by emulsion polymerization. *Journal of Applied Polymer Science*, 86(12), 3047-3056. <https://doi.org/10.1002/app.11333>
- [256] **Pu, H.-L., Chiang, W.-L., Maiti, B., Liao, Z.-X., Ho, Y.-C., Shim, M. S., ... Sung, H.-W.** (2014). Nanoparticles with dual responses to oxidative stress and reduced pH for drug release and anti-inflammatory applications. *ACS nano*, 8(2), 1213-1221.
- [257] **Sanchez-Moreno, P., Ortega-Vinuesa, J. L., Peula-Garcia, J. M., Marchal, J. A., & Boulaiz, H.** (2018). Smart drug-delivery systems for cancer nanotherapy. *Current drug targets*, 19(4), 339-359.
- [258] **Liu, D., Yang, F., Xiong, F., & Gu, N.** (2016). The smart drug delivery system and its clinical potential. *Theranostics*, 6(9), 1306.
- [259] **Hossen, S., Hossain, M. K., Basher, M. K., Mia, M. N. H., Rahman, M. T., & Uddin, M. J.** (2019). Smart nanocarrier-based drug delivery systems for cancer therapy and toxicity studies: A review. *Journal of advanced research*, 15, 1-18.
- [260] **Kim, H., Jo, A., Baek, S., Lim, D., Park, S.-Y., Cho, S. K., ... Yoon, J.** (2017). Synergistically enhanced selective intracellular uptake of anticancer drug carrier comprising folic acid-conjugated hydrogels containing magnetite nanoparticles. *Scientific reports*, 7(1), 41090.
- [261] **Leavy, O.** (2016). The birth of monoclonal antibodies. *Nature Immunology*, 17(Suppl 1), S13-S13.
- [262] **Huang, D., Deng, M., & Kuang, S.** (2019). Polymeric carriers for controlled drug delivery in obesity treatment. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 30(12), 974-989.
- [263] **Torchilin, V. P.** (2010). Passive and active drug targeting: drug delivery to tumors as an example. *Drug delivery*, 3-53.
- [264] **Duncan, R.** (2006). Polymer conjugates as anticancer nanomedicines. *Nature reviews cancer*, 6(9), 688-701.

- [265] **Roberts, M. J., Bentley, M. D., & Harris, J. M.** (2002). Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Advanced drug delivery reviews*, 54(4), 459-476.
- [266] **Maeda, H.** (2017). Polymer therapeutics and the EPR effect. *Journal of Drug Targeting*, 25(9-10), 781-785.
<https://doi.org/10.1080/1061186X.2017.1365878>
- [267] **Matsumura, Y., & Maeda, H.** (1986). A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer research*, 46(12_Part_1), 6387-6392.
- [268] **Hoare, T. R., & Kohane, D. S.** (2008). Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*, 49(8), 1993-2007.
<https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.01.027>
- [269] **Duan, C., Zhang, D., Wang, F., Zheng, D., Jia, L., Feng, F., ... Wang, F.** (2011). Chitosan-g-poly (N-isopropylacrylamide) based nanogels for tumor extracellular targeting. *International Journal of Pharmaceutics*, 409(1-2), 252-259.
- [270] **Bo, Y., Zhang, L., Wang, Z., Shen, J., Zhou, Z., Yang, Y., ... He, Y.** (2021). Antibacterial Hydrogel with Self-Healing Property for Wound-Healing Applications. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 7(11), 5135-5143.
<https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.1c00719>
- [271] **Bahram, M., Mohseni, N., & Moghtader, M.** (2016). An introduction to hydrogels and some recent applications. İçinde *Emerging concepts in analysis and applications of hydrogels*. IntechOpen.
- [272] **Li, Z., Huang, J., & Wu, J.** (2021). pH-Sensitive nanogels for drug delivery in cancer therapy. *Biomaterials Science*, 9(3), 574-589.
<https://doi.org/10.1039/D0BM01729A>
- [273] **Salehi, R., Rasouli, S., & Hamishehkar, H.** (2015). Smart thermo/pH responsive magnetic nanogels for the simultaneous delivery of doxorubicin and methotrexate. *International journal of pharmaceutics*, 487(1-2), 274-284.
- [274] **Bajpai, A. K., Bajpai, J., Saini, R., & Gupta, R.** (2011). Responsive Polymers in Biology and Technology. *Polymer Reviews*, 51(1), 53-97.
<https://doi.org/10.1080/15583724.2010.537798>
- [275] **Ward, M. A., & Georgiou, T. K.** (2011). Thermoresponsive Polymers for Biomedical Applications. *Polymers*, 3(3), 1215-1242.
<https://doi.org/10.3390/polym3031215>
- [276] **Kesgin, D.** (2002, Ağustos 2). *pH ya duyarlı poli (vinileter) bazlı amfifilik hidrojellerden protein salım kinetiğinin incelenmesi* (Yüksek Lisans Tezi). Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- [277] **Gibney, K. A., Sovadinova, I., Lopez, A. I., Urban, M., Ridgway, Z., Caputo, G. A., & Kuroda, K.** (2012). Poly (ethylene imine) s as antimicrobial agents with selective activity. *Macromolecular bioscience*, 12(9), 1279-1289.

- [278] **Bae, Y. H., Okano, T., Hsu, R., & Kim, S. W.** (1987). Thermo-sensitive polymers as on-off switches for drug release. *Die Makromolekulare Chemie, Rapid Communications*, 8(10), 481-485. <https://doi.org/10.1002/marc.1987.030081002>
- [279] **Yoshida, R., Sakai, K., Okano, T., Sakurai, Y., You Han Bae, & Sung Wan Kim.** (1992). Surface-modulated skin layers of thermal responsive hydrogels as on-off switches: I. Drug release. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 3(2), 155-162. <https://doi.org/10.1163/156856291X00250>
- [280] **Feil, H., Bae, Y. H., Feijen, J., & Kim, S. W.** (1993). Effect of comonomer hydrophilicity and ionization on the lower critical solution temperature of N-isopropylacrylamide copolymers. *Macromolecules*, 26(10), 2496-2500.
- [281] **Chuang, C., Don, T., & Chiu, W.** (2009). Synthesis and properties of chitosan-based thermo-and pH-responsive nanoparticles and application in drug release. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 47(11), 2798-2810.
- [282] **Lee, J. W., Jung, M. C., Park, H. D., Park, K. D., & Ryu, G. H.** (2004). Synthesis and characterization of thermosensitive chitosan copolymer as a novel biomaterial. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 15(8), 1065-1079. <https://doi.org/10.1163/1568562041526496>
- [283] **Judah, H. L., Liu, P., Zarbakhsh, A., & Resmini, M.** (2020). Influence of buffers, ionic strength, and ph on the volume phase transition behavior of acrylamide-based nanogels. *Polymers*, 12(11), 1-14. <https://doi.org/10.3390/polym12112590>
- [284] **Taha, M., Gupta, B. S., Khoiroh, I., & Lee, M.-J.** (2011). Interactions of Biological Buffers with Macromolecules: The Ubiquitous “Smart” Polymer PNIPAM and the Biological Buffers MES, MOPS, and MOPSO. *Macromolecules*, 44(21), 8575-8589. <https://doi.org/10.1021/ma201790c>
- [285] **Bordbar-Khiabani, A., & Gasik, M.** (2022). Smart Hydrogels for Advanced Drug Delivery Systems. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7). <https://doi.org/10.3390/ijms23073665>
- [286] **Mishra, R. K., & Ray, A. R.** (2011). Synthesis and characterization of poly {N-[3-(dimethylamino) propyl] methacrylamide-co-itaconic acid} hydrogels for drug delivery. *Journal of Applied Polymer Science*, 119(6), 3199-3206.
- [287] **Kocak, G., Tuncer, C., & Bütün, V.** (2017). pH-Responsive polymers. *Polymer Chemistry*, 8(1), 144-176.
- [288] **Lopez, C., Matsumoto, A., & Shen, A.** (2023). Dilute polyelectrolyte solutions: recent progress and open questions. *Soft Matter*, 1-37. <https://doi.org/10.1039/cXsm00000x>
- [289] **Le, M. L., Grzetic, D. J., Delaney, K. T., Yang, K. C., Xie, S., Fredrickson, G. H., ... Segalman, R. A.** (2022). Electrostatic Interactions Control the Nanostructure of Conjugated Polyelectrolyte-Polymeric Ionic Liquid Blends. *Macromolecules*, 55(18), 8321-8331. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.2c01142>

- [290] **Khokhlov, A. R., & Kramarenko, E. Y.** (1994). Polyelectrolyte/ionomer behavior in polymer gel collapse. *Macromolecular theory and simulations*, 3(1), 45-59.
- [291] **Miquelard-Garnier, G., Creton, C., & Hourdet, D.** (2008). Strain induced clustering in polyelectrolyte hydrogels. *Soft Matter*, 4(5), 1011-1023.
- [292] **Starodubtsev, S. G., Vasilevskaya, V. V., & Khokhlov, A. R.** (2007). *Smart Polymers: Applications in Biotechnology and Biomedicine*. (I. Galaev & B. Mattiasson, Ed.) (2nd bs). Boca Raton: CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420008623>
- [293] **Lee, H., Son, S. H., Sharma, R., & Won, Y.-Y.** (2011). A Discussion of the pH-Dependent Protonation Behaviors of Poly (2-(dimethylamino) ethyl methacrylate)(PDMAEMA) and Poly (ethylenimine-ran-2-ethyl-2-oxazoline)(P (EI-r-EOz)). *The Journal of Physical Chemistry B*, 115(5), 844-860.
- [294] **An, H., Yang, Y., Bo, Y., Ma, X., Wang, Y., Liu, L., ... Qin, J.** (2021). Fabrication of self-healing hydrogel from quaternized N-[3(dimethylamino)propyl]methacrylamide copolymer for antimicrobial and drug release applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 109(1), 42-53. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37005>
- [295] **Chang, R., Hsu, C.-F., & Tsai, W.-B.** (2018). Fabrication of chlorophyll-incorporated nanogels for potential applications in photothermal cancer therapy. *ACS omega*, 3(11), 16057-16062.
- [296] **Zhu, C., Jung, S., Luo, S., Meng, F., Zhu, X., Park, T. G., & Zhong, Z.** (2010). Co-delivery of siRNA and paclitaxel into cancer cells by biodegradable cationic micelles based on PDMAEMA-PCL-PDMAEMA triblock copolymers. *Biomaterials*, 31(8), 2408-2416. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.077>
- [297] **Li, J., & Mooney, D. J.** (2016). Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nature Reviews Materials*, 1(12). <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.71>
- [298] **Ghasemiyeh, P., & Mohammadi-Samani, S.** (2019). Hydrogels as Drug Delivery Systems; Pros and Cons. *Trends in Pharmaceutical Sciences*, 5(1), 7-24. <https://doi.org/10.30476/TIPS.2019.81604.1002>
- [299] **Siepmann, J., Siegel, R. A., & Siepmann, F.** (2012). Diffusion Controlled Drug Delivery Systems. İçinde J. Siepmann, R. A. Siegel, & M. J. Rathbone (Ed.), *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery* (ss. 127-152). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0881-9_6
- [300] **Lin, C.-C., & Metters, A. T.** (2006). Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(12-13), 1379-1408. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.004>

- [301] **Bajpai, A. K., Shukla, S. K., Bhanu, S., & Kankane, S.** (2008). Responsive polymers in controlled drug delivery. *Progress in Polymer Science*, 33(11), 1088-1118. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2008.07.005>
- [302] **Ritger, P. L., & Peppas, N. A.** (1987). A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *Journal of Controlled Release*, 5(1), 23-36. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(87\)90034-4](https://doi.org/10.1016/0168-3659(87)90034-4)
- [303] **Costa, P., & Sousa Lobo, J. M.** (2001). Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(2), 123-133. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(01\)00095-1](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(01)00095-1)
- [304] **Schmidt, J. J., Rowley, J., & Hyun, J. K.** (2008). Hydrogels used for cell-based drug delivery. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 87(4), 1113-1122. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32287>
- [305] **Kohane, D. S., & Langer, R.** (2010). Biocompatibility and drug delivery systems. *Chemical Science*, 1(4), 441-446. <https://doi.org/10.1039/c0sc00203h>
- [306] **Martau, G. A., Mihai, M., & Vodnar, D. C.** (2019). The use of chitosan, alginate, and pectin in the biomedical and food sector-biocompatibility, bioadhesiveness, and biodegradability. *Polymers*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/polym11111837>
- [307] **Su, F., Wang, Y., Liu, X., Shen, X., Zhang, X., Xing, Q., ... Chen, Y.** (2018). Biocompatibility and in vivo degradation of chitosan based hydrogels as potential drug carrier. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 29(13), 1515-1528. <https://doi.org/10.1080/09205063.2017.1412244>
- [308] **Kong, H. J., & Mooney, D. J.** (2003). The Effects of Poly(Ethyleneimine) (PEI) Molecular Weight on Reinforcement of Alginate Hydrogels. *Cell Transplantation*, 12(7), 779-785. <https://doi.org/10.3727/000000003108747253>
- [309] **Kong, H. J., Wong, E., & Mooney, D. J.** (2003). Independent Control of Rigidity and Toughness of Polymeric Hydrogels. *Macromolecules*, 36(12), 4582-4588. <https://doi.org/10.1021/ma034137w>
- [310] **Weeks, T. S., Adolf, D., & McCoy, J. D.** (1999). Cohesive Failure in Partially Cured Epoxies. *Macromolecules*, 32(6), 1918-1922. <https://doi.org/10.1021/ma981547p>
- [311] **Lee, D., Zhang, H., & Ryu, S.** (2018). Elastic Modulus Measurement of Hydrogels. İçinde Md. I. H. Mondal (Ed.), *Cellulose-Based Superabsorbent Hydrogels* (ss. 1-21). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-76573-0_60-1
- [312] **Shibayama, M.** (2012). Structure-mechanical property relationship of tough hydrogels. *Soft Matter*, 8(31), 8030-8038. <https://doi.org/10.1039/c2sm25325a>
- [313] **Mima, S., Miya, M., Iwamoto, R., & Yoshikawa, S.** (1983). Highly deacetylated chitosan and its properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 28(6), 1909-1917. <https://doi.org/10.1002/app.1983.070280607>

- [314] **Gamzazade, A. I., Šlimak, V. M., Skljär, A. M., Štykova, E. V., Pavlova, S. -S A., & Rogožen, S. V.** (1985). Investigation of the hydrodynamic properties of chitosan solutions. *Acta Polymerica*, 36(8), 420-424. <https://doi.org/10.1002/actp.1985.010360805>
- [315] **Zimm, B. H., & Stockmayer, W. H.** (1949). The dimensions of chain molecules containing branches and rings. *The Journal of Chemical Physics*, 17(12), 1301-1314. <https://doi.org/10.1063/1.1747157>
- [316] **Zimm, B. H., & Kilb, R. W.** (1959). Dynamics of Branched Polymer Molecules in Dilute Solution. *Journal of Polymer Science*, XXXVII, 19-42.
- [317] **Liu, Z., Wei, H., Li, A., & Yang, H.** (2017). Evaluation of structural effects on the flocculation performance of a co-graft starch-based flocculant. *Water Research*, 118, 160-166. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.04.032>
- [318] **Yu, W., Wang, Y., Li, A., & Yang, H.** (2018). Evaluation of the structural morphology of starch-graft-poly(acrylic acid) on its scale-inhibition efficiency. *Water Research*, 141, 86-95. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.04.021>
- [319] **Yu, W., & Yang, H.** (2020). Chain architectures of various cellulose-based antiscalants on the inhibition of calcium carbonate scale. *Scientific Reports*, 10(1), 21906. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78408-w>
- [320] **van Berkel, K. Y., Russell, G. T., & Gilbert, R. G.** (2006). The dissociation rate coefficient of persulfate in emulsion polymerization systems. *Polymer*, 47(13), 4667-4675. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2006.04.048>
- [321] **Sarkar, S., Adhikari, M. S., Banerjee, M., & Konar, R. S.** (1988). Thermal decomposition of potassium persulfate in aqueous solution at 50°C in an inert atmosphere of nitrogen in the presence of acrylonitrile monomer. *Journal of Applied Polymer Science*, 35(6), 1441-1458. <https://doi.org/10.1002/app.1988.070350604>
- [322] **Brandrup, J., Immergut, E. H., Grulke, E. A., Abe, A., & Bloch, D. R.** (1999). *Polymer handbook* (4th bs, C. 89). Wiley New York.
- [323] **Yalçın, B., & Erbil, C.** (2018). Effect of sodium hydroxide solution as polymerization solvent and activator on structural, mechanical and antibacterial properties of PNIPAAm and P(NIPAAm-clay) hydrogels. *Polymer Composites*, 39, E386-E406. <https://doi.org/10.1002/pc.24490>
- [324] **Zhang, S., Shi, Z., Xu, H., Ma, X., Yin, J., & Tian, M.** (2016). Revisiting the mechanism of redox-polymerization to build the hydrogel with excellent properties using a novel initiator. *Soft matter*, 12(9), 2575-2582.
- [325] **Si, K., Guo, X. Q., & Qiu, K. Y.** (1995). Initiation Mechanism of Radical Polymerization Using Ammonium Persulfate and Polymerizable Amine Redox Initiators. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 32(sup8), 1149-1159. <https://doi.org/10.1080/10601329508020336>
- [326] **Guo, X. Q., Qiu, K. Y., & De Feng, X.** (1990). Studies on the kinetics and initiation mechanism of acrylamide polymerization using persulfate/aliphatic diamine systems as initiator. *Die Makromolekulare Chemie: Macromolecular Chemistry and Physics*, 191(3), 577-587.

- [327] **Feng, X. De, Guo, X. Q., & Qiu, K. Y.** (1988). Study of the initiation mechanism of the vinyl polymerization with the system persulfate/N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine. *Die Makromolekulare Chemie*, 189(1), 77-83. <https://doi.org/10.1002/macp.1988.021890108>
- [328] **Korpe, S., Erdoğan, B., Bayram, G., Ozgen, S., Uludag, Y., & Bicak, N.** (2009). Crosslinked DADMAC polymers as cationic super absorbents. *Reactive and Functional Polymers*, 69(9), 660-665.
- [329] **Baker, J. P., Hong, L. H., Blanch, H. W., & Prausnitz, J. M.** (1994). Effect of initial total monomer concentration on the swelling behavior of cationic acrylamide-based hydrogels. *Macromolecules*, 27(6), 1446-1454.
- [330] **Trigo, R. M., Blanco, M. D., Huerta, P., Olmo, R., & Teijón, J. M.** (1993). L-Ascorbic acid release from PHEMA hydrogels. *Polymer Bulletin*, 31, 577-584.
- [331] **Martinez-Ruvalcaba, A., Sanchez-Diaz, J. C., Becerra, F., Cruz-Barba, L. E., & Gonzalez-Alvarez, A.** (2009). Swelling characterization and drug delivery kinetics of polyacrylamide-co-itaconic acid/chitosan hydrogels. *Express Polym Lett*, 3(1), 25-32.
- [332] **Sharma, R. Kr., Lalita, D., & Singh, A. P.** (2015). Synthesis and characterization of chitosan based graft copolymers for drug release applications. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(6), 612-621.
- [333] **Shahrbabaki, Z., Oveissi, F., Farajikhah, S., Ghasemian, M. B., Jansen-van Vuuren, R. D., Jessop, P. G., ... Naficy, S.** (2022). Electrical Response of Poly(N-[3-(dimethylamino)Propyl] Methacrylamide) to CO₂ at a Long Exposure Period. *ACS Omega*, 7(26), 22232-22243. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c00914>
- [334] **Wang, Q., Liu, P., Liu, P., Gong, T., Li, S., Duan, Y., & Zhang, Z.** (2014). Preparation, blood coagulation and cell compatibility evaluation of chitosan-graft-poly lactide copolymers. *Biomedical Materials (Bristol)*, 9(1). <https://doi.org/10.1088/1748-6041/9/1/015007>
- [335] **Alameh, M., Lavertu, M., Tran-Khanh, N., Chang, C. Y., Lesage, F., Bail, M., ... Buschmann, M. D.** (2018). SiRNA Delivery with Chitosan: Influence of Chitosan Molecular Weight, Degree of Deacetylation, and Amine to Phosphate Ratio on in Vitro Silencing Efficiency, Hemocompatibility, Biodistribution, and in Vivo Efficacy. *Biomacromolecules*, 19(1), 112-131. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01297>
- [336] **Pezzoli, D., Giupponi, E., Mantovani, D., & Candiani, G.** (2017). Size matters for in vitro gene delivery: Investigating the relationships among complexation protocol, transfection medium, size and sedimentation. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/srep44134>
- [337] **López-García, J., Lehocký, M., Humpolíček, P., & Sába, P.** (2014). HaCaT Keratinocytes Response on Antimicrobial Atelocollagen Substrates: Extent of Cytotoxicity, Cell Viability and Proliferation. *Journal of Functional Biomaterials*, 5(2), 43-57. <https://doi.org/10.3390/jfb5020043>

- [338] **Behzadi, S., Serpooshan, V., Tao, W., Hamaly, M. A., Alkawareek, M. Y., Dreaden, E. C., ... Mahmoudi, M.** (2017). Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell. *Chemical Society Reviews*, 46(14), 4218-4244. <https://doi.org/10.1039/C6CS00636A>
- [339] **Wang, Q. Z., Chen, X. G., Li, Z. X., Wang, S., Liu, C. S., Meng, X. H., ... Yu, L. J.** (2008). Preparation and blood coagulation evaluation of chitosan microspheres. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19(3), 1371-1377. <https://doi.org/10.1007/s10856-007-3243-y>
- [340] **Yancheva, E., Paneva, D., Danchev, D., Mespouille, L., Dubois, P., Manolova, N., & Rashkov, I.** (2007). Polyelectrolyte complexes based on (quaternized) poly[(2-dimethylamino) ethyl methacrylate]: Behavior in contact with blood. *Macromolecular Bioscience*, 7(7), 940-954. <https://doi.org/10.1002/mabi.200700056>
- [341] **Sovadinova, I., Palermo, E. F., Huang, R., Thoma, L. M., & Kuroda, K.** (2011). Mechanism of polymer-induced hemolysis: Nanosized pore formation and osmotic lysis. *Biomacromolecules*, 12(1), 260-268. <https://doi.org/10.1021/bm1011739>
- [342] **Phuong, P. T., Oliver, S., He, J., Wong, E. H. H., Mathers, R. T., & Boyer, C.** (2020). Effect of Hydrophobic Groups on Antimicrobial and Hemolytic Activity: Developing a Predictive Tool for Ternary Antimicrobial Polymers. *Biomacromolecules*, 21(12), 5241-5255. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c01320>
- [343] **Yan, Y., Zhang, G., Wu, C., Ren, Q., Liu, X., Huang, F., ... Ye, W.** (2022). Structural Exploration of Polycationic Nanoparticles for siRNA Delivery. *ACS Biomaterials Science and Engineering*. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.2c00196>
- [344] **Lai, S. K., Hida, K., Chen, C., & Hanes, J.** (2008). Characterization of the intracellular dynamics of a non-degradative pathway accessed by polymer nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 125(2), 107-111. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.10.015>
- [345] **Pavan, G. M., Mintzer, M. A., Simanek, E. E., Merkel, O. M., Kissel, T., & Danani, A.** (2010). Computational Insights into the Interactions between DNA and siRNA with “Rigid” and “Flexible” Triazine Dendrimers. *Biomacromolecules*, 11(3), 721-730. <https://doi.org/10.1021/bm901298t>
- [346] **Wytrwal-Sarna, M., Knobloch, P., Lasota, S., Michalik, M., Nowakowska, M., & Kepczynski, M.** (2022). Effect of polycation nanostructures on cell membrane permeability and toxicity. *Environmental Science: Nano*, 9(2), 702-713. <https://doi.org/10.1039/d1en01156a>
- [347] **Lin, Y. L., Jiang, G., Birrell, L. K., & El-Sayed, M. E. H.** (2010). Degradable, pH-sensitive, membrane-destabilizing, comb-like polymers for intracellular delivery of nucleic acids. *Biomaterials*, 31(27), 7150-7166. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.05.048>



ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Ceyda ŞİMŞEK

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2013, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü
- **Yükseklisans** : 2016, İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya Ana Bilim Dalı, Kimya Programı

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2015 yılından itibaren İTÜ Kimya bölümünde araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.

DOKTORA TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Şimşek, C., Eroğlu, Z. E., & Erbil, C. (2019).** Effect of ionomer/multiplet formation on mechanical properties and ascorbic acid release behavior of PNIPAAm hydrogels copolymerized by DMAEMA, DMAPMAAm and MAPTAC. *Iranian Polymer Journal*, 28(11), 977-990.
- **Şimşek, C., Demirel, E., Yüksel Durmaz, Y., & Erbil, C. (2023).** Poly (N-[3-(dimethylaminopropyl)] methacrylamide) - grafted Chitosan as a carrier for siRNA delivery: synthesis, characterization and in vitro application. *Macromolecular bioscience (under review)*

DİĞER YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

Şimşek, C., Arslan, A., Canbulat, Z., & Erbil, C. (2023). Investigation of Swelling and Theophylline Release Behaviours of Poly(N-isopropyl acrylamide-co-(N-[3-(dimethylaminopropyl)] methacrylamide) Chitosan and Poly(N-isopropyl acrylamide-co-N, N-dimethylaminoethyl methacrylate)/Chitosan Nano/Microgels with Core/Shell Structures. **(in preparation)**

Şahin, F. C., **Şimşek, C.**, & Erbil, C. (2023). Poly (N-isopropylacrylamide) based interpenetrating polymer networks as oral drug delivery systems: Effects of sulfobetaine, alginate and chitosan on swelling/compression properties and theophylline/diclofenac sodium/ciprofloxacin release kinetics. *Wiley* **(submitted)**

Endeşav, Ç., Yalçın, B., **Şimşek, C.**, & Erbil, C. (2022). Tuning Compressive Young's Moduli and Antibacterial Activities of Alginate/Poly(N -isopropylacrylamide) Hydrogels with Laponite Layers and Cerium Ions. *ACS Omega*, 7(40), 35792–35804. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c03937>

Sabah, C. K., Yalçın, B., **Şimşek, C.**, Gürsel, Y. H., & Erbil, C. (2022). Improved mechanical properties of antimicrobial poly(N -[3-(dimethylaminopropyl)] methacrylamide) hydrogels prepared by free radical polymerization in the presence of cetyltrimethylammonium bromide as a lyotropic liquid crystal template. *Soft Matter*, 18(21), 4156–4166. <https://doi.org/10.1039/D2SM00186A>

Şimşek, C., & Erbil, C. (2022). Poly (N-isopropylacrylamide) based pH-and temperature-sensitive ampholytic hydrogels with tunable mechanical, swelling and drug release properties. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 71(15), 1148–1163.

Şahin, F. C., **Şimşek, C.**, & Erbil, C. (2021). Study on preparation, compression strength and theophylline/diclofenac sodium release ability of NIPAAm/DMAEMA hydrogels. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 32(17), 2267–2292. <https://doi.org/10.1080/09205063.2021.1967700>