

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PAKLİTAKSEL YÜKLÜ POLİMERİK MİSELLERİN SENTEZİ VE
KOMBİNASYONEL TERAPİ ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Emine KESKİN YALÇIN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Aydan DAĞ

HAZİRAN 2022

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PAKLİTAKSEL YÜKLÜ POLİMERİK MİSELLERİN SENTEZİ VE
KOMBİNASYONEL TERAPİ ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Emine KESKİN YALÇIN
(205309001)**

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Aydan DAĞ

HAZİRAN 2022

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 195309002 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi Emine KESKİN YALÇIN, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “Paklitaksel Yüklü Polimerik Misellerin Sentezi ve Kombinasyonel Terapi Etkinliğinin Belirlenmesi” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Aydan DAĞ**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Eş Danışman : **Dr. Öğr. Üye. Salih TUNCAY**
Üsküdar Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Binnur AYDOĞAN TEMEL**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Doç. Dr. Belma ZENGİN KURT
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Dr. Öğr. Üye. P. Sinem OMURTAG ÖZGEN
Marmara Üniversitesi

Teslim Tarihi :

Savunma Tarihi : 10.06.2022



En sevdiklerime;

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşan, ne zaman danışsam kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenin fazlasını sunan kıymetli tez danışman hocalarım Prof. Dr. Aydan DAĞ'a ve Dr. Öğr. Üye. Salih TUNCAY'a şükranlarımı sunarım. Yine çalışmamda bana yol gösteren ve çalışma azmiyle örnek olan Dr. Öğr. Üye. Pınar Sinem OMURTAG ÖZGEN'e teşekkürü borç bilirim. Aynı laboratuvarı paylaştığımız ve çalışmalarımızda desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Binnur TEMEL AYDOĞAN ve Doç. Dr. Belma ZENGİN KURT 'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Araştırma ve yazım süresince yardımlarını esirgemeyen, çalışmamda konu ve laboratuvar kaynakları açısından bana sürekli yardımda bulunarak yol gösteren kıymetli arkadaşlarım Tuğba GENÇOĞLU, Büşra ÇETİN ERSEN, Ahmet BALCI, Şule YALÇIN, Işın MUTLU ve Ebru Didem COŞAR'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmamızı destekleyen Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkürler ederim (Proje No: 20210230).

Her koşulda inanan ve beni ben yapan değerleri kazanmamı sağlayarak her zaman yanımda olan canım eşime, varlıkları ve sonsuz sevgileriyle güç veren sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

Emine KESKİN YALÇIN

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Emine KESKİN YALÇIN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	iv
BEYAN.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	ix
SEMBOLLER	x
TABLO LİSTESİ	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
ÖZET.....	xv
SUMMARY	xvi
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser; Akciğer Kanseri ve Tedavi Yöntemleri	3
2.2. Nanoteknoloji ve İlaç Taşıyıcı Sistemler	4
2.2.1. Pasif/Aktif hedefli taşıyıcı sistemler	5
2.3. Polimerizasyon Yöntemleri	7
2.3.1. Kondenzasyon (Basamaklı) polimerizasyon.....	8
2.3.2. Katılma polimerizasyonu	9
2.3.2.1. Kontrollü polimerizasyon teknikleri.....	9
2.3.2.2. Kontrollü yaşayan serbest radikalik polimerizasyon yöntemi.....	9
2.3.2.3. Nitroksit aracılı polimerizasyon (NMP)	11
2.3.2.4. Atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP)	11
2.3.2.5. Tersinir katılma-parçalanma zincir transfer polimerizasyon (RAFT).....	12
2.4. Click Kimyası.....	14
2.5. Polimerik İlaç Taşıyıcı Sistemler	15
2.5.1. Glikopolimerler	16
2.5.2. Fotodinamik terapi (FDT).....	18
2.6. Kombinasyonel Terapi.....	22
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
3.1. Kimyasallar ve Kullanılan Cihazlar	24
3.1.1. Kimyasallar	24

3.1.2. Kullanılan cihazlar	25
3.2. Kemo-Fototerapötik Nanotaşıyıcı Sistemlerin Sentezi	25
3.2.1. RAFT ajanı sentezi.....	26
3.2.1.1. Di(tiobenzoil) disülfid sentezi	26
3.2.1.2. 4-Siyanopentanoik asit ditiobenzoat (CPADB) RAFT ajanı senteti.....	26
3.3. Monomerlerin ve Organik Bileşiklerin Sentezi	27
3.3.1. 1,2,3,4,6-Penta-O-asetil-β-D-glukopiranoz (β-GluAc) sentezi.....	27
3.3.2. 2- Bromoetil 2,3,4,5-tetra-O-asetil-β-D-glukopiranozid (AcGlucEtBr).....	27
3.3.3. 2-Azidoetil 2,3,4,6-tetra-O-asetil-β-D-glukopiranozid (AcGlucN ₃) senteti.....	28
3.3.4. 2-Azidoetil 2,3,4,6-tetra-O-asetil-β-D-glukopiranozid (AcGluc-N ₃) hidroliz reaksiyonu	28
3.3.5. (2,3:4,5-Di-O-izopropiliden)-β-D-fruktopiranoz-TSC (<i>iprFruc-2,3-</i> TSC) senteti.....	28
3.3.6. (2,3:4,5-Di-O-izopropiliden)-β-D-fruktopiranoz-N ₃ (<i>iprFruc-N₃</i>) senteti.....	29
3.3.7. (3-(3-((2-azidoetil)amino)-3-oksopropil)-2,8,12,17-tetrametil-13,18- divinilporfirin-7-il)propanoik asit (PpIX-N ₃) senteti	29
3.3.8. 3-(Trimetilsilil)prop-2-in-1-il metakrilat (TMSpMA) senteti	30
3.4. Polimer Sentezi	30
3.4.1. Poli (Trimetilsilil-korumalı propargil metakrilat) P(TMSpMA) homoblok polimer senteti.....	30
3.4.2. P(TMSpMA- <i>blok-n</i> -bütil akrilat) (P(TMSpMA- <i>b</i> -BA)) diblok senteti.....	31
3.4.3. Poli(propargil metakrilat- <i>blok-n</i> -bütil akrilat) (P(pMA- <i>b</i> -BA)) senteti.....	31
3.4.4. Click reaksiyonuyla glikopolimerlerin hazırlanması	31
3.5. Polimerik Misellerin Sentezi.....	32
3.5.1. Glikopolimerik misellerin hazırlanması ve karakterizasyonu.....	32
3.5.2. İlaç yükleme (DL) ve enkapsülasyon veriminin (EE) belirlenmesi.....	32
3.6. İlaç Salm Deneyi.....	33
3.7. Kritik misel konsantrasyonunun (KMK) belirlenmesi.....	33
3.8. Hücre Kültürü Çalışmaları	34
3.8.1. Hücrelerin büyütülmesi.....	34
3.8.2. Sitotoksikite testi	34

4.BULGULAR VE TARTIŞMA	35
4.1. RAFT Ajanı Sentezi	36
4.1.1. Di(tiyobenzoil) disülfid sentezi.....	36
4.1.2. 4-siyanopentanoik asit ditiobenzoat (CPADB) RAFT ajanı sentezi....	36
4.2. Monomerlerin ve Organik Bileşiklerin Sentezi	38
4.2.1. 1,2,3,4,6-Penta-O-asetil-β-D-glukopiranoz (β-GlucAc) sentezi	38
4.2.2. 2-Bromoetil 2,3,4,6-tetra-O-asetil-β-D-glukopiranoz sentezi (AcGlucEtBr).....	39
4.2.3. 2-Azidoetil 2,3,4,6-tetra-O-asetil-β-D-glukopiranozid (AcGlucN ₃) sentezi... ..	40
4.2.4. 2-Azidoetil-O-β-D-glukopiranozid (GlucN ₃) sentezi	41
4.2.5. (2,3:4,5-Di-O-izopropiliden)-β-D-fruktopiranoz-TSC (<i>iprFru</i> -TSC) sentezi... ..	43
4.2.6. (2,3:4,5-Di-O-izopropiliden)-β-D-fruktopiranoz-N ₃ (<i>iprFruc</i> -N ₃) sentezi... ..	44
4.2.7. (3-(3-((2-azidoetil)amino)-3-oksopropil)-2,8,12,17-tetrametil-13,18- divinilporfirin-7-il)propanoik asit (PpIX-N ₃) sentezi	45
4.2.8. 3-(Trimetilsilil) prop-2-in-1-il metakrilat (TMSpMA) sentezi	46
4.3. RAFT Polimerizasyon Yöntemiyle Polimer Sentezi	48
4.3.1. Poli(Trimetilsilil-korumalı propargil metakrilat) P(TMSpMA) homoplok polimer sentezi.....	48
4.3.2. Poli(Trimetilsilil-korumalı propargil metakrilat)- <i>blok</i> -poli(<i>n</i> -bütil akrilat) P(TMSpMA- <i>b-n</i> BA) sentezi	49
4.3.3. Poli(Propargil metakrilat)- <i>blok</i> -(<i>n</i> -bütil akrilat) (P(PMA- <i>b-n</i> BA)) sentezi.....	50
4.3.4. Glikopolimerlerin hazırlanması	52
4.4. Misellerin Sentezi	53
4.4.1. Sentezlenen misellerin karakterizasyonu	53
4.5. Karanlık/Aydınlık Sitotoksiste Testi	56
5.SONUÇLAR	58
KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ.....	67

KISALTMALAR

¹H NMR	: Proton nükleer manyetik rezonans
ACP	: 4,4'-Azobis(4-siyanovalerik asit)
AIBN	: 2,2'-Azobis(2-metilpropionitril)
ATRP	: Atom transfer radikal polimerizasyonu
CD₃OD	: Dötero metanol
CDCl₃	: Dötero kloroform
CPADB	: 4-Siyanopentanoik asit ditiobenzoat (CPADB)
dH₂O	: Distile su
DKM	: Diklorometan
DLS	: Dinamik ışık saçılımı
D-MEM	: Dulbecco modifiye besin ortamı
DMF	: Dimetil formamid
EDC	: 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid hidroklorür
EPR	: Arttırılmış geçirgenlik ve alıkonma
FD	: Foto duyarlaştırıcı
FDT	: Fotodinamik terapi
FTIR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
GPC	: Jel geçirgenlik kromatografisi
HOBT	: 1-Hidroksibenzotriazol hidrat
MTT	: 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromür
NMP	: Nitroksit aracılı polimerizasyon
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PDI	: Polidispersite indeksi
RAFT	: Tersinir katılma-parçalanma zincir transfer polimerizasyonu
TEM	: Geçirimli elektron mikroskopisi
UV-Vis	: Ultraviyole ve görünür ışık absorpsiyon spektroskopisi

SEMBOLLER

µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µmol	: Mikromol
g	: Gram
kDa	: Kilodalton
M	: Molar
mg	: Miligram
MHz	: Megahertz
mm	: Milimetre
mL	: Mililitre
mmol	: Milimol
N	: Normal
ng	: Nanogram
PTX	: Paklitaksel
PpIX	: Protoporfirin IX
°C	: Derece santigrat

TABLO LİSTESİ

Tablo 4.1 : Polimerizasyon koşulları ve polimerlerin karakterizasyonu.....	49
Tablo 4.2 : Misellere ait DLS analiz verileri.....	54
Tablo 4.3 : IC ₅₀ (µg/mL) değerleri.	57



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1: Kanserin gelişim süreci [4].....	4
Şekil 2.2 : Organik ve inorganik nanotaşıyıcılar. [6].....	5
Şekil 2.3 : Arttırılmış geçirgenlik ve alıkonma etkisiyle pasif hedefli nanoilaç alımı [10].	6
Şekil 2.4 : Polimer oluşumunun şematik gösterimi.	7
Şekil 2.5 : Kompozisyon ve yapı bakımından polimerler.	8
Şekil 2.6 : Sentez yöntemlerine göre polimerlerin sınıflandırılması.	8
Şekil 2.7 : Radikal polimerizasyon ve yaşayan radikal polimerizasyon [18]......	10
Şekil 2.8 : Nitroksit aracılı polimerizasyonda aktivasyon ve deaktivasyon mekanizması.....	11
Şekil 2.9 : ATRP'nin genel mekanizması.	12
Şekil 2.10 : RAFT'ın genel mekanizması.	13
Şekil 2.11 : Huisgen 1,3-dipolar siklo katılması ve bakır katalizli azid-alkin siklo katılması.	15
Şekil 2.12 : Şeker bazlı polimerik dağıtım sistemlerinin şematik gösterimi.	16
Şekil 2.13 : Fotodinamik terapi (FDT)'nin temel mekanizması [45].	18
Şekil 2.14 : Kovalent olmayan kapsülleme ve kovalent konjugasyon yöntemlerinden iki farklı tipte PpIX/PEG-PLA misellerinin hazırlanması ve 24 saatlik inkübasyondan sonra misellerin hücre canlılık oranları [72].	21
Şekil 2.15 : C16-PRP-DMA'nın nanopartiküller halinde kendiliğinden birleşmesi ve tümör ortamına yerleştikten sonra hücreyi nekroza uğratması [81].....	23
Şekil 2.16: Kombine FDT ve IDO blokajı için PpIX-NLG@Lipo'nun şematik gösterimi [82].	23
Şekil 4.1 : Glikopolimer bazlı yeni taşıyıcı sistemin sentezi ve kanser hücrelerine etkisi.	35
Şekil 4.2 : Di(tiobenzoil) disülfid sentezi	36
Şekil 4.3 : Di(tiobenzoil) disülfid sentezi RAFT ajanı öncüsüne ait ¹ H NMR spektrumu (CDCl ₃).	36
Şekil 4.4 : 4-siyanopentanoik asit ditiobenzoat (CPADB) RAFT ajanı sentezi.	37
Şekil 4.5 : 4-Siyanopentanoik asit ditiobenzoat (CPADB) RAFT ajanına ait ¹ H NMR spektrumu (CDCl ₃).	37
Şekil 4.6 : 4-siyanopentanoik asit ditiobenzoat (CPADB) RAFT ajanına ait ¹³ C NMR spektrumu (CDCl ₃).	38
Şekil 4.7 : 1,2,3,4,6-Penta-O-asetil-β-D-glukopiranoz (β-GluAc) sentezi.	38
Şekil 4.8 : 1,2,3,4,6-Penta-O-asetil-β-D-glukopiranoz (β-GluAc) bileşiğine ait ¹ H NMR spektrumu (CDCl ₃).	39

Şekil 4.9 : 2-Bromoetil 2,3,4,6-tetra-O-asetil-β-D-glukopiranoz sentezi.....	39
Şekil 4.10 : 2-Bromoetil 2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glukopiranoz (AcGlucEtBr) bileşiğine ait ¹ H NMR spektrumu (CDCl ₃).....	40
Şekil 4.11 : 2-Azidoetil 2,3,4,6-tetra-O-asetil-β-D-glukopiranozid (AcGlucN ₃) sentezi.....	40
Şekil 4.12 : 2-Azidoetil 2,3,4,6-tetra-O-asetil-β-D-glukopiranozid (AcGlucN ₃) bileşiğine ait ¹ H NMR spektrumu (CDCl ₃).....	41
Şekil 4.13 : 2-Azidoetil 2,3,4,6-tetra-O-asetil-β-D-glukopiranozid (AcGlucN ₃) bileşiğine ait FTIR spektrumu.....	41
Şekil 4.14 : 2-Azidoetil-O-β-D-glukopiranozid (GlucN ₃) sentezi.....	42
Şekil 4.15 : A) 2-Azidoetil 2,3,4,6-tetra-O-asetil-β-D-glukopiranozid (AcGlucN ₃) ve B) hidroliz sonrası 2-Azidoetil-O-β-D-glukopiranozid (GlucN ₃) bileşiğine ait ¹ H NMR spektrumu (A: CDCl ₃ , B: CD ₃ OD).....	42
Şekil 4.16 : (2,3:4,5-Di-O-izopropiliden)-β-D-fruktopiranoz-TSC (iprFru-TSC) sentezi.....	43
Şekil 4.17 : (2,3:4,5-Di-O-izopropiliden)-β-D-fruktopiranoz-TSC bileşiğine ait ¹ H NMR spektrumu (CDCl ₃).	44
Şekil 4.18 : (2,3:4,5-Di-O-izopropiliden)-β-D-fruktopiranoz-N ₃ (iprFru-N ₃) sentezi.	44
Şekil 4.19 : (2,3:4,5-Di-O-izopropiliden)-β-D-fruktopiranoz-N ₃ bileşiğine ait ¹ H NMR spektrumu (CDCl ₃).	44
Şekil 4.20 : (2,3:4,5-Di-O-izopropiliden)-β-D-fruktopiranoz-N ₃ bileşiğine ait FTIR spektrumu.....	45
Şekil 4.21 : (3-(3-((2-azidoetil)amino)-3-oksopropil)-2,8,12,17-tetrametil-13,18-divinilporfirin-7-il)propanoik asit sentezi.	45
Şekil 4.22 : (3-(3-((2-azidoetil) amino)-3-oksopropil)-2,8,12,17-tetrametil-13,18-divinilporfirin-7-il) propanoik asit bileşiğine ait ¹ H NMR spektrumu (DMSO- <i>d</i> ₆). .	46
Şekil 4.23 : PpIX ve PpIX-N ₃ 'e ait FTIR spektrumları.	46
Şekil 4.24 : 3-(Trimetilsilil)prop-2-in-1-il Metakrilat (TMSpMA) sentezi.....	47
Şekil 4.25 : 3-(Trimetilsilil)prop-2-in-1-il Metakrilat (TMSpMA) monomerine ait ¹ H NMR spektrumu (CDCl ₃).	47
Şekil 4.26 : 3-(Trimetilsilil)prop-2-in-1-il Metakrilat (TMSpMA) monomerine ait ¹³ C NMR spektrumu (CDCl ₃).	48
Şekil 4.27 : P(TMSpMA) homoblok polimer sentezi.....	48
Şekil 4.28 : P(TMSpMA) homoblok polimerine ait ¹ H NMR spektrumu (CDCl ₃). .	49
Şekil 4.29 : P(TMSpMA- <i>b</i> - <i>n</i> BA) diblok kopolimer sentezi.	50
Şekil 4.30 : P(TMSpMA- <i>b</i> - <i>n</i> BA) diblok kopolimer polimerine ait ¹ H NMR spektrumu (CDCl ₃).	50
Şekil 4.31 : P(PMA- <i>b</i> - <i>n</i> BA) sentezi.	51
Şekil 4.32 : A) P(TMSpMA- <i>b</i> - <i>n</i> BA) diblok kopolimer ve B) P(PMA- <i>b</i> - <i>n</i> BA) diblok polimerine ait ¹ H NMR spektrumu (CDCl ₃).	51
Şekil 4.33 : P(TMSpMA), P(TMSpMA- <i>b</i> - <i>n</i> BA) ve P(PMA- <i>b</i> - <i>n</i> BA) polimerlerine ait GPC sonuçları.	52
Şekil 4.34 : Glikopolimerlerin click reaksiyonu ile sentezi.....	52
Şekil 4.35 : Glikopolimere ait ¹ H NMR spektrumu (CDCl ₃).	53
Şekil 4.36 : Glikopolimerik misellerin sentezi.	53

Şekil 4.37 : A) GM ve GM-PTX misellerinin DLS analizi ile tespit edilen boyutları ve B) TEM analiz görüntüsü.	54
Şekil 4.38 : A) HPLC’de azalan konsantrasyonlarda hazırlanan PTX için oluşturulan kalibrasyon eğrisi ve B) İlaç yüklü miselin (GM-PTX) 37 °C’de PBS solüsyonlarında (pH=7,4, pH= 5,5) <i>in vitro</i> PTX salım grafiği.	55
Şekil 4.39 : A) UV-Vis spektrofotometrisinde PpIX’nin azalan konsantrasyonları kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi B) PpIX’nin azalan konsantrasyonlarının UV-Vis spektroskopisi ölçümleri ve C) GM, GM-PTX misellerine yüklenen PpIX’nin UV-Vis spektroskopisi ölçümleri.	56
Şekil 4.40: GM-PTX miseline ait kritik misel konsantrasyonu.	56
Şekil 4.41 : PpIX konsantrasyonuna göre A) CCD-1079Sk ve B) A-549 hücreleri karanlık-aydınlık MTT analizi.	57
Şekil 4.42: PTX konsantrasyonuna göre A) CCD-1079Sk ve B) A-549 hücreleri karanlık-aydınlık MTT analizi.	58

PAKLİTAKSEL YÜKLÜ POLİMERİK NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZİ VE KOMBİNASYONEL TERAPİ ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ

ÖZET

Kanser, vücudun hemen hemen her yerinde başlayabilen, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyüdüğü ve sonrasında vücudun diğer bölgelerine yayıldığı bir hastalık olup insan hayatını tehdit etmektedir. Kanserın mevcut temel tedavisi kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi müdahaleyi içerir; bunlar arasında kemoterapi basit ve uygun süreci nedeniyle klinikte yaygın olarak uygulanmaktadır. Kemoterapi, radyoterapi ve cerrahinin koordineli olarak uygulandığı geleneksel tedavi yöntemlerinin toksisite, vücutta spesifik olmayan bölgelere dağılma, zayıf oral biyoyararlanım ve ilaç dozunun ayarlanamaması gibi dezavantajları bulunması sebebiyle daha etkin, kişiye ve hastalığın türüne özel teşhis/tedavi sistemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Yeni nesil kombine tedavi yöntemleri arasında bulunan fotodinamik terapi (FDT), fototermal terapi (PTT), manyetik hipertermi gibi tedaviler umut vadeden yöntemler arasındadır. Bu yöntemlerin kombinasyonel terapide kullanılması, ilaç taşıyıcı sistemlerin etkinliğini artırmak ve antikanser ilacı tümör bölgesine hedeflemek açısından potansiyel bir tedavi yöntemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışmada hidrofobik kemoterapi ilacı paklitakselin (PTX), foto duyarlılaştırıcı ajan protoporfirin IX (PpIX) ile kombinasyonel tedavide kullanılması amaçlanmıştır. Öncelikle RAFT polimerizasyon yöntemi ile diblok kopolimeri hazırlanmış protoporfirin IX ve şeker bileşenleri ile azit-alkin halka katılma click reaksiyonu ile glikopolimerler sentezlenmiştir. Nanoçöktürme yöntemi ile paklitaksel glikopolimerlere enkapsüle edilerek misel formülasyonları hazırlanmıştır. Daha sonra, sadece FDT özellikli ilaç içermeyen glikopolimer bazlı miseller (GM) ve kemo-FDT özellikli paklitaksel içeren glikopolimerik misellerin (GM-PTX), A549 akciğer kanseri hücre hattı ve CCD-1079Sk sağlıklı fibroblast hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri incelenmiştir. Kırmızı ışığı absorplayan/ışınım yapan PpIX taşıyan, biyouyumlu, biyobozunur ve NIR'la tetiklenen singlet oksijen duyarlı ilaç salımı yapan glikopolimerik misel bazlı taşıyıcı platformların sentezi ve elde edilen misel yapılarının akciğer kanser hücrelerini hedeflemesi ile literatüre yeni bir FDT-Kemo kombinasyonel terapi kazandırması açısından önem taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: Akciğer kanseri, protoporfirin IX, paklitaksel, polimerik nanotaşıyıcı sistemler, kombinasyonel terapi

SYNTHESIS OF PACLITAXEL LOADED POLYMERIC NANOPARTICLES AND EVALUATION OF THEIR EFFICACY IN COMBINATIONAL THERAPY

SUMMARY

Cancer is a disease that can exist in almost any part of the body, in which cells grow uncontrollably and then spread to other parts of the body, threatening human life. The current main treatment for cancer includes chemotherapy, radiotherapy, and surgery; Among these, chemotherapy is the most wide treatment applied in the clinic. Due to the disadvantages of traditional treatment methods in which chemotherapy, radiotherapy, and surgery are applied in coordination, such as toxicity, non-specific distribution in the body, poor oral bioavailability, and high drug dosage requirement; more effective, personalized diagnosis/treatment systems are being developed. Treatments such as photodynamic therapy (PDT), photothermal therapy (PTT), and magnetic hyperthermia, which is among the new generation combined treatment methods, are the promising methods. The use of these methods in combination therapy emerges as a potential treatment method in terms of increasing the efficiency of drug delivery systems and targeting the anticancer drug to the tumor site. In this study, it was aimed to use the hydrophobic chemotherapy drug paclitaxel (PTX) in combination therapy with the photosensitizing agent protoporphyrin IX (PpIX). First of all, the diblock copolymer was prepared by the RAFT polymerization method, and protoporphyrin IX and sugar components were bounded via azide-alkyne ring addition click reaction to prepare glycopolymers. Micellar formulations were prepared by encapsulating paclitaxel into glycopolymers by the nanoprecipitation method. Then, the cytotoxic effects of drug-free drug-only glycopolymer-based micelles (GM) and glycopolymeric micelles (GM-PTX) containing chemo-PDT-only paclitaxel (GM-PTX) on A549 lung cancer cell line and CCD-1079Sk healthy fibroblast cell line were investigated. Synthesis of glycopolymeric micelle-based carrier platforms that absorb/radiate red light, carry PpIX, are biocompatible, biodegradable, and release singlet oxygen-sensitive drugs triggered by NIR, and that the resulting micelle structures target lung cancer cells are important in terms of bringing a new FDT-Chemo combination therapy to the literature carries.

Keywords: Lung cancer, protoporphyrin IX, paclitaxel, polymeric nanocarrier systems, combination therapy.

1. GİRİŞ

Dünyada insan hayatını yüksek oranda tehdit eden kanser için kullanılan tedavi yöntemlerinin dezavantajları, nanoteknoloji ve biyoteknolojiyi kullanarak yeni hedefli polimerik ilaç taşıyıcı sistemleri geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Antikanser ilaçlarının sebep olduğu; yüksek toksisite, biyouyumsuzluk, istenmeyen organ ve dokulara yönelme hedefli ilaç taşıyıcı sistemlerin araştırılmasına neden olmuştur. Pasif hedefleme ve aktif hedefleme kullanılarak ilacın kontrollü salımı, verilen dozajın azaltılması, uzun süreli *in vivo* dolaşım süresi ve toksisitenin giderilmesi sağlanır. Bu açıdan günümüzde özellikle çeşitli mimarilere sahip polimerik nanotaşıyıcı ilaç sistemleri tasarlanmaktadır. Özellikle çözücü içinde kendiliğinden birleşen amfifilik kopolimerler araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Amfifilik blok kopolimerlerin sentezi ile misel yapıları oluşturularak, hedef hücre, doku veya organlara yönlendirilebilmektedir.

Bu sistemler, çeşitli polimerizasyon teknikleri ile farklı monomerler ve başlatıcılar kullanılarak sentezlenir. Nitroksit aracılı polimerizasyon (NMP) ve atomik transfer radikal polimerizasyonu (ATRP) gibi polimerizasyon tekniklerinde yüksek sıcaklık ve metal gruplarının oluşturduğu dezavantajlar tersinir katılma-ayrışma zincir transfer (RAFT) polimerizasyon yöntemi ile giderilmektedir. RAFT polimerizasyon yöntemi ile sentezlenen polimerler, sağlıklı hücrelerden farklı kanser hücresine özel pH değerleri, sıcaklık farkı, singlet oksijen üretimi ve kanser hücresine özel reseptörler sayesinde ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılmaktadır. Özellikle glikopolimerler birçok kanser hücresinde ekspresyonu artan glukoz taşıyıcı (GLUT) reseptörleri tarafından tanınan etkin hücresel alıma sahip hedefli taşıyıcı sistemler olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca kanser hücrelerinde Warburg etkisiyle glikoz ihtiyacı artmakta ve tümör hücrelerinin sürekli olarak bölünmesi sonucunda reaktif oksijen türleri (ROS) birirmektedir ve bu durum oksidatif stresi artıran tedavi yöntemleri ile kanser hücrelerinin hedeflenmesine olanak sağlamaktadır. Bu yüzden oksidatif stresi artıran tedavi yöntemlerinden biri olarak sayılan fotodinamik terapi (FDT), yenilikçi ve minimal invaziv bir tedavi yöntemi olarak onkolojide yaygın olarak kullanılmaktadır. FDT, ışınlanan alanda terapötik bir etki göstermek için foto duyarlaştırıcıların (FD)

kullanıldığı, ışık bazlı, sistemik, lokal veya topikal olarak uygulanabilen bir tıbbi tedavidir. FD molekülün maksimum alım sırasında ışık ile uyarılması sonucunda sitotoksik olan reaktif oksijen türlerinin üretimi, kanser hücrelerinin apoptoz veya nekroz yoluyla hücre ölümüne yol açmaktadır. Fotodinamik terapide porfirinler foto duyarlaştırıcı olarak kullanılmaktadır özellikle FDT için iyi bilinen PpIX, diğer FD ajanlarına göre daha biyouyumludur. Aynı tedavi süreci sırasında kullanılan foto duyarlılaştırıcı ve kemoterapötik ilaç ile kombinasyon tedavisinin, tek yönlü tedavi süreçlerine kıyasla sağlam ve standart bir tedavi yöntemi haline gelmesi çeşitli hastalıklar için umut verici olmaktadır.

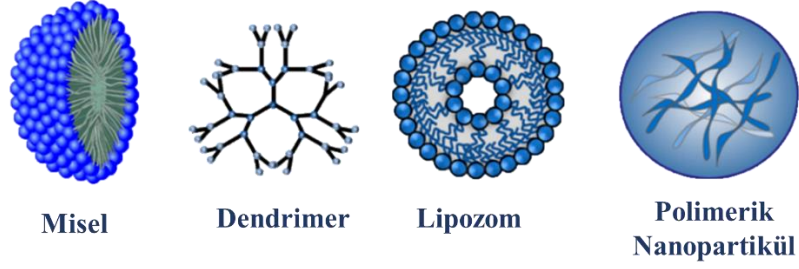
Çalışmamızda; RAFT polimerizasyon yöntemi ile diblok kopolimer zincirleri hazırlanmış, ardından kırmızı ışığı absorplayan/ışığa yapan PpIX ve şeker bileşenleri azit-alkin halka katılma click reaksiyonu ile polimer zincirine kazandırılarak glikopolimerlerin sentezi gerçekleştirilmiştir. Nanoçöktürme yöntemi ile paklitaksel enkapsüle edilerek glikopolimer bazlı misel formülasyonları elde edilmiştir. Sadece FDT özellikli (GM) ve kemo-FDT özellikli glikopolimerik misellerin (GM-PTX), A549 akciğer kanseri hücre hattı ve CCD-1079Sk sağlıklı fibroblast hücre hattı üzerinde karanlık/aydınlık MTT analizleri yapılarak sitotoksik etkileri incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

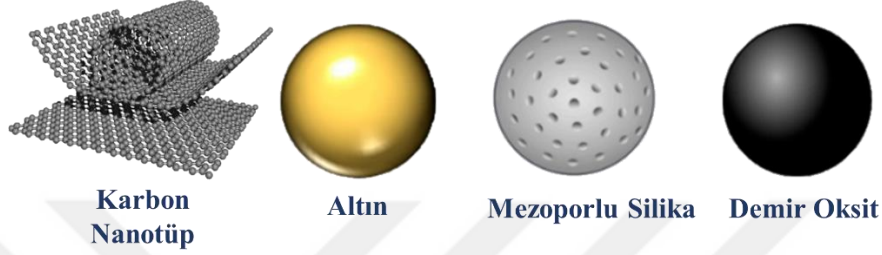
2.1. Kanser; Akciğer Kanseri ve Tedavi Yöntemleri

Kanser, vücudun birçok bölümünü etkileyebilen çok sayıda hastalığı ifade eden genel bir hastalık tablosu olup halk sağlığı için ciddi bir endişe kaynağıdır. Kanser hücreleri, kontrolsüz bir şekilde büyüyerek bölünür, sağlıklı doku ve organları işgal ederek tüm vücuda yayılıp ölüme sebep olur (Şekil 2.1). Bu yüzden kanserin erken teşhis ve tedavi yöntemleri büyük önem arz edip araştırmalar bu konuda yoğunlaşmıştır [1]. Tüm kanser vakalarının yarısından fazlasını oluşturan en yaygın dört kanser akciğer, prostat, meme ve kolon/rektumdur. Akciğer kanseri; tüm kanserlerin yaklaşık yüzde 12-16'sının nedeni iken kansere bağlı ölümlerin yüzde 17-28'inin nedenini oluşturan dünya çapında önde gelen ölüm sebeplerinden biridir. Bu kanser genel olarak küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHDAK) olmak üzere iki sınıfta değerlendirilir. KHDAK, teşhis edilen tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %80'ini oluşturur ve adenokarsinom (ADC) ve skuamöz hücreli karsinom (SQC) olmak üzere iki ana alt tipten oluşur [2]. Akciğer kanseri teşhis edildikten sonra başlıca tedavi yöntemleri olarak cerrahi uygulama, kemoterapi ve radyoterapi kullanılmaktadır. Bu tedavi yöntemleri arasında kemoterapi en sık kullanılan uygulama olmakla birlikte tedavi sırasında kullanılan kemoterapötik ajanların hedef bölgeye özgü olmaması, yüksek dozda verilmesi, immün yanıtı sebep olması sağlıklı hücreler üzerinde toksisiteye sebep olmaktadır [3]. Bu dezavantajların üstesinden gelmek, yüksek kanser terapötik etkinliği elde etmek için nanoteknoloji kullanılarak, kemoterapi ve diğer kanser tedavileri birleştirilip hedefli ilaç taşıyıcı sistem tasarlamak önemlidir.

Organik Nanotaşıyıcılar



İnorganik Nanotaşıyıcılar



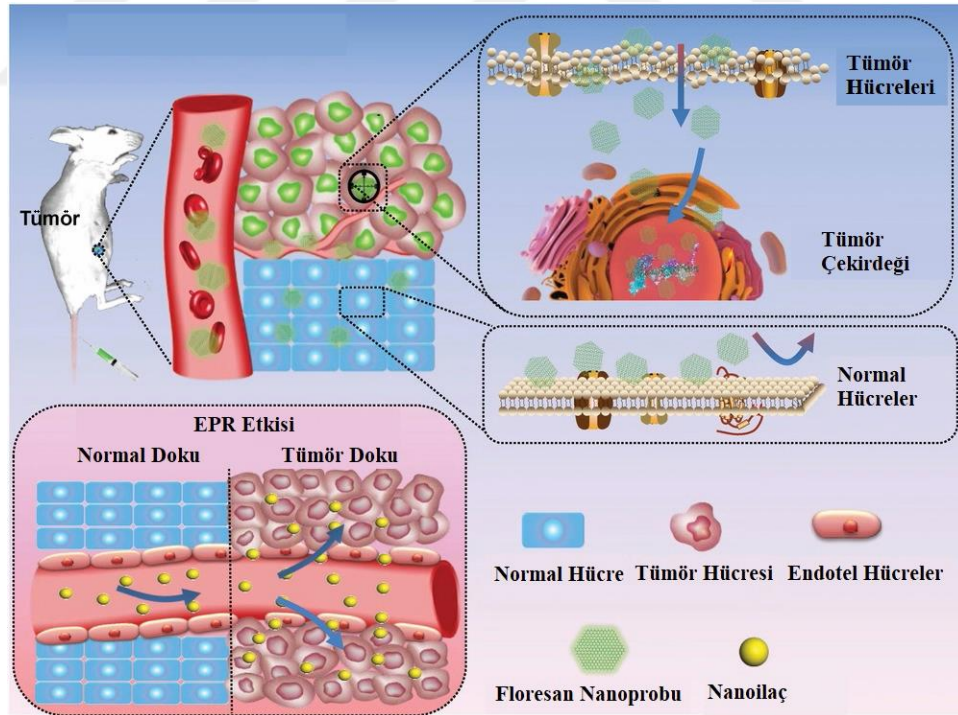
Şekil 2.2 : Organik ve inorganik nanotaşıyıcılar [6].

Tıp, eczacılık, malzeme bilimi ve mühendislik gibi multidisipliner dallar bir araya getirilerek, pasif hedefleme (EPR), aktif hedefleme, geniş yüzey/hacim oranı, çeşitli ilaçları yükleme yeteneği ve hedefleme için yüzey modifikasyonu yapılarak yeni hedefleyici ilaç taşıyıcı sistemler kullanılmaktadır [7]. Bu ilaç taşıyıcı sistemler, esas olarak kapsülleme yoluyla alıkonarak ilaçların sistemik yan etkilerini azaltmak, böylece hedeflenmemiş vücut dokularını yüksek ilaca maruz kalmaktan korumak ve yüklenen ilacı yalnızca hastalıklı bölgede bırakarak terapötik seviyeleri korumak için tasarlanmıştır [8]. Ayrıca hedefleyici ilaç taşıyıcı sistemlerin; etken madde kaybını en aza indirmesi, biyoyararlanımı artırması, büyük miktarda ve tekrarlanabilir bir şekilde üretilmesi avantajları arasında yer alır. Bu avantajlar sayesinde nanosistemler üzerinde büyük bir ilgi oluşmuştur [9].

2.2.1. Pasif/Aktif hedefli taşıyıcı sistemler

Nanotaşıyıcıların hedeflendirilmesinde pasif ve aktif hedeflendirme olmak üzere iki farklı yaklaşım kullanılmaktadır. Pasif hedeflendirmede artırılmış geçirgenlik ve alıkonma (EPR) etkisi, aktif hedeflendirmede ligant aracılı hedeflendirme ve stimulasyona bağlı hedeflendirme bulunmaktadır. Nanopartiküllerin yüzeyi, aktif hedeflemeyi indüklemek için spesifik tümör hedefleme molekülleri ile tasarlanırsa da, mevcut hedefleme stratejilerinin çoğu pasiftir. Pasif hedeflendirmede tümörlerin anatomik ve patofizyolojik özelliklerine odaklanılarak daha genel bir tümör hedefleme

stratejisi tasvir edilmiş ve geliştirilmiştir. Normal kan damarlarıyla karşılaştırıldığında tümör kan damarlarında; bradikinin (BK), nitrik oksit (NO) ve vasküler endotelyal büyüme faktörü gibi fazla oranda eksprese edilen vasküler mediatörler nedeniyle yüksek vasküler geçirgenlik mevcuttur. Bu durum, geliştirilmiş geçirgenlik ve alıkonma (EPR) etkisi olarak adlandırılmıştır ve ilk olarak 1986'da Matsumura ve Maeda tarafından tanımlanarak hedeflenen antikanser ilaçlarının geliştirilmesinde bir dönüm noktası olmuştur [10]. EPR etkisi ile normal sağlıklı dokulara kolayca yayılamayan nano ölçekli ilaç taşıyıcılarının 10-200 nm boyutları arasında tasarlanarak tümör kan damarlarından etkin bir şekilde geçmesi ve hedef bölgede birikmesi sağlanır (Şekil 2.3). Bu sayede tümör bölgesinde seçici birikim, yüksek özgüllük ve üstün biyouyumluluk avantajları sağlanmış olur [11]. Kimyasal bileşimlerine göre hedefli ilaç taşıyıcı sistemler; metaller, metal oksitler, karbonlar, polimerler, biyomoleküller, inorganik bileşikler, organik bileşikler veya bunların kombinasyonlarına ayrılabilir [12]. Lipozomlar, miseller, dendrimerler ve polimer konjugatları gibi çoklu nano ilaç taşıyıcıları, son 20 yılda çeşitli kanserlerin tedavisi için onaylanmıştır [13].



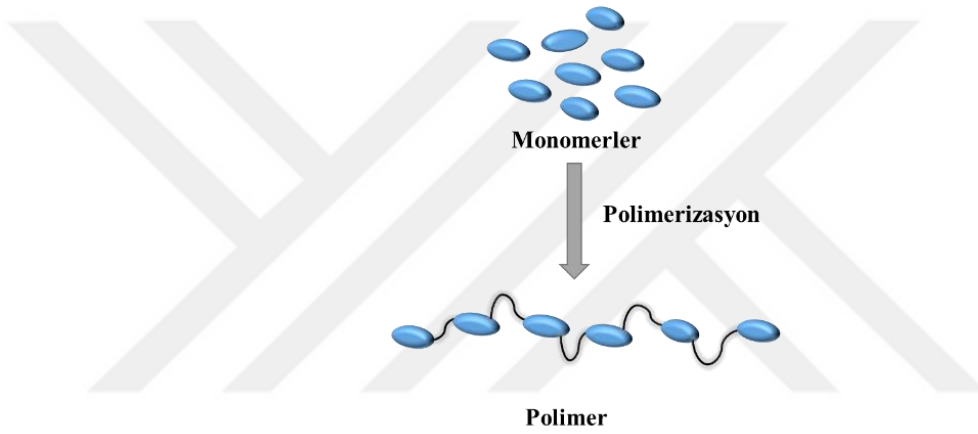
Şekil 2.3 : Arttırılmış geçirgenlik ve alıkonma etkisiyle pasif hedefli nanoilaç alımı [10].

Polimerik nanoilaç taşıyıcı sistemlerin elde edilmesinde farklı polimerizasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasının kapsamında gerçekleştirilen

polimerik ilaç taşıyıcı sistemin sentezinde kullanılan RAFT polimerizasyonu yöntemi ve diğer polimerizasyon teknikleri anlatılacaktır.

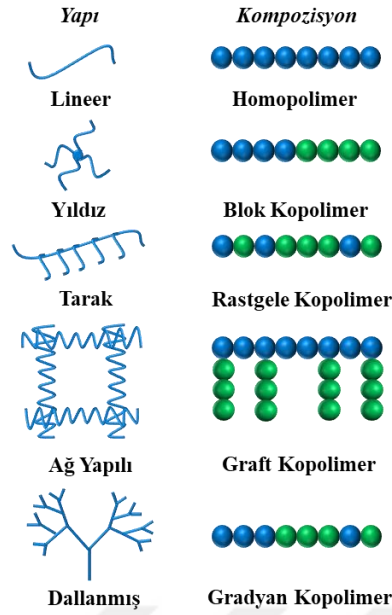
2.3. Polimerizasyon Yöntemleri

Alman kimyager olan Hermann Staudinger, tekrarlayan bir izopren birimine (monomer olarak adlandırılır) dayalı kauçuk için polimerik bir yapı formüle ederek, kimya alanına polimer konusunda katkıda bulunmuştur [14]. Polimerler, monomer adı verilen çok sayıda tekrar eden birimin kovalent bağlanma ile bir araya gelerek oluşturduğu makro moleküllerdir. Polimerizasyon, monomerden polimer üretme süreci olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2.4) [15].



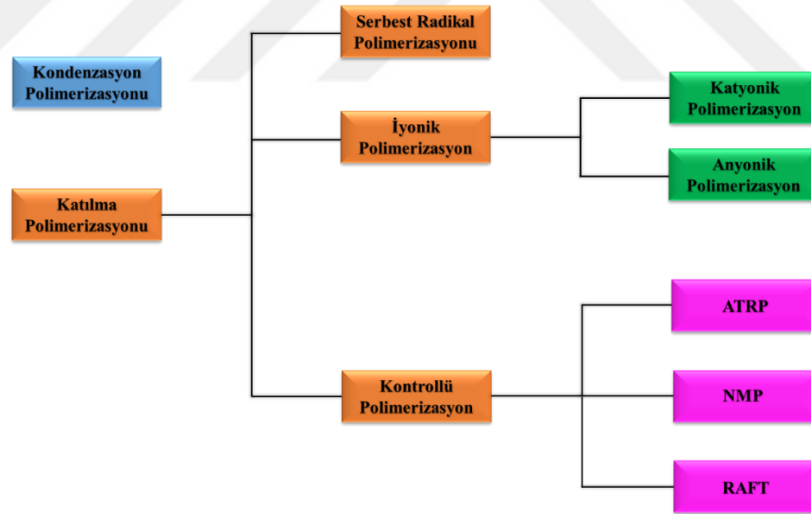
Şekil 2.4 : Polimer oluşumunun şematik gösterimi.

Sadece bir tür monomer içeren polimerizasyonlara homopolimerizasyon, birden fazla monomer türü içerenlere ise kopolimerizasyon denir. Bir polimerizasyondan üretilen makromoleküller yapı olarak; lineer, yıldız, tarak, ağ yapılı ve dallanmış formda, kompozisyon olarak; homopolimer, blok kopolimer, rastgele kopolimer, graft kopolimer, gradyan kopolimer olarak karşımıza çıkabilir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 : Kompozisyon ve yapı bakımından polimerler.

Sentezlenmek istenen polimer tipine göre laboratuvar ortamında çok çeşitli polimerizasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Polimerler sentez yöntemlerine göre basamaklı ve katılma polimerizasyonu olarak ikiye ayrılır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 : Sentez yöntemlerine göre polimerlerin sınıflandırılması.

2.3.1. Kondenzasyon (Basamaklı) polimerizasyon

Basamaklı polimerizasyonda doymamış bağlar içeren -OH, -NH₂, -COOH gibi fonksiyonel grupları taşıyan monomerler doğrudan birbirlerine katılarak polimer zincirini oluştururlar. Kullanılan monomerin en az iki reaktif bölgesi vardır. Doğal ve bazı sentetik polimerlerin üretiminde kullanılan basamaklı polimerizasyonda yan ürün olarak H₂O, HCl, NH₃ gibi küçük moleküller ortaya çıkar. İki monomer dimeri, dimer

monomerle birleşip trimeri, trimer de dimerle birleşirse pentameri oluşturur ve bu şekilde polimerizasyonda zincir uzayarak büyür. Bu durum polimerin molekül ağırlığının sürekli artmasına sebep olur. Verimli bir kondenzasyon polimerizasyonu için; H_2O , HCl gibi yan ürünler ortamdan uzaklaştırılmalı, kullanılan monomerler eşit konsantrasyonda ve saf olmalıdır [16]. Naylon, PET, poliester, poliamid gibi polimerler bu polimerizasyon yöntemi ile üretilir.

2.3.2. Katılma polimerizasyonu

Katılma polimerizasyonunu genellikle aldehitler, asetilenler, olefinler gibi doymamış monomerler gerçekleştirir. Başlama, çoğalma ve sonlanma olarak üç aşamadan oluşmaktadır. Reaksiyonun başında yüksek molekül ağırlıklı zincirler oluşur ve tepkime süresince molekül ağırlığı artışı görülmez. Yüksek molekül ağırlığına ulaşan zincirler transferlerle sonlanarak yeni aktif zincirler oluştururlar ve zamanla monomer dönüşümü artar.

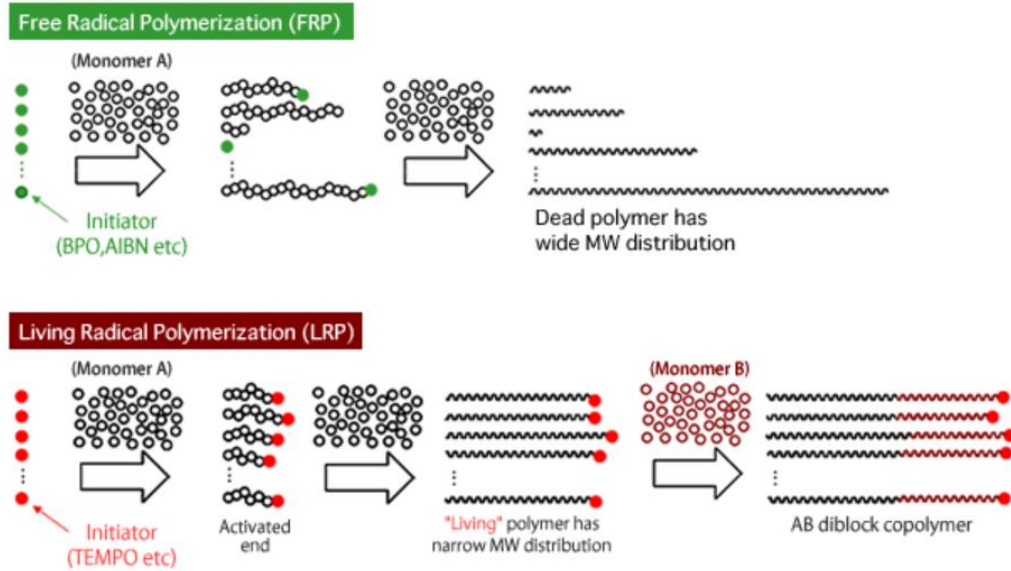
2.3.2.1. Kontrollü polimerizasyon teknikleri

Polimer biliminde özel makromoleküllerin sentezlenmesini sağlayan canlı polimerizasyon tekniklerinin geliştirilmesi önemli bir yer almaktadır. Kavramsal bakış açısından, canlı bir polimerizasyon, aktif ve hareketsiz türler arasında dinamik bir denge kurulması yoluyla zincir transferi ve sonlandırma olayları olmadan ilerleyen bir zincir polimerizasyonu olarak görülebilir. İlk olarak 1956'da Szwarc tarafından hayata geçirilen bu yöntem, bilinen molar kütlelere, bileşimlere, topolojilere ve işlevselliklere sahip tanımlı iyi yapılmış polimerlerin sentezlenmesine yardımcı olmuştur [17].

2.3.2.2. Kontrollü yaşayan serbest radikalik polimerizasyon yöntemi

15 yıl öncesine kadar canlı anyonik ve katyonik polimerizasyon yöntemlerindeki sınırlamalar nedeniyle karmaşık makromoleküler mimarileri kolayca elde etmek için yeni bir sentetik araç olan kontrollü yaşayan serbest radikalik polimerizasyon yöntemleri üzerine yapılan araştırmalar artmıştır. Kontrollü yaşayan serbest radikalik polimerizasyon yüksek derecede kontrole ulaşılmasını sağlayan birkaç yeni serbest radikalik polimerizasyon tekniğini bir araya getirir. Serbest radikalik polimerizasyon iyonik polimerizasyona göre şu açılardan farklılık gösterir: (i) göreceli kullanım kolaylığı (sadece çözünmüş oksijenin elimine edilmesi gerekir), (ii) radikal bir mekanizma ile polimerize edilebilen geniş vinilik monomerler yelpazesi ve (iii) uygulanabilecek çok sayıda proses (yığın, çözelti, emülsiyon, dispersiyon, vb.).

Bununla birlikte serbest radikal polimerizasyonunun ana sınırlaması; molar kütle, molar kütle dağılımı, zincir ucu işlevsellikleri ve makromoleküler mimari üzerindeki toplam kontrol eksikliğidir. Bu nedenle, serbest radikal polimerizasyonunun kullanım kolaylığı ile canlı iyonik polimerizasyonun sağladığı yüksek kontrol standardının tek bir polimerizasyon prosesinde bir araya getirilmesi makromoleküler sentez alanında bir devrimi de beraberinde getirmiştir. Bu görüşe göre, 1980'lerin başından beri, her biri farklı bir mekanik yaklaşıma dayanan ve yıllar içinde az ya da çok başarı ile karşılaşılan çeşitli kontrollü yaşayan serbest radikalik polimerizasyon yöntemleri geliştirilmiştir. Temel olarak ortak anahtar özellik; polimerizasyon süreci boyunca yayılan radikaller ve çeşitli hareketsiz türler (yani uç başlıklı, dolayısıyla çoğalamayan) arasında dinamik bir dengenin kurulmasıdır. Bu şekilde elde edilen denge (Şekil 2.7), termal, fotokimyasal ve/veya kimyasal uyarılar tarafından tetiklenir ve yönetilir. Böyle bir yaklaşımın başarısı için polimer zinciri, polimerizasyon süresinin çoğunu atıl durumda geçirmelidir [18].



Şekil 2.7 : Radikal polimerizasyon ve yaşayan radikal polimerizasyon [18].

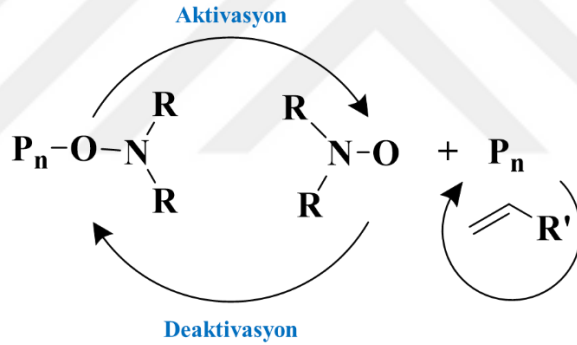
Günümüzde bu yöntem kullanılarak türetilen ve sıklıkla kullanılan kontrollü yaşayan serbest radikalik polimerizasyon yöntemleri;

- Nitroksit Aracılı Polimerizasyon (Nitroxide-Mediated Polymerization, NMP),
- Atom Transfer Radikal Polimerizasyonu (Atom Transfer Radical Polymerization, ATRP),

- Tersinir Katılma-Parçalanma Zincir Transfer Polimerizasyon (Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer Polymerization, RAFT) olarak sınıflandırılmaktadır.

2.3.2.3. Nitroksit aracılı polimerizasyon (NMP)

Georges ve arkadaşları, birkaç vinil monomerinin polimerizasyonunu kontrol etmede nitroksit aracılı polimerizasyonun etkin olduğunu buldu. NMP, baskın olarak (makro)alkoksiamin verecek şekilde kontrol ajanı olarak hareket eder ve büyüyen (makro)radikal ve nitroksit arasındaki tersine çevrilebilir bir sonlandırma mekanizmasını oluşturur. Bu hareketsiz işlevsellik, sıcaklık artışı üzerine basit bir homolitik parçalanma ile yayılan radikali ve nitroksidi geri üretir. Böylece aktif olmayan ve aktif türler arasında bir denge, yani aktivasyon-deaktivasyon dengesi kurulur. Kurulan denge, katalizör ya da biyomoleküler değişimin gerekli olmadığı, tamamen termal bir süreç olma avantajını sunar. Bu aktivasyon-deaktivasyon dengesi ve kalıcı radikal etkisi tarafından polimerizasyon kinetiği yönetilir (Şekil 2.8) [19].

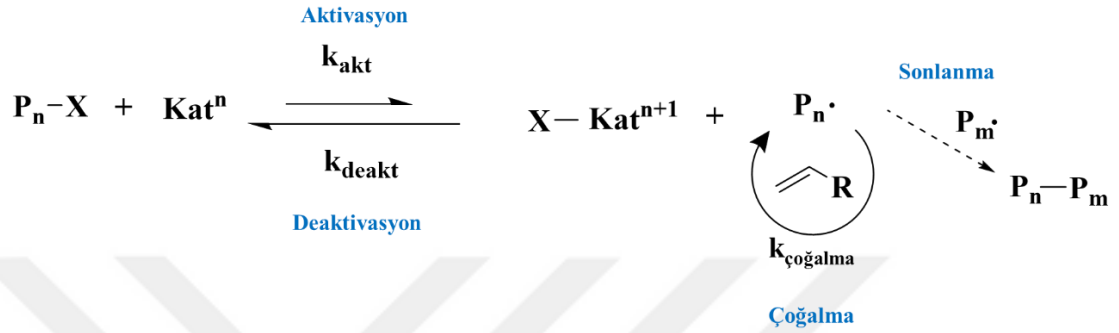


Şekil 2.8 : Nitroksit aracılı polimerizasyonda aktivasyon ve deaktivasyon mekanizması.

2.3.2.4. Atom transfer radikal polimerizasyonu (ATRP)

Wang, Matyjaszewski ve meslektaşları ile Sawamoto ve grubu 1995'te ATRP'yi bildirdi. ATRP yüksek işlevselliklere, bileşime ve mimarilere sahip polimerlerin üretimi üzerinde büyük bir etkiye sahipti. ATRP'de bir alkil halojenür (X) başlatıcı olarak kullanılır. Katalizör olarak ise genellikle Ni, Fe, Ru, Cu ve Os gibi geçiş metal kompleksleri kullanılmaktadır [20]. Aktivasyon sırasında, katalizör (Katⁿ), reaktif, karbon merkezli bir radikal oluşturmak için bir başlatıcı molekülü veya bir C-X bağına sahip bir polimer zincir ucunu azaltır. Bu radikal, monomer içindeki işlevselliklerle reaksiyona girebildiğinden alkenler gibi, polimer zincirini büyötmek için polimerizasyon yayılımı meydana gelebilir. Bununla birlikte, radikal

polimerizasyonlar doğası gereği sonlandırma süreçlerine duyarlıdır, burada çoğalan radikaller, radikal zincir-birleşmesi veya orantısız birleşme ile polimerizasyonu durdurur. Bu sınırlamanın üstesinden gelmek için ATRP'de aktivasyon adımı sırasında bir deaktivatör oluşur. Çoğu zaman, deaktivatör basitçe oksitlenmiş katalizördür (Kat^{n+1}). Bu durum, hızlı bir şekilde, ağırlıklı olarak çok düşük radikal konsantrasyonları ile aktivasyon-deaktivasyon dengesi kurar (Şekil 2.9) [21].



Şekil 2.9 : ATRP'nin genel mekanizması.

2.3.2.5. Tersinir katılma-parçalanma zincir transfer polimerizasyon (RAFT)

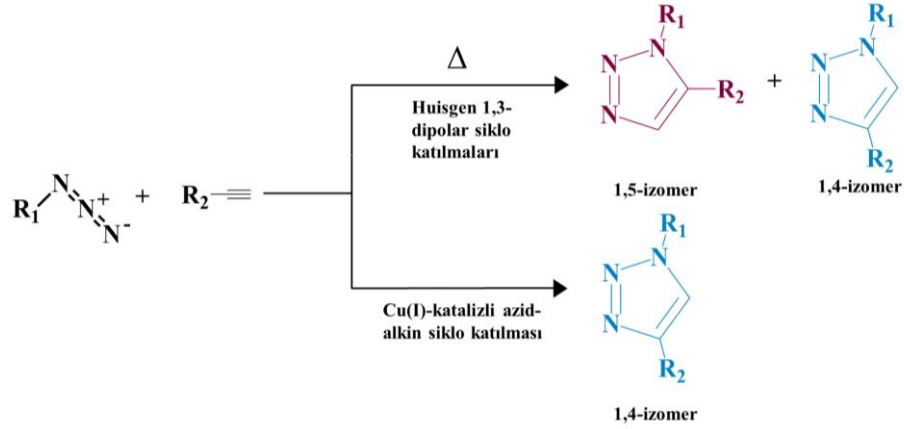
1998 yılında Rizzardo ve grubu tarafından keşfedilen, yaşayan-kontrollü radikal polimerizasyon teknikleri arasında en son bulunan bir polimerleşme yöntemidir. ATRP ve NMP tekniklerinde polimer zincirinin büyümesi tersinir sonlanma ile kontrol edilirken, RAFT tekniğinde farklı olarak tersinir zincir transferi reaksiyonu zincirin büyümesini kontrol etmektedir. RAFT, diğer polimerleşme tekniklerine kıyasla daha çeşitli polimerizasyon koşullarına ve geniş bir monomer spektrumuna uygulanılabilmektedir [22] [23]. RAFT polimerizasyonunda tersinir zincir tepkimeleri zincirin büyüme adımını kontrol ettiğinden dolayı daha geniş bir monomer spektrumunda kullanılmaktadır [24]. RAFT polimerizasyonunda ditiyoesterler, ditiyokarbamatlar, tritiyokarbonatlar ve ksantatlar RAFT başlatıcı ajanı olarak kullanılmaktadır. Polimerizasyon tiyokarboniltiyo bileşikleri, aktif ve aktif olmayan polimer zincirleri arasında transfer edilerek kontrol edilmektedir. Polimer mimarisinin ve molekül ağırlığının önceden ayarlanabilmesi, düşük heterojenlik indislerine ve düşük molekül ağırlığı dağılımına (polidispersiteye) sahip olması RAFT 'ın önemli avantajları arasındadır [25]. ATRP sonucunda elde edilen polimerde bulunan metal katalizörün temizlenmesinin çok zor olması, NMP için yüksek sıcaklığın gerekli olması RAFT polimerizasyonunun son zamanlarda daha fazla tercih edilmesine neden olmuştur [24].

2.4. Click Kimyası

1999’da Dr. Barry Sharpless ve grubu tarafından bulunan “click” kimyası; yüksek verimli, zararsız yan ürünler oluşturan, stereospesifik bir reaksiyondur. Reaksiyon koşullarının basit olması, başlangıç maddelerinin kolay bulunabilmesi, kullanılan çözücülerin zararsız olması ve ortamdan kolaylıkla uzaklaştırılıyor olması, elde edilen ürünün kolay saflaştırılması click reaksiyonlarının avantajları arasında yer alır [27]. “Click” reaksiyonları, özellikle farmakoloji biliminde büyük ilgi uyandıran araştırma konusu olmuştur. Click reaksiyonları;

- 1,3-Dipolar Halka Katılması (hetero Diels Alder halka katılmasını da içerirler),
- Nükleofilik Halka Açılmaları,
- Aldol Tipi Olmayan Karbonil Kimyası,
- Karbon-Karbon Çoklu Bağına Katılma olarak sınıflandırılmaktadır.

Bu sınıflandırmanın arasında halka katılmaları, özellikle Cu(I) katalizli, 1,2,3-triazoller oluşturmak üzere terminal alkinler ve azidlerin Huisgen 1,3-dipolar siklo katılmaları (HDS) sıklıkla kullanılmaktadır [28]. Huisgen reaksiyonu olarak bilinen 1,3- dipolar siklokatılma reaksiyonunda, azit, nitriloksit veya diazoalken gibi bir 1,3-dipol molekülünün, Cu(I) katalizörü altında alken, alkin veya karbonil gibi bir dipolarofil ile etkileşmesi sonucunda 5’li heterosiklik moleküllerin oluşumu gerçekleşir (Şekil 2.11) [29]. [3+2] Türündeki bu siklokatılma reaksiyonlarında molekülün toplam yükü kaybolur ve neredeyse tamamının dönüşümü ile yürüyen reaksiyonda herhangi bir grup korumaya ihtiyaç duyulmaz. HDS, yüksek sıcaklık gerektirmeyen, 0–160 °C aralığında çalışma imkânı sağlayan, çeşitli çözücülerin kullanıldığı, sterik faktörlerden etkilenmeyen, geniş pH aralığında (pH:5-12) gerçekleşebilen bir reaksiyon türüdür. Azid ve terminal alkinlerin reaksiyonunun standart olan koşullara çok dayanıklı olmaları ve basit olmaları bu siklokatılma tepkimesini popüler kılmaktadır [30].



Şekil 2.11 : Huisgen 1,3-dipolar siklo katılması ve bakır katalizli azid-alkin siklo katılması.

2.5. Polimerik İlaç Taşıyıcı Sistemler

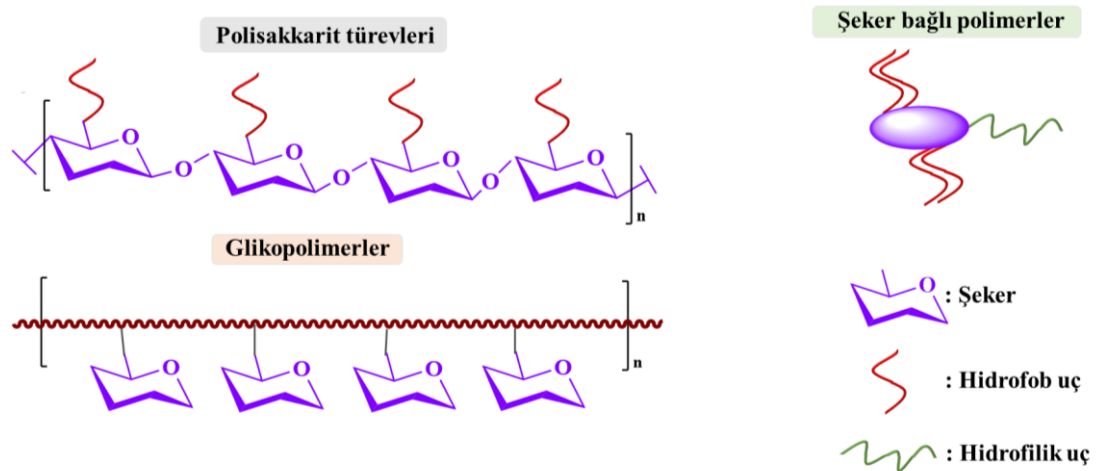
Polimerler, gelişmiş farmakokinetik özelliklerinden dolayı ilaç dağıtım sistemlerinin ayrılmaz bir parçası haline gelmiştir. Araştırmacılar kontrollü ilaç salım sistemleri ve sürekli salım formülasyonları geliştirmek için polimerleri kullanmaktadır [31]. Yeni ilaç dağıtım sistemleri arasında; miseller, dendrimerler, lipozomlar, polimerik nanopartiküller, mikrokapsüller ve lipoproteinler bulunur. Polimer bazlı kapsüllemeler ve kontrollü ilaç salım sistemleri; konvansiyonel ilaçlara göre daha iyi dolaşım sürelerine sahip olmak, kanser hücrelerini direk hedeflemek, aşırı doz ilaç uygulamasını azaltmak gibi avantajlar sayesinde biyoyararlanımı iyileştirmede, yan etkileri ve hastalara verilen diğer rahatsızlık türlerini en aza indirmede umut verici bir rol oynamaktadır. Biyolojik sistemleri taklit eden polimerler, pH veya sıcaklıktaki değişim gibi dış uyaranlara tepki verir ve bunun sonucunda çözünürlük, hidrofobik/hidrofilik denge, biyomolekül salınımı (ilaç molekülü) ve konformasyon gibi özellikleri değişir [32].

İlaçların tümör bölgesine iletimi ve tümör bölgesinde birikimini sağlayabilmek için polimerik yapılar kullanılarak 10-200 nm boyut aralığında pasif hedefli ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmektedir. Aynı zamanda farklı hedefleyici gruplar içeren polimerik taşıyıcı sistemler kullanılarak ilacın tümör hücreleri tarafından etkin hücresel alımı sağlanabilmekte ve tümör bölgesinde kontrollü salımı mümkün olabilmektedir. Bu sayede antikanser ilacın sağlıklı dokularda birikimi sınırlandırılıp, istenmeyen yan etkiler ortadan kaldırılabilir [33].

Son on yılda polimer sentetik yöntemlerindeki büyük ilerlemeler; farklı mimarilere, bileşimlere ve iyi tanımlanmış moleküler ağırlıklara sahip yeni nesil şeker bazlı polimerlerin üretilmesine olanak sağlamıştır. Bu özelliklerin tümü hedefli polimerik ilaç taşıyıcı çeşitliliğini büyük ölçüde zenginleştirmiştir. Diğer sentetik polimerlerle karşılaştırıldığında şeker bazlı polimerler biyolojik olarak parçalanabilir ve immünojenik olmama avantajlarına sahiptir ve bu da onları özellikle *in vivo* terapötik uygulamalar için uygun hale getirir. Şeker bazlı polimerler; ilaç, gen, protein ve antijen dağıtımının yanı sıra teşhis cihazları dahil olmak üzere biyomedikal uygulamalar için de büyük ilgi görmüştür [34].

2.5.1. Glikopolimerler

İnsan vücudunun temel bir bileşeni olan şekerler çeşitli biyolojik süreçlerin ayrılmaz bir parçasıdır. Hızla büyüyen disiplinler arası araştırmalar, şeker-protein etkileşimlerinin yüksek özgüllüğü nedeniyle mannoz, laktoz veya galaktoz gibi şekerlerin hedef ligandlar olarak polimerlere dahil edilmesi hakkında bilgi sağlar. Çeşitli kimyasal modifikasyonlara uygun fonksiyonel gruplara sahip şeker bazlı konjugatlar, biyoaktif ajanların verilmesine aracılık etmenin yanı sıra rekabetçi reseptör inhibisyonu yoluyla doğal biyoaktivite sergileyerek çok yönlü taşıyıcılar olarak başarı göstermektedir [35]. Şekere dayalı polimerik dağıtım sistemleri şeker ögelerinin rollerine göre; şekerin yığın polimer bileşimi olduğu polisakarit türevleri, şeker kısımlarının asılı gruplar olarak konjuge edildiği şeker ile işlevselleştirilmiş polimerler (yani glikopolimerler) ve bir şekerin bir dal bölgesi veya omurga olarak kullanıldığı şekere bağlı polimerler olarak kategorize edilebilir (Şekil 2.12) [36].



Şekil 2.12 : Şeker bazlı polimerik dağıtım sistemlerinin şematik gösterimi.

Glikopolimerler birçok kanser hücresinde ekspresyonu artan glukoz taşıyıcı (GLUT) reseptörleri tarafından tanınan etkin hücresel alıma sahip hedefli taşıyıcı sistemler olarak literatürde karşımıza çıkmaktadır. Glukoz sitozole girmek için spesifik taşıma proteinlerine ihtiyaç duyar ve esas olarak glukozun kanser hücrelerine taşınmasına kolaylaştırıcı glukoz taşıyıcıları (GLUT) aracılık eder. GLUT-1 en çok çalışılan glukoz taşıyıcısıdır, akciğer kanseri hücreleri ve diğer çeşitli kanser hücrelerinde GLUT-1'in aşırı ekspresyonu doğrulanmış, ilaç tedavisinin bir hedefi olmuştur [37]. Kanser terapötikleri için şeker aracılı hedefli ilaç taşıyıcı stratejileri, tümör hücre membranlarında bulunan şeker taşıyıcılarının aşırı ekspresyonu sebebiyle seçici olarak glikolize edilmiş ajanların daha fazla alınmasına dayanmaktadır. Glikozillenmiş ajanlar kanserli hücre tarafından daha fazla hücre içine alınarak tedavi etkinliğinin artmasını sağlar ve hedef olmayan hücrelere yönelik toksisiteyi azaltır. Aşırı eksprese edilen GLUT reseptörlerinin tipleri farklı tümörler arasında değişmektedir [38] ve hücresel glikokonjugatların alımı farklı yapısal izomerler için değişiklik gösterebilmektedir [39]. Glikopolimer bazlı ilaç taşıyıcı sistemlerin moleküler tasarımlarında terapötik etkinliği artırmak için glikopolimerdeki şeker moleküllerinin sayısı ile hidrofilik/hidrofobik oranı dikkatle değerlendirilmelidir. Ayrıca spesifik ve seçici hücre içi alım için glikopolimer uzunluğu; epitop yoğunluğundan, esneklikten de önemli ölçüde etkilenir. Bu nedenle, yapısal parametrelerin dikkatli bir şekilde düzenlenmesi önemlidir. Glikopolimerler, ana zincir ya da yan zincirinde karbonhidrat içeren polimerler, suda iyi çözünen, yüksek derecede polar ve biyouyumlu malzemeler olup, hedefli polimerik ilaç taşıyıcılar olarak kullanılabilme potansiyeli taşırlar [40].

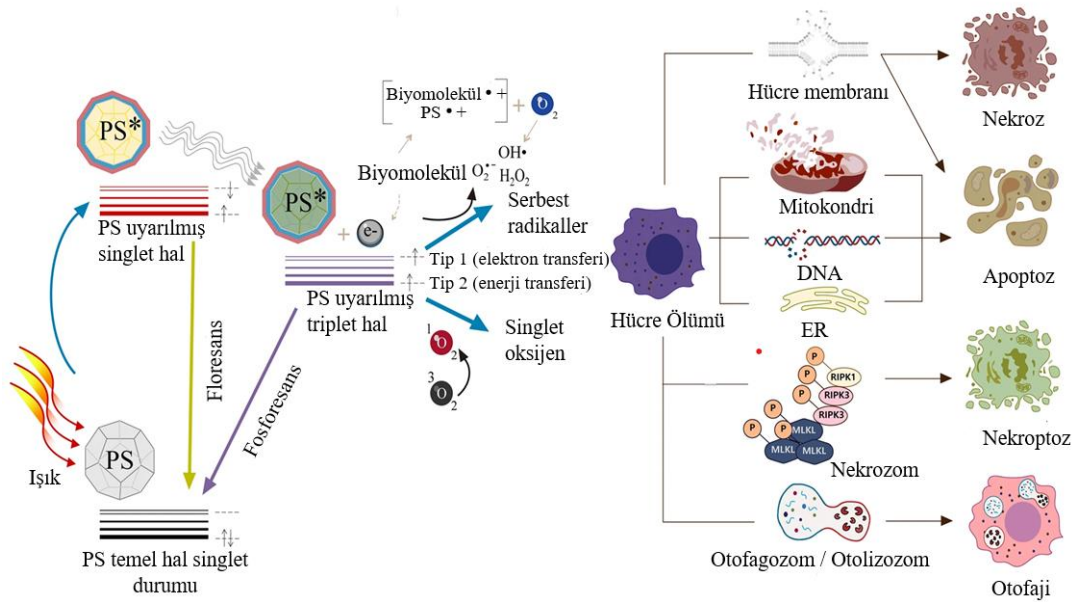
Son yıllarda, nanoparçacık ilaç dağıtım sistemleri geniş çapta çalışılmış ve hidrofobik ilaçların uygulanmasında avantajlı olduğu kanıtlanmıştır. Hidrofobik antikanser ilaçları polimerik nanopartiküllere konjuge edilerek farmakokinetik açıdan verimlilik sağlayan, suda çözünürlüğü artıran, ilaçların olumsuz reaksiyonlarını azaltabilen, hedeflemeyi iyileştirebilen ve dolayısıyla genel anti-tümör etkinliğini artıran değişikliklere yol açar [41].

1924'te Otto Warburg, kanser hücrelerinin oksijen mevcudiyetine rağmen ATP üretmek için aerobik glikoliz yoluyla glikozu metabolize ettiğini buldu. Değişen bu glukoz metabolizmasının kansere yol açabileceğini öne sürüldü ve bu durum "Warburg etkisi" olarak adlandırıldı. Warburg etkisi, normal hücrelere kıyasla tümör hücrelerinde çok daha yüksek oranda glukoz alımı ve daha yüksek laktat üretimi ile

karakterize edilir. Warburg etkisiyle glikoz ihtiyacı artmakta ve tümör hücrelerinin sürekli olarak bölünmesi sonucunda reaktif oksijen türleri (ROS) birikmektedir. Oluşan bu durum hücrelerin oksidatif strese maruz kalmasına sebep olmaktadır. Tümör hücrelerinin bu özelliği oksidatif stresi artırarak hücreleri apoptoza yönlendiren tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi yönünde araştırmacıları teşvik etmektedir [42]. Kanser için günümüzde aynı anda teşhis ve tedavinin uygulanmasını sağlayan yeni oksidatif stresi artıran teranostik yaklaşımlar üzerinde araştırmalar yapılmaktadır. Bu yeni teranostik yaklaşımlar sistemik dolaşımı uzatmak, hedef dışı etkileşimleri en aza indirmek ve hedefe özel terapötik birikimi geliştirmek için tasarlanmaktadır [43].

2.5.2. Fotodinamik terapi (FDT)

Oksidatif stresi artıran tedavi yöntemlerinden biri olarak sayılan fotodinamik terapi (FDT), yenilikçi ve minimal invaziv bir tedavi yöntemi olarak onkolojide yaygın olarak kullanılmaktadır. FDT, ışınlanan alanda terapötik bir etki sağlamak için belirli bir dalga boyunun enerjisini emen ve emisyonu floresan üreten foto fuyarlaştırıcıların (FD) tümör dokularına tutulmasına dayanan ışık bazlı, sistemik, lokal veya topikal olarak uygulanabilen bir tıbbi tedavidir. FD molekülün maksimum alım sırasında ışık ile uyarılması sonucunda oksidatif streste hızlı artış nedeniyle hücreler için sitotoksik olan reaktif oksijen türlerinin üretimi, kanser hücrelerinin apoptoz veya nekroz yoluyla hücre ölümüne yol açmaktadır (Şekil 2.13) [44].



Şekil 2.13 : Fotodinamik terapi (FDT)'nin temel mekanizması [45].

Foto duyarlılaştırıcılar, terapötik etkinliği artırmak, normal hücre ve dokulara zarar gelmesini önlemek için kullanılmıştır. FDT'nin diğer geleneksel tedavilere göre avantajları; cerrahinin yapılamadığı yerlerde uygulanabilme, ışığın sadece tümör bölgesine uygulanması ile sağlıklı doku hasarının engellenmesi, tekrarlanabilirlik, zamansal ve bölgesel olarak kontrol edilebilir niteliği ve kemoterapi/radyasyon tedavisine karşı savunmasız olan hastaların tedavi edilebilmesi olarak sıralanabilir. FDT, non-invaziv bir tedavi sağlayarak çeşitli solid kanserler için birincil veya yardımcı tedavi olarak kullanılabilmektedir [46].

FDT için kullanılan ışık kaynakları; lazerler, diyotlar (LED) ve filtreli görünür-yakın IR lambaları olmak üzere 3 kategoriye ayrılır. Genellikle ideal bir ışığa duyarlılaştırıcının, “fototerapötik pencere” olarak adlandırılan 600-850 nm spektral aralığında güçlü bir absorpsiyona ve yüksek uyarma verimliliğine sahip olması gerekmektedir. 630-850 nm dalga boyu aralığında yaymak için 1,5 W gücünde ışık kaynaklarının kullanılması yaygındır. Işık dokuya girdiğinde saçılır veya emilir ve her iki işlemin ölçümü doku tipine ve kullanılan ışığın dalga boyuna bağlıdır. Işığın absorpsiyonundaki etkinlik, hemoglobinin, miyoglobinin ve sitokromlar gibi dokularda bulunan endojen kromoforların varlığından kaynaklanmaktadır. Fotodinamik terapide ışık kaynağının dalga boyu, reaktif oksijen türlerini (ROS) oluşturmak ve hücrelerde sitotoksik etki yaratmak için ışığa duyarlılaştırıcının maksimum absorpsiyonunun dalga boyuna uygun olmalıdır [47], [48].

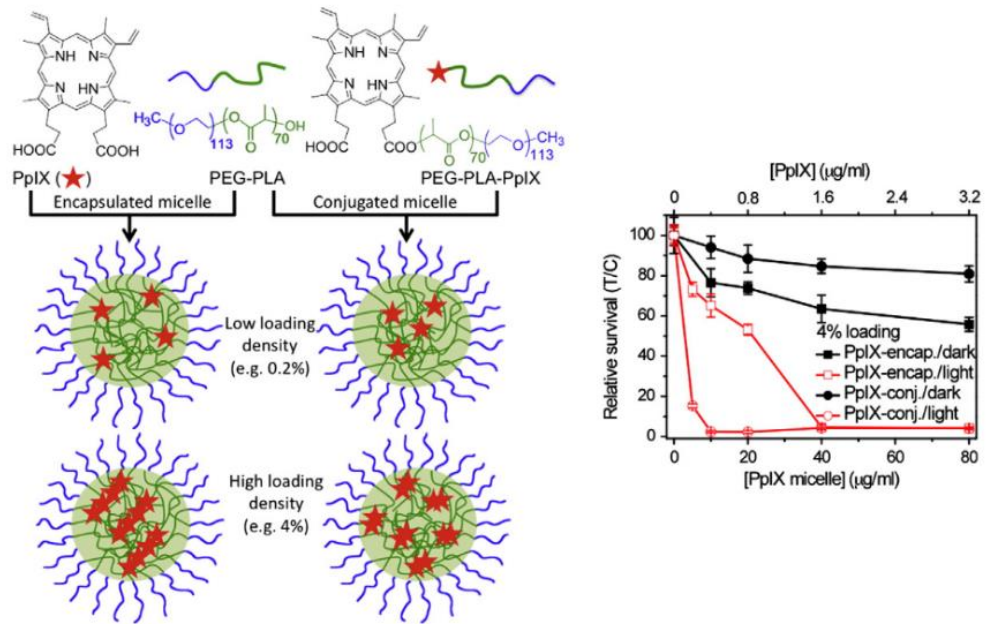
Fenotiazinyum, fullerenler ve ksantenler gibi geniş polisiklik aromatik yapıya sahip birçok FD molekülünün insan vücudunda parçalanması zordur ve ciddi yan etkilere neden olabilir. Bu yüzden FDT'de *in vivo* olarak kullanılan herhangi bir ışığa duyarlılaştırıcı toksik, mutajenik veya kanserojen olmamalıdır. İdeal bir duyarlılaştırıcının ön koşulları arasında kimyasal saflık, tümör hücreleri için seçicilik, kimyasal ve fiziksel stabilite, uygulama ile tümör dokularında maksimum birikim arasındaki kısa zaman aralığı ve optimal doku penetrasyonu bulunmaktadır. Ayrıca dokudan geçebilen ışığın yaydığı bir dalga boyunda aktive edilmelidir [49]. Işığa duyarlılaştırıcıların dört ana sınıfı, hepsi etki mekanizmaları ve ışık aktivasyonu açısından farklı fotokimyasal ve fotofiziksel özellikler sergileyen porfirin türevleri, klorinler, ftalosiyaninler ve porfisenlerdir. Ana FD'ler arasında tetrapirrol gruplarının porfirinleri bulunur. Temoporfin [50], porfimer sodyum [51], verteporfin [52], redaporfin [53] ve 5-aminolevulinik asit (ALA) [54] gibi FD ajanları klinikte yaygın

şekilde kullanılmaktadır. Porfirin bazlı FD molekülleri yüksek oranda biyouyumluluğa ve iyi terapötik etkinliğe sahiptir. Ayrıca porfirin türevlerinin yakın infrared bölgede (NIR) (600-800 nm, kırmızıdan koyu kırmızıya) [55] kuvvetli absorpsiyon yapması ve oldukça yüksek fotokimyasal kararlılığa sahip olması bu tür foto-duyarlaştırıcıları ön plana çıkarmaktadır [56]. FDT için iyi bilinen bir foto duyarlaştırıcı olan PpIX; hemoglobin, sitokrom c ve diğer biyolojik moleküllerden doğal olarak oluşan bir porfirin bileşenidir. PpIX'nin bu durumu toksisite ve immün sistem tarafından kaçınmaya yardımcı olur [57]. PpIX'nin FDT'de diğer FD ajanlarına göre daha duyarlı olma sebebi kanser hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarda birikmesidir [58]. Kanser hücrelerinde PpIX birikimi, hücrelerde 5-ALA'dan PpIX üretimi ile hücrelerin dışında PpIX atılımı arasındaki denge ile ilgilidir. Biriken PpIX ROS oluşturarak tümör hücresinin ölümüne sebep olur [59]. Temel araştırma düzeyinde, akciğer kanseri [60], beyin tümörü [61], karaciğer kanseri [62], mide kanseri [63], melanom [64], yumurtalık kanseri [65], rahim ağzı kanseri [66] gibi çok çeşitli dokulardan türetilen farklı insan kanser hücre dizilerinde PpIX birikimi hakkında birçok rapor yayınlanmıştır.

PpIX agregasyon ve sulu ortamlarda zayıf çözünürlük nedeniyle doğrudan hedef bölgeye uygulandığında sınırlı bir etkinliğe sahiptir [67]. Son gelişmeler, PpIX'nin suda çözünürlüğü iyileştirmek ve böylece terapötik etkinliği artırmak için taşıyıcıların ve kimyasal modifikasyonların kullanılmasına odaklanmıştır. Örneğin, Homayani ve arkadaşları hidroksil grubu modifikasyonunun PpIX'in suda çözünürlüğünü artırabileceğini, karanlık toksisiteyi azaltabileceğini ve hücre alımı artırabileceğini göstermiştir [68]. Fakat tüm bu avantajlarının yanı sıra PpIX moleküllerinin tümör bölgesi dışında farklı dokularda birikmeleri ve fizyolojik koşullarda stabil olmamaları gibi çeşitli dezavantajlara sahiptir. Bu dezavantajları aşabilmek amacıyla PpIX moleküllerinin yüklü olduğu nanotaşıyıcı sistemler FDT'de kullanılmaktadır [69]. García ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, FDT kullanılarak, PpIX ile etiketlenmiş IgM antikoru (Ab-PpIX), 630 nm bir ışınlama sistemi aracılığıyla, akciğer kanseri hücrelerinde IgM antikorunun özgüllüğünü belirlemek için A-549 akciğer kanseri hücre hattı ve MRC-5 akciğer fibroblast hücre hatlarında farklı konsantrasyonlarda denenmiştir. Çalışmanın sonucunda, Ab-PpIX, akciğer kanseri hücreleri A-549'da terapötik potansiyel gösterirken (%70 canlılığı azaltmış) ve

kanserli olmayan akciğer hücrelerinde (MCR-5) hiçbir aktiviteye sahip olmadığını gösterilmiştir [70].

Nanotaşıyıcı sistemlere fiziksel olarak yüklenmiş PpIX moleküllerinin kararsızlığı, *in vivo* dolaşım sırasında istenmeyen bölgelerde ilaç salınımına sebep olduğundan dolayı daha düşük tümör hedefleme seçiciliğine ve sağlıklı dokularda yan etkilere neden olabilir [71]. Bu dezavantajın üstesinden gelmek için fotodinamik terapide kullanılacak PpIX'nin konjuge ve/veya nanokapsüle edilmesi önemlidir. Bu tez kapsamında FDT kombine terapisinde kullanılmak üzere geliştirilecek nanotaşıyıcı sistemde bir FD molekülü olan protoporfirin IX (PpIX) yapıya bağlanarak tümör bölgesinde etkin hücresel alımının sağlanması amaçlanmaktadır. Ding ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada PpIX misellerinin yapı-özellik ilişkilerinin mekanik olarak anlaşılması için PpIX'nin PEG-PLA misel nano taşıyıcılarına kovalent olmayan kapsülleme ve kovalent konjugasyon ile bağlanmıştır. PpIX-konjuge misellerin kovalent olmayan kapsüllemeye göre kanser hücrelerinde daha parlak floresan ve daha yüksek FDT etkinliği ile sonuçlanmıştır (Şekil 2.14) [72].

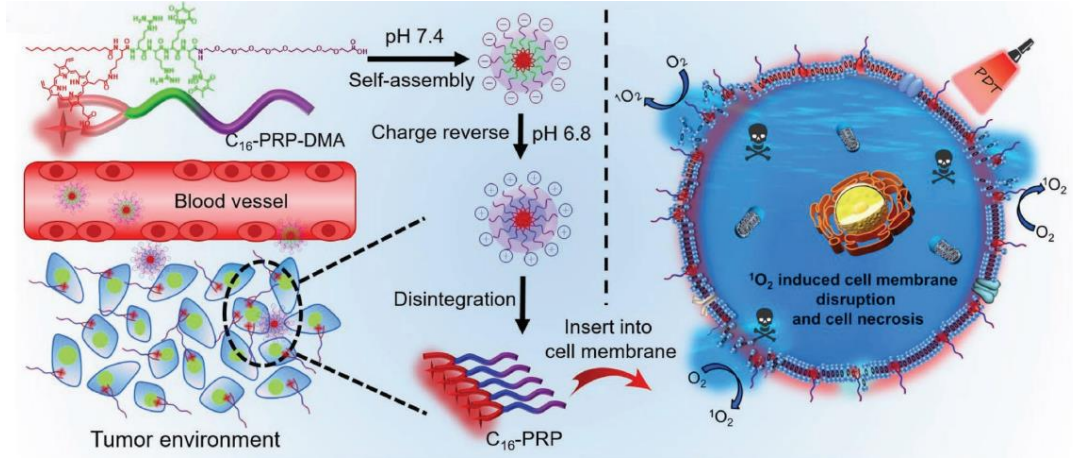


Şekil 2.14 : Kovalent olmayan kapsülleme ve kovalent konjugasyon yöntemlerinden iki farklı tipte PpIX/PEG-PLA misellerinin hazırlanması ve 24 saatlik inkübasyondan sonra misellerin hücre canlılık oranları [72].

2.6. Kombinasyonel Terapi

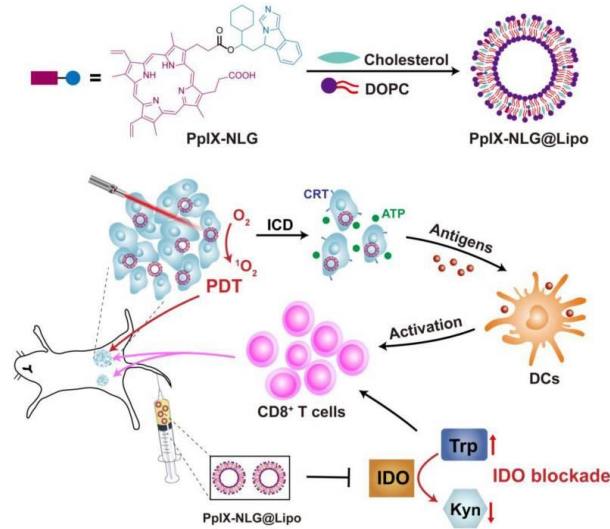
Kanser tedavisinde kullanılan PTX üçüncü kuşak kemoterapi ilacı olup, akciğer kanserleri için antineoplastik bir ajan olarak dikkate değer bir etki göstermiştir [73]. Batı *Taxus brevifolia*'nın kabuğundan ekstrakte edilen doğal bir bitki ürünü ve taksan türevi olan PTX, mikrotübülün dinamiklerini seçici olarak bozarak hücre ölümüne yol açmaktadır [74], [75]. Paklitaksel ayrıca kanser hücrelerinden izole edilmiş mitokondrilerin yanı sıra sağlam hücrelerdeki mitokondriler üzerinde doğrudan etki ederek kanser hücrelerinin apoptozuna neden olabilmektedir. PTX'in suda çözünürlüğün düşük olması ve yüksek sistemik toksisiteye sebep olmasından dolayı antikanser ilaçlarının biyoyararlanımı artırmak ve yan etkilerini en aza indirmek için lipozomlar [76], dendrimerler [77], polimerik miseller [78] ve nanoküreler [79] dahil olmak üzere birkaç yeni PTX formülasyonu, temel araştırmalarda çeşitli kanserlerin tedavisinde belirgin bir gelişme göstermiştir ve bu birçoğunun gelecekte kliniğe taşınabileceğini düşündürmektedir.

Aynı tedavi süreci sırasında kullanılan bir foto duyarlılaştırıcı ve bir kemoterapötik ilaç ile kombinasyon tedavisinin, tek yönlü yaklaşıma kıyasla çok daha büyük bir potansiyel gösterdiği gösterilmiştir. Foto duyarlılaştırıcı maddelerin özellikle porfirin yapılarının, diğer tedavilerle kombinasyon halinde sağlam ve standart bir tedavi yöntemi haline gelmesi çeşitli hastalıklar için umut verici konumdadır [80]. Örneğin Liu ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, mitokondri ve plazma zarı hedeflenerek, kombinasyon fotodinamik tümör tedavisi için tek ajanlı, kendiliğinden oluşabilen, kimerik peptit bazlı (C₁₆-PRP-DMA) nanoparçacık (M-ChiP olarak) geliştirilmiştir. Kombinasyon tedavide, ROS oluşturmak üzere foto duyarlılaştırıcı PpIX FDT'de kullanılmıştı. *In vitro* ve *in vivo* araştırmalar, mitokondri ve plazma zarındaki bu kombinasyonel FDT'nin azaltılmış yan etkilerle terapötik etki maksimizasyonuna ulaşabileceğini göstermiştir. Bu çalışma sinerjik tümör tedavisi için umut verici bir nanoplatform olarak karşımıza çıkmaktadır (Şekil 2.15) [81].



Şekil 2.15 : C16-PRP-DMA'nın nanopartiküller halinde kendiliğinden birleşmesi ve tümör ortamına yerleştikten sonra hücreyi nekroza uğratması [81].

Yapılan başka bir çalışmada, FDT ve IDO (indoleamin 2,3-dioksijenaz) blokajının ikili işlevini kullanabilmek için, ilaç konjugatı PpIX-NLG, IDO inhibitörü NLG919'u ester bağı yoluyla ışığa duyarlılaştırıcı PpIX'e bağlanarak sentezlenmiştir. Biyouyumluluğu artırmak ve tümör birikimini geliştirmek için lipozom sistemi kullanılarak, PpIX-NLG (PpIX-NLG@Lipo olarak adlandırılır) ilaç taşıyıcısı olarak seçilmiştir. Nano ölçekli PpIX-NLG@Lipo'nun intravenöz enjeksiyondan sonra tümör bölgesinde birikerek ROS üretiminden kaynaklı tümör bölgelerinin indüklenmesi ve daha fazla CD8⁺ T hücresi proliferasyonunu sayesinde hem birincil tümörlerin hem de uzak tümörlerin inhibisyonu ile immünojenik hücre ölümüne (ICD) sebep olmuştur (Şekil 2.16) [82].



Şekil 2.16: Kombine FDT ve IDO blokajı için PpIX-NLG@Lipo'nun şematik gösterimi [82].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kimyasallar ve Kullanılan Cihazlar

3.1.1. Kimyasallar

1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid hidroklorür (EDC, $\geq 98,0$), protoporfirin IX (PpIX, ≥ 0.95), 1-hidroksibenzotriazol hidrat (HOBT, $\geq 97,0$), 4',4'-azobis (4-siyanopentanoik asit) (ACVA, $\geq 98,0$), 4-(dimetilamino)piridin (DMAP, $\geq 99\%$), sodyum hidroksit (ACS Reagent, ≥ 97 pellet), borontriflorür dietil eterat (sentez için), D-glukoz ($\geq 99,5$), D-(-)-fruktoz ($\geq 99,0$), asetik anhidrit (Reagentplus® $\geq 99,0$), 2,2'-azobis(2-metilpropiyonitril) (AIBN, $\geq 98,0$), 3-azido-1-propanamin (azidoetilamin, ≥ 0.95), bakır bromür (CuBr_2 , ≥ 98), bütül akrilat (BA, ≥ 99), dietil eter ($\geq 99,5$), petrol eteri (ACS Reagent $\geq 90,0$), sodyum azit (NaN_3 , $\geq 99,5\%$), 2-bromoetanol ($\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, ≥ 95), Potasyum ferrisiyanür(III) ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$), elemental kükürt (S), benzil klorür ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{Cl}$, ≥ 99), metakriloil klorür (≥ 97), p-toluensülfonil klorür ($\geq 99,0$), PMDETA (PMDTA, ≥ 99) tetra-n-butilamonyum florür (TBAF), sodyum metoksit (CH_3ONa), trietilamin (Et_3N , $\geq 99,0$), N,N-dimetil formamid (DMF, $\geq 99,8$), diklorometan (DKM, HPLC için $\geq 99,8$), tetrahidrofuran (THF, $\geq 99,9$), kloroform ($\geq 99,4$) kimyasallarının tamamı Sigma Aldrich'den alınarak kullanıldı. Metanol (MeOH , $\geq 99,5$), asetonitril (likit kromatografi için $\geq 99,9$), piridin (EMSURE ACS Reagent $\geq 99,5$), toluen (EMSURE, analiz için), hidroklorik asit (HCl , EMPLURA $\geq 32,0$) çözücülerinin tamamı Merck'ten temin edilerek kullanıldı. Etil asetat (EtOAc , $\geq 99,7\%$ LC-MS için), n-hekzan ($\geq 96,0$) çözücüleri ve sodyum bikarbonat (NaHCO_3 , $\geq 99,0$), sodyum sülfat (Na_2SO_4), sodyum klorür (NaCl) kimyasalları Isolab'dan alındı. 3-(trimetilsilil) 1-propanol (≥ 97) PlusChem'den temin edildi. Sodyum asetat (ACS Reagent $\geq 99,0$) Alfa Aesar'dan temin edildi. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazoliyum bromid (MTT), fosfat bovine serum tampon çözeltisi (PBS, tablet 100 mL için) Invitrogen'den temin edildi. 4 Å moleküler sieve Merck, 3,5 kDa Diyaliz membranı Repligen'den alındı. Paklitaksel (PTX) KOÇAK farma A.Ş. tarafından temin edildi. Geri kalan tüm

kimyasallar Sigma Aldrich'ten alınarak herhangi bir ileri saflaştırma yapılmaksızın kullanıldı.

3.1.2. Kullanılan cihazlar

Reaksiyonlar sırasında HEIDOLPH Labortechnique ısıtıcılı manyetik karıştırıcı kullanılmış ve reaksiyon sonunda elde edilen maddelerin çözücüleri HEIDOLPH Labaroto döner buharlaştırıcı kullanılarak uçurulmuştur. Saflaştırma aşamalarından sonra elde edilen maddeleri kurutulmak için VACUCELL vakum inkübatörü kullanılmıştır. ^1H NMR ve ^{13}C NMR ölçümleri, 500 MHz'lik Bruker NMR cihazında CDCl_3 , CD_3OD ve $\text{DMSO}-d_6$ çözücüleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Fourier dönüşümlü infrared (FTIR) spektrumları ALPHA Bruker spektrometresinde kaydedilmiştir. Jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) ölçümleri, bir pompa ve Viscotek VE 3580 refraktif indeks (RI) dedektöründen oluşan Viscotek GPCmax VE 2001 Autosampler sistemi kullanılarak elde edilmiştir. Seri olarak bağlanmış üç Viscotek GPC kolonu (T3000, LT4000L ve LT5000L) (iç çap 7,8 mm, 300 mm uzunluk) ve bir Viscotek guard kolonu (CLM3008, iç çap 4,6 mm, 10 mm uzunluk) kullanılmıştır. Çözücü olarak THF kullanılmıştır ve ölçümler 35 °C'de 1,0 mL/dakika akış hızında yapılmıştır. Dedektör, dar molekül ağırlığı dağılımına sahip PS standartlarıyla kalibre edilmiş ve veriler Viscotek OmniSEC 4.7.0 yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. 633 nm dalga boyunda ve 25°C'de bir Malvern NanoZSP dinamik ışık saçılım (DLS) spektrometresi cihazı kullanılarak dH_2O içerisinde 173°'lik ölçüm açısı ile misellerin ortalama partikül boyutu ve partikül boyutu dağılımları belirlenmiştir. İlaç yükleme verimliliği, enkapsülasyon etkinliği ve ilaç salım sonuçları Thermo serisinde HPLC analizi yapılarak belirlenmiştir. Kromatografik ayrımlar 25 °C'de ters fazlı bir C18 kolonu (ZORBAX Eclipse XDB-C18, 4.6 × 150 mm, 5 µm), UV1000 UV/VIS dedektörü kullanılarak elde edildi.

3.2. Kemo-Fototerapötik Nanotaşıyıcı Sistemlerin Sentezi

PTX yüklü ilaç içeren ve PTX yüklü ilaç içermeyen taşıyıcı sistemlerin sentezlenmesi için öncelikle miselleri oluşturulacak polimerlerin RAFT polimerizasyonunda kullanılması için RAFT ajanı sentezlenmiştir. Polimerlerin tekrarlanan ünitelerini oluşturacak şeker monomerleri sentezlendikten sonra diblok kopolimerlerin sentezi gerçekleştirilmiştir. Diblok polimerler hidroliz edilmiş, ardından paklitaksel (PTX) yüklenerek ilaç yüklü glikopolimerik misellerin sentezi gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. RAFT ajanı sentezi

RAFT ajanı 4-siyanopentanoik asit ditiobenzoat (CPADB) iki basamakta sentezlenmiştir.

3.2.1.1. Di(tiobenzoil) disülfid sentezi

Sodyum metoksit (metanol içinde %30'luk çözelti, 40.0 g, 0.22 mol), susuz metanol (40.0 g, 1.25 mol) ve elementel kükürt (6.4 g, 0.20 mol) üç boyunlu yuvarlak tabanlı bir balona ilave edildi [83]. Benzil klorür (12.6 g, 0.10 mol) azot atmosferi altında 250 mL'lik bir ekleme hunisinden damla damla 1 saat içinde balona eklendi. Sistem 10 saat yağ banyosunda 67°C'de refluks edildi. Reaksiyon daha sonra bir buz banyosunda 7 °C'ye soğutuldu, çöken tuz süzüldü ve çözücü vakum altında uçuruldu. Elde edilen ham sodyum ditiyobenzoat katısı deiyonize su (500 mL) ve dietil eter (200 mL) ile ekstraksiyon sırasında yavaş yavaş hidroklorik asit (%32 w/w) eklenerek üç kez ekstrakte edildi. Eter fazında bulunan ditiobenzoik asit yavaş yavaş sodyum hidroksit (1.0 M) eklenmesiyle su fazına alındı. Baz ilavesinin iki kez daha tekrarlanmasından sonra, sulu üst sodyum tabakası ditiobenzoat çözeltisi tutuldu ve manyetik karıştırıcı çubuklu 1 L'lik bir konik şişeye aktarıldı. Potasyum ferrisiyanür (III) (17.01 g, 0.05 mol) deiyonize su (500 mL) içinde çözündürüldü ve pembe-kırmızı katılar üretmek üzere kuvvetli karıştırma altında 1 saatlik bir süre boyunca bir ilave hunisi yoluyla sodyum ditiyobenzoat çözeltisine damla damla ilave edildi. Çökelti süzüldü ve deiyonize su ile yıkandı ve katı gece boyunca oda sıcaklığında vakumla kurutuldu. Elde edilen ürün ¹H NMR spektroskopisiyle karakterize edildi. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.18 – 7.29 (m).

3.2.1.2. 4-Siyanopentanoik asit ditiobenzoat (CPADB) RAFT ajanı sentezi

Literatürde bulunan metoda göre [83], di(tiobenzoil) disülfid (9.73 g, 2.9 x10⁻² mol), 4',4'-azobis (4-siyanopentanoik asit) (13.4 g, 4.4 x10⁻² mol) ve etil asetat solventi (80 mL), iki boyunlu, yuvarlak tabanlı 100 mL'lik cam balona ilave edildi. 80 °C'de azot gazı atmosferinde reaksiyon kuruldu. 18 saat sonra reaksiyon sonlandırılarak ortamda bulunan solvent döner buharlaştırıcı vasıtasıyla uçuruldu. Ürün 1:4 etil asetat:heksan çözücü sistemi kullanılarak kolon kromatografisiyle saflaştırıldı. Kırmızı renkli fraksiyonlar birleştirildi ve 1:3 etil asetat:heksan karışımı kullanılarak kristallendirildi. Kristallenen ürün vakum etüvünde kurutuldu. Elde edilen ürün ¹H NMR ve ¹³C NMR spektroskopisiyle karakterize edildi. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.90 (s, 2H), 7.58

(s, 1H), 7.42 (s, 2H), 2.75 (s, 2H), 2.60 (s, 1H), 2.47 (s, 1H), 1.95 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 222.30, 176.46, 144.65, 133.24, 128.75, 126.84, 118.53, 45.75, 33.20, 29.52, 24.35.

3.3. Monomerlerin ve Organik Bileşiklerin Sentezi

Polimerin modifikasyonunda kullanılmak üzere azid fonksiyonel grubu içeren glukoz ve fruktoz şeker bileşikleri ve (3-(3-((2-azidoetil)amino)-3-oksopropil)-2,8,12,17-tetrametil-13,18-divinilporfirin-7-il)propanoik asit (PpIX-N₃) sentezlendi. Ayrıca, polimer bloğunu oluşturacak 3-(trimetilsilil)prop-2-in-1-il metakrilat (TMSpMA) monomeri sentezlendi.

3.3.1. 1,2,3,4,6-Penta-O-asetil-β-D-glukopiranoz (β-GluAc) sentezi

1,2,3,4,6-Penta-O-asetil-β-D-glukopiranoz daha önce literatürde bulunan benzer bir prosedüre göre sentezlendi [40]. Sodyum asetat (6.1 g, 0.074 mol) ve asetik anhidrit (65 mL, 0.690 mol) yarım saat boyunca azot gazı altında karıştırıldı. Refluks sıcaklığına çıkarıldı ve 5 dakika aralıklarla β-D-Glukopiranoz (Glu) (11.9 g, 0.066 mol) yavaş yavaş eklendi. 45 dakika sonunda tüm glukoz eklendikten sonra reaksiyon karışımı 500 mL buzlu su içerisine çöktürüldü. 15 dakika karıştırıldıktan sonra beyaz katı çökelek krozedden süzüldü, vakum etüvünde kurutuldu. Elde edilen ürün ¹H NMR spektroskopisiyle karakterize edildi. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.70 (s, 1H), 5.24 (s, 1H), 5.12 (s, 2H), 4.26 (s, 1H), 4.12 (s, 1H), 3.85 (s, 1H), 2.24 – 1.86 (m, 16H).

3.3.2. 2- Bromoetil 2,3,4,5-tetra-O-asetil-β-D-glukopiranozid (AcGluEtBr)

2- Bromoetil 2,3,4,5-tetra-O-asetil-β-D-glukopiranozid (AcGluEtBr) literatüre göre sentezlendi [40]. β-GluAc (10.0 g, 25.40 mmol) ve 2-bromoetanol (4 mL, 30.74 mmol) 3 boyunlu balon içerisine alınarak üstüne 160 mL susuz DKM ilave edildi. 18 mL borontriflorür dietil eterat ile oda sıcaklığında argon atmosferi altında damlatma balonu ile yaklaşık 30 dakikada ortama eklendi. Karışım 20 dk argon atmosferi ile purge edildi ve reaksiyon oda sıcaklığında 1 saat karıştırıldı. Reaksiyon süresi sonunda ortam süzüldü. 250 mL buzlu su ortama ilave edilip doygun NaHCO₃ ile 2 kez ekstraksiyon işlemi yapıldı. Na₂SO₄ ile kurutulan ürün solvent döner buharlaştırıcıda uçurularak konsantre edildi. Daha sonra ürün 1:4 etil asetat:heksan kolon kromatografisiyle saflaştırıldı. Elde edilen ürün ¹H NMR spektroskopisiyle karakterize edildi. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.21 (s, 1H), 5.07 (s, 1H), 5.00 (s, 1H), 4.57 (s, 1H), 4.24 (s, 1H), 4.15 (s, 2H), 3.75 (d, *J* = 66.4 Hz, 2H), 3.44 (s, 2H), 2.06 (s, 13H).

3.3.3. 2-Azidoetil 2,3,4,6-tetra-O-asetil-β-D-glukopiranozid (AcGlucN₃) sentezi

Prosedüre göre [40], AcGlucEtBr (5.50g, 12.0 mmol), NaN₃ (1.11 g, 17.0 mmol) 100 mL aseton ve 33 mL su içinde refluks altında gece boyunca karıştırıldı. Reaksiyon ortamını TLC analizi ile kontrol edilerek bromürün azide tamamen dönüştüğü görüldüğünde aseton buharlaştırıldı ve sulu reaksiyon karışımı iki kez DKM ile ekstrakte edildi. Organik fazlar birleştirildi ve sodyum sülfat üzerinde kurutuldu. Solvent süzildükten sonra, vakumla buharlaştırıldı. Beyaz katı şeklinde elde edilen ürün ¹H NMR spektroskopisiyle karakterize edildi. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.19 (s, 1H), 5.07 (s, 1H), 4.99 (s, 1H), 4.58 (s, 1H), 4.22 (s, 1H), 4.15 (s, 1H), 3.99 (s, 1H), 3.67 (s, 2H), 3.45 (s, 1H), 3.26 (s, 1H), 2.06 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.98 (s, 3H).

3.3.4. 2-Azidoetil 2,3,4,6-tetra-O-asetil-β-D-glukopiranozid (AcGluc-N₃) hidroliz reaksiyonu

Genel bir prosedürde [40], AcGluc-N₃ (1.0 g, 2.4 x10⁻³ mol) üzerine 0 °C'de 10 mL kuru metanol ilave edilerek reaksiyon solüsyonu, 30 dakika boyunca nitrojen akışı altında çözündürüldü. Ardından kuru bir metanol (0.092 M) çözeltisi içinde taze hazırlanmış NaOCH₃ (metanol içinde ağırlıkça %25), uygun miktar (0.66 mL, asetil grubu başına 1,2 eşdeğer ve 2,9 x10⁻³ mol) bir şırınga yoluyla damlatılarak reaksiyon karışımına dahil edildi. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 3 saat karıştırıldı. Sonlandırılan reaksiyon ortamına eter koyularak ürün çöktürüldü. Elde edilen şeker 24 saat 40 °C'de vakumlu etüv fırınında kurutuldu. Hidroliz olmuş şeker ¹H NMR karakterize edildi. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 4.26 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 4.09 – 3.94 (m, 1H), 3.87 – 3.77 (m, 1H), 3.74 – 3.66 (m, 1H), 3.65 – 3.53 (m, 1H), 3.42 (t, J = 5.2 Hz, 2H), 3.34 – 3.27 (m, 0H), 3.30 (s, 6H), 3.26 – 3.19 (m, 2H), 3.15 (dd, J = 9.1, 7.8 Hz, 1H), 1.29 – 1.16 (m, 1H).

3.3.5. (2,3:4,5-Di-O-izopropiliden)-β-D-fruktopiranoz-TSC (iprFruc-2,3-TSC) sentezi

iprFruc-2,3 tosilleme sentezi daha önce literatürde varolan prosedür uyarlanarak gerçekleştirildi [84]. 3 boyunlu 250 mL'lik cam balonda 20 ml kuru DKM içinde karışan iprFruc-2,3 (1.0 g, 3.84x10⁻³ mol) üzerine 0 °C'de argon altında 10 ml kuru DKM ile çözünen p-toluensülfonil klorür (0.81 g, 4.22x10⁻³ mol) ve daha sonra piridin (6,19 ml, 0,077 mol) şırınga ile balona ilave edildi. Reaksiyon oda sıcaklığında 3 saat boyunca gerçekleşti. Daha sonra reaksiyonu durdurmak için soğuk su ilave edildi ve

yarım saat karıştırıldı. Solvent döner buharlaştırıcıda uçurularak konsantre edildi. 100 mL DKM ile çözülüp 50 mL dH₂O ile üç kez, doymuş NaCl çözeltisiyle de üç kez ekstrakte edildi. DKM fazı sodyum sülfat üzerinden kurutuldu, filtre kağıdıyla süzülüp döner buharlaştırıcıda uçuruldu. Ürün 1:4 etil asetat:heksan kolon kromatografisiyle saflaştırıldı. Elde edilen ürün ¹H NMR spektroskopisiyle karakterize edildi. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.79 (s, 2H), 7.35 (s, 2H), 4.55 (s, 1H), 4.31 (s, 1H), 4.20 (s, 1H), 4.03 (s, 2H), 3.84 (s, 1H), 3.71 (s, 1H), 2.45 (s, 3H), 1.54 (s, 3H), 1.50 (s, 3H), 1.36 (s, 6H), 1.31 (s, 3H).

3.3.6. (2,3:4,5-Di-O-izopropiliden)-β-D-fruktopiranoz-N₃ (*iprFruc-N₃*) sentezi

(2,3:4,5-Di-O-izopropiliden)-β-D-fruktopiranoz-N₃ için literatürde var olan prosedür takip edildi [85]. 10 mL DMF içinde *iprFruc-TSC* (1.78 g, 4.29x10⁻³ mol) 2 boyunlu 250 mL'lik cam balona koyuldu. Daha sonra sodyum azit (0.84 g, 1.28 x10⁻² mol) tartılarak 20 mL DMF içinde çözüldü ve 130 °C'ye ayarlanmış yağ banyosuna yerleştirilen balona azot gazı altında şırınga ile ilave edildi. Reaksiyon çözeltisi 130 °C 'de 48 saat karıştırıldıktan sonra reaksiyon sonlandırılıp oda sıcaklığına getirildi. Reaksiyon karışımında bulunan solvent döner buharlaştırıcıda uçuruldu. 100 mL DKM ile çözülüp 50 mL dH₂O ile üç kez ekstrakte edildi. Ürün 1:3 etil asetat:heksan kolon kromatografisiyle saflaştırıldı. Reaksiyon sonunda elde edilen ürün ¹H NMR ve FTIR ile karakterize edildi. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 4.60 (s, 1H), 4.29 (s, 1H), 4.24 (s, 1H), 3.91 (s, 1H), 3.79 (s, 1H), 3.58 (s, 1H), 3.28 (s, 1H), 1.56 (s, 4H), 1.47 (s, 6H), 1.34 (s, 3H).

3.3.7. (3-(3-((2-azidoetil)amino)-3-oksopropil)-2,8,12,17-tetrametil-13,18-divinilporfirin-7-il)propanoik asit (*PpIX-N₃*) sentezi

PpIX-N₃ literatür takip edilerek sentezlendi [86]. 3 boyunlu 250 mL'lik cam balona *PpIX* (0.2 g, 3.55 x10⁻⁴ mol), N, N-diizopropiletilamin (DIEA, 0.023 g, 1.77 x10⁻⁴ mol), 1-hidroksibenzotriazol hidrat (HOBt, 0.024 g, 1.77 x10⁻⁴ mol) ve N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid hidroklorür (EDC.HCl, 0.034 g, 1.77 x10⁻⁴ mol) eklenerek 27 mL DMF ile çözüldü ve oda sıcaklığında 2 saat karıştırıldı. Daha sonra azidoetilamin (0.020 g, 1.95 x10⁻⁴ mol) eklendi ve 48 saat karıştırıldı. Reaksiyon ortamında bulunan solvent uçurularak 100 mL DKM ile çözülüp 50 mL dH₂O ile dört kez ekstrakte edildi. Ürün 1:4 etil asetat:heksan kolon kromatografisiyle saflaştırıldı. Reaksiyon sonunda elde edilen ürün ¹H NMR ve FTIR ile karakterize edildi. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 10.62 (s, 1H), 10.31 (s, 4H), 8.52 (s, 2H), 8.04 (s, 2H), 7.71

(s, 3H), 6.56 – 6.41 (m, 3H), 6.25 (s, 2H), 4.25 (s, 12H), 3.77 (s, 7H), 3.67 – 3.52 (m, 7H), 2.04 (s, 7H).

3.3.8. 3-(Trimetilsilil)prop-2-in-1-il metakrilat (TMSpMA) sentezi

3-(Trimetilsilil) prop-2-in-1-il metakrilat sentezi daha önce literatürde var olan prosedür uyarlanarak gerçekleştirildi [39]. 3-(trimetilsilil) 1-propanol (10.0 g, 7.5×10^{-2} mol) ve Et₃N (13.7 mL, 9.8×10^{-2} mol) karışımı 3 boyunlu 250 mL'lik cam balona 0 °C'ye soğutulan ortamda 50 mL DKM ile içinde çözülüp ilave edildi. Daha sonra 50 mL DKM içinde metakriloil klorür çözeltisi (11.08 mL, 11.3×10^{-2} mol), 30 dakika boyunca damla damla ilave edildi. Karışım bu sıcaklıkta 30 dakika, ardından oda sıcaklığında 72 saat boyunca karıştırıldı. Reaksiyon durdurulduktan sonra süzülerek döner buharlaştırıcıda uçuruldu. Daha sonra 100 mL DKM ile çözülüp 50 mL dH₂O ile üç kez ekstrakte edildi. Ürün 1:100 dietil eter:petrol eteri kolon kromatografisiyle saflaştırıldı. Elde edilen ürün ¹H NMR ve ¹³C NMR spektroskopisiyle karakterize edildi. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 6.18 (s, 1H), 5.61 (s, 1H), 4.76 (s, 2H), 1.97 (s, 2H), 0.18 (s, 8H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 166.49, 135.63, 126.28, 99.00, 91.85, 52.87, 18.19.

3.4. Polimer Sentezi

3.4.1. Poli (Trimetilsilil-korumalı propargil metakrilat) P(TMSpMA) homoblok polimer sentezi

P(TMSpMA) prosedüre göre tersinir ekleme-parçalanma zincir-aktarım (RAFT) polimerizasyon yöntemiyle hazırlandı [39]. CPADB RAFT ajanı (0.024 g, 8.48×10^{-5} mol), 3-(trimetilsilil) prop-2-in-1-ilmetakrilat (TMSpMA) (1.00 g, 5.09×10^{-3} mol), AIBN (1.74 mg, 1.06×10^{-5} mol) septa-kapalı yuvarlak tabanlı bir şişeye ilave edildi ve 4 mL toluen içinde çözüldü. Polimerizasyon şişesi bir buz banyosuna yerleştirildi ve reaksiyon çözeltisi 50 dakika boyunca sürekli bir azot gazı akışı ile degaz edildi. Polimerizasyon ortamında monomer, RAFT ajanı ve AIBN ([monomer]₀/[RAFT]₀/[başlatıcı]₀) arasındaki oran 60:1.0:0.125 olacak şekilde reaksiyon gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı, 70 °C'de silikon yağı banyosuna konularak reaksiyon başlatıldı. Homopolimerizasyon reaksiyonu, hızlı soğutma ve oksijene maruz bırakma yoluyla 5 saat sonra söndürüldü. Polimerizasyon çözeltisi, toluenin kısmi buharlaştırılmasıyla konsantre edildi ve daha sonra polimer, reaksiyona girmemiş monomerleri (TMSpMA ve FMA) ve RAFT ajanını uzaklaştırmak amacıyla

iki kez soğuk metanol içinde çöktürüldü. Daha sonra saflaştırılmış pembe katı şeklinde polimer vakum altında kurutuldu. Saflaştırılmış polimer ^1H NMR ve THF jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) ölçümleri ile karakterize edildi. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.03 (s, 2H), 7.86 (s, 2H), 4.60 (s, 62H).

3.4.2. P(TMSPMA-blok-n-bütil akrilat) (P(TMSPMA-b-BA)) diblok sentezi

Literatüre göre [39] makro RAFT ajanı olarak P(TMSPMA) kullanılarak n-BA ile zincir uzatıldı. P(TMSPMA) (0.30 g, 6×10^{-5} mol mol) ve n-BA (0.78 mL, 5.4×10^{-3} mol), bir septa kapaklı vial içinde 4.5 mL toluen ile birleştirildi. AIBN (9×10^{-6} mol), toluen stok çözeltisinden (3 mL içinde 0.05 g) alınarak eklendi. Reaksiyon karışımının gazı azot gazı ile degaze edildikten sonra 70 °C'de 8,5 saat karıştırıldı. İki bloklu kopolimer, soğuk metanol içinde iki kez çökeltilerek saflaştırıldı. Elde edilen polimer vakumlu etüv fırınında 40 °C'de 24 saat kurutuldu, ^1H NMR ve THF GPC ile karakterize edildi. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 4.60 (s, 62H), 4.03 (s, 177H).

3.4.3. Poli(propargil metakrilat-blok-n-bütil akrilat) (P(pMA-b-BA)) sentezi

Polimer hidrolizi literatür takip edilerek yapıldı [39]. Trimetilsilil korumalı blok kopolimer (260 mg), THF (20 mL) içerisinde çözüldü. Renksiz reaksiyon çözeltisi nitrojenle 10 dakika süre ile degaz edildi ve 0 °C'ye soğutuldu. 1 M TBAF çözeltisi (alkin-trimetilsilil gruplarına göre 30 eşdeğer mol/mol), şırınga yoluyla damla damla ilave edildi. Nihai bulanık karışım, bu sıcaklıkta 30 dakika karıştırıldı ve daha sonra oda sıcaklığına getirildi. Koruma kaldırma 4 saatten daha kısa bir sürede tamamlandı. Nihai çözelti daha sonra döner buharlaştırıcıda uçurularak konsantre edildi ve polimer soğuk metanol içinde çöktürüldü. Elde edilen polimer 24 saat 40 °C'de vakumlu etüv fırınında kurutuldu. Hidroliz olmuş polimer ^1H NMR ve THF GPC ölçümleri ile karakterize edildi. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 4.62 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 4.04 (qt, $J = 14.4, 5.3$ Hz, 5H), 2.51 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 2.37 – 2.23 (m, 2H), 1.96 – 1.85 (m, 2H), 1.61 (dt, $J = 15.3, 8.1$ Hz, 7H), 1.37 (h, $J = 7.8$ Hz, 5H), 1.26 (s, 1H), 1.12 – 1.08 (m, 1H), 0.94 (t, $J = 7.3$ Hz, 8H).

3.4.4. Click reaksiyonu ile glikopolimerlerin hazırlanması

Literatüre göre click reaksiyonu gerçekleştirildi [39]. P(pMA-b-BA) (0.051 g, 3.57×10^{-6}), PpIX-N3 (0.018 g, 2.85×10^{-5} mol), fruktoz azit (0.020g, 7.8×10^{-5} mol), PMDETA (0.008 mL, 3.6×10^{-5} mol), CuBr (0.06 g, 3.6×10^{-5} mol) ve 10 mL'lik bir Schlenk tüpüne DMF (1,3 mL) ilave edildi. Reaksiyon karışımının gazı, üç donma-

vakum-çözme (FPT) döngüsü ile alındı, nitrojen altında bırakıldı ve 2 gün boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Reaksiyon durduruldu ve soğuk metanol içinde iki kez çöktürüldü. Daha sonra çözelti, bakır kompleksini uzaklaştırmak için nötr alümina ile doldurulmuş bir kolondan süzüldü. Reaksiyon sonrası PpIX miktarının belirlenmesi için UV spektroskopisi kullanıldı. Polimer ¹H NMR ile karakterize edildi. ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8.20 (s, 1H), 8.15 (s, 1H).

3.5. Polimerik Misellerin Sentezi

3.5.1. Glikopolimerik misellerin hazırlanması ve karakterizasyonu

PTX içeren (GM-PTX) ve PTX içermeyen (GM) iki adet glikopolimer bazlı miseller hazırlanmıştır. PTX içermeyen miselin hazırlanması için glikoblok kopolimer (2.3 mg) DMSO (0.2 mL), PTX içeren misel için de glikoblok kopolimer (5.1 mg), PTX (1 mg) ve DMSO (0.5 mL) oda sıcaklığında 30 dakika karıştırıldı ve daha sonra UP su, bir şırınga pompası aracılığıyla ilaç içermeyen karışıma 1.8 mL, ilaç içeren karışıma 4.5 mL olacak şekilde 24 saat reaksiyona girmek üzere ilave edildi. Reaksiyon ortamları oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda karıştırıldı. Glikoblok kopolimer konjugatları daha sonra UP suya (MWCO 3.5 kDa) karşı diyaliz edildi. Daha sonra suda kendiliğinde oluşan miseller dinamik ışık saçılımı spektroskopisi (DLS) ve geçirimli elektron mikroskopisi (TEM) ile karakterize edildi.

3.5.2. İlaç yükleme (DL) ve enkapsülasyon veriminin (EE) belirlenmesi

Yüklenen PTX miktarı UV spektroskopi cihazı ile 405 nm’de ölçülen absorbans değeri kullanılarak hesaplandı. Bunun için 1 mg PpIX alınıp 5 mL DMF ile seyreltildi. Daha sonra buradan 100 µL alınıp 2900 µL DMF ile tamamlandı ve 18 farklı konsantrasyon olacak şekilde 500 µL DMF ile seyreltme yapıldı. Elde edilen PpIX çözeltilerinin 405 nm’deki değerleri ölçülerek bir kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. İlaçlı ve ilaçsız misellerin içerdiği PpIX miktarı belirlenmek için her bir örnekten 500 µL alınıp 2500 µL DMF ile tamamlanıp ölçümü alındı. Daha sonra 405 nm’de ölçülen absorbans değerleri kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklemde yerine konularak mg/mL değerleri hesaplandı.

Literatür takip edilerek HPLC analizi gerçekleştirildi [87]. Mobil faz olarak deiyonize su ve asetonitril kullanıldı. Analiz metodu asetonitril/su lineer gradyentleriyle (1:9–4:6 v/v 0–10 dk, 4:6–6:4 v/v 10–15 dk, 6:4–4:6 v/v 15–22 dk, 4:6–1:9 v/v 22–24 dk) 1.0

mL/dk akış hızında oluşturuldu. Misellerdeki PTX miktarı HPLC cihazı ile 227 nm’de ölçülen değer kullanılarak aşağıda verilen denklemler yoluyla hesaplandı. Öncelikle hesaplamanın yapılabilmesi için 1 mg PTX 10 mL UP su içerisinde çözüldü ve 10 farklı konsantrasyon olacak şekilde 0,75 mL UP su ile seyreltme yapıldı. Elde edilen PTX çözeltilerinin 227 nm’deki değerleri ölçülerek bir kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. GM-PTX misel çözeltisinden 60 µL alınarak 1 mL UP su ile tamamlandı ve daha sonra 227 nm’de oluşturulan kalibrasyon eğrisi kullanılarak içerdiği PTX miktarı µg/mL olarak hesaplandı. Bu değer ilgili denklemlerde kullanılarak ilaç yükleme (DL) ve enkapsülasyon etkinliği (EE) hesaplandı [88].

$$\%DL = \frac{\text{misel içerisindeki ilaç}}{\text{misel miktarı}}$$

$$\%EE = \frac{\text{misel içerisindeki ilaç}}{\text{yüklenen toplam ilaç}}$$

Denklem 3.1 : İlaç yükleme (DL) ve enkapsülasyon etkinliği (EE) denklemleri.

3.6. İlaç Salım Deneyi

PTX yüklü misellerin ilaç salım profillerini incelemek için, 1’er mL örnek 3.5 kDa’lık diyaliz membranı içerisine konuldu. pH 5,5 ve pH 7,4’te 15 mL’lik fosfat bovine serum tampon çözeltilerine (PBS) alınarak 37 °C’lik inkübatörde karıştırıldı [89]. Deney başlatıldıktan sonra 0,5, 1,5, 3, 6, 9, 24, 32, 48, 54, 72, 78 saat sonra tampon çözelti içerisinde 0,5’er mL örnek çekilerek, 0,5’er mL PBS çözeltisi konuldu. Salım deneyinden alınan örnekler HPLC kullanılarak analiz edildi.

3.7. Kritik Misel Konsantrasyonunun (KMK) Belirlenmesi

Kritik misel konsantrasyonun belirlenmesi için azalan farklı konsantrasyonlardaki hazırlanan ilaç yüklü misellerin DLS ile ölçümleri kullanıldı. GM-PTX 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4 ve 0.3 mg/mL olacak şekilde seyreltilerek DLS ölçümü alındıktan sonra konsantrasyona karşı intensite grafiği çizilerek kritik misel konsantrasyonu belirlendi.

3.8. Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü çalışmaları için A-549 akciğer kanser hücre hattı ve CCD-1079Sk sağlıklı deri fibroblast hücre hattı kullanıldı.

3.8.1. Hücrelerin büyütülmesi

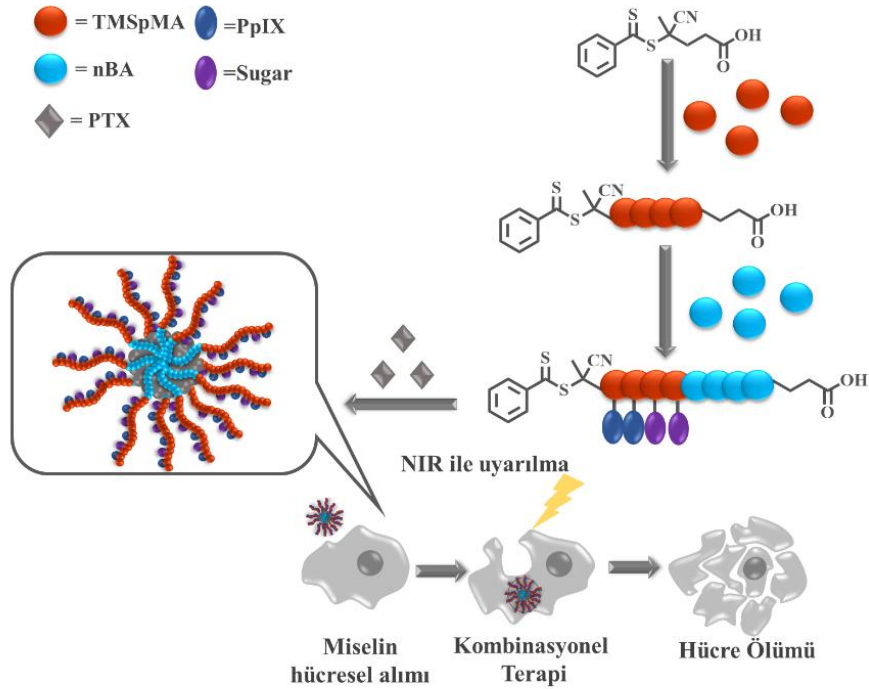
Her kuyuda 5×10^3 hücre olacak şekilde 200 μ L %20 FBS (Fetal bovine serum) içeren D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) besiyerinde 96 kuyulu plate içerisine ekim yapılarak %20 CO₂ içeren 37 °C'lik inkübatörde hücrelerin kuyulara tutunmaları için 24 saat bekletildi. 24 saatin sonunda hücrelerin üstündeki besiyeri boşaltılarak kuyular PBS ile yıkandı. Ardından kuyulara yeni besiyeri eklenerek hücrelere uygulanacak işlem gerçekleştirildi.

3.8.2. Sitotoksikite testi

GM-PTX, GM, serbest PTX ve serbest PpIX olmak üzere 4 örnek hücrelere uygulandı. Aydınlik ve karanlık deneylerinin yapılabilmesi için PpIX içeren örnekler için ayrı plakalar hazırlandı. Her kuyuda 5×10^3 hücre olacak şekilde 200 μ L D-MEM besi yerinde 96 kuyulu plaka içerisine ekim yapılarak %5 CO₂ içeren 37 °C'lik inkübatörde 24 saat bekletildi. Örnekler 0,613 mg/mL misellerin formülasyonlarının içerdiği PTX ve PpIX konsantrasyonlarına eşit serbest PTX ve PpIX kullanılarak hazırlandı. Ardından kuyulardaki besiyeri boşaltılarak 3 tekrarlı olacak şekilde CCD-1079Sk (CRL-2097™) ve A-549 (CRM-CCL-185™) hücrelerine 100 μ L besiyeriyle birlikte 100 μ L örnek 9 farklı konsantrasyonda hazırlanan örnekler eklendi. Kontrol olarak 100 μ L dH₂O kullanıldı. Hücreler 21 saat boyunca %10 CO₂ içeren 37 °C'lik inkübatörde bekletildi. Aydınlik deneyi için 4 saat sonra hazırlanan plateler alınarak 34 dk boyunca 700 nm NIR ışığa maruz bırakıldı. Tekrardan %10 CO₂ içeren 37 °C'lik inkübatörde toplam 21 saat bekletildi. 21 saatin sonunda hücrelerin üzerine 30 μ L MTT karanlık ortamda eklenerek 3 saat daha 37 °C'de inkübe edildi. Toplam 24. saatin sonunda hücrelerin üzeri boşaltılıp 100 μ L dimetilsulfoksit (DMSO) eklendi. Ardından hücre canlılığını belirlemek için mikropilaka okuyucu (ELISA Reader) cihazında ölçüm alındı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, kemo ve fotodinamik tedavinin (FDT) bir arada uygulanması için glikopolimer bazlı yeni bir taşıyıcı sistemin sentezi tasarlanmıştır. Taşıyıcı sistemin kombine tedavi potansiyellerinin araştırılmasında RAFT polimerizasyon yöntemi ile hazırlanan diblok kopolimer zincirleri foto-duyarlaştırıcı ajan protoporfirin IX (PpIX) ve şeker bileşenleri ile azit-alkin klinka katılma click reaksiyonu ile katılarak glikopolimerlerin sentezi gerçekleştirilmiştir. Nanoçöktürme yöntemi ile hidrofobik kemoterapi ilacı paklitaksel (PTX) sentezlenen glikopolimerlere enkapsüle edilerek misel formülasyonları elde edilmiş ve misellerin kemo ve fotodinamik tedavi etkinlikleri akciğer kanseri hücre hattı ve sağlıklı epitel hücre hattı üzerinde aydınlık-karanlık sitotoksik etkileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir (Şekil 4.1).



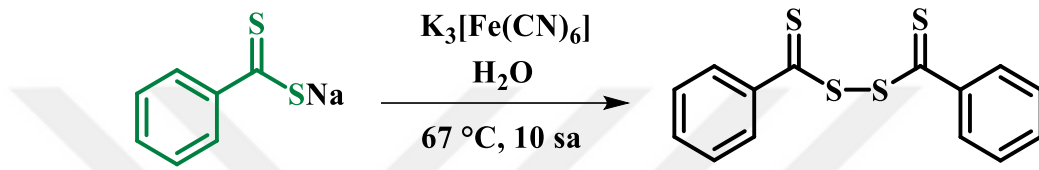
Şekil 4.1 : Glikopolimer bazlı yeni taşıyıcı sistemin sentezi ve kanser hücrelerine etkisi.

4.1. RAFT Ajanı Sentezi

RAFT ajanı 4-siyanopentanoik asit ditiobenzoat (CPADB) iki basamakta sentezlendi ve ^1H NMR spektroskopisi ve ^{13}C NMR spektroskopisi ile karakterize edildi.

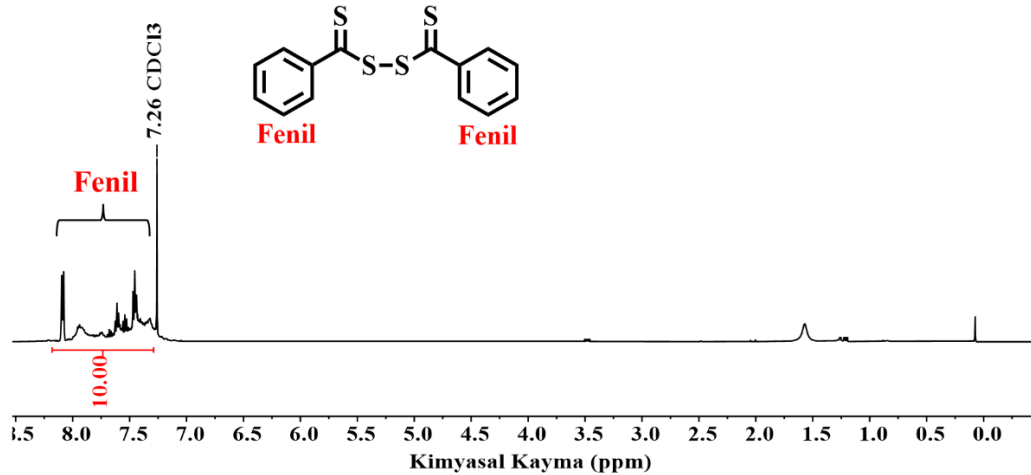
4.1.1. Di(tiyobenzoil) disülfid sentezi

Polimer sentezinde kullanılacak RAFT ajanı öncül bileşiği olan di(tiyobenzoil) disülfid; sodyum metoksit, susuz metanol ve elementel kükürt üzerine benzil klorür yavaş yavaş ilave edilerek (25.5 g) %83 verimle elde edildi (Şekil 4.2). ^1H NMR spektroskopisi ile bileşik karakterize edildi.



Şekil 4.2 : Di(tiyobenzoil) disülfid sentezi

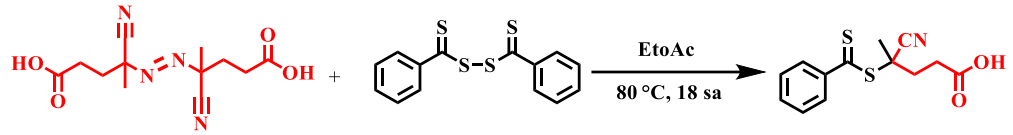
^1H NMR spektrumuna göre bileşiğin fenil grubundan gelen protonlar multipler pikler olarak 7.2-8.2 ppm aralığında gözükmemektedir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 : Di(tiyobenzoil) disülfid sentezi RAFT ajanı öncüsüne ait ^1H NMR spektrumu (CDCl_3).

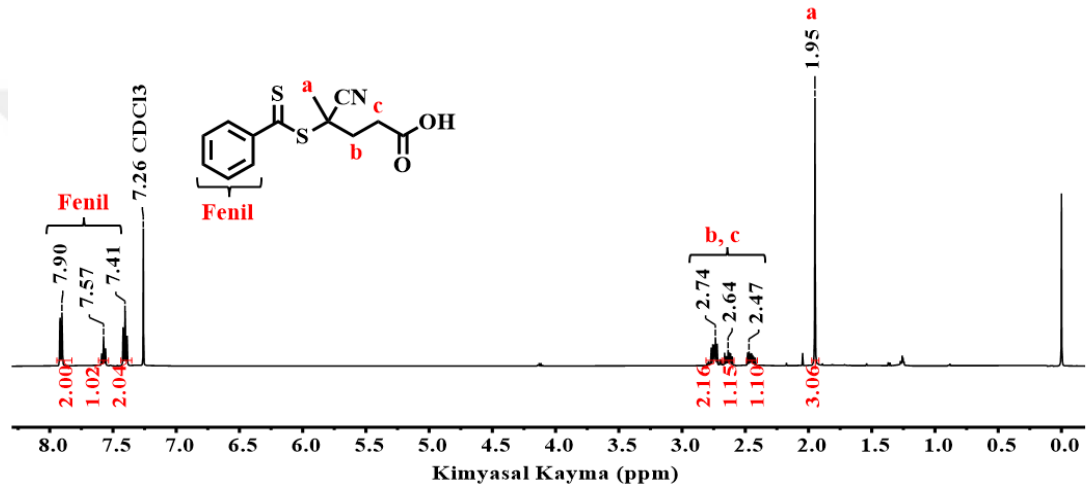
4.1.2. 4-siyanopentanoik asit ditiobenzoat (CPADB) RAFT ajanı sentezi

Pembe renkli katı halinde 4-siyanopentanoik asit ditiobenzoat (CPADB) RAFT ajanı (7.95 g) %91 verimle sentezlenmiştir (Şekil 4.4).



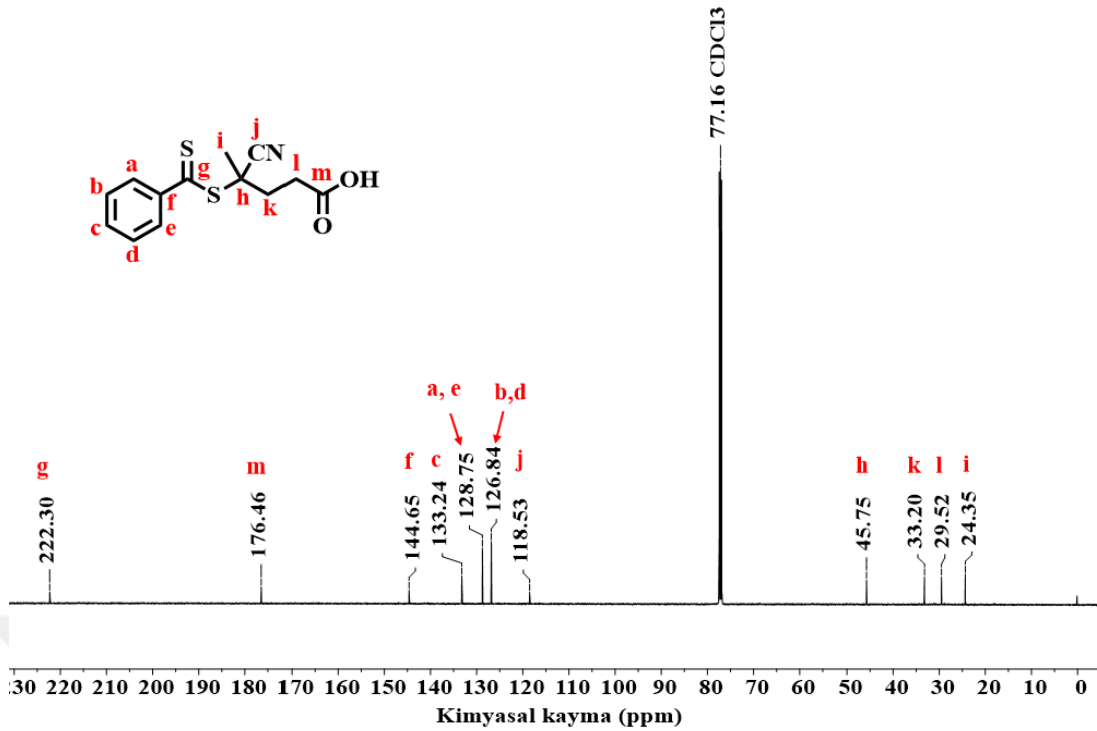
Şekil 4.4 : 4-Siyanopentanoik asit ditiobenzoat (CPADB) RAFT ajanı sentezi.

Elde edilen CPADB ürünü ^1H NMR spektroskopisi ve ^{13}C NMR spektroskopisi ile karakterize edildi (Şekil 4.5) Spektrumda fenil grubundan gelen protonlar 7.41, 7.57 ve 7.90 ppm’de gözlenmiştir. Metil grubuna ait protonlardan gelen 1.95 ppm’de çıkan singlet pik ve metilen ($-\text{CH}_2\text{CH}_2-$) protonlarından gelen 2.47, 2.64, 2.74 ppm’de çıkan pikler bileşiğin başarılı şekilde sentezlendiğini göstermektedir.



Şekil 4.5 : 4-Siyanopentanoik asit ditiobenzoat (CPADB) RAFT ajanına ait ^1H NMR spektrumu (CDCl_3).

CPADB RAFT ajanının karbon atomlarına ait pikler ^{13}C NMR spektrumunda gözükmemektedir. Şekil 4.5’e göre 126.84, 128.75, 133.24, 144,65 ppm’de fenil grubuna ait pikler ve 176.46 ppm’de karboksil grubuna ait pikinin varlığı sentezinin gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 4.6).



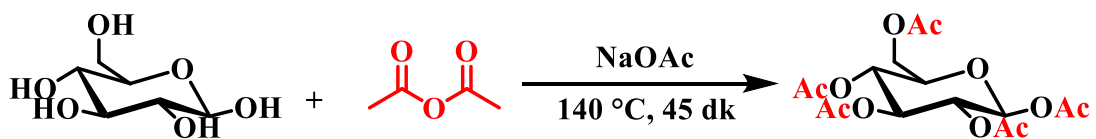
Şekil 4.6 : 4-Siyanopentanoik asit ditiobenzoat (CPADB) RAFT ajanına ait ¹³C NMR spektrumu (CDCl₃).

4.2. Monomerlerin ve Organik Bileşiklerin Sentezi

Polimerin modifikasyonunda kullanılmak üzere azit fonksiyonel grubu içeren glukoz ve fruktoz şeker bileşikleri ile (3-(3-((2-azidoetil)amino)-3-oksopropil)-2,8,12,17-tetrametil-13,18-divinilporfirin-7-il)propanoik asit (PpIX-N₃) başarılı bir şekilde sentezlenerek karakterize edildi. Ayrıca, polimer bloğunu oluşturacak 3-(trimetilsilil)prop-2-in-1-il metakrilat (TMSpMA) monomeri de sentezlenerek karakterize edildi.

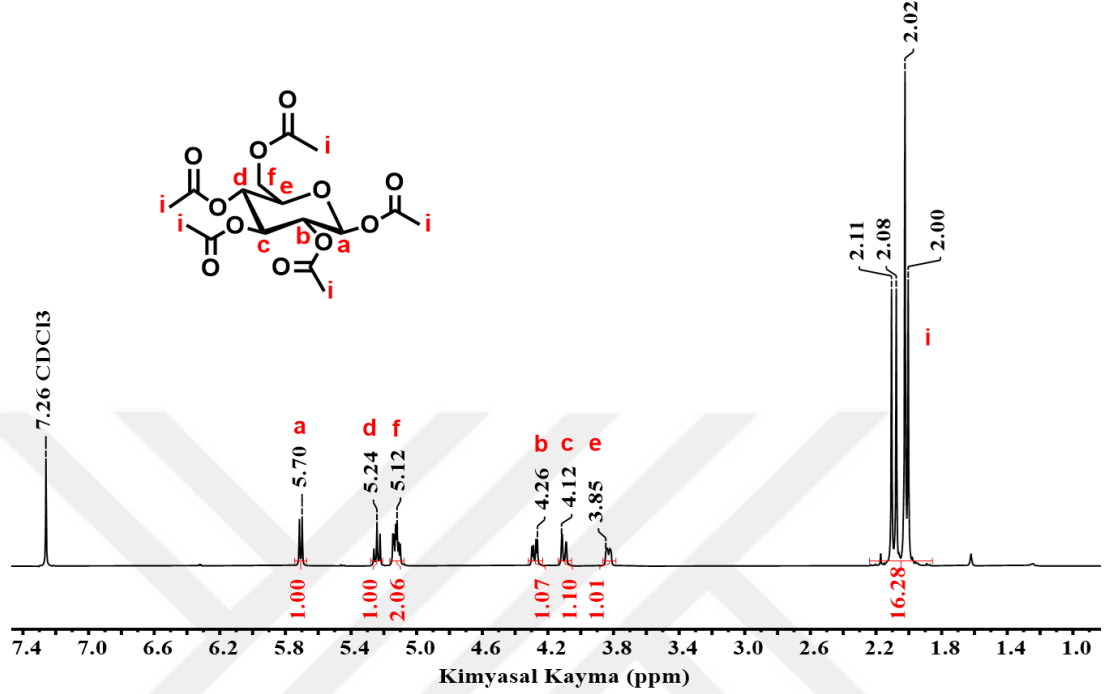
4.2.1. 1,2,3,4,6-Penta-O-asetil-β-D-glukopiranoz (β-GluAc) sentezi

1,2,3,4,6-Penta-O-asetil-β-D-glukopiranoz (β-GluAc) sentezi β-D-glukopiranoz (Glu) bileşiğinin asetik anhidrit varlığında sodyum asetat kullanılarak asetillenmesi reaksiyonu sonucunda elde edildi (Şekil 4.7). Buzlu suda çöktürülüp vakum etüvünde kurutulan β-GluAc (13.42 g) %91 verimle sentezlendi.



Şekil 4.7 : 1,2,3,4,6-Penta-O-asetil-β-D-glukopiranoz (β-GluAc) sentezi.

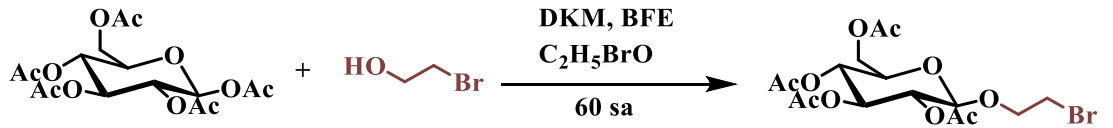
^1H NMR spektroskopisi (Şekil 4.8) kullanılarak karakterize edildi. Şekil 4.8.'de β -GluAc bileşiğine ait protonlar açık şekilde gösterilmiştir. Spektrumda yapıya katılan asetil grubunun metil protonları 2.00, 2.08, 2.11 ve 2.02 ppm'de görülmektedir.



Şekil 4.8 : 1,2,3,4,6-Penta-O-asetil- β -D-glukopiranoz (β -GluAc) bileşiğine ait ^1H NMR spektrumu (CDCl_3).

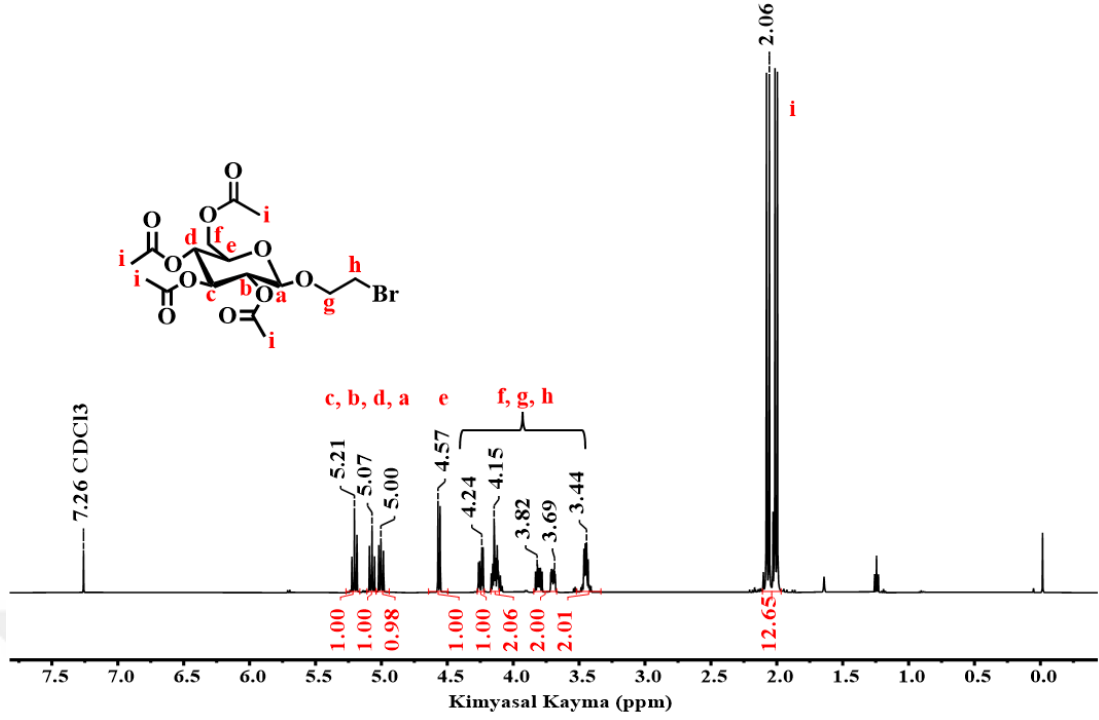
4.2.2. 2-Bromoetil 2,3,4,6-tetra-O-asetil- β -D-glukopiranoz sentezi (AcGlucEtBr)

2-Bromoetil 2,3,4,6-tetra-O-asetil- β -D-glukopiranozid (AcGlcEtBr) (7,0 g), beyaz bir katı halinde %60 verimle elde edildi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 : 2-Bromoetil 2,3,4,6-tetra-O-asetil- β -D-glukopiranoz sentezi.

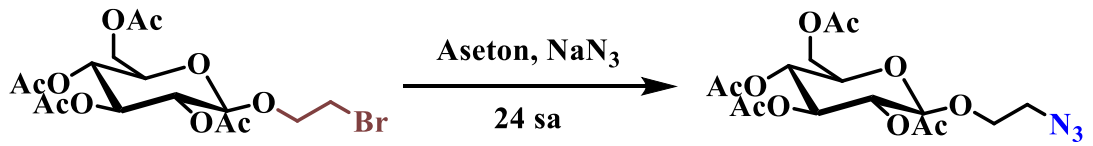
^1H NMR spektroskopisi (Şekil 4.10) kullanılarak AcGlcEtBr karakterize edildi. Şekil 4.9'da AcGlcEtBr bileşiğine ait asetil grubunun metil protonları spektrumda 1.98-2.06 ppm aralığında singlet pikler olarak görülmektedir.



Şekil 4.10 : 2-Bromoetil 2,3,4,6-tetra-O-asetil-β-D-glukopiranoz (AcGlucEtBr) bileşiğine ait ^1H NMR spektrumu (CDCl_3).

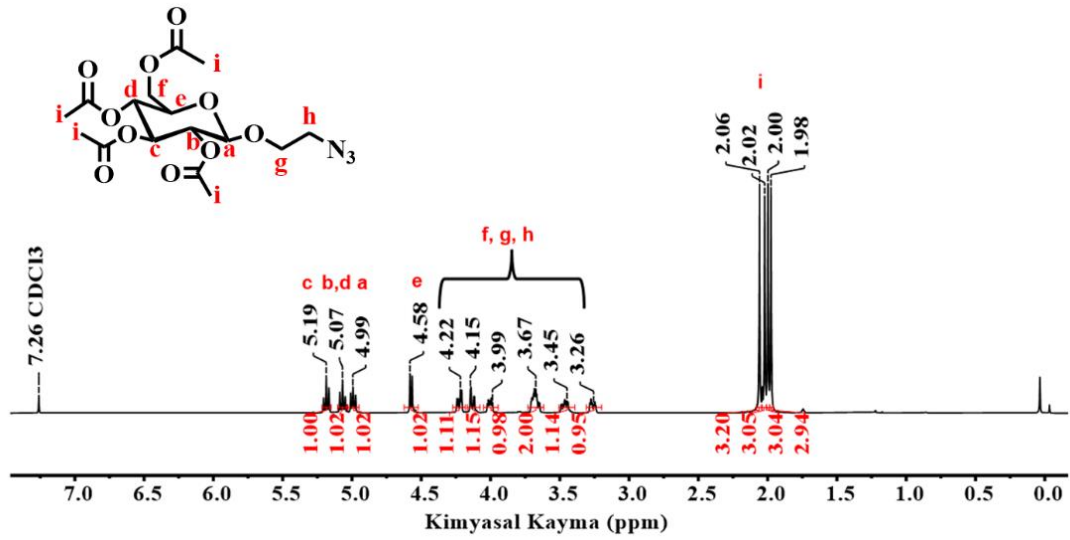
4.2.3. 2-Azidoetil 2,3,4,6-tetra-O-asetil-β-D-glukopiranozid (AcGlucN₃) sentezi

2-Azidoetil 2,3,4,6-tetra-O-asetil-β-D-glukopiranozid (AcGlucN₃), AcGlucEtBr ve NaN_3 bileşiğinin aseton-su karışımı içerisinde reflüks sıcaklığında nükleofilik yerdeğiştirme reaksiyonu sonucunda elde edildi (Şekil 4.11). Vakumla buharlaştırılan beyaz katı olarak elde edilen ürün (4,33 g) %86 verimle sentezlendi.



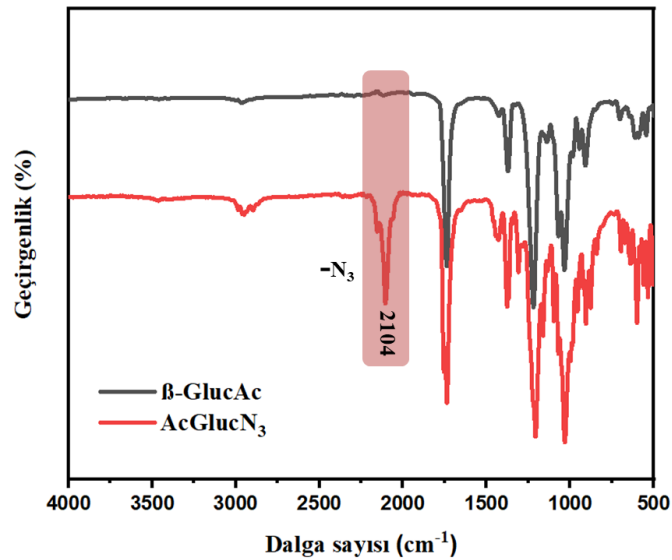
Şekil 4.11 : 2-Azidoetil 2,3,4,6-tetra-O-asetil-β-D-glukopiranozid (AcGlucN₃) sentezi.

^1H NMR spektroskopisi (Şekil 4.12) ve FTIR (Şekil 4.13) kullanılarak karakterize edildi. Şekil 4.11'de AcGlucN₃ bileşiğine ait protonlar yer almaktadır. Yapıya -Br yerine bağlanan -N₃ grubunun artan elektron yoğunluğu metilen komşu protonun 3.44 ppm'den 3.99 ppm'e kaymasına sebep olmuştur.



Şekil 4.12 : 2-Azidoetil 2,3,4,6-tetra-O-asetil- β -D-glukopiranozid (AcGlucN₃) bileşiğine ait ¹H NMR spektrumu (CDCl₃).

FTIR analizinde elde edilen verilere göre β -GluAc ve AcGlucN₃ bileşiklerine ait FTIR spektrumu Şekil 4.13’de gösterilmektedir. AcGlucN₃ bileşiğine ait eğride β -GluAc bileşiğine ait eğriden farklı olarak -N₃ grubuna ait 2104 cm⁻¹’deki bandın yapıya dahil olması bileşiğin başarılı bir şekilde sentezlendiğini belirtmektedir.

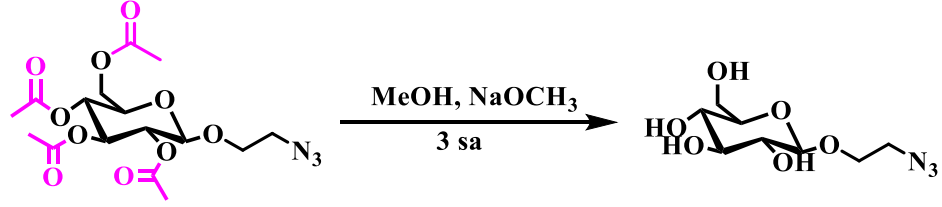


Şekil 4.13 : 2-Azidoetil 2,3,4,6-tetra-O-asetil- β -D-glukopiranozid (AcGlucN₃) bileşiğine ait FTIR spektrumu.

4.2.4. 2-Azidoetil-O- β -D-glukopiranozid (GluCN₃) sentezi

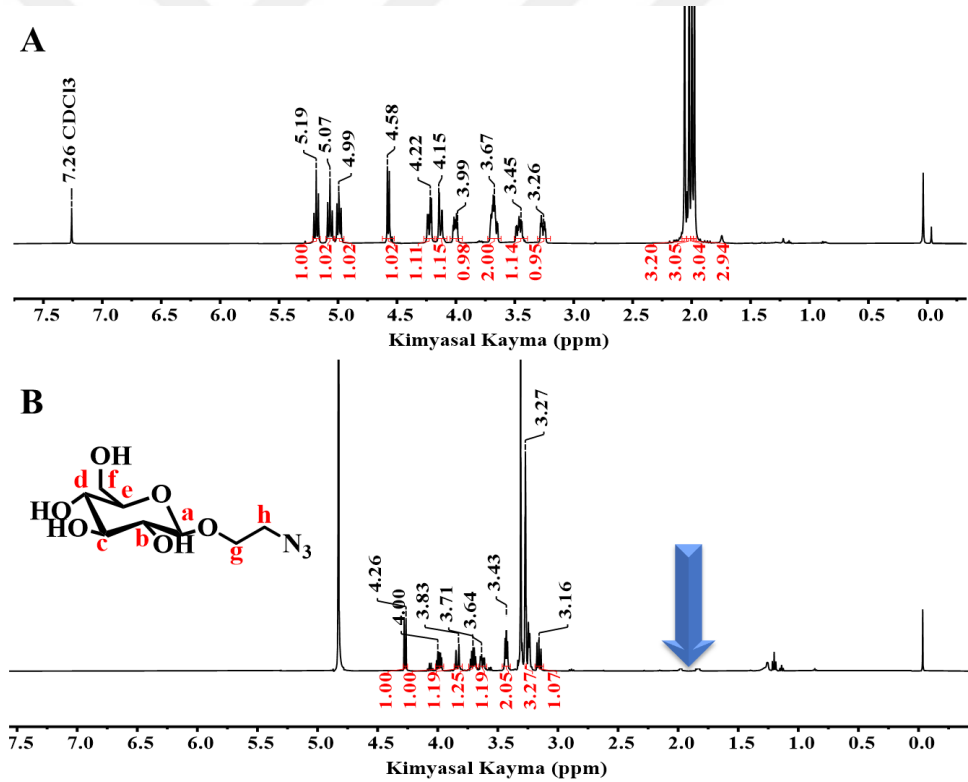
AcGlucN₃’ün şeker ünitelerinde bulunan asetil koruma gruplarının kaldırılması bazik ortamda hidroliz reaksiyonu ile gerçekleştirildi. Koruma gruplarının kaldırılması

NaOCH₃ (metanol içinde ağırlıkça %25) varlığında susuz metanol içinde oda sıcaklığında 3 saat karıştırılarak gerçekleştirildi (Şekil 4.14). 0,66 g bileşik elde edilmiştir.



Şekil 4.14 : 2-Azidoetil-O-β-D-glukopiranozid (GlucN₃) sentezi.

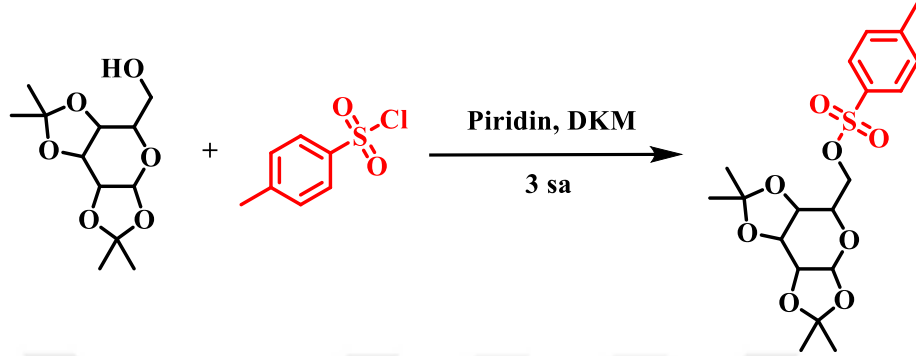
1.98- 2.06 ppm aralığında çıkan asetil grubuna ait singlet piklerinin yok olması hidroliz reaksiyonun gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 4.15). Asetil koruma gruplarının kaldırılması glikoblok kopolimer yapısına katılacak 2-azidoetil-O-β-D-glukopiranozid (GlucN₃) bileşiğinin, polimer iskelesinin temel işlemleri açısından gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.15 : A) 2-Azidoetil 2,3,4,6-tetra-O-asetil-β-D-glukopiranozid (AcGlucN₃) ve B) hidroliz sonrası 2-Azidoetil-O-β-D-glukopiranozid (GlucN₃) bileşiğine ait ¹H NMR spektrumu (A: CDCl₃, B: CD₃OD).

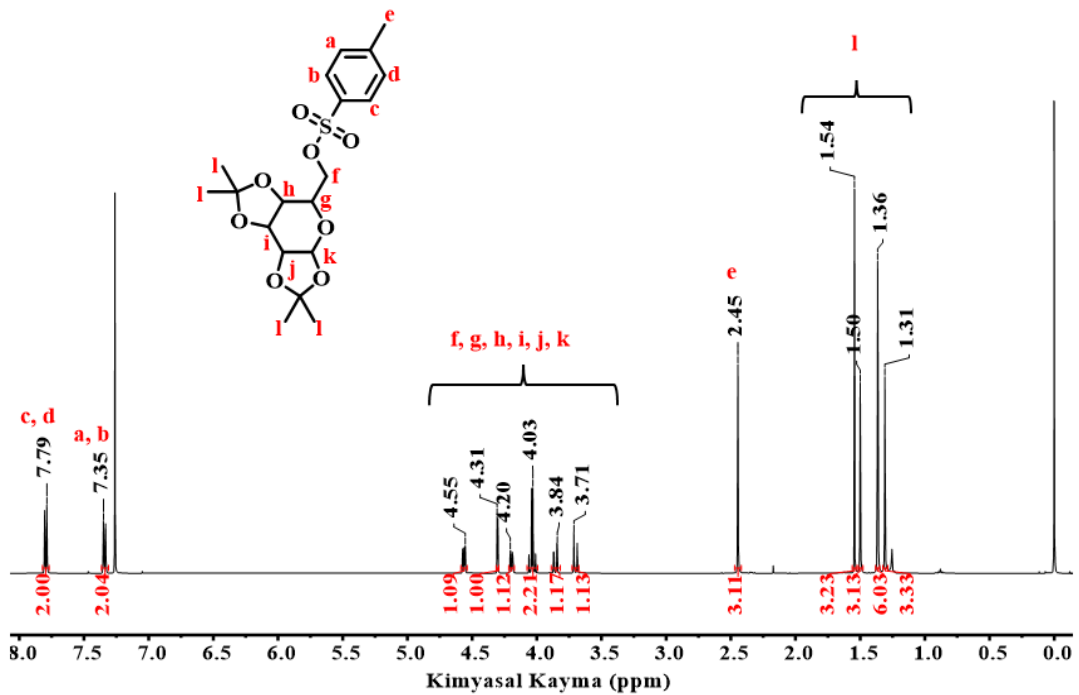
4.2.5. (2,3:4,5-Di-O-izopropiliden)-β-D-fruktopiranoz-TSC(*iprFru*-TSC) sentezi

Önceden sentezlenen izopropiliden Fruktoz'un (*iprFru*) p-toluensülfonil klorür ile piridin varlığında gerçekleştirilen reaksiyon sonucunda (2,3:4,5-Di-O-izopropiliden)-β-D-fruktopiranoz-TSC (*iprFru*-TSC) bileşiği sentezlendi (Şekil 4.16).



Şekil 4.16 : (2,3:4,5-Di-O-izopropiliden)-β-D-fruktopiranoz-TSC (*iprFru*-TSC) sentezi.

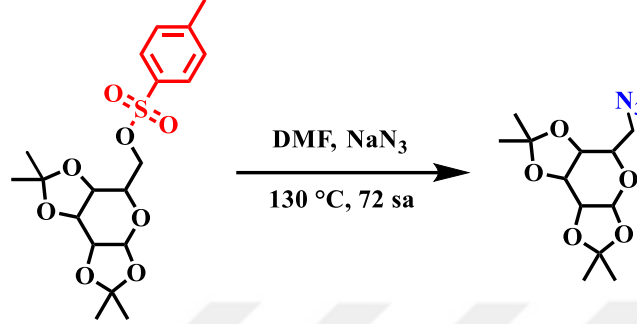
Ürün DKM-dH₂O ile ve doymuş NaCl üç kez ekstrakte edildi ardından 1:4 etil asetat:heksan kolon kromatografisiyle saflaştırıldı. Beyaz katı ürün (1,4 g) %88 verimle elde edildi. Elde edilen *iprFru*-TSC monomeri ¹H NMR spektroskopisi (Şekil 4.17) kullanılarak karakterize edildi. Şekil 4.17'da *iprFru*-TSC monomerine ait protonlar gösterilmektedir. ¹H NMR spektrumuna göre yapıya katılan tosil grubuna ait fenil protonları 7.35 ve 7.79 ppm'de dublet pik, metil grubuna ait protonlar ise 2.45 ppm'de singlet pik olarak gözükmemektedir.



Şekil 4.17 : (2,3:4,5-Di-O-izopropiliden)-β-D-fruktopiranoz-TSC bileşiğine ait ¹H NMR spektrumu (CDCl₃).

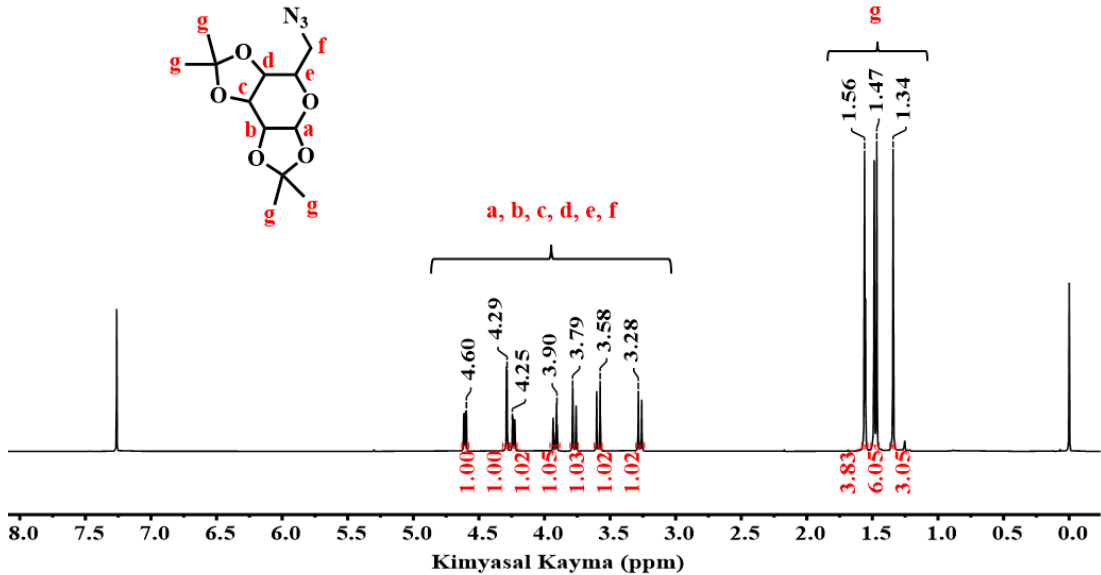
4.2.6. (2,3:4,5-Di-O-izopropiliden)-β-D-fruktopiranoz-N₃ (*iprFruc-N₃*) sentezi

Sentezlenen *iprFru*-TSC'nin sodium azit ile reaksiyonu sonucunda (2,3:4,5-Di-O-izopropiliden)-β-D-fruktopiranoz-N₃ (*iprFruc-N₃*) sentezlendi (Şekil 4.18).



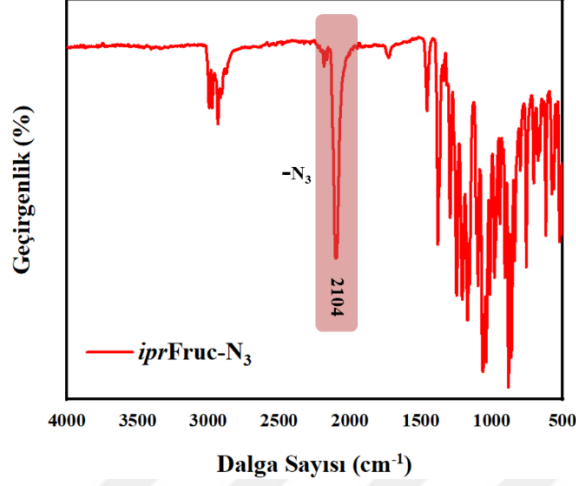
Şekil 4.18 : (2,3:4,5-Di-O-izopropiliden)-β-D-fruktopiranoz-N₃ (*iprFruc-N₃*) sentezi.

Ham ürün DKM-dH₂O ile üç kez ekstrakte edildi. Daha sonra 1:3 etil asetat-heksan kromatografisi ile ürün saflaştırıldı. Beyaz katı olarak (0,88 g) %72 verimle *iprFruc-N₃* elde edildi. Sentezlenen ürün ¹H NMR spektroskopisi (Şekil 4.19) ve FTIR (Şekil 4.20) kullanılarak karakterize edildi. Şekil 4.18.'de *iprFruc-N₃* bileşiğine ait protonlar gösterilmiştir. Yapıdan ayrılan tosil grubuna ait 7.35 ve 7.79 ppm'de çıkan protonlarının spektrumda görülmemesi reaksiyonun gerçekleştiğini doğrulamaktadır.



Şekil 4.19 : (2,3:4,5-Di-O-izopropiliden)-β-D-fruktopiranoz-N₃ bileşiğine ait ¹H NMR spektrumu (CDCl₃).

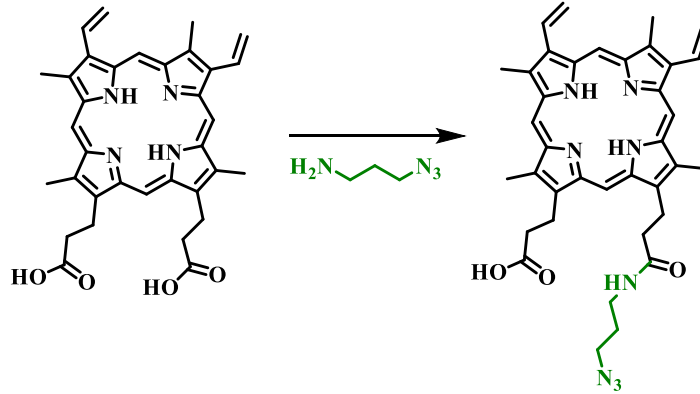
*ipr*Fruc-N₃ FTIR analizi ile ¹H NMR spektrumu sonucu doğrulanmıştır. 2104 cm⁻¹ dalga sayılı bandın *ipr*Fruc-N₃'e ait FTIR spektrumunda görülmesi azit grubunun (-N₃) eklendiğini göstermektedir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20 : (2,3:4,5-Di-O-izopropiliden)-β-D-fruktopiranoz-N₃ bileşiğine ait FTIR spektrumu.

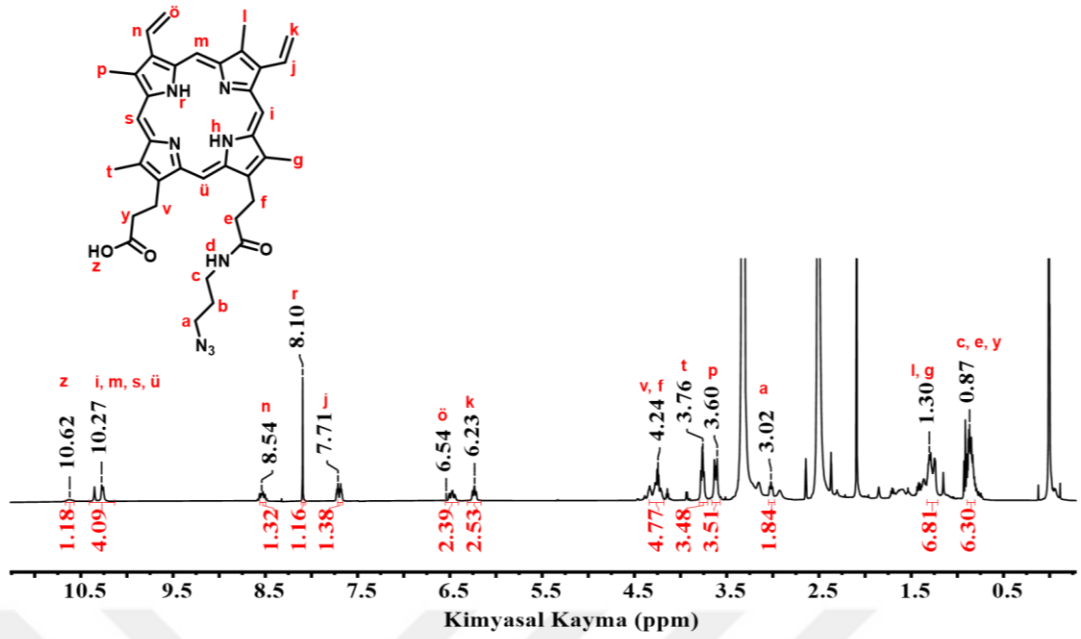
4.2.7. (3-(3-((2-azidoetil)amino)-3-oksopropil)-2,8,12,17-tetrametil-13,18-divinilporfirin-7-il)propanoik asit (PpIX-N₃) sentezi

(3-(3-((2-azidoetil)amino)-3-oksopropil)-2,8,12,17-tetrametil-13,18-divinilporfirin-7-il)propanoik asit (PpIX-N₃), PpIX ve azidoetilaminin esterleşme reaksiyonu sonucunda elde edildi. (Şekil 4.21).



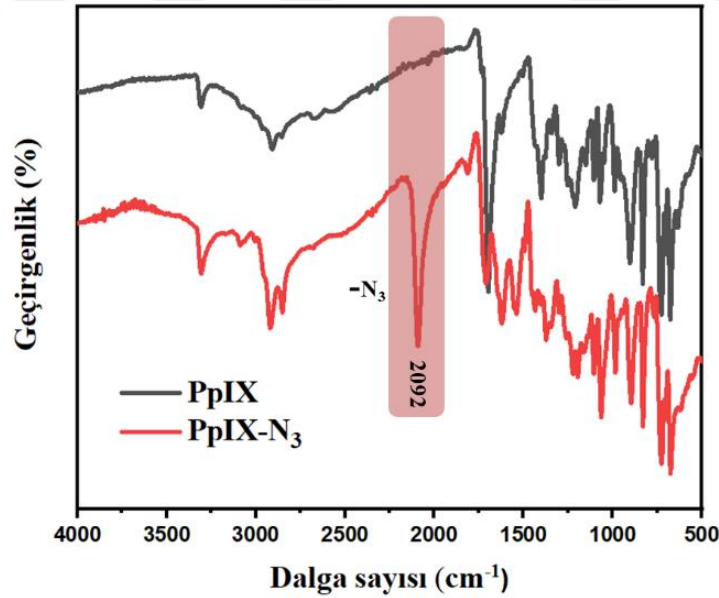
Şekil 4.21 : (3-(3-((2-azidoetil)amino)-3-oksopropil)-2,8,12,17-tetrametil-13,18-divinilporfirin-7-il)propanoik asit sentezi.

Vakum altında konsantre edilen lacivert renkli ürün (0,180 g) %79 verimle elde edilerek ¹H NMR spektroskopisi ile karakterize edildi (Şekil 4.22). ¹H NMR spektrumunda azit grubuna bağlı metilen protonları 3.02 ppm'de triplet pik olarak çıkmıştır.



Şekil 4.22 : (3-(3-((2-azidoetil) amino)-3-oksopropil)-2,8,12,17-tetrametil-13,18-divinilporfirin-7-il) propanoik asit bileşiğine ait ^1H NMR spektrumu ($\text{DMSO-}d_6$).

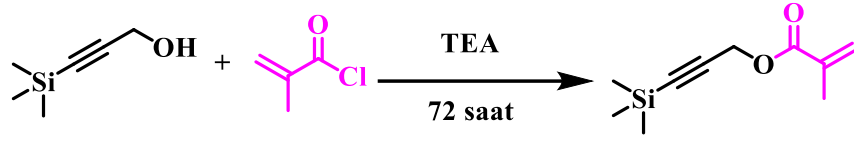
^1H NMR spektrumu sonucunu desteklemek için PpIX ve elde edilen ürün FTIR spektroskopisi ile analiz edildi (Şekil 4.23). FTIR spektrumuna bakıldığında 2092 cm^{-1} dalga sayılı bant $-\text{N}_3$ grubunun bileşiğe katıldığını göstermektedir.



Şekil 4.23 : PpIX ve PpIX- N_3 'e ait FTIR spektrumları.

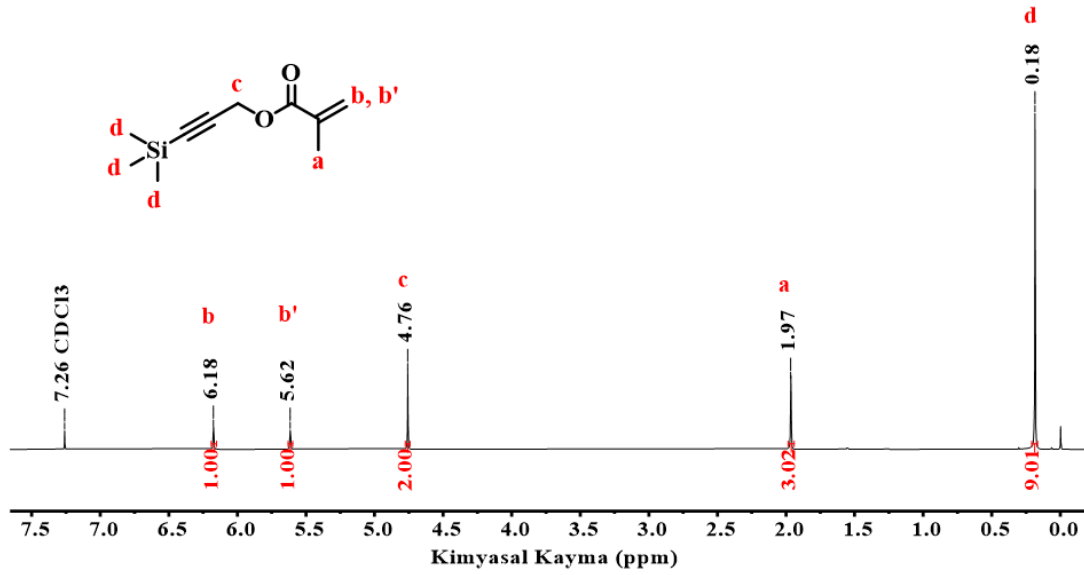
4.2.8. 3-(Trimetilsilil) prop-2-in-1-il Metakrilat (TMSpMA) sentezi

Monomer TMSpMA; 3-(trimetilsilil) 1-propanol, trietilamin ve metakriloil klorür varlığında (13,5 g) %88 verimlilikle sentezlendi (Şekil 4.24).



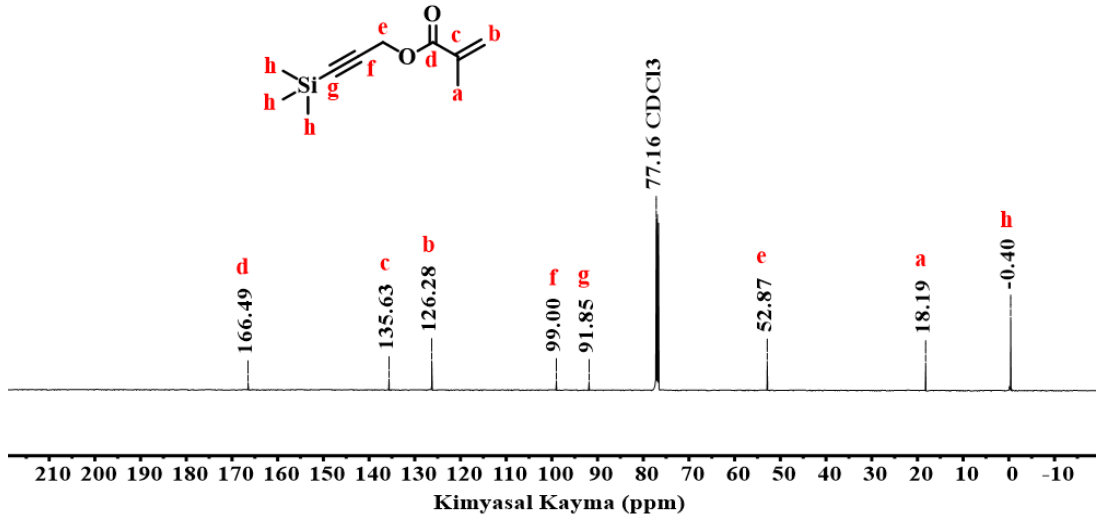
Şekil 4.24 : 3-(Trimetilsilil)prop-2-in-1-il Metakrilat (TMSpMA) sentezi.

^1H NMR spektroskopisi ile elde edilen monomer TMSpMA karakterize edildi (Şekil 4.25). ^1H NMR spektrumunda, metakrilat grubuna ait $-\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-$ protonlarının 5.62 ve 6.18 ppm'de, metakrilat grubuna ait $-\text{CH}_3$ protonlarının 1.97 ppm'de ve $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ grubuna ait protonlarının 0.18 ppm'de görülmesi TMSpMA monomerinin sentezlendiğini göstermektedir.



Şekil 4.25 : 3-(Trimetilsilil)prop-2-in-1-il Metakrilat (TMSpMA) monomerine ait ^1H NMR spektrumu (CDCl_3).

Şekil 4.26'de verilen ^{13}C NMR spektrumuna göre TMSpMA monomerine ait tüm karbon atomlarının pikleri sentezlenen bileşiğin yapısını doğrulamaktadır. ^{13}C NMR spektrumunda, metakrilat grubuna ait $-\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-$ karbonlarının sırasıyla 18.19, 126.28, 135.63 ppm'de ve $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ grubunun metil karbonlarının 0.40 ppm'de görülmesi TMSpMA monomerinin sentezlendiğini göstermektedir.



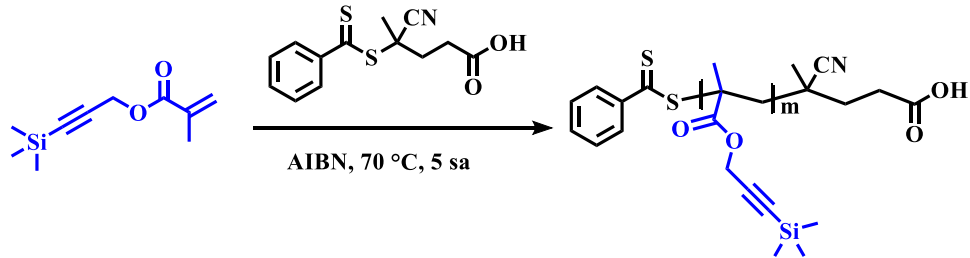
Şekil 4.26 : 3-(Trimetilsilil)prop-2-in-1-il Metakrilat (TMSpMA) monomerine ait ^{13}C NMR spektrumu (CDCl_3).

4.3. RAFT Polimerizasyon Yöntemiyle Polimer Sentezi

Misel formülasyonlarında kullanılacak glikopolimer bazlı polimerlerin öncü polimerleri olan P(TMSpMA) homopolimeri ve P(TMSpMA-*b*-*n*BA) diblok kopolimeri RAFT polimerizasyon yöntemi ile sentezlendi.

4.3.1. Poli(Trimetilsilil-Korumalı Propargil Metakrilat) P(TMSpMA) homoplok polimer sentezi

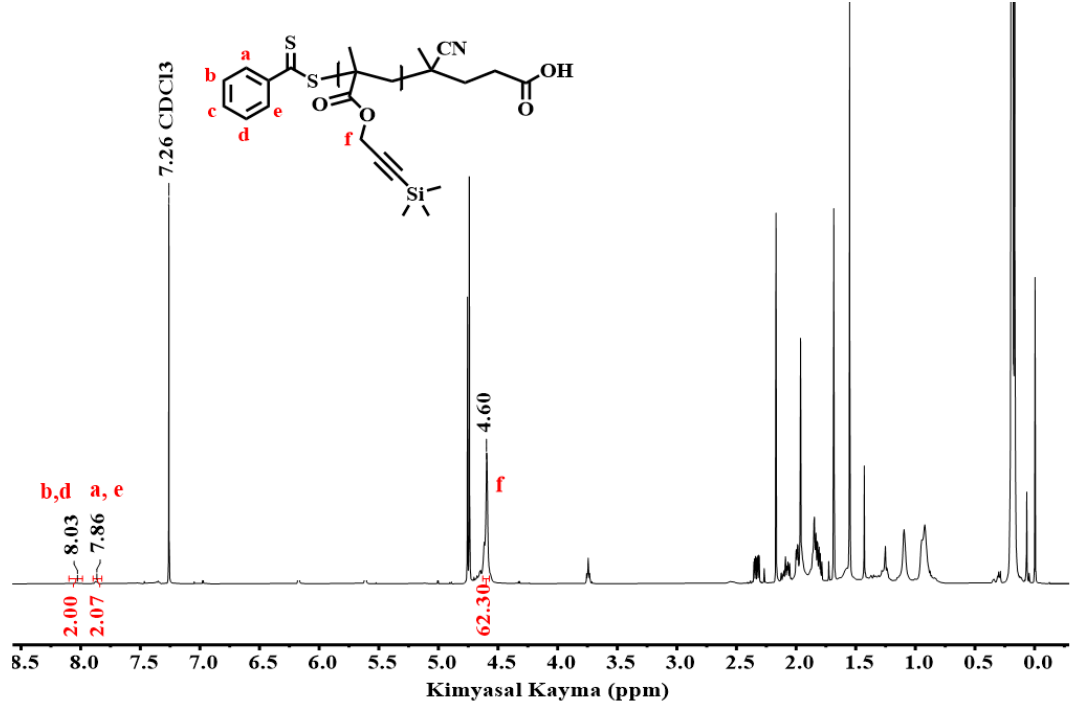
P(TMSpMA) homopolimeri için [TMSpMA]:[CBADB]:[AIBN]=[60]:[1]:[0,125] polimerizasyon oranı kullanıldı. Polimerizasyon 70 °C’de gerçekleştirildi (Şekil 4.27). Ham polimer THF’te çözülüp soğuk hekzana çöktürülerek reaksiyona girmemiş monomerden uzaklaştırıldı.



Şekil 4.27 : P(TMSpMA) homoblok polimer sentezi.

Monomer dönüşümünün belirlenmesinde RAFT ajanına ait 8.03 ve 7.86 ppm’de çıkan fenil grubu protonlarının polimer zincirinde 4.60 ppm’de çıkan $-\text{OCH}_2$ pikine

integrasyonundan hesaplandı (Şekil 4.28) ^1H NMR'dan %52'lik TMSpMA monomer dönüşümü bulunmuştur.



Şekil 4.28 : P(TMSpMA) homoblok polimerine ait ^1H NMR spektrumu (CDCl_3).

TMSpMA monomerinden sentezlenen homoblok polimere ait GPC sonucuna göre polimerin M_n değeri 6,01 kDa, M_w/M_n değeri 1,36 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.32), (Tablo 4.1).

Tablo 4.1 : Polimerizasyon koşulları ve polimerlerin karakterizasyonu

Polimer	[M]:[RAFT]:[B]	Süre (sa)	Dön. ^a (%)	$M_{n,\text{NMR}}$ (kDa)	$M_{n,\text{GPC}}^b$	
					M_n	M_w/M_n
P(TMSpMA)	[60]:[1]:[0,125]	5	59	6,36	6,01	1,36
P(TMSpMA- <i>b</i> -nBA)	[90]:[1]:[0,150]	10	43	17,6	28,5	1,36
P(PMA- <i>b</i> -nBA)	-	4	>99	15,4	17,9	1,38

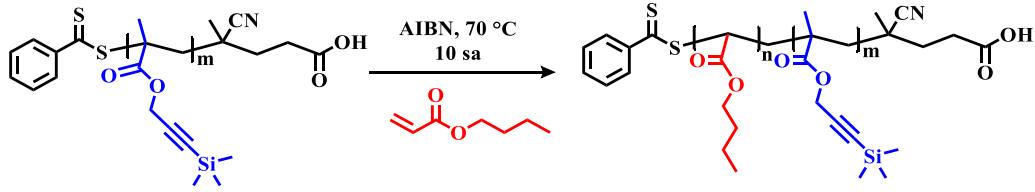
^a Polimerizasyon dönüşümü gravimetrik analizle belirlendi.

^b Moleküler ağırlık (M_n) (kDa) ve polidispersite indeksi (M_w/M_n) THF GPC ile belirlendi.

4.3.2. Poli(Trimetilsilil-korumalı propargil metakrilat)-blok-poli(*n*-bütül akrilat) P(TMSpMA-*b*-nBA) sentezi

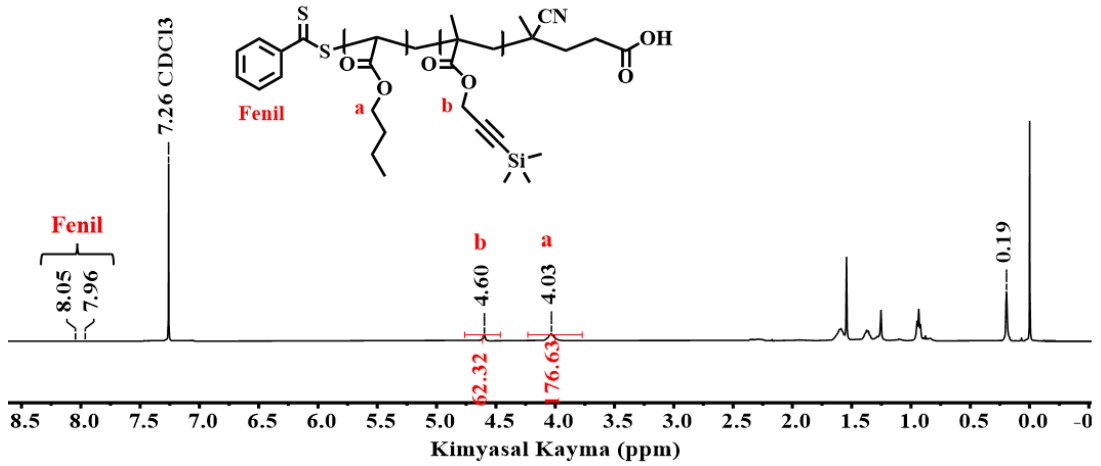
P(TMSpMA-*b*-nBA) diblok kopolimeri P(TMSpMA) homoblok polimerinin zincir uzatma reaksiyonu ile sentezlendi. Polimerizasyon oranı olarak [*n*-BA]:[P(TMSpMA)]:[AIBN]=[90]:[1]:[0,150] kullanıldı. Polimerizasyon 70 °C'de 10

saat boyunca gerçekleştirildi. Bu sürenin sonunda polimerizasyon karışımı THF'te çözülüp soğuk hekzana çöktürülerek saflaştırıldı (Şekil 4.28).



Şekil 4.29 : P(TMSpMA-*b*-nBA) diblok kopolimer sentezi.

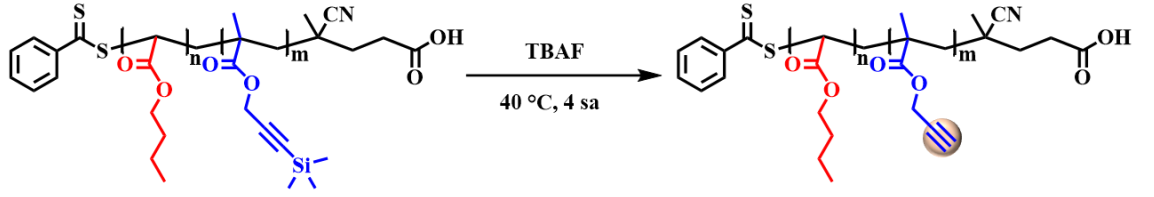
Elde edilen P(TMSpMA-*b*-BA) diblok polimeri ^1H NMR spektroskopisi (Şekil 4.30) ve GPC (Şekil 4.33) ile karakterize edildi. Şekil Şekil 4.30'da P(TMSpMA-*b*-BA) diblok polimerine ait protonlar gösterilmektedir. nBA'nın 4.03 ppm'de çıkan karbonile komşu $-\text{OCH}_2$ protonlarının integrasyonundan yapılan hesaplama göre polimer yapısına katılan *n*-bütil akrilat ünitesi sayısı 88 olarak belirlenmiştir. %97'lik nBA dönüşümü ^1H NMR'dan hesaplanmıştır. ^1H NMR sonucuna göre diblok polimerin sahip olduğu moleküler ağırlık 17,6 kDa olarak hesaplanmıştır. GPC sonucuna göre polimere M_n değeri 28,5 kDa, PDI değeri 1,36 olarak bulunmuştur (Tablo 4.1).



Şekil 4.30 : P(TMSpMA-*b*-nBA) diblok kopolimer polimerine ait ^1H NMR spektrumu (CDCl_3).

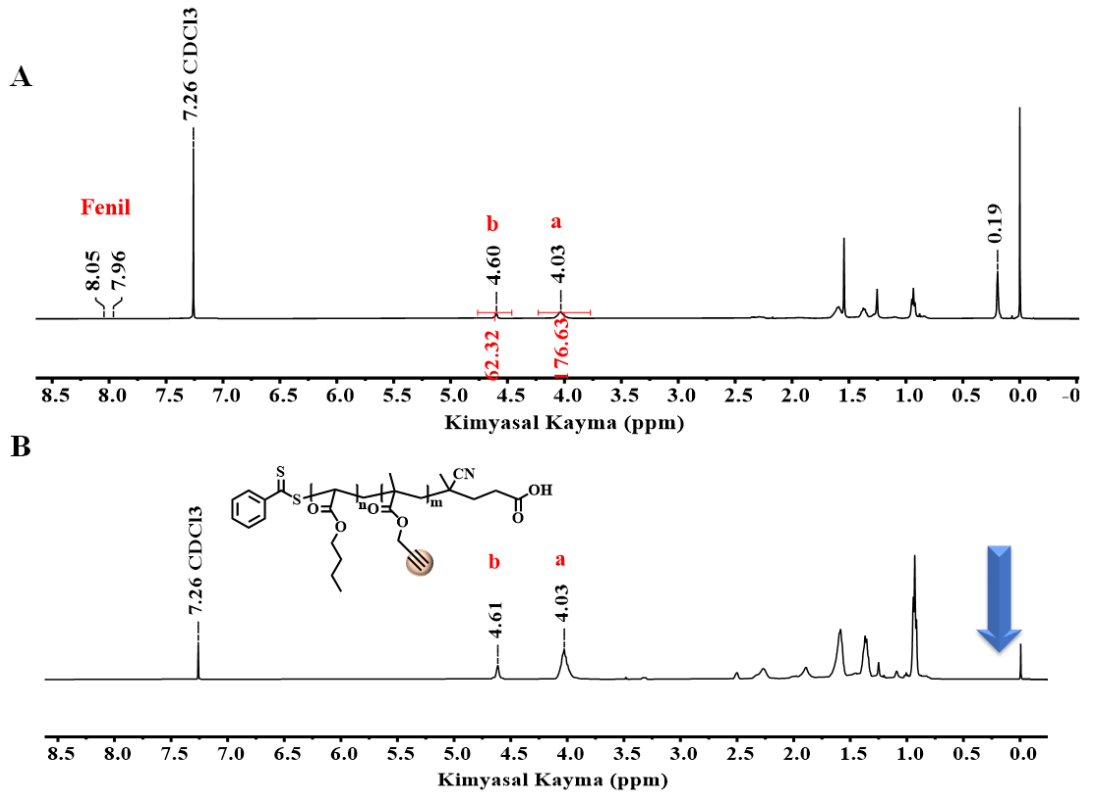
4.3.3. Poli(Propargil metakrilat)-blok-(*n*-bütil akrilat) (P(PMA-*b*-nBA)) sentezi

P(TMSpMA-*b*-BA) polimerindeki trimetilsilil koruma grupları TBAF hidrolizi ile yapıdan uzaklaştırılmıştır (Şekil 4.31). Hidrolizi sonucu elde edilen ürün ^1H NMR spektroskopisi ve GPC ile karakterize edildi.



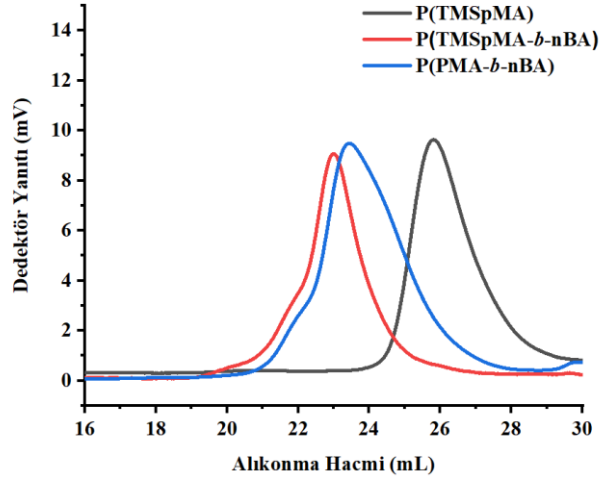
Şekil 4.31 : P(PMA-*b*-nBA) sentezi.

^1H NMR spektrumuna göre diblok polimerin TMSpMA ünitelerine siliil protonlarından gelen 0.19 ppm'deki pikin spektrumda olmaması hidroliz reaksiyonun etkinliğini göstermektedir (Şekil 4.32).



Şekil 4.32 : A) P(TMSpMA-*b*-nBA) diblok kopolimer ve B) P(PMA-*b*-nBA) diblok polimerine ait ^1H NMR spektrumu (CDCl_3).

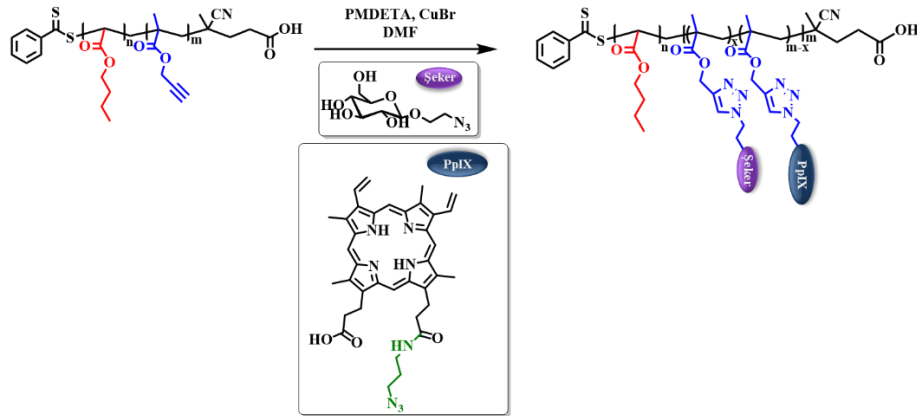
GPC sonucuna göre (Şekil 4.33) hidroliz sonrası diblok kopolimerin M_n değeri 15,4 kDa ve PDI değeri 1,38 olarak bulunmuştur (Tablo 4.1).



Şekil 4.33 : P(TMSpMA), P(TMSpMA-*b*-nBA) ve P(PMA-*b*-nBA) polimerlerine ait GPC sonuçları.

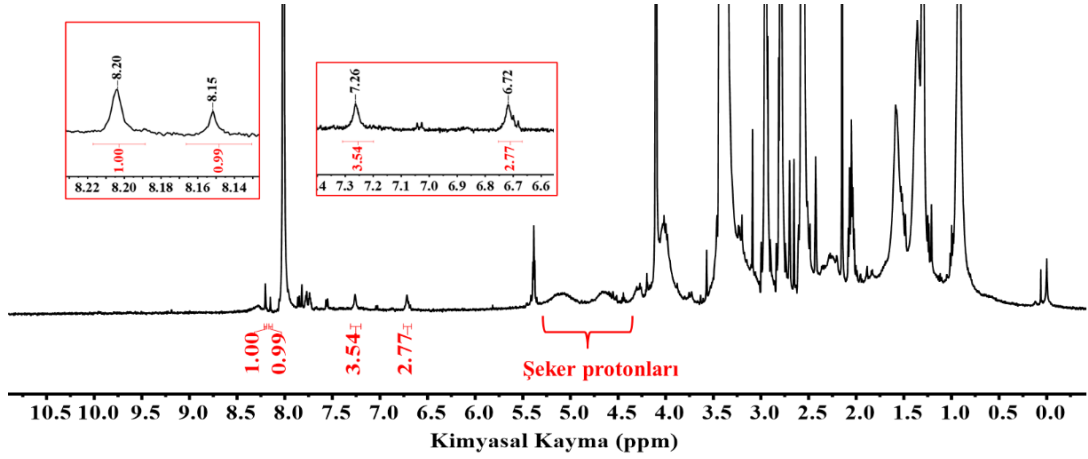
4.3.4. Glikopolimerlerin hazırlanması

P(pMA-*b*-BA), PpIX-N₃, glukoz azit, PMDETA ve CuBr kullanılarak donma-vakum-çözme döngüsü kullanıldı ve click reaksiyonu gerçekleştirildi (Şekil 4.34). Reaksiyon sonucunda elde edilen ürün, soğuk metanol içinde çöktürülüp ardından nötr alümina ile doldurulmuş kolondan süzülerek saflaştırıldı. Ürün ¹H NMR spektroskopisi ile karakterize edildi.



Şekil 4.34 : Glikopolimerlerin click reaksiyonu ile sentezi.

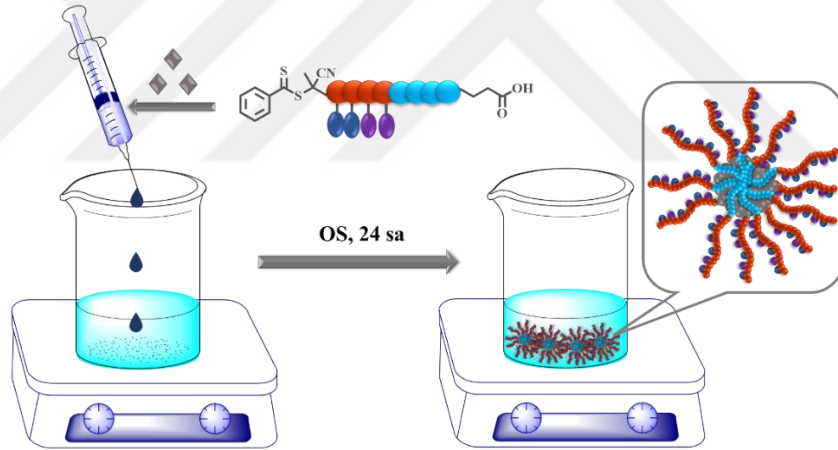
Spektruma göre triazol halkasına ait 8.15 ve 8.20 ppmde çıkan pikler click reaksiyonunun gerçekleştiğini göstermektedir. Ayrıca 6.72 ve 7.26 ppm ile 4.20-5.30 ppm arasında çıkan protonlar sırasıyla protoporfirin ve şeker monomerlerinin her ikisinin de diblok yapısına katıldığını göstermektedir (Şekil 4.35).



Şekil 4.35 : Glikopolimere ait ^1H NMR spektrumu (CDCl_3).

4.4. Misellerin Sentezi

İlaç yüklü ve yüksüz glikopolimer bazlı misellerin sentezinde nanoçöktürme yöntemi kullanıldı (Şekil 4.36). Sadece FDT özellikli glikopolimerik miseller GM olarak, kemo-FDT özellikli glikopolimerik miseller GM-PTX olarak isimlendirildi.

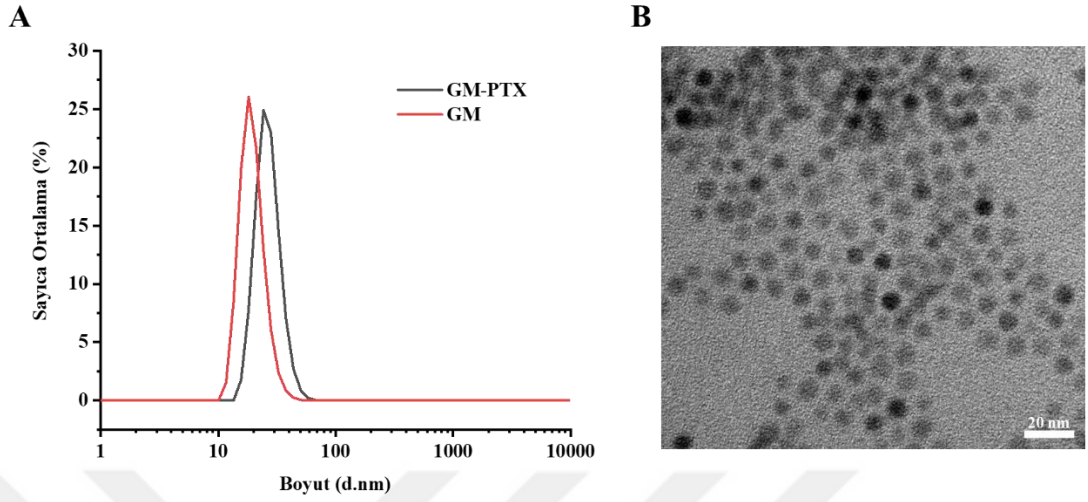


Şekil 4.36 : Glikopolimerik misellerin sentezi.

4.4.1. Sentezlenen misellerin karakterizasyonu

GM ve GM-PTX misellerinin boyutları, zeta potansiyelleri ve morfolojilerinin incelenmesi dinamik ışık saçılımı (DLS) analizi ve geçirimli elektron mikroskopisi (TEM) analizi ile gerçekleştirildi (Şekil 4.37). Sudaki misellerin boyut ve zeta potansiyelleri Zetasizer DLS ölçüm cihazıyla analiz edildi (Tablo 4.2). İlaç yüklü ve yüksüz olarak sentezlenen her iki misel yapısının boyutu 30 nm'den küçük olduğu bulundu. Zeta potansiyel değerlerinin ~ -20 dolayında olması misellerin yüzeyinin şeker grupları ile kaplı olduğunu kanıtlamaktadır. Negatif yük glikopolimerdeki şeker

ünitelerinin taşıdığı hidroksil grubundan kaynaklanmaktadır. EPR etkisinden yararlanabilmek için hazırlanan misellerin boyutu uygun aralıktadır.



Şekil 4.37 : A) GM ve GM-PTX misellerinin DLS analizi ile tespit edilen boyutları ve B) TEM analiz görüntüsü.

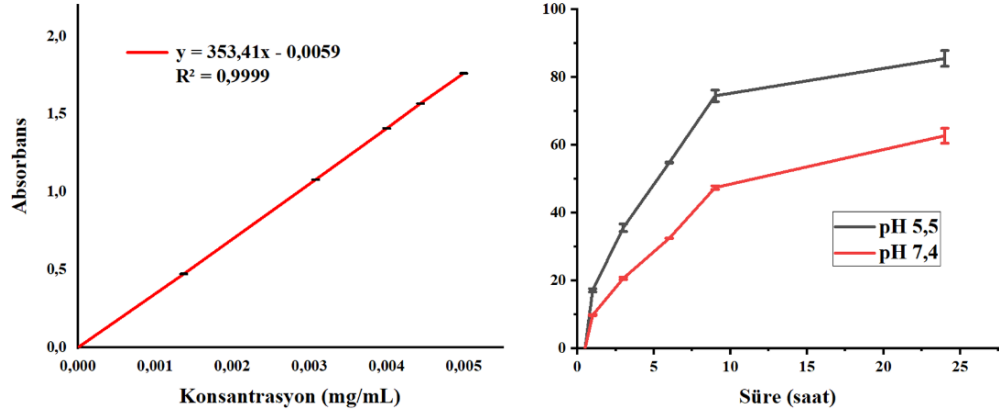
Örneklere ait DLS verileri Tablo 4.2.'de özetlenmiştir.

Tablo 4.2 : Misellere ait DLS analiz verileri

Örnek	Zeta Potansiyeli (mV)	PDI	Boyut (d.nm)
GM	-18,9 ± 0,58	0,748	19,80 ± 2,70
GM-PTX	-21,0 ± 0,78	0,362	27,02 ± 3,51

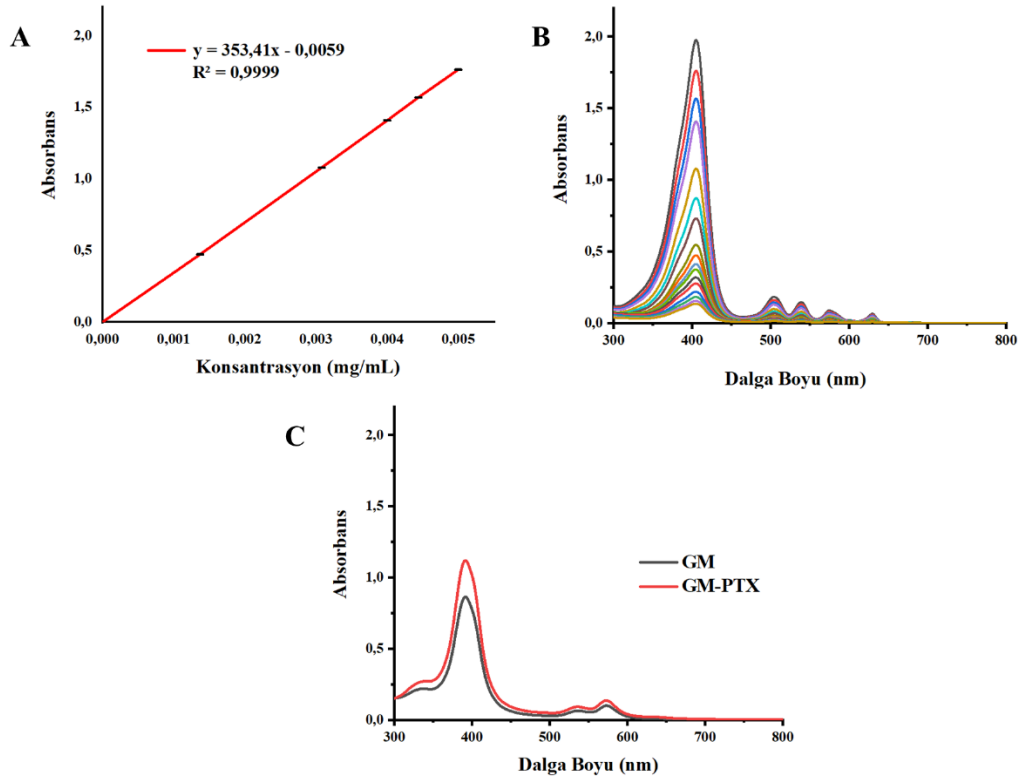
HPLC analizi kullanılarak ilaç yükleme kapasitesi (DL) ve enkapsülasyon etkinliği (EE) belirlendi. Numunelerin PTX için 227 nm'de absorpsiyonu belirlendi ve oluşturulan kalibrasyon eğrilerine göre hesaplama yapıldı. İlaç yükleme kapasitesi (DL) %5.5, enkapsülasyon etkinliği (EE) %29.6 olarak belirlendi (Şekil 4.38).

PTX yüklü miseller 3.5 kDa'lık diyaliz membranı içerisine konularak iki farklı pH değerinde (pH 5,5 ve pH 7,4 PBS) salım profilleri incelendi. PBS tampon çözeltilerinde 37 °C'de inkübasyonu gerçekleştirilen misellerden belirlenen sürelerde örnekler alınarak HPLC'de ölçümleri yapıldı. Kümülatif olarak birleştirilen sonuçlar doğrultusunda ilaç salım grafiği elde edildi (Şekil 4.38). İlk 10 saat içerisinde hızlı bir şekilde gerçekleşen salımın 24. saat sonunda pH: 7,4'te %62, pH: 5,5'de ise %85 oranına ulaştığı belirlendi (Şekil 4.38.) Asidik ortamda PTX daha fazla salınmıştır [90].



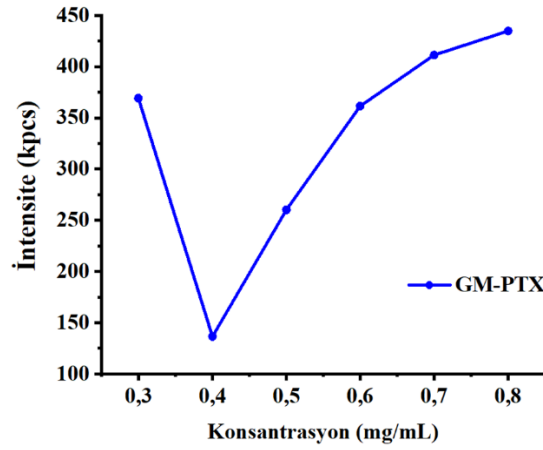
Şekil 4.38 : A) HPLC’de azalan konsantrasyonlarda hazırlanan PTX için oluşturulan kalibrasyon eğrisi ve B) İlaç yüklü miselin (GM-PTX) 37 °C’de PBS solüsyonlarında (pH=7,4, pH= 5,5) *in vitro* PTX salım grafiği.

UV-Vis spektroskopisi kullanılarak glikopolimer bazlı misellerde bulunan PpIX miktarı daha önceden oluşturulan eğrisi ile belirlenmiştir. PpIX 405 nm’de maksimum absorbans verirken miselde bulunan PpIX 392 nm’de maksimum absorbans vermiştir [91]. Bunun sebebi misel oluşturulurken kullanılan DMSO’dan kaynaklanmaktadır. Kalibrasyon eğrisine göre GM’de bulunan PpIX miktarı 0,0019 mg/mL iken, GM-PTX’de bulunan PpIX miktarı ise 0,0028 mg/mL olarak hesaplanmaktadır (Şekil 4.38).



Şekil 4.39 : A) UV-Vis spektrofotometrisinde PpIX'nin azalan konsantrasyonları kullanılarak oluşturulan kalibrasyon eğrisi B) PpIX'nin azalan konsantrasyonlarının UV-Vis spektroskopisi ölçümleri ve C) GM, GM-PTX misellerine yüklenen PpIX'nin UV-Vis spektroskopisi ölçümleri.

Kritik misel konsantrasyonunun hesaplanabilmesi için paklitaksel içeren glikopolimerik miselin azalan farklı konsantrasyonları kullanıldı. DLS cihazında yapılan ölçümle konsantrasyona karşı intensite değerleri kullanılarak kritik misel konsantrasyonu 0,4 mg/mL olarak belirlendi (Şekil 4.38). Kritik misel değeri için miselde yüzey aktif madde üzerinde değişiklikler yapılarak kritik misel konsantrasyonun optimum noktaya getirilmesi ileride yapılacak çalışmalar için amaçlanmaktadır [91].



Şekil 4.40: GM-PTX miseline ait kritik misel konsantrasyonu.

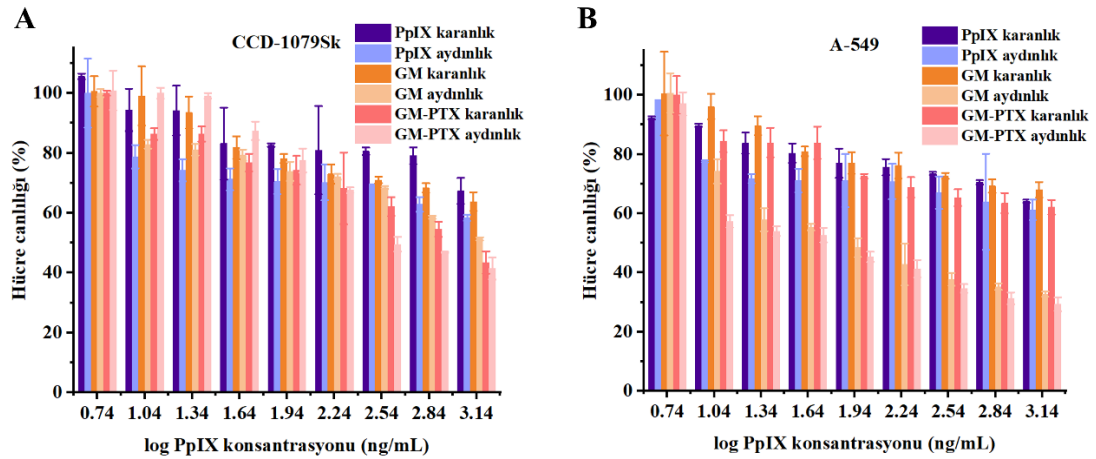
4.5. Karanlık/Aydınlık Sitotoksite Testi

Hücreleri 24 saat boyunca serbest PTX, serbest PpIX (misellerin içerdiği miktara denk olarak 1,9 µg/mL), GM ve GM-PTX olmak üzere 4 örnek hücrelere 9 farklı konsantrasyonda uygulandı. Aydınlık ve karanlık deneylerinin yapılabilmesi için PpIX içeren örnekler için ayrı plakalar hazırlanarak 34 dk boyunca 700 nm NIR ışığa maruz bırakıldı. Daha sonra MTT analizi kullanarak hücre canlılığını belirlendi. Örneklerle ait IC₅₀ değerleri Tablo 4.3'te görülmektedir. PpIX içeren örneklerle bakıldığında FDT uygulamasının IC₅₀ değerlerini ~2 kat düşürdüğü görülmektedir. Kombinasyonel terapide kullanılan ilaç yüklü GM-PTX glikopolimerik miseli serbest PpIX'e kıyasla CCD-1079Sk ~2 kat, A-549 akciğer kanser hattı hücrelerinde ise ~10 kat daha etkin olduğu görülmektedir. Bu durum glikopolimer bazlı misellerin kanser hücrelerindeki etkin hücre içi alımından kaynaklanmaktadır [37].

Tablo 4.3 : IC₅₀(µg/mL) değerleri.

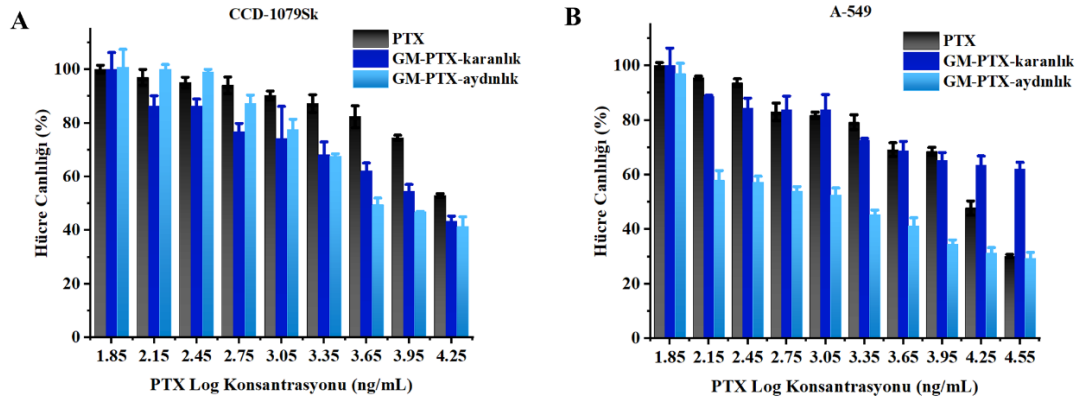
Örnek	IC-50 (µg/mL)			
	CCD-1079Sk		A-549	
	Karanlık	Aydınlık	Karanlık	Aydınlık
PpIX	1,758±0,005	0,862±0,004	1,557±0,003	0,976±0,004
GM	1,476±0,004	0,743±0,005	1,604±0,0039	0,065±0,007
GM-PTX	0,792±0,005 (7,787±0,006)	0,489±0,008 (6,339±0,008)	1,945±0,004 (25,834±0,004)	0,098±0,006 (1,281±0,006)
PTX	21,3±0,005		13,736±0,007	

9 farklı konsantrasyonda serbest PpIX uygulanan hücrelerde canlılığın %68’den büyük olduğu görülmüştür (Şekil 4.40). FDT’de kullanılan glikopolimer bazlı misel formdaki örnekler hücre içi alımdan kaynaklı olarak daha fazla etkinlik göstermiştir. Kemo-FDT kombinasyonel terapisine bağlı olarak GM-PTX’in uygulandığı aydınlık örneklerinde sinerjik etki görülmektedir.



Şekil 4.41 : PpIX konsantrasyonuna göre A) CCD-1079Sk ve B) A-549 hücreleri karanlık-aydınlık MTT analizi.

PTX konsantrasyonuna göre glikopolimerik yapılı ilaç yüklü miseller serbest PTX’e kıyasla hücreler üzerinde daha sitotoksik etki göstermiştir (Şekil 4.41). Sağlıklı fibroblast hücre hattı CCD-1079Sk hücrelerine kıyasla PTX yüklü glikopolimerler A-549 akciğer kanseri hücrelerinde daha etkilidir. Fotodinamik terapide ROS kaynaklı ışığa maruz kalan ilaç yüklü misel yapıları kanser hücrelerinde, ~19,8 kat IC₅₀ değerini düşürmektedir. Bu yüzden aydınlık ortam Özellikle GM-PTX misel yapısının GM ve serbest PTX’e göre kanser hücrelerini büyük oranda öldürmesi kemo ve FDT’nin bir etki yaptığını göstermektedir.



Şekil 4.42: PTX konsantrasyonuna göre A) CCD-1079Sk ve B) A-549 hücreleri karanlık-aydınlık MTT analizi.

5. SONUÇLAR

FDT-Kemo kombinasyonel terapisi için amaçlanan glikopolimerik misel yapıları başarılı bir şekilde sentezlenmiştir. Öncelikle polimerizasyonda kullanılacak RAFT ajanı %91 verimlilikle sentezlenerek ^1H NMR ve ^{13}C NMR ile karakterize edilmiştir. Daha sonra polimerin modifikasyonunda kullanılmak üzere Gluc- N_3 , *ipr*Fruc- N_3 ve PpIX- N_3 başarılı bir şekilde sentezlenerek ^1H NMR ve FTIR ile karakterize edilmiştir. Ayrıca polimer bloğunu oluşturacak TMSpMA monomeri de %88 verimlilikle sentezlenmiş, ^1H NMR ve ^{13}C NMR karakterize edilmiştir. RAFT polimerizasyon yöntemiyle hazırlanan diblok polimerin ağırlığı GPC'den 17,900 g/mol bulunmuştur. Sonrasında Gluc N_3 , PpIX- N_3 bileşiklerinin P(pMA-*b*-BA) polimer zincirine kazandırılması azit-alkin halka katılma click reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen glikopolimerler ile nanoçöktürme yöntemi kullanılarak ilaç yüklü (GM-PTX) ve yüksüz (GM) glikopolimerik miseller sentezlenmiştir. Sentezlenen glikopolimerik miseller DLS, TEM, UV-Vis ve HPLC ile karakterize edilmiştir.

İlaç yüklü ve yüksüz olarak sentezlenen her iki misel yapısının da boyutu 30 nm'den küçük, zeta potansiyel değerleri misellerin yüzeyinde bulunan şeker gruplarından kaynaklı $\sim$ -20 dolaylarındadır. Elde ettiğimiz sonuçlar EPR etkisinden yararlanabilmek için hazırlanan misellerin boyutunun uygun olduğunu göstermektedir. Sadece FDT özellikli (GM) ve kemo-FDT özellikli glikopolimerik misellerin (GM-PTX), A549 akciğer kanseri hücre hattı ve CCD-1079Sk sağlıklı fibroblast hücre hattı üzerindeki karanlık-aydınlık sitotoksik etkileri incelenmiş ve çıkan sonuçlar kombinasyonel terapi için tasarladığımız taşıyıcı sistemin ROS ve kemoterapi etkisiyle kanser hücrelerini apoptoza yönlendiren potansiyel bir pasif hedefli ilaç taşıyıcı sistem olduğunu göstermektedir. Çalışmada sentezlediğimiz *ipr*Fruc- N_3 kullanılarak yeni misel yapılarının oluşturulması ileri çalışmalar olarak belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] **Tarannum, N., Kumar, D., Surya, S. G., & Dramou, P.** (2022). Point-of-care detection assay based on biomarker-imprinted polymer for different cancers: a state-of-the-art review. *Polymer Bulletin*, 1-46.
- [2] **Valentiner, U., Knips, J., Pries, R., Clauditz, T., Münscher, A., Sauter, G., ... & Schumacher, U.** (2019). Selectin binding sites are involved in cell adhesive properties of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancers*, 11(11), 1672.
- [3] **Maeda, H.** (2017). Polymer therapeutics and the EPR effect. *Journal of drug targeting*, 25(9-10), 781-785.
- [4] Process of cancer development. (2022). 21 Mayıs 2022'de <https://www.dreamstime.com> adresinden alındı.
- [5] **Bogunia-Kubik, K., & Sugisaka, M.** (2002). From molecular biology to nanotechnology and nanomedicine. *Biosystems*, 65(2-3), 123-138.
- [6] **Gessner, I., & Neundorff, I.** (2020). Nanoparticles modified with cell-penetrating peptides: Conjugation mechanisms, physicochemical properties, and application in cancer diagnosis and therapy. *International journal of molecular sciences*, 21(7), 2536.
- [7] **Salkho, N. M., Awad, N. S., Pitt, W. G., & Hussein, G. A.** (2022). Photo-Induced Drug Release from Polymeric Micelles and Liposomes: Phototriggering Mechanisms in Drug Delivery Systems. *Polymers*, 14(7), 1286.
- [8] **Park, K.** (2007). Nanotechnology: What it can do for drug delivery. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 120(1-2), 1.
- [9] **Zhao, C. Y., Cheng, R., Yang, Z., & Tian, Z. M.** (2018). Nanotechnology for cancer therapy based on chemotherapy. *Molecules*, 23(4), 826.
- [10] **Maeda, H.** (2021). The 35th Anniversary of the Discovery of EPR Effect: A New Wave of Nanomedicines for Tumor-Targeted Drug Delivery—Personal Remarks and Future Prospects. *Journal of personalized medicine*, 11(3), 229.
- [11] **Fan, W., Yung, B., Huang, P., & Chen, X.** (2017). Nanotechnology for multimodal synergistic cancer therapy. *Chemical reviews*, 117(22), 13566-13638.
- [12] **Wong, X. Y., Sena-Torralba, A., Alvarez-Diduk, R., Muthoosamy, K., & Merkoçi, A.** (2020). Nanomaterials for nanotheranostics: tuning their properties according to disease needs. *ACS nano.*, 14(3), 2585-2627.
- [13] **Park, J., Choi, Y., Chang, H., Um, W. ve ark.** (2019). “Alliance with EPR Effect: Combined Strategies to Improve the EPR Effect in the Tumor Microenvironment”. *Theranostics*, 9(26): 8073–8090.

- [14] **Günay, K. A., Theato, P., & Klok, H. A.** (2013). Standing on the shoulders of Hermann Staudinger: Post-polymerization modification from past to present. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 51(1), 1-28.
- [15] **Odian, G.** (2004). *Principles of polymerization*. John Wiley & Sons.
- [16] **Baysal, B.,** (1994). *Polimer Kimyası, İkinci Baskı*, O.D.T.Ü. Basımevi, Ankara.
- [17] **Szwarc, M.** (1956). ‘Living’ polymers. *Nature*, 178(4543), 1168-1169.
- [18] **Nicolas, J., Guillaneuf, Y., Lefay, C., Bertin, D., Gimes, D., & Charleux, B.** (2013). Nitroxide-mediated polymerization. *Progress in Polymer Science*, 38(1), 63-235.
- [19] **Nicolas, J., Guillaneuf, Y., Lefay, C., Bertin, D., Gimes, D., & Charleux, B.** (2013). Nitroxide-mediated polymerization. *Progress in Polymer Science*, 38(1), 63-235.
- [20] **Soly, S., Mistry, B., & Murthy, C. N.** (2022). Photo-mediated metal-free atom transfer radical polymerization: recent advances in organocatalysts and perfection towards polymer synthesis. *Polymer International*, 71(2), 159-168.
- [21] **Corbin, D. A., & Miyake, G. M.** (2021). Photoinduced Organocatalyzed Atom Transfer Radical Polymerization (O-ATRP): Precision Polymer Synthesis Using Organic Photoredox Catalysis. *Chemical Reviews*.
- [22] **Zhu, J., Zhou, D., Zhu, X., & Chen, G.** (2004). Reversible addition–fragmentation chain transfer polymerization of glycidyl methacrylate with 2-cyanoprop-2-yl 1-dithionaphthalate as a chain-transfer agent. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 42(10), 2558-2565.
- [23] **Öztürk, T., Yavuz, M., Göktaş, M., & Hazer, B.** (2016). One-step synthesis of triarm block copolymers by simultaneous atom transfer radical and ring-opening polymerization. *Polymer bulletin*, 73(6), 1497-1513.
- [24] **Garnier, S., & Laschewsky, A.** (2005). Synthesis of new amphiphilic diblock copolymers and their self-assembly in aqueous solution. *Macromolecules*, 38(18), 7580-7592.
- [25] **Moad, G., Rizzardo, E., & Thang, S. H.** (2005). Living radical polymerization by the RAFT process. *Australian journal of chemistry*, 58(6), 379-410.
- [26] **Semsarilar, M., & Abetz, V.** (2021). Polymerizations by RAFT: Developments of the Technique and Its Application in the Synthesis of Tailored (Co) polymers. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 222(1), 2000311.
- [27] **Moses, J. E., & Moorhouse, A. D.** (2007). The growing applications of click chemistry. *Chemical Society Reviews*, 36(8), 1249-1262.
- [28] **Hein, C. D., Liu, X. M., & Wang, D.** (2008). Click chemistry, a powerful tool for pharmaceutical sciences. *Pharmaceutical research*, 25(10), 2216-2230.
- [29] **Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V., & Sharpless, K. B.** (2002). A stepwise huisgen cycloaddition process: copper (I)-catalyzed regioselective “ligation” of azides and terminal alkynes. *Angewandte Chemie*, 114(14), 2708-2711.
- [30] **Huisgen, R.** (1963). Kinetics and mechanism of 1, 3-dipolar cycloadditions. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 2(11), 633-645.

- [31] **Sung, Y. K., & Kim, S. W.** (2020). Recent advances in polymeric drug delivery systems. *Biomaterials Research*, 24(1), 1-12.
- [32] **Liechty, W. B., Kryscio, D. R., Slaughter, B. V., & Peppas, N. A.** (2010). Polymers for drug delivery systems. *Annual review of chemical and biomolecular engineering*, 1, 149-173.
- [33] **Maeda, H., Bharate, G. Y., & Daruwalla, J.** (2009). Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 71(3), 409-419.
- [34] **Jain, K., Kesharwani, P., Gupta, U., & Jain, N. K.** (2012). A review of glycosylated carriers for drug delivery. *Biomaterials*, 33(16), 4166-4186.
- [35] **Gu, L., Faig, A., Abdelhamid, D., & Uhrich, K.** (2014). Sugar-based amphiphilic polymers for biomedical applications: from nanocarriers to therapeutics. *Accounts of chemical research*, 47(10), 2867-2877.
- [36] **Zhang, Y., Chan, J. W., Moretti, A., & Uhrich, K. E.** (2015). Designing polymers with sugar-based advantages for bioactive delivery applications. *Journal of Controlled Release*, 219, 355-368.
- [37] **Amann, T., & Hellerbrand, C.** (2009). GLUT1 as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *Expert opinion on therapeutic targets*, 13(12), 1411-1427.
- [38] **Moldogazieva, N. T., Mokhosev, I. M., & Terentiev, A. A.** (2020). Metabolic heterogeneity of cancer cells: an interplay between HIF-1, GLUTs, and AMPK. *Cancers*, 12(4), 862.
- [39] **Dag, A., Omurtag Ozgen, P. S., & Atasoy, S.** (2019). Glyconanoparticles for targeted tumor therapy of platinum anticancer drug. *Biomacromolecules*, 20(8), 2962-2972.
- [40] **Babiuch, K., Dag, A., Zhao, J., Lu, H., & Stenzel, M. H.** (2015). Carbohydrate-specific uptake of fucosylated polymeric micelles by different cancer cell lines. *Biomacromolecules*, 16(7), 1948-1957.
- [41] **Lu, J., Li, Z., Zink, J. I., & Tamanoi, F.** (2012). In vivo tumor suppression efficacy of mesoporous silica nanoparticles-based drug-delivery system: enhanced efficacy by folate modification. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 8(2), 212-220.
- [42] **Upadhyay, M., Samal, J., Kandpal, M., Singh, O. V., & Vivekanandan, P.** (2013). The Warburg effect: insights from the past decade. *Pharmacology & therapeutics*, 137(3), 318-330.
- [43] **Park, K.** (2007). Nanotechnology: What it can do for drug delivery. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 120(1-2), 1.
- [44] **Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., ... & Golab, J.** (2011). Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61(4), 250-281.
- [45] **Sai, D. L., Lee, J., Nguyen, D. L., & Kim, Y. P.** (2021). Tailoring photosensitive ROS for advanced photodynamic therapy. *Experimental & Molecular Medicine*, 53(4), 495-504.
- [46] **Juarranz, Á., Jaén, P., Sanz-Rodríguez, F., Cuevas, J., & González, S.** (2008). Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clinical and Translational Oncology*, 10(3), 148-154.

- [47] **Robertson, C. A., Evans, D. H., & Abrahamse, H.** (2009). Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 96(1), 1-8.
- [48] **Janas, K., Boniewska-Bernacka, E., Dyrda, G., & Słota, R.** (2021). Porphyrin and phthalocyanine photosensitizers designed for targeted photodynamic therapy of colorectal cancer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 30, 115926.
- [49] **Castano, A. P., Demidova, T. N., & Hamblin, M. R.** (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 1(4), 279-293.
- [50] **Haimov, E., Weitman, H., Polani, S., Schori, H., Zitoun, D., & Shefi, O.** (2018). meso-Tetrahydroxyphenylchlorin-conjugated gold nanoparticles as a tool to improve photodynamic therapy. *ACS applied materials & interfaces*, 10(3), 2319-2327.
- [51] **Overholt, B. F., Lightdale, C. J., Wang, K. K., Canto, M. I., Burdick, S., Haggitt, R. C., ... & International Photodynamic Group for High-Grade Dysplasia in Barrett's Esophagus.** (2005). Photodynamic therapy with porfimer sodium for ablation of high-grade dysplasia in Barrett's esophagus: international, partially blinded, randomized phase III trial. *Gastrointestinal endoscopy*, 62(4), 488-498.
- [52] **Yang, M., Jiang, D., Chen, Z., & Chen, J.** (2016). Photodynamic therapy of drug-resistant human colon adenocarcinoma using verteporfin-loaded TPGS nanoparticles with tumor homing and penetrating peptide functionalization. *RSC advances*, 6(103), 100984-100992.
- [53] **Pucelik, B., Arnaut, L. G., Stochel, G., & Dabrowski, J. M.** (2016). Design of Pluronic-based formulation for enhanced redaporfin-photodynamic therapy against pigmented melanoma. *ACS applied materials & interfaces*, 8(34), 22039-22055.
- [54] **Hu, S., Yang, Y., Jiang, B., Su, D., Zhang, L., Huang, Z., & Zhang, F.** (2019). Treatment of condyloma acuminatum using the combination of laser ablation and ALA-PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 25, 193-196.
- [55] **Allison, R. R., & Sibata, C. H.** (2010). Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: a clinical review. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 7(2), 61-75.
- [56] **Jia, H. R., Zhu, Y. X., Chen, Z., & Wu, F. G.** (2017). Cholesterol-assisted bacterial cell surface engineering for photodynamic inactivation of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(19), 15943-15951.
- [57] **Rossi, L. M., Silva, P. R., Vono, L. L., Fernandes, A. U., Tada, D. B., & Baptista, M. S.** (2008). Protoporphyrin IX nanoparticle carrier: preparation, optical properties, and singlet oxygen generation. *Langmuir*, 24(21), 12534-12538.
- [58] **Nakayama, T., Otsuka, S., Kobayashi, T., Okajima, H., Matsumoto, K., Hagiya, Y., ... & Ogura, S. I.** (2016). Dormant cancer cells accumulate high

protoporphyrin IX levels and are sensitive to 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. *Scientific reports*, 6(1), 1-12.

- [59] **Kitajima, Y., Ishii, T., Kohda, T., Ishizuka, M., Yamazaki, K., Nishimura, Y., ... & Nakajima, M.** (2019). Mechanistic study of PpIX accumulation using the JFCR39 cell panel revealed a role for dynamin 2-mediated exocytosis. *Scientific reports*, 9(1), 1-11.
- [60] **Kobuchi, H., Moriya, K., Ogino, T., Fujita, H., Inoue, K., Shuin, T., ... & Utsumi, T.** (2012). Mitochondrial localization of ABC transporter ABCG2 and its function in 5-aminolevulinic acid-mediated protoporphyrin IX accumulation. *PloS one*, 7(11), e50082.
- [61] **El-Khatib, M., Tepe, C., Senger, B., Dibué-Adjei, M., Riemenschneider, M. J., Stummer, W., ... & Cornelius, J. F.** (2015). Aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy of human meningioma: an *in vitro* study on primary cell lines. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(5), 9936-9948.
- [62] **Kim, C. H., Chung, C. W., Choi, K. H., Yoo, J. J., Kim, D. H., Jeong, Y. I., & Kang, D. H.** (2011). Effect of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy via reactive oxygen species in human cholangiocarcinoma cells. *International journal of nanomedicine*, 6, 1357.
- [63] **Hino, H., Murayama, Y., Nakanishi, M., Inoue, K., Nakajima, M., & Otsuji, E.** (2013). 5-Aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy using light-emitting diodes of different wavelengths in a mouse model of peritoneally disseminated gastric cancer. *Journal of surgical research*, 185(1), 119-126.
- [64] **Mohammadi, Z., Sazgarnia, A., Rajabi, O., Soudmand, S., Esmaily, H., & Sadeghi, H. R.** (2013). An *in vitro* study on the photosensitivity of 5-aminolevulinic acid conjugated gold nanoparticles. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 10(4), 382-388.
- [65] **Sailer, R., Strauss, W. S., Wagner, M., Emmert, H., & Schneckenburger, H.** (2007). Relation between intracellular location and photodynamic efficacy of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX *in vitro*. Comparison between human glioblastoma cells and other cancer cell lines. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 6(2), 145-151.
- [66] **Ohgari, Y., Miyata, Y., Miyagi, T., Gotoh, S., Ohta, T., Kataoka, T., ... & Taketani, S.** (2011). Roles of Porphyrin and Iron Metabolisms in the δ -Aminolevulinic Acid (ALA)-induced Accumulation of Protoporphyrin and Photodamage of Tumor Cells. *Photochemistry and photobiology*, 87(5), 1138-1145.
- [67] **Rossi, L. M., Silva, P. R., Vono, L. L., Fernandes, A. U., Tada, D. B., & Baptista, M. S.** (2008). Protoporphyrin IX nanoparticle carrier: preparation, optical properties, and singlet oxygen generation. *Langmuir*, 24(21), 12534-12538.
- [68] **Homayoni, H., Jiang, K., Zou, X., Hossu, M., Rashidi, L. H., & Chen, W.** (2015). Enhancement of protoporphyrin IX performance in aqueous solutions for photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 12(2), 258-266.

- [69] **Li, S. Y., Cheng, H., Qiu, W. X., Liu, L. H., Chen, S., Hu, Y., ... & Zhang, X. Z.** (2015). Protease-activable cell-penetrating peptide–protoporphyrin conjugate for targeted photodynamic therapy in vivo. *ACS applied materials & interfaces*, 7(51), 28319-28329.
- [70] **Martínez-García, C., Medina-Flores, Y., de la Rosa-Vázquez, J. M., Soriano-Pérez, E. E., Villalobos-Hernández, J. R., & Ramón-Gallegos, E.** (2018). Theranostic-PDT with the antibody anti isoform 4 SOD mitochondrial labeled with PpIX in the lung cancer cell line A-549. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 22, 197-204.
- [71] **Lee, S. J., Koo, H., Lee, D. E., Min, S., Lee, S., Chen, X., ... & Choi, K.** (2011). Tumor-homing photosensitizer-conjugated glycol chitosan nanoparticles for synchronous photodynamic imaging and therapy based on cellular on/off system. *Biomaterials*, 32(16), 4021-4029.
- [72] **Ding, H., Sumer, B. D., Kessinger, C. W., Dong, Y., Huang, G., Boothman, D. A., & Gao, J.** (2011). Nanoscopic micelle delivery improves the photophysical properties and efficacy of photodynamic therapy of protoporphyrin IX. *Journal of Controlled Release*, 151(3), 271-277.
- [73] **Langer, C. J., Hirsh, V., Ko, A., Renschler, M. F., & Socinski, M. A.** (2015). Weekly nab-paclitaxel in combination with carboplatin as first-line therapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer: analysis of safety and efficacy in patients with renal impairment. *Clinical lung cancer*, 16(2), 112-120.
- [74] **Du, X., Khan, A. R., Fu, M., Ji, J., Yu, A., & Zhai, G.** (2018). Current development in the formulations of non-injection administration of paclitaxel. *International journal of pharmaceutics*, 542(1-2), 242-252.
- [75] **Singla, A. K., Garg, A., & Aggarwal, D.** (2002). Paclitaxel and its formulations. *International journal of pharmaceutics*, 235(1-2), 179-192.
- [76] **Prabhakar, A., & Banerjee, R.** (2019). Nanobubble liposome complexes for diagnostic imaging and ultrasound-triggered drug delivery in cancers: a theranostic approach. *ACS omega*, 4(13), 15567-15580.
- [77] **Liu, D., Wang, C., Yang, J., An, Y., Yang, R., & Teng, G.** (2020). CRGDK-Functionalized PAMAM-Based Drug-Delivery System with High Permeability. *ACS omega*, 5(16), 9316-9323.
- [78] **Wang, T., Petrenko, V. A., & Torchilin, V. P.** (2010). Paclitaxel-loaded polymeric micelles modified with MCF-7 cell-specific phage protein: enhanced binding to target cancer cells and increased cytotoxicity. *Molecular pharmaceutics*, 7(4), 1007-1014.
- [79] **Wu, J., Liu, Y., Tang, Y., Wang, S., Wang, C., Li, Y., ... & Lu, G.** (2016). Synergistic chemo–photothermal therapy of breast cancer by mesenchymal stem cell-encapsulated yolk–shell GNR@ HPMO-PTX nanospheres. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(28), 17927-17935.
- [80] **Otvagin, V. F., Kuzmina, N. S., Kudriashova, E. S., Nyuchev, A. V., Gavryushin, A. E., & Fedorov, A. Y.** (2022). Conjugates of Porphyrinoid-Based Photosensitizers with Cytotoxic Drugs: Current Progress and Future Directions toward Selective Photodynamic Therapy. *Journal of medicinal chemistry*.

- [81] **Liu, L. H., Qiu, W. X., Zhang, Y. H., Li, B., Zhang, C., Gao, F., ... & Zhang, X. Z.** (2017). A charge reversible self-delivery chimeric peptide with cell membrane-targeting properties for enhanced photodynamic therapy. *Advanced Functional Materials*, 27(25), 1700220.
- [82] **Huang, Z., Wei, G., Zeng, Z., Huang, Y., Huang, L., Shen, Y., ... & Zhao, C.** (2019). Enhanced cancer therapy through synergetic photodynamic/immune checkpoint blockade mediated by a liposomal conjugate comprised of porphyrin and IDO inhibitor. *Theranostics*, 9(19), 5542.
- [83] **Yuan, J., Huang, X., Li, P., Li, L., & Shen, J.** (2013). Surface-initiated RAFT polymerization of sulfobetaine from cellulose membranes to improve hemocompatibility and antibiofouling property. *Polymer Chemistry*, 4(19), 5074-5085.
- [84] **Lu, Y., & Just, G.** (2001). Stereoselective synthesis of dithymidine phosphorothioates using d-xylose derived chiral auxiliaries. *Tetrahedron*, 57(9), 1677-1687.
- [85] **Li, S. C., Meng, X. B., Cai, M. S., & Li, Z. J.** (2006). Optimized Procedure for the Synthesis of 6-Azido-6-deoxy-galactopyranosides From 6-O-Tosyl-galactopyranosides. *Synthetic communications*, 36(5), 637-643.
- [86] **Amirshaghghi, A., Altun, B., Nwe, K., Yan, L., Stein, J. M., Cheng, Z., & Tsourkas, A.** (2018). Site-specific labeling of cyanine and porphyrin dye-stabilized nanoemulsions with affibodies for cellular targeting. *Journal of the American Chemical Society*, 140(42), 13550-13553.
- [87] **Yu, Y., Chen, C. K., Law, W. C., Mok, J., Zou, J., Prasad, P. N., & Cheng, C.** (2013). Well-defined degradable brush polymer–drug conjugates for sustained delivery of paclitaxel. *Molecular pharmaceutics*, 10(3), 867-874.
- [88] **Washington, K. E., Kularatne, R. N., Biewer, M. C., & Stefan, M. C.** (2018). Combination loading of doxorubicin and resveratrol in polymeric micelles for increased loading efficiency and efficacy. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 4(3), 997-1004.
- [89] **Ranade, S. V., Miller, K. M., Richard, R. E., Chan, A. K., Allen, M. J., & Helmus, M. N.** (2004). Physical characterization of controlled release of paclitaxel from the TAXUS™ Express2™ drug-eluting stent. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 71(4), 625-634.
- [90] **Huang, D., Zhuang, Y., Shen, H., Yang, F., Wang, X., & Wu, D.** (2018). Acetal-linked PEGylated paclitaxel prodrugs forming free-paclitaxel-loaded pH-responsive micelles with high drug loading capacity and improved drug delivery. *Materials Science and Engineering: C*, 82, 60-68.
- [91] **Topel, Ö., Çakır, B. A., Budama, L., & Hoda, N.** (2013). Determination of critical micelle concentration of polybutadiene-block-poly (ethyleneoxide) diblock copolymer by fluorescence spectroscopy and dynamic light scattering. *Journal of Molecular Liquids*, 177, 40-43.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Emine KESKİN YALÇIN

Doğum Tarihi ve Yeri :

E-posta :

ÖĞRENİM DURUMU:

- Lisans : 2017, Necmettin Erbakan Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoteknoloji

YÜKSEK LİSANS TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER

Keskin Yalcin, E., Cetin Ersen, B., Gencoglu, T., Dag, A., “Synthesis of Paclitaxel Loaded Polymeric Nanoparticles and Evaluation Their Efficacy in Combinational Therapy”, *20th International Pharmaceutical Technology Symposium*, Ankara, Turkey, February 21-23, 2022.