T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTİBAKTERİYEL POLİMER PEPTİD KONJUGATLARININ GELİŞTİRİLMESİ

Damla GÖKKAYA ÖZBURUN

DOKTORA TEZİ
Biyomühendislik Anabilim Dalı
Biyomühendislik Programı

Danışman
Doç. Dr. Murat TOPUZOĞULLARI

Eş-Danışman
Prof. Dr. Mehmet Murat ÖZMEN

Haziran, 2025

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTİBAKTERİYEL POLİMER PEPTİD KONJUGATLARININ GELİŞTİRİLMESİ

Damla GÖKKAYA ÖZBURUN tarafından hazırlanan tez çalışması 27.06.2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı Biyomühendislik Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Murat TOPUZOĞULLARI
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Prof. Dr. Mehmet Murat ÖZMEN
Yıldız Teknik Üniversitesi
Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Murat TOPUZOĞULLARI, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Tülin ÖZBEK, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Azime ERARSLAN , Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Suzan ABDURRAHMANOĞLU, Üye
Marmara Üniversitesi _____

Doç. Dr. Emine ALARÇİN, Üye
Marmara Üniversitesi _____

Danışmanım Doç. Dr. Murat TOPUZOĞULLARI sorumluluğunda tarafımca hazırlanan Antibakteriyel Polimer Peptid Konjugatlarının Geliştirilmesi başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Damla GÖKKAYA ÖZBURUN

İmza

Bu çalışma, "Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı'nın 11940" numaralı projesi ile desteklenmiştir. Bu çalışma, "Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı'nın Grup A Acil Ar-Ge Proje Destek Programı tarafından TUSEB/2022-ACİL-01/11940" numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Aileme ve Eşime

TEŞEKKÜR

Öncelikle lisans tezimden itibaren yüksek lisans ve doktora eğitimim boyunca engin bilgi ve deneyimlerini paylaşmayı esirgemeyen, hem akademik alandaki hem laboratuvar tecrübeleri ile uzmanlık alanımın ilerlemesinde ve tez çalışmamın şekillenmesinde her daim büyük emeği olan, yolculuğumun en başından itibaren bana rehberlik eden kıymetli danışman hocam Doç. Dr. Murat TOPUZOĞULLARI'na sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı borç bilirim.

Tez çalışmama önemli katkılar sağlayan, lisans, yüksek lisans ve doktora eğitimimdeki akademik çalışmalarım boyunca desteğini benden esirgemeyen, bilimsel yolda ilerlememde büyük katkısı olan ve hep yol gösteren değerli eş danışmanım Prof. Dr. Mehmet Murat ÖZMEN'e derin bir minnet ve saygı ile teşekkürlerimi sunarım.

Prof. Dr. Suzan Abdurrahmanoğlu ve Prof. Dr. Tülin ÖZBEK tez sürecimdeki çalışmalarımdaki öneri ve büyük katkılarından dolayı,

Çalışmalarımın ilerlemesine imkan sağlayan Biyomühendislik Bölümü'ne, Biyomühendislik Bölümü'ndeki sevgili hocalarıma ve arkadaşlarıma,

Grup A Acil Ar-Ge Proje Destek Programı tarafından TUSEB/2022-ACİL-01/11940 numaralı projesi ile maddi destek sağlayan Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı'na,

Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından yürütülen 2211-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs programı kapsamında TÜBİTAK'a,

Türkiye Cumhuriyeti Yükseköğretim Kurulu (YÖK) tarafından sağlanan 100/2000 YÖK Doktora Burs Programı kapsamında YÖK'e teşekkürlerimi sunarım.

Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü KMC-306/307 laboratuvarlarındaki tüm çalışma ekibime desteklerinden ve arkadaşlıklarından, Hande Hançer'e biyolojik aktivite çalışmalarındaki katkılarından dolayı sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Desteklerini ve sevgilerini asla esirgemeyen ve her anımda yanımda hissettiğim, tez çalışmam boyunca beni motive edip bana aile gibi hissetiren değerli arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

Beni bugünlere getiren bütün eğitim ve öğretim hayatım boyunca izlediğim yolda sevgilerini ve desteklerini esirgemeyen her anımda yanımda olan annem ve babam Özden ve Mücahit GÖKKAYA'ya ve canım ablam Gizem GÖKKAYA'ya ve bana her zaman rol model olan kuzenim Gülden YÜREKTÜRK'e emeklerinden dolayı teşekkürlerimi ve sonsuz sevgilerimi borç bilirim.

Son olarak hayatımda, attığım adımlarda ve akademik kariyerimde en büyük destekçim olan, tüm zorlu süreçlerimde sevgisiyle beni her zaman motive eden, benden sabrını ve enerjisini esirgemeyen canım eşim Ömer Faruk ÖZBURUN'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi borç bilirim.

Damla GÖKKAYA ÖZBURUN

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ x

KISALTMA LİSTESİ xi

ŞEKİL LİSTESİ xiv

TABLO LİSTESİ xvii

ÖZET xviii

ABSTRACT xx

1 GİRİŞ 1

1.1 Literatür Özeti 1

1.2 Tezin Amacı 5

1.3 Hipotez 6

2 GENEL BİLGİLER 7

2.1 Antibakteriyel Polimerler 7

2.1.1 Kendiliğinden Antibakteriyel Polimerler 9

2.2 Antibakteriyel Peptidler 13

2.3 Antibakteriyel Polimerler ve Antibakteriyel Peptidlerin Etki Mekanizmaları 15

2.3.1 Antibakteriyel Polimerlerin Etki Mekanizması 19

2.3.2 Antibakteriyel Peptidlerin Etki Mekanizması 20

2.3.3 Antibakteriyel Polimer-Peptidlerin Konjugatlarının Etki Mekanizması 22

2.4 Antibakteriyel Polimer-Peptid Konjugatları 23

2.5 Antibakteriyel Polimer-Peptid Konjugatlarının Mimari Yapıları . . . 27

2.6 Antibakteriyel Polimer-Peptid Konjugatlarının Uygulama Alanları . 30

3 MATERYAL VE YÖNTEMLER 32

3.1 Kimyasal Malzemeler 32

3.2 Kullanılan Cihazlar 33

3.3 Deneysel Yöntemler 34
3.3.1 Lineer Polimer-Peptid Konjugatı 34
3.3.2 Graft Polimer-Peptid Konjugatı 37
3.4 Karakterizasyon 40
3.4.1 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) Analizi 40
3.4.2 NMR Spektroskopisi ile Analizi 40
3.4.3 Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC) 41
3.4.4 UV-Vis Spektroskopisi 41
3.4.5 Floresans Spektroskopisi 41
3.4.6 Antibakteriyel Testler 41
3.4.7 Biyouyumluluk Testleri 42

4 BULGULAR VE TARTIŞMA 44
4.1 Lineer Polimer-Peptid Konjugatı 45
4.1.1 RAFT polimerizasyonuyla P(4VP-co-HPMA) kopolimerinin sentezi 45
4.1.2 P(4VP-co-HPMA) kopolimerinin zincir uç grubunun tiyol grubuna indirgenmesi 50
4.1.3 P(4VP-co-HPMA) kopolimerinin maleimid uç grubuna sahip RWWRWWR peptidi ile konjugasyonu 52
4.1.4 RWWRWWR peptidi ile konjuge edilmiş P(4VP-co-HPMA) kopolimerinin kuarternerleştirilmesi . . . 55
4.2 Graft Polimer-Peptid Konjugatı 57
4.2.1 Serbest Radikal Polimerizasyonu ile P(4VP-co-HPMA) kopolimerinin sentezi 57
4.2.2 SPVH kopolimerlerinin kuarternerleştirilmesi (QSPVH) . . 62
4.2.3 (QSPVH) kopolimerinin 6-bromohekzanoik asit ile kuarternizasyonu (QSPVH-C) 64
4.2.4 Kuarternize SPVH kopolimeri ve RWWRWWR peptidinin amid bağıyla konjugasyonu 65
4.3 Antibakteriyel Aktivitenin Değerlendirilmesi 73
4.3.1 Lineer Polimer-Peptid Konjugatının Antibakteriyel Aktivitesi 73
4.3.2 Graft Polimer-Peptid Konjugatının Antibakteriyel Aktivitesi 74
4.4 Hücre Canlılık Testi 75
4.4.1 Lineer Polimer-Peptid Konjugatının Hücre Canlılık Testi . . 75
4.4.2 Graft Polimer-Peptid Konjugatının Hücre Canlılık Testi . . . 77

5 SONUÇ 82

KAYNAKÇA 85

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **97**

SİMGE LİSTESİ

M_w	Ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı
α	Alfa
β	Beta
$[CTA]_0$	CTA ajanı başlangıç derişimi
Da	Dalton
ϵ	Epsilon
kDa	Kilodalton
n_{KA}	Kuarternizasyon ajanı mol sayısı
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
ppm	Milyon başına parça
M	Molarite
M_n	Sayıca ortalama molekül ağırlığı
$[I]_0$	Reaksiyon başlangıcında başlatıcı molaritesi
$[M]_0$	Reaksiyon başlangıcında monomer molaritesi
	derece

KISALTMA LİSTESİ

4VP	4-vinilpiridin
ABPep	Antibakteriyel peptid
ABPol	Antibakteriyel polimer
AIBN	Azobisisobütironitril
ABD	Antibakteriyel direnç
APMA	N-(3-aminopropil)-metakrilamid
Arg	Arjinin
BrH	1-Bromohekzan
Bt	Benzotriazolil
CS	Kitosan
CTA	4-siyano-4-(fenilkarbonotiyoltiyo)pentanoik asit
DCC	N,N'-Disikloheksilkarbodiimid
DIPEA	N,N-Diizopropiletilamin
DMA	N,N-dimetilakrilamid
DMEM	Dulbecco'nun Modifiye Edilmiş Eagle Besiyeri
DMF	Dimetilformamid
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EDA	Etilendiamin
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
FBS	Fetal sığır serumu

FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GPC	Jel Geçirgenlik Kromatografisi
H-NMR	Proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
HBTU	2-(1-H-benzotrizol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronyum hekzaflorofosfat
HEMA	2-Hidroksietil metakrilat
HI	Hemolitik indeks
HPMA	N-(2-hidroksipropil) metakrilamid
ISO	Uluslararası Standardizasyon Örgütü
KOB	Koloni oluşturan birimler
LPS	Lipopolisakkaritler
LTA	Lipoteikoik asitler
MA	Metakrilat
MİK	Minimum inhibitör konsantrasyon
MWCO	Moleküler Ağırlık Kesim Eşiği
MHB	Mueller hinton broth
Mn	Sayıca ortalama molekül ağırlığı
MTT	3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromür
NaCl	Sodyum klorür
NAG	N-asetilglukozaminin
NAM	N-asetilmuramik asit
NHS	N-hidroksisüksinimid
OBt	Hidroksibenzotriazol
OD	Optik yoğunluk
OEGMA	Oligo(etilen glikol) metil eter metakrilat
P(4VP)	Poli(4-vinilpiridin)
PDI	Polidispersite
PDMAEMA	Poli(2-dimetilaminoetil metakrilat)
PEG	Poli(etilen glikol)

PLL	Poli-l-lisin
PMA	Polimaleik anhidrit
R	Arjinin
RAFT	Tersinir Katılma-Parçalanma Zincir Transferi Polimerizasyonu
ROP	Halka açılması polimerizasyonu
ROS	Reaktif oksijen türleri
TA	Teikoik asitleri
TBP	Tribütilfosfin
W	Triptofan

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Antibakteriyel özelliğe sahip malzemelerin sınıflandırılması [44] . 8
Şekil 2.2 Katyonik doğal polimerler; (a) kuarternize kitosan, (b) kuarternize ε-PLL ve (c) kuarternize jelatin 10
Şekil 2.3 Katyonik sentetik polimerler; (a) kuarternize P(4VP), (b)kuarternize poli(etilen imin) ve (c) kuarternize PDMAEMA ve (d) poli(β-amino ester) 11
Şekil 2.4 P(4VP) polimerinin alkil halojenür ile kuarternizasyonu 12
Şekil 2.5 Farklı amino asit yapılarından oluşan peptid zinciri [74] 13
Şekil 2.6 ABPep'lerin sahip olduğu amfifilik yapı [81] 14
Şekil 2.7 Gram negatif bakterisinin hücre duvarının şematik gösterimi [88] 17
Şekil 2.8 Gram negatif bakterisinin hücre duvarının şematik gösterimi [88] 17
Şekil 2.9 Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerin antibiyotik direnç mekanizmaları [93] 18
Şekil 2.10 Katyonik polimerin bakteri hücresi ile elektrostatik etkileşimi [98] 20
Şekil 2.11 Membran hedefli ABPep'in bakteri hücresi ile etkileşim modelleri [104] 21
Şekil 2.12 ABPep-polimer konjugatının bakteri membranı üzerindeki etki mekanizması [107] 23
Şekil 2.13 Polimer-peptid konjugasyonunda kullanılan çeşitli reaksiyon mekanizmaları [112] 25
Şekil 2.14 Tiyol uç gruba sahip polimer ile maleimid uç gruba sahip peptidin konjugasyon mekanizması [115] 26
Şekil 2.15 Karboksil grubu ile amin grubu arasında HBTU bazı varlığında amid bağı oluşumu mekanizması ile polimer-peptid konjugasyonu [120] 27
Şekil 2.16 Farklı mimari yapılara sahip polimer-peptid konjugatları [124] . . 28
Şekil 3.1 P(4VP-co-HPMA)'nin RAFT polimerizasyonuyla sentezi. 34
Şekil 3.2 P(4VP-co-HPMA)'nin zincir uç grubunun etilendiamin ile tiyol grubuna indirgenmesi 36
Şekil 3.3 RWWRWWR peptidi ile P(4VP-co-HPMA) kopolimerinin konjugasyonu 36

Şekil 3.4 RWWRWWR peptidi ile konjuge edilmiş P(4VP-co-HPMA) kopolimerinin kuarternize edilmesi 37
Şekil 3.5 P(4VP-co-HPMA)'nin serbest radikal polimerizasyonuyla sentezlenmesi 37
Şekil 3.6 1-bromohekzan ile P(4VP-co-HPMA)'nin kuarternize edilmesi . . 39
Şekil 3.7 P(4VP-co-HPMA)'nin 1-bromohekzanoik asit ile kuarternize edilmesi 39
Şekil 3.8 COOH yan gruplara sahip SPVH kopolimerinin RWWRWWR peptidi ile konjugasyonu 40
Şekil 3.9 Broth mikrodilüsyon çalışması sırasında örneklerin 96'lı mikrolaka üzerindeki örnek konsantrasyon bilgilerinin şematik gösterimi 42
Şekil 4.1 PVH2'nin FT-IR spekturumu 46
Şekil 4.2 PVH4-2'nin FT-IR spekturumu 46
Şekil 4.3 Üretilen (a)PVH2 ve (b)PVH4-2 kopolimerlerinin ışık saçılması dedektöründen elde edilen GPC kromatogramları 47
Şekil 4.4 Üretilen (a) PVH2 ve (b) PVH4-2 kopolimerlerinin ^{1}H-NMR spektrumları 49
Şekil 4.5 PVH4-2 kopolimerinin ve indirgenmiş halinin (PVH4-2T) UV spektrumu 51
Şekil 4.6 PVH4-2 kopolimerinin ve indirgenmiş halinin (PVH4-2T) 280 nm'deki UV dedektörü tarafından alınan GPC kromatogramları . 52
Şekil 4.7 PVH4-2T, peptid ve PVH4-Pep1 konjugatının 280 nm'de UV dedektöründen elde edilen GPC kromatogramları 53
Şekil 4.8 PVH4-2T polimeri, peptid ve PVH4-Pep1 konjugatının saflaştırma sonrası floresan emisyon spektrumları (uyarma: 280 nm; emisyon: 290-600 nm) 54
Şekil 4.9 PVH4-Pep1 konjugatının kalibrasyon eğrisi 55
Şekil 4.10 Kuarternize edilmiş QPVH4-Pep1 konjugatının ^{1}H-NMR spektrumu 56
Şekil 4.11 SPVH2'nin FT-IR spekturumu 57
Şekil 4.12 SPVH5'in FT-IR spekturumu 58
Şekil 4.13 Üretilen SPVH2 kopolimerinin ışık saçılması dedektöründen elde edilen GPC kromatogramı 59
Şekil 4.14 SPVH2 kopolimerinin ^{1}H-NMR spektrumu 60
Şekil 4.15 SPVH5 polimerine ait GPC kromatogramı 61
Şekil 4.16 SPVH5 kopolimerinin ^{1}H-NMR spektrumu 62
Şekil 4.17 QSPVH2 kopolimerinin ^{1}H-NMR spektrumu 63
Şekil 4.18 QSPVH5 kopolimerinin ^{1}H-NMR spektrumu 63

Şekil 4.19 COOH grubu takılmış QSPVH2-C kopolimerlerinin ^{1}H-NMR spektrumu. 64
Şekil 4.20 COOH grubu takılmış QSPVH5-C kopolimerlerinin ^{1}H-NMR spektrumu. 65
Şekil 4.21 SPVH5 polimeri ve SPVH5-Pep3 konjugatının saflaştırma sonrası floresan emisyon spektrumları (uyarma: 280 nm; emisyon: 290-600 nm) 66
Şekil 4.22 SPVH5 polimeri ve SPVH5-Pep3 konjugatının 280 nm'de UV dedektöründen elde edilen GPC kromatogramları 67
Şekil 4.23 SH-RWWRWWR peptidinin kalibrasyon eğrisi 67
Şekil 4.24 SPVH5 polimeri ve SPVH5-Pep4 konjugatının saflaştırma sonrası floresan emisyon spektrumları (uyarma: 280 nm; emisyon: 290-600 nm) 68
Şekil 4.25 SPVH5 polimeri ve SPVH5-Pep4 konjugatının 280 nm'de UV dedektöründen elde edilen GPC kromatogramları 69
Şekil 4.26 SPVH5 polimeri ve SPVH5-Pep5 konjugatı saflaştırma sonrası floresan emisyon spektrumları (uyarma: 280 nm; emisyon: 290-600 nm) 70
Şekil 4.27 SPVH5 polimeri ve SPVH5-Pep6 konjugatı saflaştırma sonrası floresan emisyon spektrumları (uyarma: 280 nm; emisyon: 290-600 nm) 71
Şekil 4.28 SPVH5 polimeri, peptid ve SPVH5-Pep6 konjugatının 280 nm'de UV dedektöründen elde edilen GPC kromatogramları 72
Şekil 4.29 RWWRWWR peptidi, PVH4-Q2 polimeri, PVH4-Pep-Q konjugatının farklı bakterilere karşı MİK değerleri ve 10^{-4} seyreltmedeki petri görüntüleri 73
Şekil 4.30 RWWRWWR peptidi, SPVH5-Q polimeri ve SPVH5-Pep6 konjugatının farklı bakterilere karşı MİK değerleri ve 10^{-4} seyreltmedeki petri görüntüleri 74
Şekil 4.31 RWWRWWR peptidi, PVH4-Q2 polimeri ve lineer PVH4-Pep-Q konjugatıyla muamele edilmiş L929 hücrelerinin 24 saat inkübasyon sonrasında konsantrasyona bağlı hücre canlılığı değerleri 76
Şekil 4.32 RWWRWWR peptidi, QSPVH5 polimeri ve graft SPVH5-Pep6 konjugatıyla muamele edilmiş L929 hücrelerinin 24 saat inkübasyon sonrasında konsantrasyona bağlı hücre canlılığı değerleri 78

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1 Tez çalışmasında kullanılan kimyasal malzemeler 32
Tablo 3.2 Tez çalışmasında kullanılan cihazlar 33
Tablo 3.3 P(4VP-co-HPMA)'nin RAFT polimerizasyonuyla sentezlenmesi 35
Tablo 3.4 P(4VP-co-HPMA)'nin serbest radikal polimerizasyonuyla sentezlenmesi (SPVH) 38
Tablo 3.5 QSPVH5C polimeri ile antibakteriyel peptidinin sentez metodları 40
Tablo 4.1 Üretilen PVH kopolimerlerinin Mw ve Mw/Mn değerleri 48
Tablo 4.2 PVH kopolimerlerinin ^{1}H-NMR spektrumlarından elde edilen molce monomer yüzdeleri 50
Tablo 4.3 Üretilen SPVH kopolimerlerinin Mw ve Mw/Mn değerleri 58
Tablo 4.4 SPVH kopolimerlerinin ^{1}H-NMR spektrumlarından elde edilen molce monomer yüzdeleri 59

ÖZET

Antibakteriyel Polimer Peptid Konjugatlarının Geliştirilmesi

Damla GÖKKAYA ÖZBURUN

Biyomühendislik Anabilim Dalı
Doktora Tezi

Danışman: Doç. Dr. Murat TOPUZOĞULLARI
Eş-Danışman: Prof. Dr. Mehmet Murat ÖZMEN

Bakterilerin antibiyotiklere karşı giderek geliştirdikleri direnç farklı antibakteriyel malzemelere olan ilgili arttırmaktadır. Bu kapsamda geliştirilen antibakteriyel polimerler ve antibakteriyel peptidler genellikle yapılarında bulunan pozitif yüklü gruplar sayesinde bakteri hücrelerinin membranları ile elektrostatik etkileşime girerek bakterileri öldürme özelliğine sahiptirler. Antibiyotiklerden farklı etki mekanizmalarıyla antibakteriyel dirence karşı kullanılabilecek önemli malzeme sınıfları haline gelen bu moleküller bir araya getirilmesiyle oluşturulan antibakteriyel polimer-peptid konjugatlarının antibakteriyel dirence karşı kullanılabilecek daha etkin bir malzeme sınıfı olabileceği öngörülmüştür. Bu sebeple de bu antibakteriyel konjgatların üretilmesi ve biyolojik aktivitelerinin incelenmesi yüksek öneme sahiptir.

Bu tez çalışmasında, kendiliğinden antibakteriyel aktiviteye sahip 4-vinilpiridin (4VP) ve N-(2-hidroksipropil) metakrilamid (HPMA) monomerlerinden farklı polimerizasyon yöntemleri ile sentezlenen kopolimerler ve katyonik kısa zincirli antimikrobiyal peptid RWWRWWR'nin farklı moleküler mimarilerde polimer-peptid konjugatları tasarlanmıştır. Lineer ve graft mimaride üretilen konjugatlar, NMR spektroskopisi ve GPC analizleri ile karakterize edilerek kimyasal yapıları ve molekül ağırlıkları belirlenmiştir. Konjugasyon verimleri floresans spektroskopisi ile hesaplanmıştır. Antibakteriyel etkinlikleri *E. coli* ve *S. aureus* üzerinde değerlendirilmiş, biyouyumlulukları L929 fibroblast hücreleri üzerinde incelenmiştir. Graft polimer-peptid konjugatları, lineer

yapıdakilere kıyasla daha düşük minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri ile daha güçlü antibakteriyel aktivite sergilemiştir. Öte yandan, lineer konjugatlar biyouyumluluk açısından daha üstün bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar, moleküler mimarinin polimer-peptid konjugatlarının biyolojik performansı üzerinde belirleyici olduğunu göstermekte ve bu malzeme sistemlerinin bakteriyel enfeksiyonlarla mücadelede ve biyomedikal uygulamalarda potansiyel vaat ettiğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: 4-vinilpiridin, kuarternizasyon, antibakteriyel, konjugat

ABSTRACT

Development of Antibacterial Polymer Peptide Conjugates

Damla GÖKKAYA ÖZBURUN

Department of Bioengineering
Doctor of Philosophy Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Murat TOPUZOĞULLARI
Co-supervisor: Prof. Dr. Mehmet Murat ÖZMEN

The increasing resistance of bacteria to antibiotics has intensified interest in alternative antibacterial materials. In this context, antibacterial polymers and peptides, which typically exert their bactericidal effects through electrostatic interactions between their positively charged groups and bacterial cell membranes, have emerged as important material classes that can be employed against antibacterial resistance via mechanisms distinct from conventional antibiotics. It is hypothesized that antibacterial polymer-peptide conjugates, formed by combining these molecules, may represent a more effective class of materials to combat antibacterial resistance. Therefore, the synthesis and biological evaluation of such antibacterial conjugates hold significant importance.

In this thesis study, copolymers synthesized from 4-vinylpyridine (4VP), which inherently possess antibacterial activity, and N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide (HPMA) via different polymerization techniques, were designed to form polymer-peptide conjugates with the cationic short-chain antimicrobial peptide RWWRWWR in distinct molecular architectures. The conjugates, produced in linear and graft architectures, were characterized by NMR spectroscopy and GPC to determine their chemical structures and molecular weights. Conjugation efficiencies were quantified using fluorescence spectroscopy. Their antibacterial activities were assessed against *E. coli* and *S. aureus*, while biocompatibility was evaluated using L929 fibroblast cells. The graft polymer-peptide conjugates exhibited stronger antibacterial activity with lower minimum inhibitory

concentration (MIC) values compared to the linear counterparts. Conversely, linear conjugates demonstrated superior biocompatibility. These findings indicate that molecular architecture plays a critical role in the biological performance of polymer-peptide conjugates and suggest that these material systems hold promising potential for combating bacterial infections and for applications in biomedical fields.

Keywords: 4-vinylpyridine, antibacterial, quaternization, conjugate

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Patojenik bakterilerin yol açtığı enfeksiyonlar halk sağlığı için eskiden olduğu kadar günümüzde de önemli bir sorun oluşturmaktadır [1]. Antibiyotiklerin ortaya çıkmasıyla bakteriyel enfeksiyonların yol açtığı morbidite ve mortalite oranları büyük oranda düşmüş olmasına rağmen [2, 3], 2024 yılında Dünya Sağlık Örgütü'nün açıkladığı rapor, son yıllarda bakterilerin antibiyotiklere karşı önemli oranda direnç geliştirdiklerini, bakteriyel enfeksiyonların tedavilerinin zorlaştığını ve mevcut antibiyotiklerin bakterilerin direnç mekanizmalarına karşı etkisiz hale geldiğini belirtmektedir. Ayrıca antibakteriyel dirençle mücadelede bilimsel araştırmaların geliştirilmesinin kritik bir adım olduğunu vurgulamışlardır [4, 5]. Bakterilerin antibiyotiklere karşı artan direnci dünya çapında bulaşıcı hastalıkların ve ölümlerin artmasına neden olmuştur. Bu sebeple, mevcut antibiyotikler ve antibiyotik etki mekanizmalarından farklı olarak yeni ve özgün antibakteriyel malzemelerin geliştirilmesine yönelik araştırmaların sayısı büyük oranda artmıştır [6–8].

Son yıllarda; polimerler, peptidler, nanopartiküller ve hidrojeller gibi birçok farklı malzeme antibakteriyel özellikleri açısından incelenmekte ve bunların bir kısmı ticari olarak da kullanılmaktadır. Bu malzemelerin, dirençli bakteriyel patojenlere karşı da etki gösterebildikleri birçok çalışmada belirtilmiştir [9]. Polimerler, antibakteriyel malzemeler içinde önemli bir sınıfı oluşturmakta olup genellikle mikrobiyal canlılığı yok etme stratejisine yönelik olarak aktivite göstermektedir. Antibakteriyel polimerler (ABPol) kendiliğinden antibakteriyel özelliğe sahip olabildikleri gibi katyonik biyosit [10], antibakteriyel peptidler veya antibiyotikler gibi aktif maddelerle işlevselleştirilerek de bakterileri öldürebilmektedir [11]. Antibakteriyel polimerik malzemelerin sayısız örneği olmasına rağmen, bunların çoğu kuarterner amonyum gruplarına sahip doğal ve sentetik katyonik polimerik sistemlerden oluşmaktadır [12]. Antibakteriyel polimerik malzemelerin mekanizması, temel olarak, mikrobiyolojik canlılığı yok

etme ve/veya yapışmazlık stratejilerine dayanmaktadır.

Örneğin, antibakteriyel katyonik polimerler bakterilerin hücre zarlarının bozulmasına sebep olarak bakteriyel canlılığı sonlandırırken, hidrofilik yapısından dolayı yapışma önleyici bir aktiviteye sahip olan heparin bakterilerin büyümesini önlemektedir [13, 14]. Antibakteriyel katyonik polimerlerin etki mekanizmaları, katyonik gruplarının bakteri hücresi yüzeyindeki negatif yüklü gruplarla seçici olarak elektrostatik etkileşimine dayanmaktadır. En yaygın kullanılan ABPol'ler, hücre duvarı ile etkileşime giren ve hücre içi bileşenlerin sızıntısıyla sonuçlanan hücre ölümüne neden olan pozitif yüklü kuarterner amonyum yapılarını içermektedir [15].

Kuarternize edilmiş poli(4-vinilpiridin) P(4VP) kullanılan kuarternizasyon ajanının alkil zinciri uzunluğuna bağlı olarak kendine özgü antibakteriyel özelliklere sahip sentetik bir polimerdir [16]. Kuarternize P(4VP)'ler *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. Aeruginosa*) ve *Escherichia coli* (*E. coli*) gibi bakteri suşlarını önemli derecede etkisiz hale getirmekte ve öldürebilmektedir. Ancak P(4VP)'nin hücrelere karşı toksik etki gösterdiği ve bununla birlikte oldukça hidrofobik bir polimer olduğu yapılan çalışmalarda görülmüştür [17]. Bu sebeple P(4VP)'nin farklı monomerlerle (oligo(etilen glikol) metil eter metakrilat (OEGMA), N-(2-hidroksipropil) metakrilamid (HPMA), 2-Hidroksietil metakrilat (HEMA), vinilpirolidon, vb.) rastgele veya blok kopolimerleri yapılarak biyouyumluluk ve hidrofiliklik gibi özellikler yapıya kazandırılmaktadır [18, 19].

Polimerler dışında antibakteriyel özelliğe sahip en önemli malzeme/molekül sınıflarından birisi de antibakteriyel peptidler (ABPep'ler)'dir [20]. Bu moleküller, doğuştan gelen bağışıklık tepkisinin bir parçası olan ve anti-enflamatuar, antibakteriyel, antiviral ve hatta anti-kanser aktivitelerine sahip olabilen doğal moleküllerdir [21]. ABPep'ler, çeşitli patojenlere karşı ilk savunma hattını sağlamaktadırlar. Peptidin pozitif yük miktarı, hidrofobik özelliği ve ikincil yapısı, ABPep'lerin antibakteriyel aktivitesi için önemlidir [22]. ABPep'ler +2 ile +13 arasında değişen net bir pozitif yük göstermekte ve belirli bir katyonik yapı içermektedir. ABPep'lerin sahip olduğu bu katyonik yapı, lizin ve arjinin (ve bazen histidin) amino asitlerinin varlığından kaynaklanmaktadır [23]. Ayrıca hidrofobiklik, tüm ABPep'ler için anahtar bir özelliktir ve peptid dizisindeki valin, lösin, izolösin, alanin, metiyonin, fenilalanin, tirozin ve triptofan gibi hidrofobik amino asitlerin yüzdesi olarak tanımlanmaktadır (tipik olarak ABPep'ler için %50). Hidrofobiklik, suda çözünür ABPep'lerin membran lipit çift tabakasını parçalayarak membran geçirgenliğini sağlamaktadır. Ancak, aşırı hidrofobiklik seviyeleri memeli hücre toksisitesine ve antibakteriyel etkinlik kaybına yol

açabilmektedir [24]. ABPep'ler küçük molekül olmalarından dolayı tek başlarına kullanıldıklarında vücuttan hızlı bir şekilde atılmaktadırlar, raf ömürleri kısadır ve üretimleri de maliyetlidir [25]. Ancak yüksek etkinliğe sahiptirler ve üretimlerinin tekrarlanabilirliği çok yüksektir. ABPol'ler ise ABPep'lere kıyasla, düşük maliyetli olmaları, uzun süreli depolama ve kullanım ömrüne sahip olmaları gibi birçok avantajı bulunmaktadır [26, 27]. Ancak polimerlerin etkinliğinin peptidlere göre daha düşük olması en büyük dezavantajlarıdır. Bu sebeple, ABPol ve ABPep'leri bir arada içeren bir sistemin her iki malzemenin avantajlı özelliklerine sahip olabileceği düşünülmektedir [28]. Mevcut bilgiler doğrultusunda, ABPep ve ABPol'lerin kovalent konjugatlarının yüksek etkinliğe sahip, raf ömrü uzun, maliyeti ABPep'lere göre daha düşük olacağı öngörülmektedir.

Literatürde ABPol'ler ve ABPep konjugatlarına dair çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Liu ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, ABPep'ler olan RRWW-NH_2 ve RWRW-NH_2'yi birbirine bağlamak için reaktif polimaleik anhidrit (PMA) zincirini kullanarak antimikrobiyal ajanlar sentezlenmiştir. Antibakteriyel polimerik peptidlerin katyonik yükündeki artış nedeniyle, konjugatlar, sabit bir hemolitik indeks (HI) değeri gösterirken, serbest peptidlere kıyasla antibakteriyel etki 10 kat arttırmıştır [29]. Amfifilik ABPep-polimer konjugatları, çekirdek veya koronaları oluşturan ABPep'ler ile kendi kendine misel yapıları oluşturmaktadır. Prensip olarak, misellerin oluşumu, ABPep zincirlerinin lokal olarak konsantre olması nedeniyle, ABPep'lerin antibakteriyel aktivitesini arttırmaktadır. Bu mekanizma katyonik polimerden oluşmuş koronaya sahip diğer antibakteriyel miseller ve veziküllerin oluşturduğu antibakteriyel mekanizma ile aynıdır [30]. Wooley ve arkadaşları, amfifilik blok kopolimer yapısına sahip miseller sentezlemiş ve bu misellerin yüzeyine ABPep olan tritriptisin konjuge etmişlerdir. ABPep'in *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı MİK (minimum inhibitör konsantrasyon) değerlerinin sırasıyla 16 ve 32 µg/mL'de etkili olduğu gösterilmiştir. Buna karşılık kütlece yaklaşık %10 ABPep'den oluşan misellerin *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı sırasıyla 13 ve 13 µg/mL MİK değerine sahip olduğu ortaya konulmuştur [31]. Yapılan başka bir çalışmada, ROP (halka açılması polimerizasyonu) yöntemi kullanarak antimikrobiyal polipeptid bazlı bir kopolimer olan poli(L-laktit)-b-poli(fenilalanin-stat-lizin) sentezlenmiştir. Sulu çözelti içerisinde kararlı olarak kendi kendine misel oluşturan bu kopolimer yapısının etkin bir antibakteriyel özellik sergilediği bulunmuştur [32].

Diğer antibakteriyel malzemelerle karşılaştırıldığında, ABPep-polimer konjugatları ile yapılan kaplamaların oldukça yüksek antibakteriyel aktiviteye ve biyouyumluluğa sahip olduğu gösterilmiştir. Pinese ve arkadaşları, kısa katyonik ABPep olan Palm-Arg-Arg-NH_2'nin silillenmiş bir hibrid yapısı ile tıbbi bir

silikon kateteri modifiye etmişlerdir. Palm-Arg-Arg-NH_2'nin Gram negatif bakteri sınıfından olan *E. coli*, *P. Aeruginosa* ve Gram pozitif bakteri sınıfından *S. aureus*'a karşı mikromolar aralıkta MİK gösterdiği bulunmuştur [33]. Bakteriyel biyofilm oluşumunu engellemek için yapılan bir başka çalışmada ABPep'ler, metakrilata (MA) konjuge edilmiştir ve elde edilen MA-ABPep monomerleri, daha sonra ABPep-polimer konjugatları olarak dental yapıştırıcılara kopolimerize edilmiştir. Polimetakrilat bazlı ABPep konjuge matrisin biyoaktivitesi araştırılmıştır. Dental yapıştırıcılara konjüge edilen antibakteriyel peptid-polimer yapısının, *S. mutans*'a karşı önemli antimikrobiyal aktivite gösterdiği ortaya konulmuştur [34].

Doğal polimer olan kitosan ile yapılan bir çalışmada, antimikrobiyal CysHHC10 peptidi, maleimidoheksanoik bağlayıcılar kullanılarak tiyol-maleimid "klik" konjugasyonu yoluyla kitosan omurgasının C-2 (amino) (CSNHHC) veya C-6 (hidroksil) (CSOHHC) pozisyonuna bağlanmıştır. Primer amino omurgası bozulmamış peptid fonksiyonlu kitosan (CSOHHC) peptidopolisakarit, peptidle aşılanmış amino omurgaya (CSNHHC) kıyasla Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı daha yüksek bakterisidal aktivite sergilemiştir [35]. Gram negatif bakteri türü olan *P. Aeruginosa*'ın sebep olduğu biyofilmler, kronik doku hastalıklarından implante tıbbi cihazlara kadar geniş bir enfeksiyon yelpazesine sahiptir. Bu problemi gidermek için yapılan bir çalışmada kitosan-polietilen glikol-peptid konjugatı (CS-PEG-LK13) tasarlanmış ve sulu çözelti içinde kendi kendine oluşan yaklaşık 100 nm boyutunda nötral bir nanoküre yapısı elde edilmiştir. CS-PEG-LK13 yapısı, bakteri hücre zarıyla karşılaştığında α-sarmal yapısı ile hücre zarının parçalanıp bozulmasına ve bakterilerin inaktive olmasına sebep olmaktadır. Bu yapısal değişiklik nedeniyle, CS-PEG-LK13 nanoküreler, *P. aeruginosa*'da (8 μg/mL peptid) düşük MİK değeri göstererek hem planktonik formda hem de biyofilm formunda *P. aeruginosa* üzerinde belirgin bir yıkıcı etki göstermiştir [36].

Literatürdeki bilgiler ışığında antibakteriyel polimer-peptid konjugatları, hem polimerlerin yapısal avantajlarının hem de peptidlerin biyolojik özelliklerinin bir araya getirildiği alternatif antibakteriyel tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından önemli bir potansiyel sunmaktadır. Bu tez çalışmasında ABPol olarak kuarternize P(4VP-co-HPMA) kopolimeri ile RWWRWWR dizisine sahip ABPep'nin [37] kovalent konjugatının sentezlenmesi ve bu konjugata dayalı farklı mimarilerde antibakteriyel sistemlerin geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Bu kapsamda lineer konjugat ve graft konjugat olmak üzere 2 farklı yapı üretilmiştir. Üretilen bu konjugatların yapısal karakterizasyonları ve biyolojik aktiviteleri kapsamlı şekilde incelenmiştir. Literatürde, P(4VP-co-HPMA) gibi fonksiyonel kopolimerlerle ABPep'lerin konjuge edilmesine ilişkin sınırlı sayıda çalışma

bulunmakta olup, bu çalışma hem polimer mimarisinin ABPep'lerin aktivitesi üzerindeki etkisini hem de konjugatların antimikrobiyal potansiyelini sistematik biçimde ortaya koyarak önemli bir boşluğu doldurmaktadır. Bu yönüyle çalışma, özgün bir polimer-peptid platformu geliştirerek antibakteriyel malzeme tasarımına yenilikçi katkılar sunmakta ve literatüre sentez-yapı-aktivite ilişkisine dair yeni veriler kazandırmaktadır.

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmada, Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler üzerinde antibakteriyel etkinliğe sahip kuarternize edilmiş P(4VP-co-HPMA) kopolimeri ile RWWRWWR dizisine sahip ABPep'in farklı mimarilerde (lineer ve graft) konjugatları sentezi, karakterizasyonu ve bu konjugatların antibakteriyel etkinliği ile biyouyumluluklarının incelenmesi amaçlanmıştır. Üretilen konjugatların yapısındaki farklı antibakteriyel moleküllerin, sinerjistik etkisine dayandırılan bu yaklaşımla, polimer ya da peptidin MİK değerlerinden daha düşük MİK değerleri göstermeleri ya da konjugatların polimer veya peptidden daha yüksek biyouyumluluğa sahip olmaları beklenmektedir. Bu amaca uygun olarak:

1- Lineer polimer-peptid konjugatı için

- RAFT polimerizasyonuyla P(4VP-co-HPMA) kopolimerinin sentezi,
- P(4VP-co-HPMA) kopolimerinin zincir uç grubunun tiyol grubuna indirgenmesi,
- Tiyol uç grubuna sahip kopolimerin maleimid uç grubuna sahip RWWRWWR peptidi ile konjugasyonu (lineer polimer-peptid konjugatı),
- Lineer polimer-peptid konjugatının kuarternizasyonu,

2- Graft polimer-peptid konjugatı için

- Serbest radikal polimerizasyonu ile P(4VP-co-HPMA) kopolimerinin sentezlenmesi,
- Sentezlenen P(4VP-co-HPMA) kopolimerinin kuarternize edilmesi,
- Kuarternize P(4VP-co-HPMA) kopolimerine karboksilik asit yan grupların eklenmesi,

- Karboksilik yan gruba sahip kopolimerin ve RWWRWWR peptidlerin kovalent bağlanması ile graft polimer-peptid konjugatının eldesi hedeflenmiştir.

Belirtilen sentez basamakları sonrasında ise üretilen farklı polimerik mimarilerin antibakteriyel etkinlik ve biyouyumluluk özellikleri üzerine etkisi incelenmiştir.

1.3 Hipotez

Bu çalışma, antibakteriyel polimer-peptid konjugatlarının etkisini değerlendirerek, bu materyallerin klinik uygulamalar için potansiyelini araştırmayı hedeflemektedir. Bu kapsamda hipotez, antibakteriyel polimer-peptid konjugatlarının, hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı etkili bir çözüm sunarak, antibiyotiklere karşı gelişen dirençle mücadelede önemli bir araç olacağı yönündedir. Yapılan bu çalışma ile üretilen malzemelerin toksik ve pahalı herhangi bir katkı maddesi eklemeden kendiliğinden antibakteriyel özelliğe sahip olacakları öngörülmektedir.

Polimer-peptid konjugatlarının farklı mimarilerde üretilmesinden dolayı çözelti davranışları ve bu sebeple de bakteri ve memeli hücrelerle etkileşimlerinin değişeceği öngörülmektedir. Bu durumun da üretilen konjugatlarının tek başına polimer veya peptid moleküllerine göre farklı antibakteriyel aktivite ve biyouyumluluk değerlerine sahip olmasına yol açacağı ve özellikle lokal uygulamalarda kullanılabilecek potansiyel bir biyomalzeme adayı olarak öne çıkacağı düşünülmektedir. Elde edilen sonuçlar daha yüksek etkinliğe sahip malzemelerin geliştirilmesi için önemli bilgiler sunacaktır.

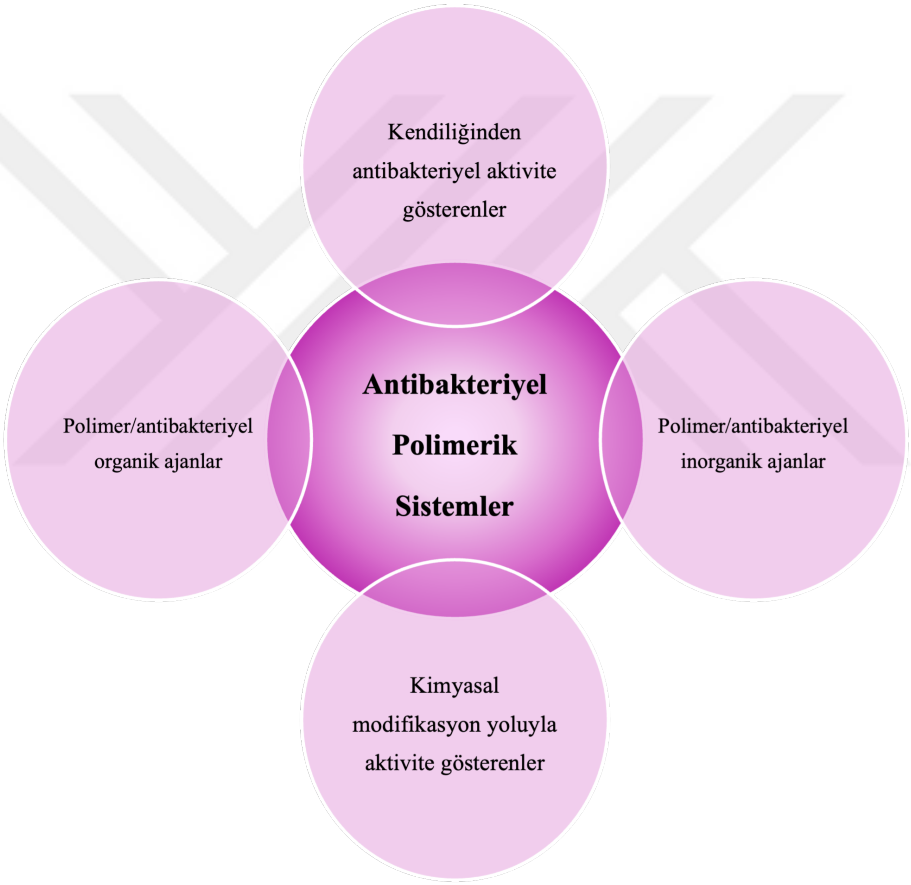
2
GENEL BİLGİLER

2.1 Antibakteriyel Polimerler

Bakteri ve diğer mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonlar ciddi hastalıklara yol açmakta ve dünya genelinde her yıl birçok ölüme sebep olmaktadır. Bakterilerin neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmek için genellikle antibiyotikler kullanılmaktadır. Ancak, antibiyotiklerin aşırı kullanımı, çoklu ilaç dirençli bakterilerin gelişmesine neden olmuş ve bu dirençle başa çıkabilmek için daha güçlü veya daha karmaşık antibiyotik formülasyonlarına ihtiyaç duyulmuştur [38]. Geleneksel antibiyotiklere karşı direnç geliştiren çoklu ilaç dirençli patojenlerin yaygınlaşması, yeni ve etkili antibakteriyel ajanlara duyulan ihtiyacı daha da acil hale getirmiştir [11]. Bu durum, küresel sağlık sistemini tehdit eden en ciddi sorunlardan biri olarak öne çıkmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, bu patojenlerin neden olduğu küresel sağlık krizi, mikrobiyal enfeksiyonların yeniden önde gelen ölüm nedenlerinden biri haline gelmesine yol açabilir. Eğer gerekli önlemler alınmazsa, 2050 yılına kadar bu enfeksiyonlar 10 milyon insanın hayatına mal olabilir [39, 40]. Bu kritik tablo, yenilikçi antibakteriyel ajanların geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Bu nedenle, araştırmacılar, antibakteriyel etkinliği artırmak amacıyla yeni malzemeler geliştirmek, farklı yapılar tasarlamak ve yenilikçi yöntemler keşfetmek gibi çeşitli yaklaşımlar üzerinde çalışmaktadır [7, 41, 42]. Bakteriyel kontaminasyona karşı potansiyel taşıyan inorganik ve organik çeşitli bakterisidal malzemeler geliştirilmiştir. İnorganik antibakteriyel malzemeler, genellikle metaller veya metal oksitlerden oluşmakta olup, hızlı ve geniş spektrumlu antibakteriyel etkileri, termal stabiliteleri ve özellikle düşük direnç gelişimi riski taşımaları nedeniyle büyük ilgi görmektedir. Bununla birlikte, inorganik antibakteriyel malzemelerin biyobirikim potansiyeli ve toksisite sorunları, bu malzemelerin kullanımını ciddi şekilde kısıtlamaktadır [43].

İnorganik antibakteriyel malzemelere ek olarak, organik antibakteriyel malzemelere dayalı çeşitli yaklaşımlar da ilaç direnci ve biyolojik toksisite gibi sorunların üstesinden gelmek amacıyla hızla gelişmektedir. Bu stratejiler arasında doğal

ve sentetik polimerlerden elde edilen bakterisidal özelliklere sahip malzemeler, önemli alternatifler olarak öne çıkmaktadır. Doğal antibakteriyel enzimler ve peptitler, güçlü biyosidal aktivite ve biyouyumluluk gösterirken, ana dezavantajları yüksek üretim maliyetleridir. Buna karşın, sentetik ABPol malzemelerin üretimi çok daha düşük maliyetlidir ve ayrıca işlenebilirlikleri de daha kolaydır. Literatürde antibakteriyel özelliğe sahip polimerler; kendiliğinden antibakteriyel aktivite gösterenler, kimyasal modifikasyon yoluyla aktivite kazananlar, antibakteriyel organik bileşikleri içerenler ve aktif inorganik sistemlerin eklenmesiyle antibakteriyel özellik gösteren polimerler olmak üzere Şekil 2.1'de gösterildiği gibi 4 kategoriye ayrılmışlardır [44].



Şekil 2.1 Antibakteriyel özelliğe sahip malzemelerin sınıflandırılması [44]

Kendiliğinden antibakteriyel aktivite gösteren polimerler, herhangi bir ek bileşen veya aktif molekül içermeden, doğrudan kendi yüzeylerinde bulunan fonksiyonel gruplar veya yapısal özellikler sayesinde antibakteriyel etki göstermektedir. Bu özellikleri sayesinde diğer antibakteriyel özelliğe sahip polimerlerden önemli ölçüde ayrılmaktadır.

Bakteriyel çoğalmayı en aza indirmek için alternatif bir yaklaşım ise bakterilerin farklı yüzeylerde çoğalmasını önleyerek büyümelerini engellemek ya da yüzeye

tutunmalarını tamamen önlemektir. Bu bağlamda, yeni antibakteriyel malzemelerin araştırılması ve geliştirilmesi oldukça önemli bir konu haline gelmiştir [45].

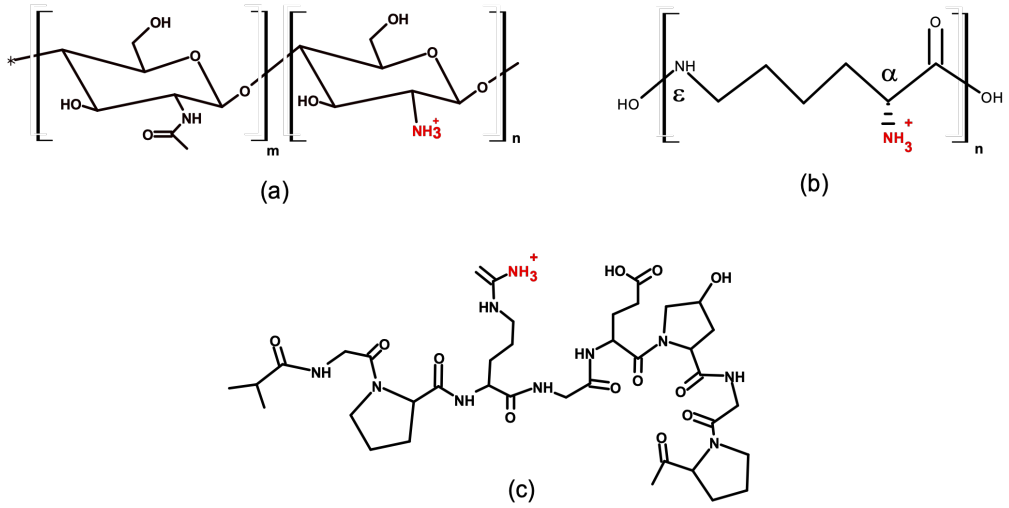
2.1.1 Kendiliğinden Antibakteriyel Polimerler

Geleneksel antibakteriyel malzemeler genellikle aktif biyositlerin yüzeylere entegre edilmesiyle elde edilirken, kendiliğinden antibakteriyel özellikler gösteren polimerler ise doğrudan kendi yapılarında bulunan fonksiyonel grupları veya moleküler özellikleri sayesinde mikroorganizmaları engelleme kapasitesine sahiptir [46]. Bunun için polimerin yapısında genellikle amonyum, fosfonyum, imidazolyum, guanidinyum ve sülfonyum gibi grupların bulunması gerekmektedir. Bu yapıların sahip olduğu katyonik özellik polimerin antibakteriyel etkinlik sergileyebilmesini sağlamaktadır [47]. Katyonik polimerlerin özellikleri, polimer zincirinin esnekliği, hidrojen bağı (H-bağı) oluşumu, hidrofobik etkileşimler, elektrostatik kuvvetler veya yük transfer potansiyeli, asidin iyonlaşma değeri ve nükleofilik karakter gibi faktörlere büyük ölçüde bağlıdır. Katyonik polimerler, çeşitli terapötik uygulamalar için doğal ve sentetik polimerler olmak üzere iki ayrı sınıfa ayrılmaktadır [48].

2.1.1.1 Doğal Katyonik Polimerler

Doğal kaynaklı katyonik polimerler, genellikle toksik olmayan, yenilenebilir kaynaklardan elde edilen, biyouyumlu, biyobozunur ve düşük immünojenisiteye sahip olmaları nedeniyle terapötik uygulamalar için uygun adaylardır. Çoğu doğal katyonik polimer, fizikokimyasal özellikleri iyileştirmek için kolayca modifiye edilebilen reaktif alanlar içermektedir [49]. Kitosan, poli-l-lisin (PLL) ve jelatin amonyum grubu içeren ve bu sayede katyonik özellik gösteren doğal polimerlerdir [50–52]. Bu polimerlere ait katyonik yapılar Şekil 2.2'de verilmiştir.

Bu doğal polimerlerin sahip olduğu amin grupları kimyasal, fiziksel ve biyolojik özelliklerini belirlemede önemli etkilere sahiptir. Ayrıca polimerlerin modifikasyonları için çeşitli olanaklar sağlamaktadır [53]. Yapılarında bulunan amin gruplarının modifiye edilmesi sayesinde bu polimerler pozitif yüklenerek katyonik özellik kazanmaktadır. Bu sayede elektrostatik etkileşim, şelasyon etkisi ve hidrofobik etki gibi çeşitli mekanizmalar ile bakterinin negatif yüklü membranı üzerine etki edebilmektedirler [54]. Örneğin PLL polimerinin yapısında ϵ-amino ile α-karboksil grupları bulunmaktadır ve yapısındaki amin grupları sayesinde katyonik özellik göstermektedir. Katyonik PLL mikroorganizmanın yüzeyine elektrostatik adsorpsiyon ile tutunmakta ve mikroorganizmanın dış zarına hasar vermektedir. Bu fizyolojik hasar sonucunda mikroorganizmanın ölümü



Şekil 2.2 Katyonik doğal polimerler; (a) kuarternize kitosan, (b) kuarternize ε-PLL ve (c) kuarternize jelatin

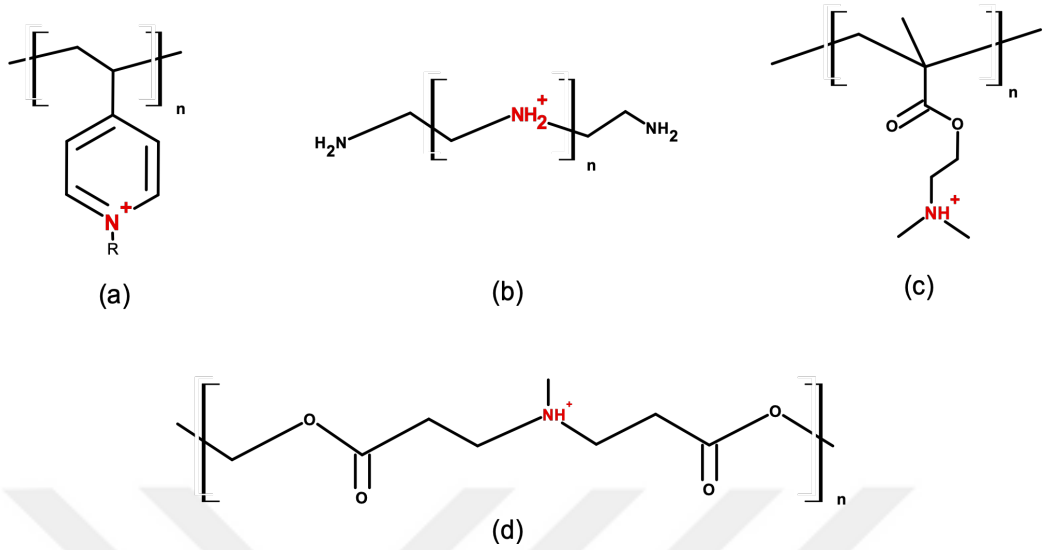
gerçekleşmektedir [55].

2.1.1.2 Sentetik Katyonik Polimerler

Sentetik polimerler, doğal polimerlere nazaran hedeflenen molekül ağırlıkları aralığında ve kontrollü bir şekilde üretilebildikleri için terapötik uygulamalarda oldukça yaygın kullanılmaktadır. Ayrıca sentetik polimerler fonksiyonel gruplar ve biyoaktif moleküller ile daha kolay bir şekilde modifiye edilmekte ve istenilen özelliklere sahip yapılar meydana getirilmektedir. Bu özellikler polimerin hem bozunma özelliklerini hem de biyolojik ortamdaki terapötik etkilerini düzenlemektedir [52].

Sentetik katyonik polimerler, kimyasal yapıları, molekül ağırlıkları, yük yoğunlukları ve iyonojenik grupları açısından çok çeşitleri olmaları sebebi ile polimerik biyositlerin en önemli sınıflarından birisi haline gelmiştir [56]. Bu polimerler yapılarında primer, sekonder, tersiyer ve kuarterner amonyum, guanidinyum ve tersiyer sülfonyum gibi grupları bulundurmakta ve bu sayede katyonik bir hal almaktadır [57]. Amin grubu içeren polimerler, çözücü polaritesi ve pH gibi dış ortam özelliklerine karşı gelişmiş duyarlılık sergileyen işlevsel bir makromolekül sınıfıdır [58]. Kuaterner amonyum kalıcı pozitif yüke sahipken, birincil, ikincil ve üçüncül amonyum grupları pH'a bağlıd pşarak pozitif yüklenir, yani polimerlerin protonlanma durumu, bileşendeki aminlerin pKa'sına ve antibakteriyel aktivitelerini göstermeleri gereken ortamın pH'ına bağlıdır [59]. Katyonik kuarterner amonyum grubuna sahip Şekil 2.3'te yapıları gösterilen P(4VP) [60], poli(etilen imin) [61], poli(2-dimetilaminoetil metakrilat)

(PDMAEMA) [62] ve poli(β-amino ester) [63] gibi polimerler bu alanda oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

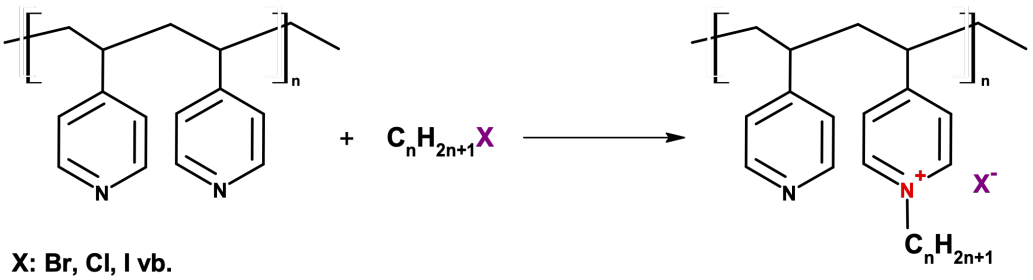


Şekil 2.3 Katyonik sentetik polimerler; (a) kuarternize P(4VP), (b)kuarternize poli(etilen imin) ve (c) kuarternize PDMAEMA ve (d) poli(β-amino ester)

Genel olarak, kuaternizasyon ABPol'lerin antibakteriyel performansını büyük ölçüde artıran önemli bir kimyasal özelliktir. Bu özellik kuarternize polimerlerde azot atomuna bağlı olan alkil yan zincirlerinin doğası ve uzunluğu ile kolayca ayarlanmaktadır. Tiller ve arkadaşları, farklı doğrusal alkil zincirlerine sahip poli(4-vinil-N-alkilpiridinyum bromür) serilerini hazırlamış ve bunların *S. aureus*'a karşı gösterdiği aktiviteyi incelemişlerdir [17]. Lu ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada, benzil, butil, dodesil ve hekzadesil bromür ile kuaternize edilmiş dimetilaminoetil metakrilatın aktivitesi değerlendirilmiş ve benzil ve butil zincirlerinin ile kuarternize edilen polimerin antibakteriyel aktivitelerinin diğerlerine göre daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir [64].

- **Poli(4-vinilpiridin)**

Poli(4-vinilpiridin) kuarternizasyon reaksiyonu sonucunda bir polikatyon elde etmek için en yaygın çalışılan lineer polimerlerden birisidir. Kuarternize P(4VP)'ler antibakteriyel çalışmalarda, ağır metallerin uzaklaştırılmasında ve gen transferi gibi alanlarda kullanılmaktadır. Ayrıca, P(4VP)'nin yapısında bulunan piridin halkaları, azot atomlarının farklı atomlarla veya moleküllerle modifiye edilmesini sağlamaktadır [65]. Şekil 2.5'te gösterildiği gibi piridin halkasında bulunan azot grubunun alkil halojenür gibi gruplarla kuarternize edilmesi ile P(4VP) pozitif yüklenmektedir.



Şekil 2.4 P(4VP) polimerinin alkil halojenür ile kuarternizasyonu

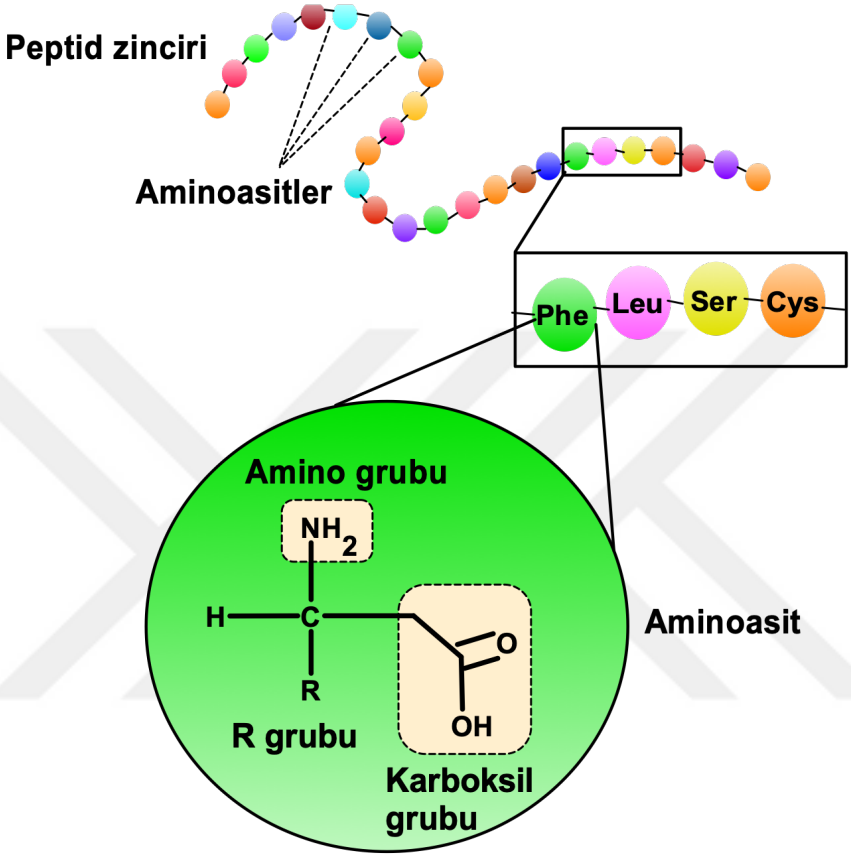
İlk defa Coleman ve Fuoss'un yapmış olduğu çalışmada P(4VP)'nin, n-butil bromür ile kuarternizasyonu gerçekleştirilmiştir [66]. P(4VP)'lerin kuarternizasyonunda farklı fonksiyonel gruplara sahip ajanlar kullanılsa da çoğunlukla n-alkilbromür/iyodür gibi ajanlar tercih edilmektedir [67–69]. Briones ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, P(4VP) farklı alkil zincir uzunluklarına sahip alkilbromürlerle kuarternize edilmiştir ve polimerik iyonik sıvılar elde edilmiştir. Farklı alkil zinciri uzunluğuna sahip yapıların su arıtımında ağır metal iyonlarının ayrıştırılması ve uzaklaştırılmasındaki etkisi incelemiştir [70].

Kuarterner amonyum grupları taşıyan P(4VP), antibakteriyel uygulamalar için kullanılan en belirgin katyonik polimerlerden birisidir. Kuarternize P(4VP) antibakteriyel aktivitesi sahip olduğu pozitif yük yoğunluğu ve hidrofobik grup uzunluğuna bağlı olarak değişmektedir [71]. Pozitif yük yoğunluğu sayesinde bakteri zarının negatif yüklü gruplarıyla etkileşime girmekte, bakteri zarını parçalamakta ve bakteriyi öldürmektedir. Katyonik polimerlerin aktivitesini arttırmak için polimer yapısına alkilbromürler gibi hidrofobik grupların eklenmesi polimerin bakteri zarına daha güçlü bağlanmasını sağlar [72].

P(4VP), biyouyumluluğunun düşük olması sebebiyle memeli hücrelerde oldukça toksik bir etki göstermekte ve tek başına kullanılmaları oldukça sınırlanmaktadır. Bu sebepten çok daha düşük sitotoksisiteye sahip, biyouyumlu ve suda çözünürlüğü arttıracak HPMA, N-vinilpirolidon, HEMA ve OEGMA monomerleri ile kopolimer yapısı oluşturularak kullanılması daha çok tercih edilmektedir [21, 73]. Bu monomerler ile sentezlenmiş P(4VP) kopolimeri türevlerinin hidrofilik/hidrofobik dengesi biyolojik aktiviteyi olumlu yönde etkileyebilmektedir. Ayrıca kopolimerlere göre biyouyumluluk açısından oldukça yüksek olan ABPep'ler ile konjugasyonlarında çok daha düşük toksisite göstermektedirler.

2.2 Antibakteriyel Peptidler

Antibakteriyel peptidler Şekil 2.5'te gösterildiği gibi farklı sayıda ve çeşitteki amino asitlerden oluşarak kimyasal yapıları ve amino asit bileşimleri bakımından önemli ölçüde farklılık göstermektedirler. Amino asitler yapılarında bir amino grubu, bir karboksilik asit grubu ve R grubu (fonsiyonel yapılar) bulundurmaktadır.

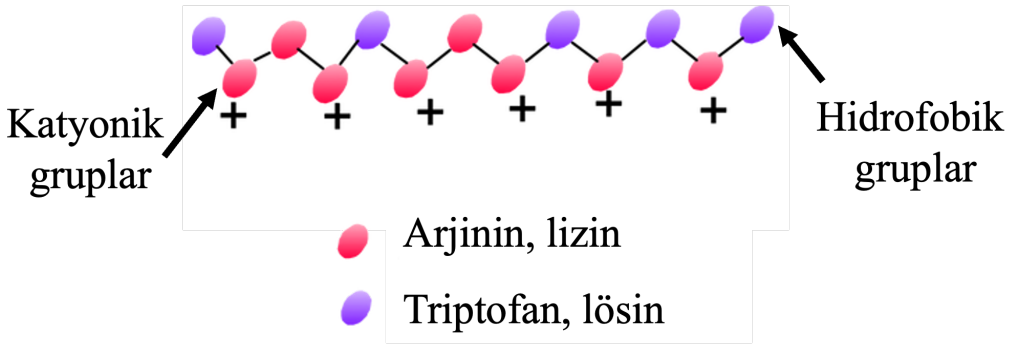


Şekil 2.5 Farklı amino asit yapılarından oluşan peptid zinciri [74]

ABPep'ler sınıflandırılması ikincil yapılarıyla ilişkilendirilerek 4 sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar α-heliks, β-tabaka, doğrusal peptidler ve α-β karışımından oluşan proteinlerdir. α-heliks yapıları doğada en yaygın bulunmakta ve sarmal spiral şeklinde düzenlenmesi ile tanımlanmaktadır. Bu katlanma şekli peptidlere mikrobiyal membranlarla etkileşimlerini ve genel antibakteriyel etkinliklerini etkileyen önemli özellikler kazandırmaktadır [75]. β-tabaka yapısına sahip ABPep'ler, bir hidrojen bağı omurgasından oluşan kıvrımlı yapılardır. Bu omurga yapısı genellikle molekül içi sülfür bağları (sistein kalıntıları) tarafından stabilize edilmekte ve bu peptidlerin genel kararlılığına ve işlevselliğine katkıda bulunmaktadır [76]. α-β karışımı yapısına sahip ABPep'ler peptid zincirlerinde hem α sarmal hem de β tabaka yapılarının çeşitli ve hibrit bir düzenlemesi ile oluşmaktadır. Bu yapılardaki peptidler genelde amfipatik özellik göstermekte ve

yapılarında hem hidrofobik hem de hidrofilik amino asit bölgeleri içermektedir [77]. Doğrusal ABPep'ler, genellikle serbest amino asit kalıntılarından oluşmakta, triptofan ve prolin açısından zengin olan 13 amino asit uzunluğundaki indolisidin gibi kısa zincirli yapılara örnek teşkil etmektedir [78]. ABPep'lerin kısmen lineer yapıları, genellikle hidrofilik bir N-ucu ve hidrofobik bir C-ucu ile karakterize edilen amfipatik bir doğaya sahiptir. Bu yapısal özellik, C-ucunun alanin, glisin ve valin gibi apolar amino asitler açısından zengin, N-ucunun ise arjinin ve lizin gibi katyonik amino asitleri daha yüksek oranda içermesiyle meydana gelmektedir. ABPep'lerin içeriğindeki amino asitlerin yaklaşık %50'si hidrofobiktir ve bu kalıntılar, mikrobiyal zarlarla etkileşime katkıda bulunmaktadır.

ABPep'lerin bir diğer önemli özelliği +2 ile +13 arasında değişen net pozitif yük ile birleşmiş amfifilik yapılarıdır [79]. Bu tip yapıdaki ABPep'ler, katyonik yapıları sayesinde Gram negatif bakterilerdeki lipopolisakkaritler, Gram pozitif bakterilerdeki teikoik asitler ve anyonik lipitler gibi hücre zarının negatif yüklü bileşenleri ile elektrostatik etkileşime girmektedir. Bu etkileşimin ardından, ABPep'lerin hidrofobik kısımlarının lipit çift tabakaya gömülmesiyle bakterinin zarı depolarizasyona uğramaktadır. Sonuç olarak, bakteriyel zar bütünlüğü bozulmakta, hücre içeriği sızmakta ve bakteriyel hücre ölümü gerçekleşmektedir [80]. Şekil 2.6'da da görüldüğü üzere ABPep'ler sahip olduğu amfifilik yapı sayesinde oldukça güçlü antibakteriyel aktivite sergilemeleri sebebi ile hayati öneme sahiptirler.



Şekil 2.6 ABPep'lerin sahip olduğu amfifilik yapı [81]

ABPep'ler bakterilerin geliştirdiği antibiyotik direncine karşılık ABPol'ler gibi iyi bir alternatif olarak oldukça yaygın olarak çalışılmaktadır. ABPep'ler güvenlikleri, düşük kalıntı ve düşük direnç özellikleri ile tercih edilmekte ve bu sayede antibakteriyel dirence karşılık önemli bir potansiyel göstermektedir [82]. Örneğin yapılan bir çalışmada, 26 amino asit dizisinden oluşan α-heliks yapısında sahip antibakteriyel özellikte olan Peceleganan peptidinin ilaca dirençli bakterilerin neden

olduğu dermal bakteriyel enfeksiyonlarının tedavisinde güvenli ve etkili bir şekilde klinik olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür [83].

Peptidler, çeşitliliği ve modifiye edilebilirliği sayesinde diğer moleküler yapılara bağlanabilmekte ve belirli bakteri türlerini hedefleyebilecek şekilde tasarlanabilmektedir [84]. ABPep'ler, esas olarak hücre zarlarını veya belirli hücre içi bileşenleri hedef alarak çeşitli mekanizmalar aracılığıyla çok çeşitli mikroorganizmaları inhibe edebilmektedir. Mikroorganizmalar üzerindeki etki mekanizmaları yük, yapı, dizi uzunluğu, hidrofibisite ve peptid yoğunluğu gibi farklı fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır. Bu mekanizmalar sayesinde Gram negatif (*E.coli, P.aeruginosa*), Gram pozitif bakterilere (*S.aureus, S.pneumoniae*), mantarlara ve virüslere karşı geniş antibakteriyel atktivite sergilemektedir.

2.3 Antibakteriyel Polimerler ve Antibakteriyel Peptidlerin Etki Mekanizmaları

Bakteriler, çok çeşitli ortamlarda bulunabilen tek hücreli organizmalardır. Hücre duvarlarının sahip olduğu özgün yapısal ve kimyasal özellikler, bakteriler açısından büyük öneme sahiptir [85]. Hücre duvarlarının sahip olduğu özellikler şu şekilde sıralanabilir:

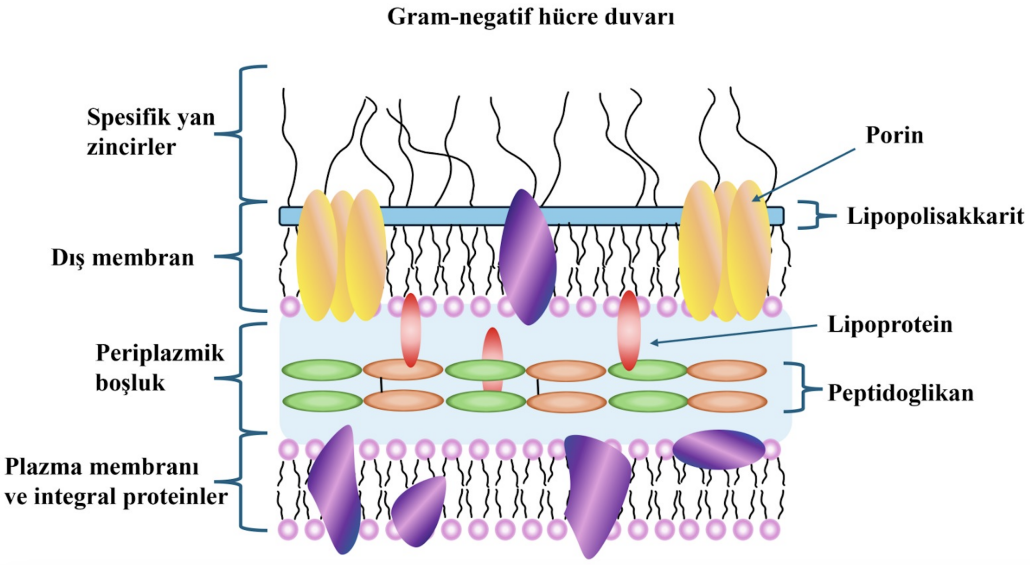
- Genellikle çevresel etmenlere karşı koruma sağlayarak bakteriyel canlılık için gerekli temel yapıyı sağlamak,
- Doğada başka hiçbir yerde bulunmayan benzersiz bileşenlerden oluşmak,
- Bakterilerin şeklinden sorumlu olmak,
- Konak hücrelere yapışmak için ligandlar ve proteinler için bir durak sağlamak,
- İlaçlar veya virüsler için reseptör bölgelerini açığa çıkarmak,
- Antibiyotiklerin saldırısı için en önemli bölgeleri temsil etmek,
- Immünolojik ayrım ve çeşitlilik için yapılar sağlamak ve hayvanlar ve insanlarda hastalık semptomlarına neden olabilmek gibi.

Prokaryotik mikroorganizmalar sınıfında bulunan bakterilerin tanımlanması, hastalıkların kontrolü için bilgi elde etmede mikrobiyoloji ve patolojide önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle mikrobiyolojide bakterilerin sınıflandırılması için çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Mikrobiyologlar, organizmanın morfolojisini ve boyanma özelliklerini belirlemek amacıyla genellikle fenotipik tiplendirme şemalarına dayalı yöntemler kullanmaktadırlar. Fenotipik sınıflandırmanın temel amaçları, farklı türlerin üyeleri yüksek düzeyde benzerlik paylaşabileceğinden, suş kümeleri oluşturmak ve bakteri türlerinin hiyerarşisini oluşturmaktır [86].

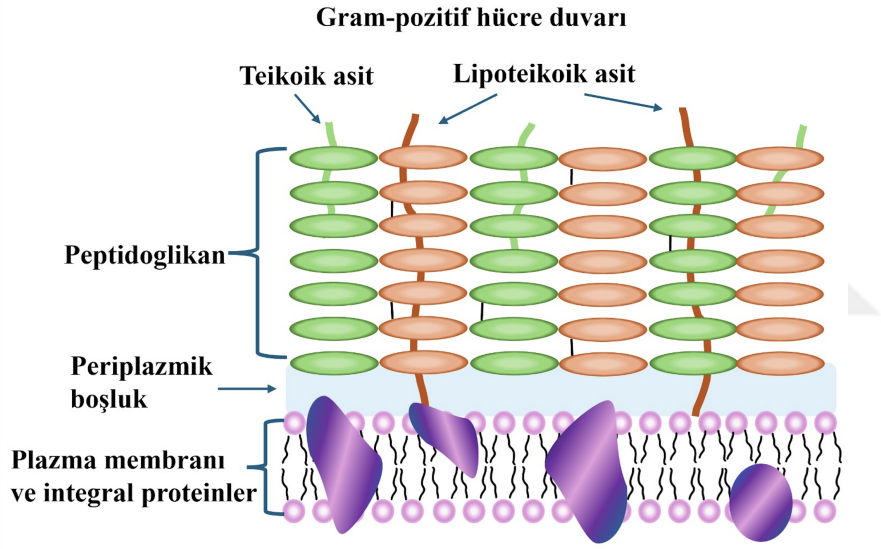
Günümüzde de önemli bir teknik olan Gram boyama sınıflandırması H.C. Gram tarafından 1884'te keşfedilmiştir. Gram boyası bakterileri iki temel hücre çeşidine ayırmaktadır. Başlangıçtaki kristal menekşe boyasını (mor) koruyan bakteriler Gram pozitif, renksizleştirilmiş ve karbol fuksin (veya safranin) ile kırmızıya boyananlar Gram negatif olarak adlandırılmaktadır. Bu boyama tepkisi, her iki bakteri çeşidinin hücre duvarlarının kimyasal ve yapısal farklılıklarına dayanmaktadır. Gram pozitifler, renksizleşmeye direnen ve peptidoglikan ve ikincil polimerlerden oluşan kalın, nispeten geçirgen olmayan bir duvara sahiptir. Gram negatif bakteriler, ince bir peptidoglikan tabakasına ek olarak dış zar olarak bilinen lipit-protein çift katmanına sahiptir [87].

Gram negatif bakteriler Şekil 2.7'de görüldüğü gibi hem sitoplazmik hem de dış membrana sahiptir; fosfolipitlere ek olarak, dış zar lipopolisakkaritler (LPS) içermektedir. Gram pozitif bakterilerin Şekil 2.8'de görüldüğü üzere dış membranı veya LPS'si yoktur; ancak duvar polisakkaritlerden oluşan teikoik asitleri (TA) ve lipoteikoik asitler (LTA) içermektedir. TA, peptidoglikana kovalent olarak bağlıyken, LTA sitoplazmik zar içine yerleşmiştir. TA, fosfodiester bağlarıyla bağlı poliol tekrar birimleri veya gliserol fosfat ya da ribitol fosfat kalıntıları olarak kimyasal olarak tanımlanan, bakteri hücre yüzeyi glikopolimerlerinin çeşitli bir ailesini oluşturmaktadır. Yapısal olarak, TA ve LTA, yapılarındaki birden fazla fosfat grubundan dolayı yüksek derecede negatif yüklü özellikler sergilemekte ve eklenmiş D-alanin kalıntıları nedeniyle daha az pozitif yüklü gruplar içermektedir [85].

Bakteriyel hücre duvarının ana omurgası, N-asetilmuramik asit (NAM) ile bağlı disakkarit N-asetilglukozaminin (NAG) tekrarlayan doğrusal ünitelerinden oluşan, murein olarak da adlandırılan peptidoglikandır. Disakkaritler, genellikle esnek pentapeptid amino asit zincirleri aracılığıyla çapraz bağlanmıştır ve ağ benzeri bir çerçeve oluşturmaktadır. Bakteri hücrelerini kapsülleyen çapraz bağlı polimerik ağ yapısına sahip olan peptidoglikan tabakası, Gram negatif hücrelerde daha ince, Gram pozitif bakterilerde ise daha kalındır [89]. Gram pozitif bakteriler, 30 ila



Şekil 2.7 Gram negatif bakterisinin hücre duvarının şematik gösterimi [88]

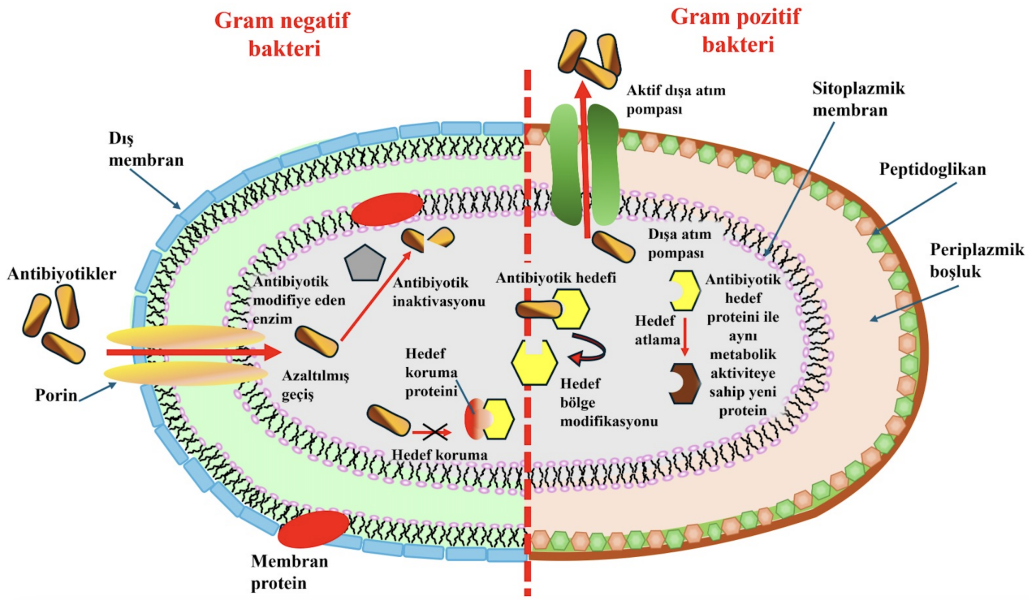


Şekil 2.8 Gram negatif bakterisinin hücre duvarının şematik gösterimi [88]

100 nm veya daha kalın bir boyuta ulaşabilen bir peptidoglikan iplikçik tabakası sergilerken, Gram negatif bakterilerin sadece birkaç nanometrelik bir tabakası vardır. *E. coli, Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa)* ve *Klebsiella aerogenes (K. aerogenes)* gibi patojenler Gram nagetif, *S. aureus, Staphylococcus epidermidis (S. epidermidis)* ve *Bacillus cereus (B. cereus)* gibi patojenler de Gram pozitif bakteri sınıfında bulunmaktadır [90].

Mikroorganizmalar, antibiyotiklerin kullanımlarının giderek artması ve yanlış kullanımına bağlı olarak antibakteriyel direnç (ABD) geliştirmektedir. Antibiyotik direnci, bakterilerin terapötik antibiyotiklerin yarattığı baskıya karşı gösterdiği evrimsel bir yanıttır. Klinik açıdan bakıldığında, antibiyotikler ilk kullanımında tüm hedeflenen patojenler üzerinde etki gösterebilmekteyken, uzun süreli kullanımı sonucunda bakteriler bu antibiyotiğe karşı direnç geliştirmektedir. Evrimsel açıdan ise bakteriler, antibiyotiklerin etkilerine iki ana mekanizma ile uyum sağlamaktadır: kromozomal gen mutasyonları ve direnç belirleyicilerini kodlayan yabancı DNA'nın yatay gen transferi yoluyla kazanılması. Mutasyonlar antibiyotiğin hedeflerini kodlayan genler, antibiyotiğin taşınmasını sağlayan genler ve taşıyıcıların ekspresyonunu baskılayan düzenleyici genler (örneğin, antibiyotik modifiye eden enzimler ve çoklu ilaç dışa atım pompaları) olarak esasen üç farklı gen türünü içermektedir. Bu mekanizmalar antibiyotik direncinin ortaya çıkmasına neden olur [91].

Şekil 2.9'da Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerin antibiyotiklere karşı sahip olduğu direnç mekanizmaları gösterilmektedir. ABD mekanizmaları esas olarak enzimatik ilaç inaktivasyonu, ilaç hedef değişikliği, dış membran geçirgenliğindeki değişiklikler ve antibakteriyel bileşiklerin aktif dışarı atılımını içermektedir [92].



Şekil 2.9 Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerin antibiyotik direnç mekanizmaları [93]

Bakteriyel enfeksiyonlara bağlı tahmini 7,7 milyon ölümün yaklaşık 1,27 milyonu, mevcut antibiyotiklerle tedavi edilemeyen antibiyotik dirençli bakteriyel patojenlerden kaynaklanabilmektedir. Bu önemli derecede yüksek ABD yükü her geçen gün giderek artmaktadır [94]. ABD, günümüzde dünya üzerindeki

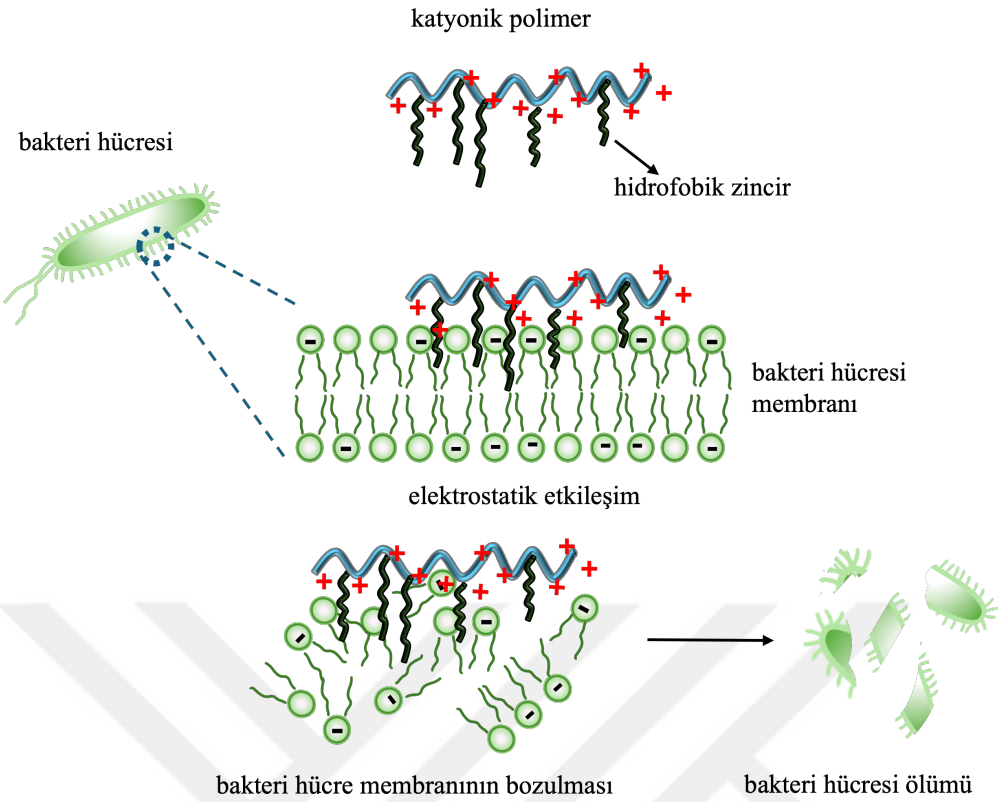
çoğu insanın ve diğer türlerin sağlığını, refahını ve yaşam potansiyelini doğrudan etkilemektedir. İnsanlar yaşamları boyunca antibakteriyel dirençli enfeksiyon riskiyle karşı karşıya olup, etkili tedavilere erişim giderek zorlaşmaktadır. Dirençli bakteriler, HIV ve sıtma kadar büyük veya daha ciddi bir küresel sağlık tehdidi oluşturmaktadır. Son on yılda birçok ülke, antibakteriyel direnci ele almak için ulusal eylem planları oluşturmuştur. Bu planların çoğu, DSÖ Küresel Eylem Planı temel alınarak hazırlanmış olup; sağlık çalışanları ve halk arasında farkındalığın artırılması, ABD'nin izlenmesi, enfeksiyonların ve dirençli bakterilerin yayılmasının önlenmesi, yeni antibakteriyellerin araştırılması ve geliştirilmesi gibi stratejileri içermektedir [95].

2.3.1 Antibakteriyel Polimerlerin Etki Mekanizması

Polimerlerin yapısına aktif grupların eklenmesi ile polimerler antibakteriyel özellik kazanabilmektedir. ABPol'ler aktif grupların bağlanma şekline göre polimerik biyositler ve biyosidal polimerler olarak sınıflandırılmaktadır [96]. Polimerik biyositler, antibakteriyel aktiviye oluşturabilecek amino, karboksil ve hidroksil gruplar gibi biyolojik olarak aktif tekrarlayan birimlerin kovalent olarak bağlanması ile oluşturulabilmektedir. Bunlar kuarterner amonyum bileşikleri, halojenler, sulfonyum tuzları ve N-halaminler gibi yapılardır. Biyosidal polimerler ise biyolojik olarak aktif tekrar eden birimlere ihtiyaç duymadan yapısında kuarterner amonyum, fosfonyum, tersiyer sülfonyum ve guanidinyum gibi katyonik biyositler bulundurmakta ve bu sayede antibakteriyel etki tüm katyonik özelliğe sahip makromolekülün yapısına ait olmaktadır [11].

Antibakteriyel katyonik polimerler patojenlerin sebep olduğu enfeksiyon hastalıklarının tedavisi için polimer bilimi için önemlidir. Bunun en büyük sebebi antibiyotiklere kıyasla antibakteriyel katyonik polimerin ciddi ABD oluşturmamasıdır. Yapısında bulunan katyonik ve hidrofobik gruplar bu polimerlerin en önemli özellikleridir [97]. Bu sayede etkin bir antibakyeriyel etki mekanizması sergilemektedirler. Katyonik polimerler, Şekil 2.10'da gösterildiği gibi öncelikle katyonik grupların patojenlerin zarına adsorbe olması, ardından sahip olduğu hidrofobik grupların zar içerisinden girerek zarı bozması ve bunun sonunda mikoorganizmaların ölümüne sebep olması ile sonuçlanan bir genel antibakteriyel etki mekanizmasına sahiptirler [98, 99].

Katyonik polimerler lipitler, proteinler ve diğer bileşenlerden oluşan bakteriyel hücre zarlarını hedef alarak antibakteriyel aktivite göstermektedirler. Öncelikle lipit çift tabakada geçici porların ve defektlerin oluşmasına neden olmakta, sonrasında oluşan bu porlar ve defektler zar geçirgenliğini arttırmakta ve iyonların,



Şekil 2.10 Katyonik polimerin bakteri hücresi ile elektrostatik etkileşimi [98]

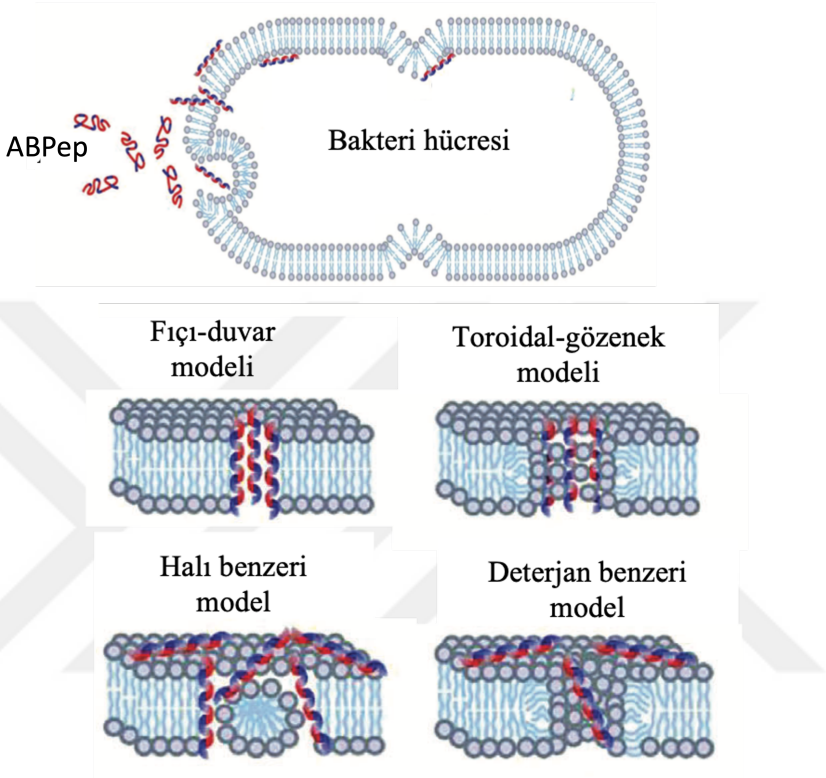
metabolitlerin ve diğer biyolojik bileşenlerin kaybı da bakterinin iç dengesini bozmaktadır. Zarın parçalanması, geçirgenliğin artması, iyon dengesizlikleri ve hücresel içeriğin sızması gibi etkiler bakteri hücresinin ölümüne neden olmaktadır [100, 101].

2.3.2 Antibakteriyel Peptidlerin Etki Mekanizması

Gram negatif bakteriler, negatif yüklü lipopolisakaritlerden oluşan plazma zarına ve dış zara sahiptir. Gram pozitif bakteriler ise dış zara sahip olmayıp, plazma zarının dışında peptidoglikan ve negatif yüklü teikoik asit içeren bir hücre duvarı tabakası ile çevrilidir. Bu nedenle, ABPep'ler elektrostatik çekim yoluyla zarla etkileşebilmekte, bu da zarın bozulması ve sitoplazmaya giriş için güçlü bir temel sağlamaktadır.

ABPep'ler öncelikle hedef patojenin fosfolipitleri ile etkişime girmektedir. İlk olarak, ABPep'ler elektrostatik veya hidrofobik etkileşimler gibi bakteri hücreleri ile biyokimyasal ve biyofiziksel afinite yardımıyla ilk teması kurmaktadır. Ardından bakterinin zarında yapısal bir değişiklik meydana getirmekte ve bu değişiklik zarın özelliklerini değiştirmeye başlamaktadır. Bakterinin hücre zarı üzerinde belirli seviyeye kadar birikmektedir. Daha sonra zarın geçirgenliğini arttırarak ya da

zarın elektriksel dengesini etkileyerek zarın fonsiyonlarını geçici ya da kalıcı olarak bozmaktadır ve bu durum bakteri hücresinin ölümüne yol açmaktadır [102]. ABPep'ler bu genel mekanizmayı farklı yollarla sağlayabilmektedir. Literatürde Şekil 2.11'de gösterildiği üzere iki ana model üzerinde durulmuştur: Transmembran gözenek modelleri (fıçı duvar modeli ve toroidal gözenek modeli) ve gözeneksiz modeller (halı benzeri model ve deterjan benzeri model) [103].



Şekil 2.11 Membran hedefli ABPep'in bakteri hücresi ile etkileşim modelleri [104]

Transmembran gözenek modellerinden ilki fıçı duvar modelinde, peptidler bakteri zarı üzerinde monomer olarak birikmekte, belirli bir konsantrasyona geldiğinde oligomerleşerek lidip çift tabakanın hidrofobik merkezine sarmal şekilde dikey olarak yerleşmektedir. Fazla peptid birikimi gözenek boyutunu arttırarak stabil bir fıçı (kanal) oluşturmakta, bu durum sitoplazmadan dışarı bileşenlerin akışına ve hücre ölümüne yol açmaktadır. Toroidal gözenek modelinde ise peptidin hidrofilik bölgeleri bakterilerinin zarındaki lipitlerin hidrofobik baş kısımları ile etkileşmekte ve bu durum zarın bükülmesine neden olarak halka şeklinde geçici gözenekler oluşturmaktadır. Toroidal gözenek modelindeki gözenekler, fıçı duvar modeline göre daha az stabildir [24, 105].

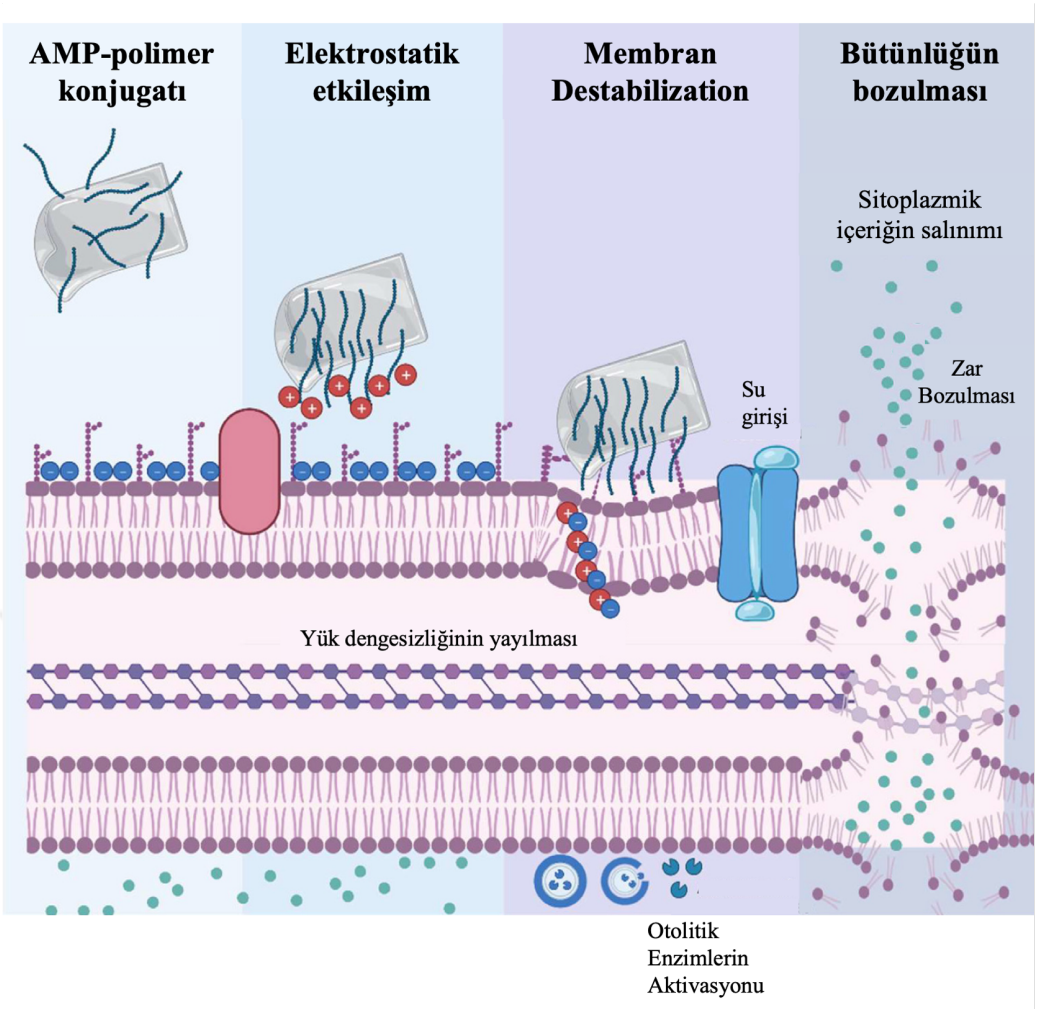
Gözeneksiz modeller olan halı benzeri modelinde, ABPep ilk olarak bakteri zarı üzerinde monomer veya oligomer olarak birikmekte ve zarı halı gibi kaplamaktadır. Peptit konsantrasyonu belirli bir eşiğe ulaştığında, biriken peptitler

zarın geçirgenliğini artırmakta ve bu da zarın yırtılmasına yol açmaktadır. deterjan benzeri model de ise peptit moleküllerinin bakteri zarının fosfolipit kısmı ile bağlanmasını ve daha sonra zar yüzeyine hizalanmasını içermektedir, bu da lipit çift katmanının deterjan benzeri bir şekilde bükülmesini teşvik etmektedir [106].

2.3.3 Antibakteriyel Polimer-Peptidlerin Konjugatlarının Etki Mekanizması

Antibakteriyel polimer-peptid konjugatlarının, bakterilerin hücre duvarı ile elektrostatik etkileşimi, ABD'ye karşı son yıllarda oldukça yaygın bir şekilde araştırılmaktadır. ABPol'lerin ve ABPep'lerin her ikisi de bakterileri birkaç farklı mekanizma ile öldürebilmektedir. Bunlar genellikle bakteriyel zar ile etkileşime girerek hücre bütünlüğünü bozmakta veya metabolik süreçleri hedef almaktadır. Bu malzemeler bakteri zarını bozarak, hücre içi işlevleri engelleyerek veya hücre duvarı sentezini durdurarak bakterileri öldürmektedir. Çok yönlü saldırı mekanizmaları nedeniyle direnç gelişimi antibiyotiklere kıyasla daha zor olmaktadır, bu da onları yeni nesil antibakteriyel ajanlar olarak öne çıkarmaktadır.

Şekil 2.12'de gösterildiği gibi pozitif yüklü ABPep-polimer konjugatı ile negatif yüklü bakteriyel membran arasındaki ilk elektrostatik etkileşim, konjugatın membrana yönelmesine yol açmakta ve bu da konjugatın yoğunluğunu artırmaktadır. Bu durum, membranın elektrostatik dengesinin bozulmasına neden olmaktadır ve bu bozulma iç membran katmanlarına kadar yayılmaktadır. Bu sayede pozitif yüklü konjugat membran potansiyelini dramatik şekilde değiştirmektedir. Otolizin enzimlerinin aktive olması, hücre içinde bir bozulma zincirini başlatmakta ve su girişinin artması, hücre içi basıncı artırmaktadır. Tüm bu süreç, hücre duvarı bütünlüğünün kaybı ve sitoplazmik içeriğin serbest bırakılmasıyla sonuçlanarak hücre ölümüne yol açmaktadır [107].



Şekil 2.12 ABPep-polimer konjugatının bakteri membranı üzerindeki etki mekanizması [107]

2.4 Antibakteriyel Polimer-Peptid Konjugatları

ABPep'ler yüksek etkinliğe ve özgüllüğe sahip olmasıyla birlikte düşük bir dozu bile güvenilir antibakteriyel aktivite gösterebilmektedir. ABPep'ler oldukça spesifik etki mekanizmalarına sahip olmaları ve memeli hücrelerini hedeflememeleri sebebiyle *in vivo* olarak düşük sitotoksisiteye sahiptir. Kısa yarı ömürleri nedeniyle vücutta düşük birikim göstermeleri de sitotoksisiteyi azaltmaktadır. Buna ek olarak peptidler insan vücuduna alındıklarında küçük moleküler yapıları ve sınırlı üç boyutlu konformasyonları nedeniyle, genellikle proteinlere kıyasla daha düşük immünojenik özellik gösterirler. Bu durum, terapötik uygulamalarda peptitlerin bağışıklık sistemi tarafından tanınıp güçlü bir immün yanıt oluşturma riskini azaltmaktadır. [108]. Ancak ABPep'lerin endojen proteazlar tarafından proteolize edilmesi, *in vitro* olarak yüksek stabiliteye sahip olmalarına rağmen düşük biyoyararlanıma ve kısa yarı ömürlü olmalarına yol açabilmektedirler. Bu biyolojik sorunların yanı sıra, peptidlerin sentez maliyeti yüksek olmakla birlikte,

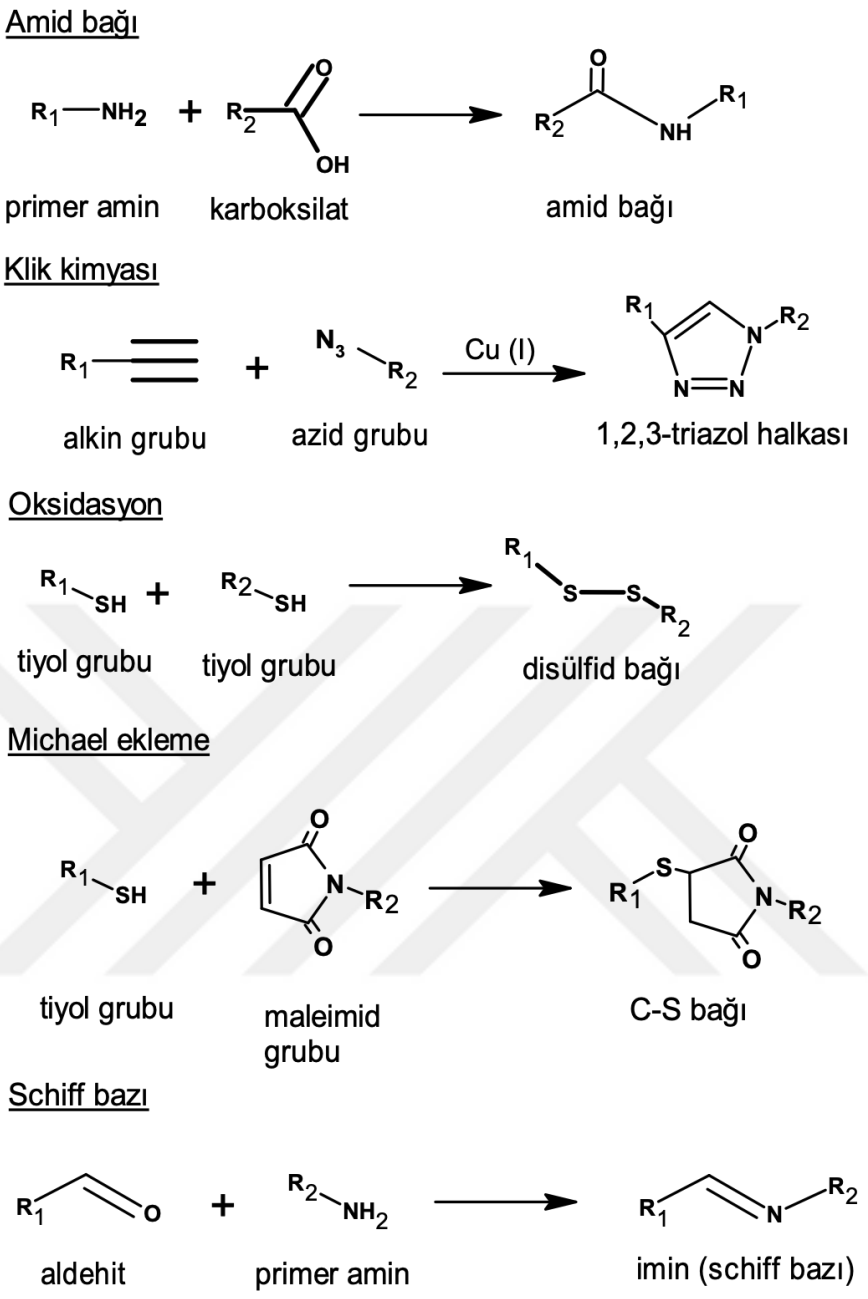
saflaştırma işlemleri de oldukça zor olabilmektedir [109, 110]. Bu sebepler doğrultusunda ABPep'ler, geniş antibakteriyel spektrumlara sahip olmasına rağmen klinik uygulamalarda çeşitli sorunlarla karşılaşmaktadır.

Bu sorunların üstesinden gelmek için yapı olarak farklı ancak işlev olarak ABPep'lere oldukça benzer olan katyonik polimerler üretilmektedir. Bu polimerler ABPep'lerin amfipatik doğasına ve katyonik yapısına benzer şekilde tasarlanmaktadır. Polimer zinciri boyunca rastgele dağılan metakrilat, piridin halkası gibi katyonik ve hidrofobik gruplar bulunduran polimerler oldukça yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu özellikleri sayesinde antibakteriyel sentetik polimerlerin kimyasal ve yapısal çeşitliliğinden yararlanarak yeni polimer mimarilerinin antibakteriyel uygulamalar için kullanılma potansiyelini ortaya koymaktadır [111]. ABPep'lerle karşılaştırıldığında, düşük maliyetli olması ve etkili üretimi, uzun süreli kullanım ve depolamada kararlılık, kısa temas sürelerinde patojenik mikroorganizmalara karşı biyosidal veya geniş spektrumlu aktivite göstermeleri gibi birçok avantaj sağlamaktadırlar. Tüm bunların yanı sıra ABPep'lerin düşük toksisitesine kıyasla önemli oranda toksisite sergileyebilmektedirler ve bu durum da kullanımlarını sınırlamaktadır.

Katyonik polimerlerin ve ABPep'lerin sahip olduğu özelliklerin avantajları ve dezavantajları göz önüne alındığında, polimer-peptid konjugatlarının, tek başlarına kullanımına kıyasla daha optimal malzemeler sunacağı düşünülmektedir. Antibakteriyel polimer-peptid konjugatları, katyonik polimerin memeli hücreler üzerinde göstermiş olduğu yüksek toksisiteyi düşürmeye yardımcı olabilmektedir. Buna ek olarak katyonik polimerin sahip olduğu antibakteriyel akviteyi de iyileştirebilmektedir. Ayrıca geliştirilen konjugat yapısı ile peptidlerin enzimatik yıkım ve çevresel faktörlere karşı dayanıklılığını arttırarak biyolojik ortamda daha uzun süre aktif kalmasını sağlamaktadır.

ABPep'ler ve fonksiyonel polimerler arasındaki kovalent konjugasyonlar, bağlantı yönteminin büyük önem taşıdığı çeşitli reaksiyonlarla gerçekleşmektedir. ABPep'ler ve polimerler; amid bağı, klik kimyası, oksidasyon, foto çapraz bağlama, Michael ekleme veya Schiff bazı gibi reaksiyonları gerçekleştirebilmeleri için birbirleriyle reaksiyona girebilen fonksiyonel gruplara sahip olmalıdır [112]. Polimer ve peptidlerin konjugasyonunda kullanılabilecek reaksiyonlar ve fonksiyonel grupların bir kısmı Şekil 2.13'te gösterilmektedir.

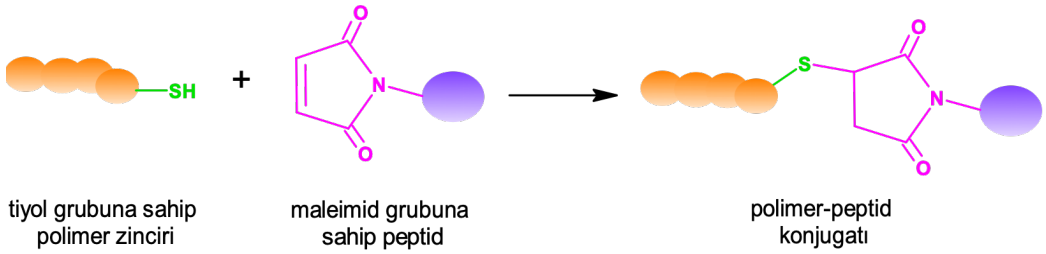
Peptidlerin sistein (-SH) kalıntılarında bulunan sülfidril grubu, kovalent bağlanma için kullanılan önemli fonksiyonel gruplardan birisidir. Birincil aminlere bağlanma maleimid ile fonksiyonelleştirilmiş polimerlerin kovalent bağlanması



Şekil 2.13 Polimer-peptid konjugasyonunda kullanılan çeşitli reaksiyon mekanizmaları [112]

ile elde edilmektedir. Şekil 2.14'te verilen bu tiyol reaktif maleimid grupları ile gerçekleştirilen reaksiyonlar yaygın olarak kullanılan reaksiyonlardan biridir. Maleimidler, sisteinin tiyol gruplarıyla kolayca reaksiyona girmekte ve bu nedenle N-substitüe maleimidler, peptitlere farklı zincirler bağlamak için sıklıkla kullanılmaktadır . Bu reaksiyon, nötr pH ve oda sıcaklığında gerçekleştirilebildiği için oldukça seçici ve kullanışlıdır [113]. Gao ve arkadaşları, sistein ile fonksiyonelleştirilmiş katyonik ABPep Te213'ü (KRWWKW-WRRC), poli(N,N-dimetilakrilamid-stat-N-(3-aminopropil)-metakrilamid hidroklorür)

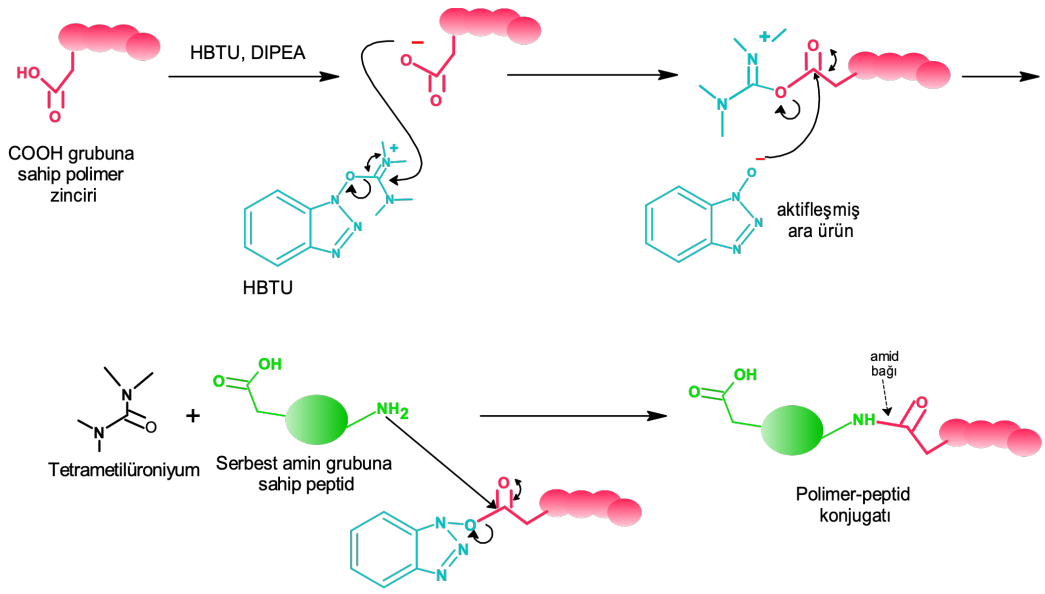
(poli(DMA-stat-APMA)) kopolimer zincirlerine, maleimid-tiol ekleme reaksiyonu kullanarak konjuge etmiştir [114].



Şekil 2.14 Tiyol uç gruba sahip polimer ile maleimid uç gruba sahip peptidin konjugasyon mekanizması [115]

Diğer bir yaygın yöntem, N-terminal ucun α-amino grubunun bir karboksil grubu ile bağlanarak amid bağı oluşturulmasıdır [116]. Karboksil grubu (–COOH) ile amin grubu ($–NH_2$ veya –NH) arasında hem peptit sentezinde hem de ABPep'lerin polimerlerle birleştirilmesinde yaygın kullanılan standart reaksiyondur. Benzer şekilde, serbest karboksil grubuna sahip bir polimer, bir peptidin N-terminalindeki veya bir amino asitin yan zincirindeki primer amin grubu ile kolayca konjuge edilebilmektedir. Bu amaç doğrultusunda polimer ve peptidlerin bağlanması için en yaygın kullanılan aktivasyon ajanları karbodiimid (1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid (EDC) veya N,N'-disikloheksilkarbodiimid (DCC)) ve uronyum (O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluroniyum hekzaflorofosfat (HBTU)) türevleri gibi aktivasyon ajanlarıdır. Ayrıca reaksiyon verimi arttırmak ve istenmeyen yan reaksiyonları önlemek amacıyla genellikle HOBt (hidroksibenzotriazol), NHS (N-hidroksisüksinimid) veya N,N-Diizopropiletilamin (DIPEA) gibi yardımcı aktivatör bazları da aktivatör ajanları ile birlikte kullanılmaktadır [117, 118].

Şekil 2.15'te karboksil grubuna sahip polimer zinciri ile amin grubuna sahip peptidin HBTU varlığında amid bağı oluşumu ile konjugasyon mekanizması gösterilmektedir. HBTU gibi reaktifler, amidleşme öncesi karboksilik asidi daha reaktif hale getirmektedirler. Öncelikle tersiyer bir organik baz (DIPEA), karboksilik asidi deprotonlayarak karboksilat anyonu ($R\text{-}COO^-$) oluşmasını sağlar ve nükleofilik aktiviteyi artırır. Karboksilat anyonu, HBTU'nun elektrofilik merkezine nükleofilik bir saldırı gerçekleştirir. HBTU'dan ayrılan bir parçacık (benzotriazol), tekrar saldırarak karboksilik asidi benzotriazolil estere (Bt ester) dönüştürür. Bt ester çok reaktiftir ve hızlıca amid bağı oluşturabilmektedir. Bt ester, amino grubu içeren molekülle reaksiyona girerek amid bağını oluşturur. Böylece iki molekül arasında kovalent bağ oluşmuş olur [119].



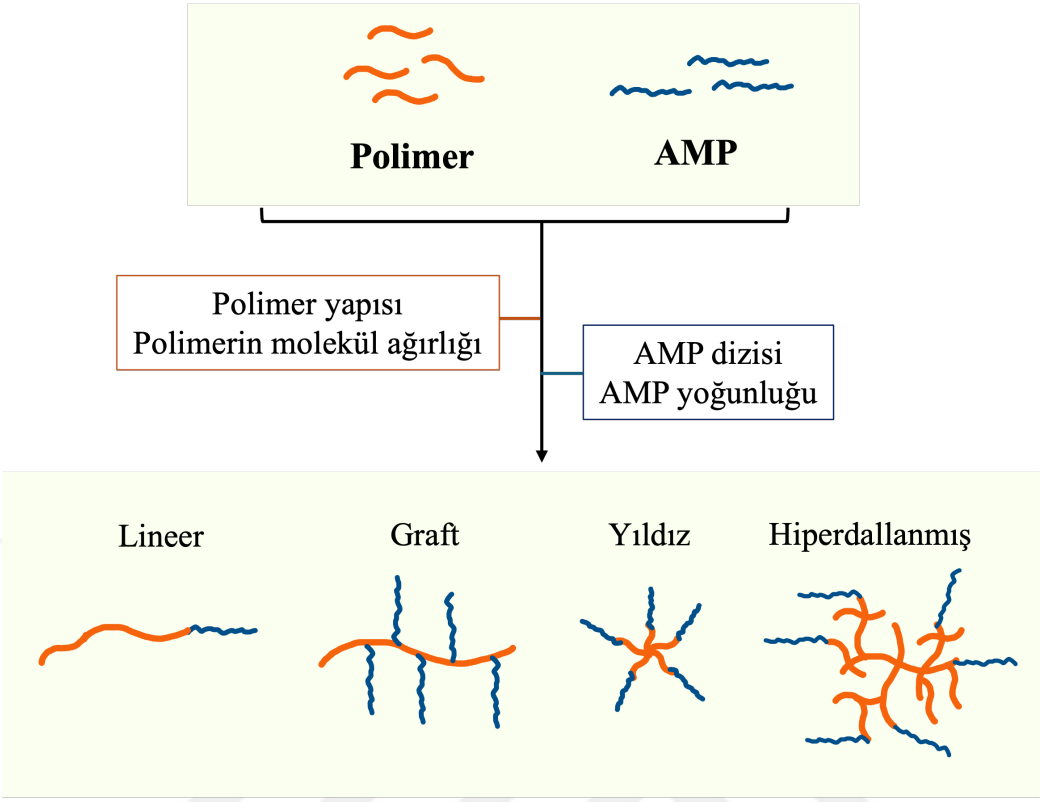
Şekil 2.15 Karboksil grubu ile amin grubu arasında HBTU bazı varlığında amid bağı oluşumu mekanizması ile polimer-peptid konjugasyonu [120]

Bu mekanizma ile gerçekleşen konjugasyon sonucunda amid bağı oluşmakta ve bu bağ polimer-peptid gibi biyomoleküllerin arasında oldukça kararlı bir bağ olmasını sağlamaktadır. Söz konusu avantajları sayesinde karboksil ve amin grupları arasında gerçekleşen konjugasyon ile ABPep'lerin hedef polimerlere bağlanmasında etkili ve güvenilir bir strateji olarak öne çıkmaktadır [121]. Yapılan bir çalışmada α-sarmal yapıya sahip aurein 2.1, aurein 2.6 and aurein 3.1 peptidleri COOH grubu bulunan PEG'e C-terminal pegilasyon ile konjuge edilmiştir [122].

2.5 Antibakteriyel Polimer-Peptid Konjugatlarının Mimari Yapıları

ABPep-polimer konjugatları alanındaki son gelişmeler, polimer kimyası, konjugasyon kimyası ve polimer destekli terapötik taşıma sistemlerini geliştiren moleküler tasarımına dayanmaktadır [112]. Polimerler ayarlanmış moleküler ağırlık, mimari ve bileşimle hazırlanmaktadır. Bu faktörler konjugat boyutunu, morfolojisini ve yüzey yükünü dolayısıyla antibakteriyel aktivitesini belirlemektedir. Literatürde yapılan farklı çalışmalar da ABPep-polimer konjugatlarının yapısal çeşitliliğini ve terapötik potansiyelini göstermektedir [9, 123]. Polimer zinciri başına birden fazla ABPep bağlanması ile sentezlenen konjugatlar sayesinde genellikle ABPep'lerin sahip olduğu güçlü antibakteriyel aktivitesi korunmaktadır. Bu sebeple ABPep'lerle birlikte polimerlerin kullanılmasının antibakteriyel aktivitede moleküler mimarinin rolünün oldukça önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Şekil 2.16'te gösterildiği üzere doğrusal,

graft, yıldız ve hiperdallanmış mimarilere sahip konjugatlar üretilmektedir [124].



Şekil 2.16 Farklı mimari yapılara sahip polimer-peptid konjugatları [124]

Tek bir ABPep'in doğrusal bir polimer zincirinin sonuna bağlandığı doğrusal ABPep-polimer konjugatları, genellikle ABPep'lerin kararlılığını ve biyouyumluluğu iyileştirmekte ancak antibakteriyel aktiviteyi düşürebilmektedir. ABPep'lerin tedavi edici özelliklerini biyouyumlu polimerlere konjugasyon yoluyla iyileştirmeye yönelik çalışmaları ilk olarak 2000'li yıllarda doğrusal mimarilere odaklanarak gerçekleştirilmiştir. Magainin 2 (GIGKWLHSAKKFGKAFVGEIMNS), tachyplesin I (KWCFRVCYRGICYRRCR) ve nisin A'nın PEG ile konjugasyonunun, ökaryotik hücreler için toksisiteyi azalttığı ancak antibakteriyel aktiviteyi de düşürdüğü açıklanmıştır [125]. Ayrıca ABPol ve ABPep'lerin lineer konjugasyonu, polimerin antibakteriyel aktivitesi ile karşılaştırıldığında antibakteriyel aktiviteyi azaltmasına rağmen antibakyeriyel polimerin memeli hücrelere karşı göstermiş olduğu sitotoksisteyi iyileştirebilmektedir [126].

antibakteriyel uygulamalar için doğrusal olmayan polimer mimarileri aynı polimer zincirinde birden fazla ABPep bağlanmasını sağlayabilmektedirler, bu da ABPep konsantrasyonunu ve dolayısıyla membran etkileşimini arttırarak bakterinin öldürülmesini arttırabilmektedir. Doğrusal konjugatlara kıyasla,

yüksek bakterisidal aktivite, düşük toksisite ve iyileştirilmiş kararlılığın dengesini sağlayabilecek doğrusal olmayan mimarilere sahip ABPep-polimer konjugatları için yapılan araştırmalar devam etmektedir. ABPep'ler bakteriyel membran bozulmasını kolaylaştırmada kooperatif bir şekilde çalışma eğiliminde olduğundan, birden fazla ABPep'in konjugasyonuna izin veren doğrusal olmayan polimer mimarilerinin daha etkili bakterisidal aktivite sağladığı görülmektedir.

Graft yapıdaki konjugatlar, bir polimer veya bir peptid gibi ana zincir üzerine bağlanmış makromoleküler yan zincirlerden oluşmaktadır. Graft polimerlerin yan zincir ve omurga uzunluğu, bu konjugatların bakterisidal aktivitesini artırmak ve sitotoksik etkileri azaltmak için modüle edilebilmektedir. ABPep yan zincir yoğunluğunun artırılması genellikle antibakteriyel aktiviteyi artırmaktadır [127]. Chan-Park tarafından yapılan bir çalışmada, polifosfoesterlerdeki alkin içeriğinin ayarlanmasıyla sistein uçlu ABPep CysHHC10'un (H-CKRWWKWIRW-NH_2) yoğunluğunun modüle edildiği gösterilmiştir. Peptidin tek başına kullanımıyla karşılaştırıldığında (MİK = 8 μg/mL), %41 ve %57 peptit içeriğine sahip konjugatlar, sırasıyla *E. coli*'ye karşı 16 ve 8 μg/mL'lik MİK değerleri sergilemiştir. Bu konjugatların MİK değerleri sırasıyla 6,6 ve 4,6 μg/mL peptite karşılık gelmekte olup, peptit kütle fraksiyonu temel alındığında, polifosfoester–peptid konjugatları, serbest peptitten daha düşük MİK değerleri sergilediği ortaya konulmuştur [128]. Polimer kimyasının bağlı peptitlerin sekonder yapısının esnekliğini büyük ölçüde etkilediği ve bunun da genel antibakteriyel aktivite üzerinde önemli sonuçlar doğurduğu gösterilmiştir. Literatürde yapılan farklı bir çalışmada, konjugatın graft yapısının, yüzeylerdeki ABPep aktivitesinin etkinliğini belirleyen önemli bir faktör olduğu ve polimer kimyasının da polimere bağlı peptitlerin sekonder yapısının esnekliğini büyük ölçüde etkileyerek genel antibakteriyel aktivite üzerinde kayda değer etkileri olduğu bulunmuştur. [129].

Antibakteriyel graft polimer tasarımında, bakteri yapışmasını önleyici özellik ile bakterisidal aktivite arasındaki denge kritik bir faktördür. ABPep'lerin graft polimerlere immobilizasyonu antibakteriyel özellikler kazandırsa da, bu durum bakteri yapışmasını önleyici özellikleri olumsuz etkileyebilmektedir. Bu sorunlar, ABPep'lerin polimer fırçalar üzerinde homojen dağılımının sağlanması, fırça yoğunluğunun dikkatli optimize edilmesi, daha güçlü ABPep'lerin kullanımı ve yeni nesil polimer fırça yapılarının tasarlanması gibi yaklaşımlarla çözülebilmektedir [130].

2.6 Antibakteriyel Polimer-Peptid Konjugatlarının Uygulama Alanları

Polimer-peptid konjugatları ilaç taşıma, aşılar ve antibakteriyel terapötik uygulamalarda kullanılmak üzere belirli işlevlere sahip olacak şekilde uyarlanabilen biyomalzemelerdir. Önceki bölümlerde de bahsedildiği gibi peptidler tek başlarına kullanıldıklarında, biyomedikal uygulamalarda bazı dezavantajlara sahiptir. Biyolojik ortamlarda enzimatik bozulmaya duyarlılık nedeniyle kısa yarı ömürleri vardır. Ayrıca, biyolojik ortamlarda inaktif bir konformasyona katlanabilmektedirler. Polimerlerin peptidlerle konjugasyonu sonucunda, bu sistemlere çeşitli terapötik ajanları kapsülleştirebilme, kontrollü ve hedeflenmiş ilaç iletimi sağlama, ilaç çözünürlüğünü artırma, sitotoksisiteyi azaltma ve uyarana duyarlı davranışlar sergileme gibi özellikler kazandırmaktadır [131].

Antibakteriyel polimer-peptid konjugatları hem biyomedikal ve hem de endüstriyel alanlarda oldukça geniş uygulama alanlarına sahiptir. Özellikle antibakteriyel kaplamalarda, ilaç taşıma sistemlerinde, yara rejenerasyonuna yönelik biyomalzemelerde ve doku mühendisliği gibi sistemlerde bakteriyel enfeksiyonlara ve mikrobiyal kontaminasyonlara karşı kullanılan önemli bir biyomalzeme çeşididir [28].

Metalik ve polimerik bazlı biyomalzemeler, kemik onarımı ve rejenereasyonu gibi klinik uygulamalarda kullanılmaktadır. Ancak, bakteriyel enfeksiyonlara karşı dayanaksız olmaları sonucu uzun süreli kullanımları sorun teşkil edebilmektedir. Bakterilerden kaynaklı inflamasyonu engellemek için antibakteriyel polimer-peptid konjugatları implant kaplamalarda kullanılmaktadır [132, 133]. Bunun sonucunda da yara iyileşmesinin gecikmesi ve doku nekrozu gibi olumsuz etkiler ortadan kaldırılabilmektedir. Ayrıca diğer antibakyeriyel ajanlara kıyasla, polimer-peptid konjugatlarının kullanılması yüksek antibakteriyel aktivite ve iyi biyouyumluluk sağlamaktadır. Örneğin, Costa ve arkadaşlarının Dhvar5 adlı bir katyonik peptidi kitosan kaplamalara kovalent olarak konjuge etmişlerdir. Bu sistemin Metisilin dirençli *S. aureus* kolonizasyonunu azalttığını kanıtlamışlardır [134]. Gao ve arkadaşları tarafından yapılan farklı bir çalışmada, katyonik bir ABPep halka açılma polimerizasyonu yöntemiyle sentezlemiş ve sentezlenen bu ABPep PEG zincirlerine bağlanarak antibakteriyel ve biyolojik yapışmayı engelleyici özellikte bir kaplama elde etmiştir. Kaplama olmayan implant yüzeyi ile karşılaştırıldığında PEG-ABPep kaplı implant yüzeyinde bakteri bulunmamıştır [135].

Antibakteriyel tedavi, antibakteriyel ajanların enfekte bölgeye yeterli miktarda başarılı bir şekilde teslim edilmesi ile gerçekleşmektedir. Polimer tabanlı ilaç taşıma

sistemleri, ilaçların kan dolaşımında korunmasını, belirli hücrelere aktif hedefleme yapılmasını ve sağlıklı dokulara karşı toksisitenin azaltılmasını sağlamaktadır [136]. Suda çözünebilen bu polimer taşıyıcılar, polimer iskeletine biyobozunur bağlarla bağlanmış düşük moleküler ağırlıklı ilaçlar veya peptitler taşımaktadır. Bu taşıyıcılar, aktif moleküllerin enfekte hücrelerde, organlarda ve dokularda kontrollü salınımını sağlamak için tasarlanmıştır. Polimer-peptid konjugatları, serbest peptidlerle karşılaştırıldığında, daha üstün etkinlik, geliştirilmiş farmakokinetik özellikler, artan stabilite, hedefleme yeteneği ve istenilen bölgede kontrollü aktive olma gibi avantajlar sunmaktadır. Yapılan bir çalışmada, GKWMKLLKKILK dizisine sahip peptid ile sentezlenen antibakteriyel polimer-peptit konjugatları, ABPep'nin bakteriyel enfeksiyon bölgesine taşınırken korunması ve serbest ABPep'nin enzimatik veya pH'a duyarlı hidrolizle salınması için uyaran duyarlı ilaç taşıma sistemleri olarak tasarlanmıştır [137].

Mevcut çalışmalar, antibakteriyel özellik gösteren polimer-peptid konjugatlarının, polimer ve/veya peptid yapılarına optimal şekilde yerleştirilmiş çeşitli fonksiyonel gruplar sayesinde farklı mimarilerde yüksek biyolojik aktivite sergileyen özgün yapılar oluşturduğunu göstermektedir. Ancak, antibakteriyel direnç mekanizmalarındaki artan çeşitlilik, bu alandaki yeni ve etkili çözümlere olan ihtiyacın sürdüğünü ortaya koymaktadır. Bu doğrultuda, tez çalışması kapsamında bakteriyel enfeksiyonlara karşı etkili, antibiyotik direncini aşma potansiyeline ve geliştirilmiş biyouyumluluk profiline sahip yenilikçi polimer-peptid mimarileri geliştirilmiştir. Özellikle antibakteriyel etkinlikleri sayesinde bu konjugatlar, biyomedikal uygulamalarda önemli kullanım potansiyeline sahiptir.

3
MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1 Kimyasal Malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal malzemeler ve markaları Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1 Tez çalışmasında kullanılan kimyasal malzemeler

Kullanılan Kimyasallar	**Marka**
4-Vinilpiridin (4VP)	Sigma-Aldrich
Azobisisobütironitril (AIBN)	Sigma-Aldrich
1-Bromohekzan (BrH)	Sigma-Aldrich
Etilendiamin (EDA)	Sigma-Aldrich
Tribütilfosfin (TBP)	Sigma-Aldrich
Etilendiamintetraasetik asit (EDTA)	Sigma-Aldrich
Diizopropiletilamin (DIPEA)	Sigma-Aldrich
2-(1H-benzotrizol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil-uronyum hekzaflorofosfat (HBTU)	Sigma-Aldrich
1-Bromohekzanoik asit	Sigma-Aldrich
4-Siyano-4-(fenilkarbonotiyoltiyo) pentanoik asit (CTA)	TCI Chemical
N-(2-Hidroksipropil)metakrilamid (HPMA)	TCI Chemical
Dimetilformamid (DMF)	Merck
Dietil eter	Merck
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Merck
Muller Hilton broth	Merck

Tablo 3.1 Tez çalışmasında kullanılan kimyasal malzemeler (devam)

Kullanılan Kimyasal Malzemeler	**Marka**
E. coli	ATCC
S. aureus	ATCC
(3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür) (MTT)	neoFroxx
Fetal sığır serumu (FBS)	Gibco
Dulbecco'nun Modifiye Edilmiş Eagle Besiyeri (DMEM)	Capricorn

3.2 Kullanılan Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve markaları Tablo 3.2'de verilmektedir.

Tablo 3.2 Tez çalışmasında kullanılan cihazlar

Kullanılan Cihazlar	**Marka**
Jel Geçirgenlik Kromatografisi	Viscotek TDA302
FTIR spektrofotometresi	Shimadzu IRPrestige-21
NMR spektrofotometresi	Bruker Avance
Floresans spektrometresi	PTI Technologies Quanta Master
UV spektrofotometresi	Shimadzu UV1700
Vakumlu etüv	Binder
Etüv (sterilizatör)	Binder
Ultra saf su cihazı	Millipore MilliQ
Ultrasonik su banyosu	Bandelin Sonorex
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	Heidolph
Hassas terazi	Presica
Mikroplaka okuyucu	Biotek Epoch 2
Etüv (sterilizatör)	Binder
Ultra saf su cihazı	Millipore MilliQ

3.3 Deneysel Yöntemler

Tez çalışmasında antibakteriyel aktiviteye sahip farklı mimarilerde pozitif yüklü polimer-peptid konjugatları üretilmiştir ve bu konjugatların biyolojik etkinlikleri incelemiştir.

Öncelikle P(4VP-co-HPMA) kopolimerleri tersinir katılmalı-ayrışmalı zincir transferi (RAFT) ve serbest radikal polimerizasyonu ile sentezlenmiştir. Ardından sentezlenen kopolimerler kuarternizasyon ajanları kullanılarak pozitif yüklenmiştir. Katyonik özelliğe sahip kopolimerler RWWRWWR ve SH-RWWRWWR amino asit dizilerine sahip peptid ile lineer ve graft yapılarında olacak şekilde konjugasyon reaksiyonları gerçekleştirilmiştir.

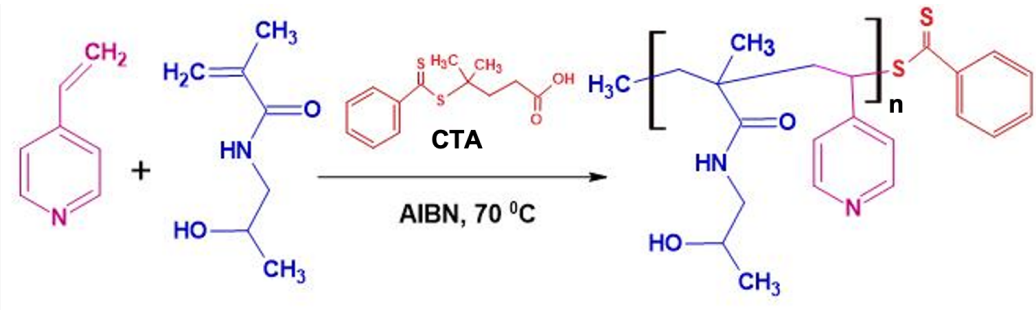
Üretilen lineer ve graft konjugatların *E. coli* ve *S. aureus* bakterileri üzerindeki antibakteriyel aktiviteleri, L929 hücreleri üzerinde de biyolojik etkinlikleri incelenmiştir.

3.3.1 Lineer Polimer-Peptid Konjugatı

Lineer polimer-peptid konjugatı üretiminde izlenen deneysel basamaklar sırasıyla verilmektedir.

3.3.1.1 RAFT polimerizasyonuyla P(4VP-co-HPMA) kopolimerinin sentezi

Tez çalışmasının ilk basamağında Şekil 3.1'de gösterilen 4VP'nin HPMA ile RAFT polimerizasyonu gerçekleştirilerek P(4VP-co-HPMA) kopolimeri sentezlenmiştir [138].



Şekil 3.1 P(4VP-co-HPMA)'nin RAFT polimerizasyonuyla sentezi.

Hedeflenen P(4VP-co-HPMA) (PVH) polimerinin sentezi için Tablo 3.3'te verilen farklı reaksiyon şartları denenmiş ve bu polimer serisi PVH koduyla isimlendirilmiştir.

Tablo 3.3 P(4VP-co-HPMA)'nin RAFT polimerizasyonuyla sentezlenmesi

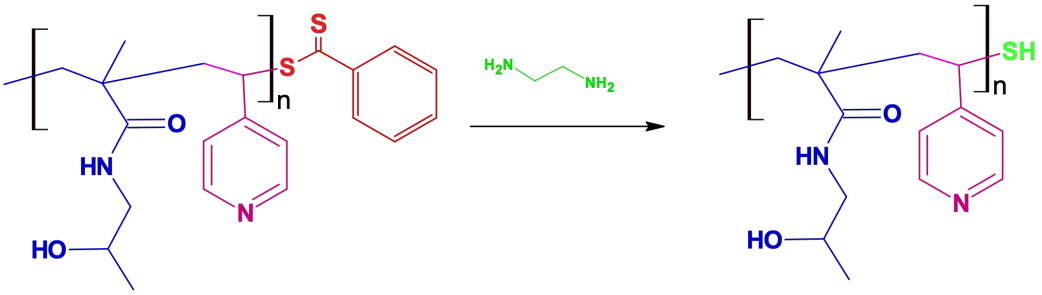
Üretilen Polimer Kodu	$[M]_0$ / $[CTA]_0$ / $[I]_0$	**Reaksiyon süresi (sa)**
PVH1	200/1/0,25	12
PVH2	200/1/0,25	2
PVH3-1	500/1/0,33	2
PVH4-1	800/1/0,33	2
PVH4-2	800/1/0,33	2

Örnek bir sentez şu şekilde gerçekleştirilmiştir:

Sentez sırasında RAFT ajanı olarak 4-siyano-4 (fenilkarbonotiyoltiyo)pentanoic acid (CTA ajanı) seçilmiştir. Başlatıcı olarak azobisizobütironitril (AIBN) kullanılmıştır. Tablo 3.3'te gösterilen $[M]_0$ / $[CTA]_0$ / $[I]_0$ oranları kullanılarak yapılan hesaplamalar sonucunda toplam çözelti hacmi 5 mL ve toplam monomer konsatrasyonu 2 M olacak şekilde 4VP, HPMA monomerleri ve CTA ajanı dimetilformamid (DMF) içinde çözülmüştür. Çözeltiden en az 30 dakika azot gazı geçirilmiş ve ardından yağ banyosunda 70°C'ye ısıtılıp AIBN çözeltiye eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. Reaksiyon sonunda elde edilen polimer soğuk dietileterle çöktürülmüştür. Polimer birkaç kez metanolle çözülüp soğuk dietileterle çöktürülerek yıkanmıştır. Ardından elde edilen polimer bir gece boyunca 50°C'de vakumlu etüvde kurutulmuştur. Elde edilen polimerin molekül ağırlığı ve molekül ağırlığı dağılımı GPC kullanılarak belirlenmiş, kimyasal yapısı ise NMR spektroskopisi ile saptanmıştır.

3.3.1.2 P(4VP-co-HPMA) kopolimerinin zincir uç grubunun tiyol grubuna indirgenmesi

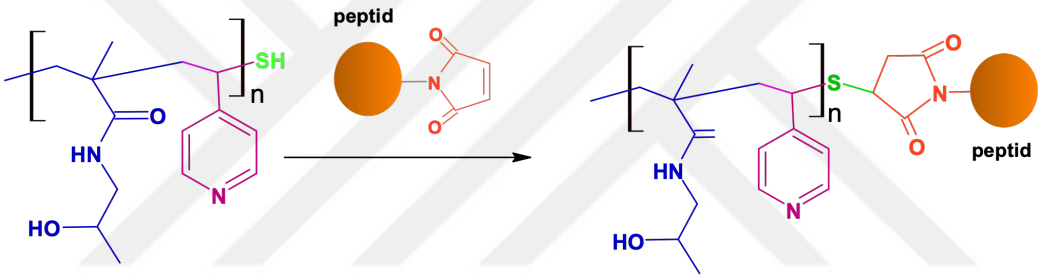
RAFT polimerizasyonuyla üretilmiş kopolimerin zincir uç grubu tiyol maleimid reaksiyonu için uygun değildir. Bu sebeple, zincir ucundaki ditiyoester grubu Şekil 3.2'de görüldüğü gibi tiyol (-SH) grubuna indirgenmiştir [139]. Bunun için 20 mg kuarternize kopolimer 1,75 mL DMSO'da çözülmüştür. Çözelti 30 dakika azot gazına tabi tutulmuştur. Daha sonra [PVH]/[EDA]/[TBP]=1/100/10 olacak şekilde belirlenen miktarlarda tribütilfosfin (TBP) ve etilendiamin (EDA) çözeltiye eklenerek 7 gün boyunca 25°C'de reaksiyona sokulmuştur. Reaksiyon sonunda kopolimer aşırı miktarda dietil eter ile çöktürülüp kurutulmuştur. Elde edilen ürün UV spektrometresi ve GPC ile analiz edilmiştir.



Şekil 3.2 P(4VP-co-HPMA)'nin zincir uç grubunun etilendiamin ile tiyol grubuna indirgenmesi

3.3.1.3 P(4VP-co-HPMA) kopolimerinin maleimid uç grubuna sahip RWWRWWR peptidi ile konjugasyonu

İndirgenmiş P(4VP-co-HPMA) ve katyonik peptid, polimerin tiyol grubu ve peptidin maleimid grubu tiyol-maleimid reaksiyonu ile Şekil 3.3'te görüldüğü gibi konjuge edilmiştir [139]. Tiyol uç gruba indirgenmiş polimer (9 mg) 2,0



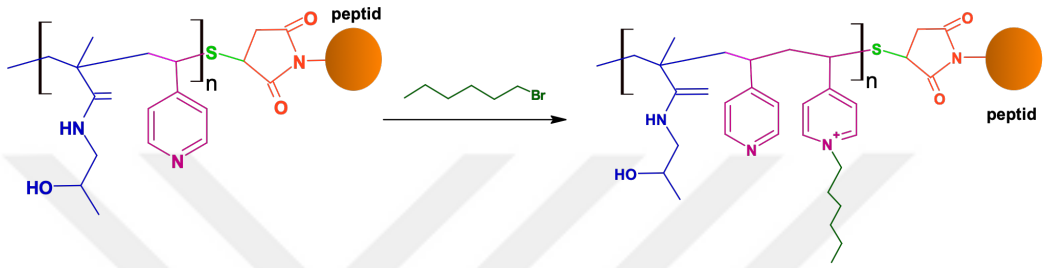
Şekil 3.3 RWWRWWR peptidi ile P(4VP-co-HPMA) kopolimerinin konjugasyonu

mL DMF'te çözülmüştür. Maleimid işlevli peptidin mol sayısı, polimerin 3 katı olacak şekilde belirlenmiştir. 0,5 mL DMF içinde çözülmüş olan N-terminal ucu maleimid-işlevselleştirilmiş peptit, polimer çözeltisine ilave edilmiştir. Reaksiyon, oda sıcaklığında 3 gün gerçekleştirildikten sonra, çözelti aşırı miktar soğuk dietil eter ile çöktürülmüştür. Ardından kurutulan konjugatın sulu çözeltisi hazırlanmış ve bağlanmamış peptidlerin uzaklaştırılması için pH 4'te MWCO değeri 3,5 kDa olan diyaliz membran ile diyaliz yapılmıştır. Diyaliz işleminin ardından konjugat liyofilizatörde kurutulmuştur. Daha sonra oluşan konjugat GPC ve floresans spektroskopisi ile incelenmiştir.

3.3.1.4 RWWRWWR peptidi ile konjuge edilmiş P(4VP-co-HPMA) kopolimerinin kuarternerleştirilmesi

Sentezlenen konjugatta bulunan 4VP birimleri Şekil 3.4'te görüldüğü gibi hekzil bromür kullanılarak kuarternize edilmiştir. 5 mg konjugat 0,5 mL etanol içerisinde çözülmüş ve bu çözeltiye kuarternizasyon oranını ayarlayabilmek için belirlenen

konsantrasyonda kuarternizasyon ajanı (hekzil bromür) ilave edilmiştir. Daha önceki yapmış olduğumuz çalışmalardan referans alarak polimerin en yüksek antibakteriyel etkinliği için polimer zincirindeki piridin halkalarının %40 ve üzerinde olacak şekilde kuarternernize edilmiştir [16]. Homojen haldeki çözelti yaklaşık 2 gün boyunca 70°C'de tutulmuştur. Bu işlemin sonunda polimerin saflaştırılması için çözelti içerisindeki polimer aşırı miktar dietil eter ile çöktürülüp santrifüj edilmiştir. Daha sonra toz formda olan örnekler etüvde kurutulmuştur. ^{1}H-NMR spektrumu alınan konjugatın kimyasal yapısı ve kuarternizasyon derecesi saptanmıştır.

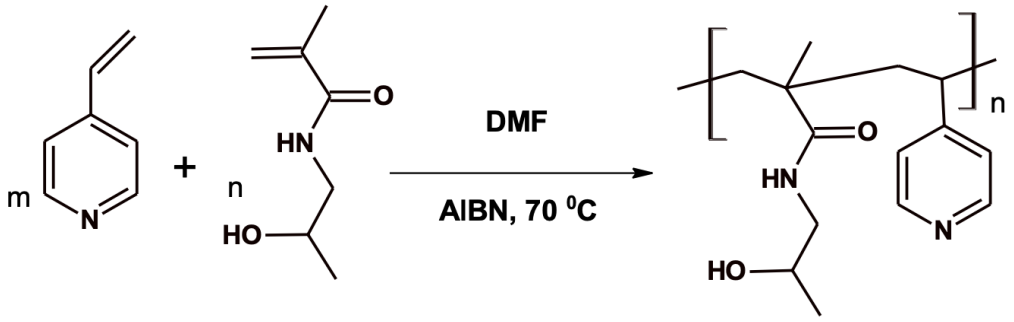


Şekil 3.4 RWWRWWR peptidi ile konjuge edilmiş P(4VP-co-HPMA) kopolimerinin kuarternize edilmesi

3.3.2 Graft Polimer-Peptid Konjugatı

3.3.2.1 Serbest Radikal Polimerizasyonu ile P(4VP-co-HPMA) sentezi

Tez çalışmasında Şekil 3.5'te gösterilen 4VP'nin suda çözünür HPMA monomeriyle serbest radikal polimerizasyonu gerçekleştirilmiştir [16].



Şekil 3.5 P(4VP-co-HPMA)'nin serbest radikal polimerizasyonuyla sentezlenmesi

Hedeflenen P(4VP-co-HPMA) (SPVH) kopolimerinin sentezi için Tablo 3.4'te verilen $[M]_0$ / $[I]_0$ oranları kullanılarak iki farklı polimer sentezlenmiştir. Sentez sırasında başlatıcı olarak AIBN kullanılmıştır. Hedeflenen $[M]_0$ / $[I]_0$ oranları kullanılarak yapılan hesaplamalar sonucunda toplam çözelti hacmi 5 mL ve toplam monomer konsatrasyonu 2 M olacak şekilde 4VP (0,4 M) ve HPMA

Tablo 3.4 P(4VP-co-HPMA)'nin serbest radikal polimerizasyonuyla sentezlenmesi (SPVH)

Üretilen Polimer Kodu	$[M]_0$ / $[I]_0$
SPVH2	400/1
SPVH5	100/1

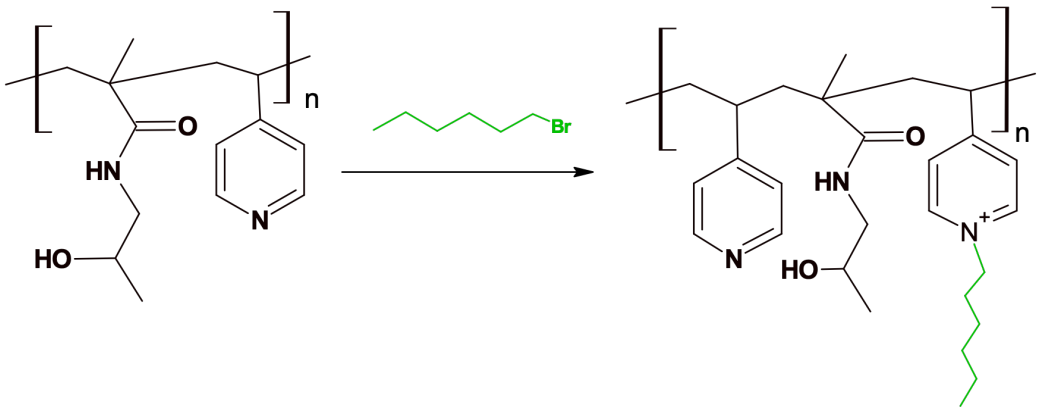
(1,6 M) monomerleri DMF içinde çözülmüştür. Çözeltiden en az 30 dakika azot gazı geçirilmiş ve ardından yağ banyosunda 70°C'ye ısıtılıp AIBN çözeltiye eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. Reaksiyon sonunda elde edilen polimer soğuk dietileterle çöktürülmüştür. Polimer birkaç kez metanolle çözülüp soğuk dietileterle çöktürülerek yıkanmıştır. Ardından elde edilen polimer 1 gece boyunca 50°C'de vakumlu etüvde kurutulmuştur. Elde edilen polimerin molekül ağırlığı ve dağılımı GPC kullanılarak belirlenmiş, kimyasal yapısı ise NMR spektroskopisi ile saptanmıştır.

3.3.2.2 P(4VP-co-HPMA) Kopolimerinin Kuarternerleştirilmesi (QSPVH)

Sentezlenen kopolimerde bulunan 4VP birimleri Şekil 3.6'da görüldüğü gibi hekzil bromür kullanılarak kuarternize edilmiştir [67]. SPVH2 ve SPVH5 kopolimerleri ayrı ayrı 300 mg olacak şekilde 6 mL etanol içerisinde çözülmüş ve bu çözeltiye kuarternizasyon oranını ayarlayabilmek için belirlenen konsantrasyonda kuarternizasyon ajanı (hekzil bromür) ilave edilmiştir. Daha önce yapılan optimizasyon çalışmalarından referans alınarak polimerin en yüksek antibakteriyel etkinliği için polimer zincirindeki piridin halkalarının %40 ve üzerinde olacak şekilde kuarternize edilmiştir (Sonraki basamakta piridin halkasından bağlanacak karboksil gruplar da düşünülerek hesaplama yapılmıştır). Homojen haldeki çözelti yaklaşık 4 gün boyunca 70°C'de tutulmuştur. Bu işlemin sonunda polimerin saflaştırılması için çözelti içerisindeki polimer aşırı miktar dietil eter ile çöktürülüp santrifüj edilmiştir. Daha sonra toz formda olan örnekler etüvde kurutulmuştur. ^{1}H-NMR spektrumları alınan polimerin kimyasal yapısı ve kuarternizasyon derecesi saptanmıştır.

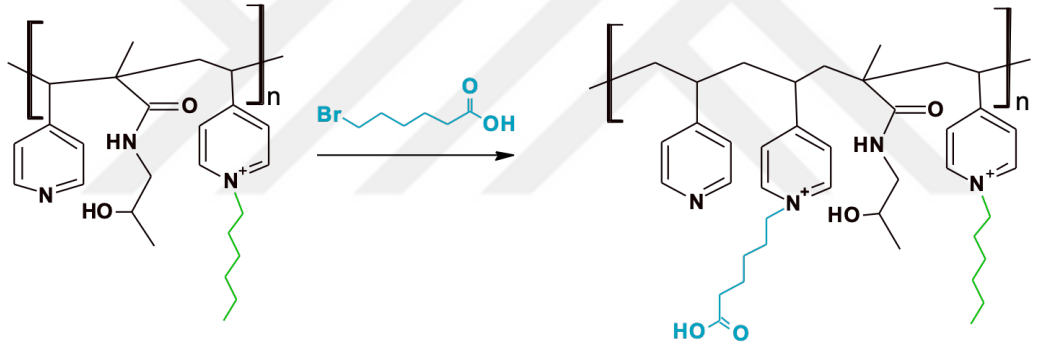
3.3.2.3 Kuarternize P(4VP-co-HPMA) kopolimerinin 1-bromohekzanoik asit ile kuarternizasyonu (QSPVHC)

Polimer-ABPep graft konjugatlarının sentezlenebilmesi için öncelikle kuarternize kopolimerdeki kuarternize edilmemiş 4VP gruplarının karboksilik asit yapısı ile fonksiyonelleştirebilmesi için Şekil 3.7'de görüldüğü gibi 6-bromohekzanoik asitle



Şekil 3.6 1-bromohekzan ile P(4VP-co-HPMA)'nin kuarternize edilmesi

kuarternizasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Kopolimerler ayrı ayrı 250 mg tartılarak 5 mL izopropanol içerisinde çözülmüştür. Reaksiyon 70°C'de 3 gün süreyle gerçekleştirilmiştir. Daha sonra polimer çözeltisi aşırı eterle çöktürülerek vakumlu etüvde kurutulmuştur. Elde edilen polimer NMR spektroskopisi ile analiz edilmiş ve polimer zinciri üzerindeki karboksilik asit grubu sayısı belirlenmiştir.

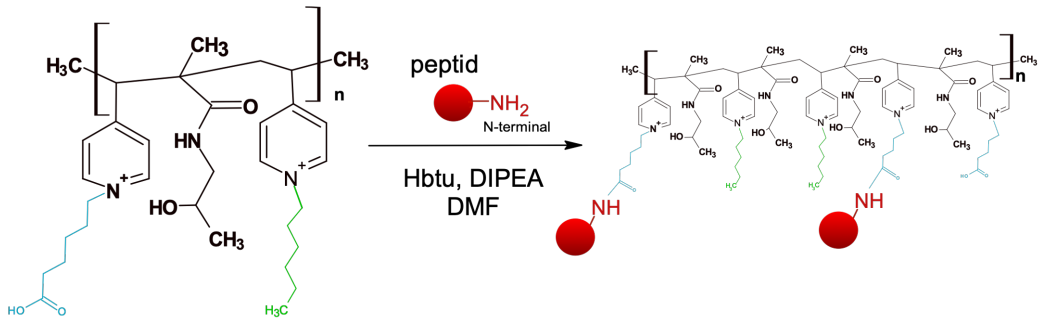


Şekil 3.7 P(4VP-co-HPMA)'nin 1-bromohekzanoik asit ile kuarternize edilmesi

3.3.2.4 Kuarternize P(4VP-co-HPMA) kopolimerine RWWRWWR peptidinin amid bağıyla konjugasyonu

RWWRWWR peptidi polimerde bulunan COOH grupları üzerinden konjuge edilmiştir. İlgili reaksiyon mekanizması Şekil 3.8'de gösterilmektedir. Bu yöntemde, polimerin karboksilik yan gruplarına RWWRWWR peptidinin sahip olduğu amin grubundan bağlanmanın gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir.

Reaksiyonu gerçekleştirmek için aktivatör bazı olarak DIPEA, aktivatör olarak da HBTU [140] Tablo 3.5'te gösterildiği gibi belirlenen miktarlarda kullanılmıştır. Çözelti 5 dakika karıştırıldıktan sonra 2 mL DMF'te çözülen RWWRWWR peptidi eklenmiştir. Reaksiyon gerçekleştirildikten sonra çözelti aşırı miktar soğuk eter ile çöktürülmüştür. Vakum etüvde 50°C'de kurutulmuştur. Ardından, konjugat pH



Şekil 3.8 COOH yan gruplara sahip SPVH kopolimerinin RWWRWWR peptidi ile konjugasyonu

4'e ayarlı tampon çözeltide çözülmüş ve bağlanmamış peptidlerin uzaklaştırılması için pH 4'te MWCO değeri 3,5 kDa olan diyaliz membran ile diyaliz yapılmıştır. Diyaliz işleminin ardından konjugat liyofilizatörde kurutulmuştur. Daha sonra oluşan konjugatlar floresans spektroskopisi ve GPC ile incelenmiştir.

Tablo 3.5 QSPVH5C polimeri ile antibakteriyel peptidinin sentez metodları

Konjugatın ismi	**Aktivatör/Aktivatör bazı**	**Peptid miktarı (molce)**	**Reaksiyon süresi**
SPVH5-Pep3	[COOH]:[HBTU]:[DIPEA] = 1:1:3	[COOH]:[Peptid]=1:3	60 dakika
SPVH5-Pep4	[COOH]:[HBTU]:[DIPEA] = 1:3:6	[COOH]:[Peptid]=1:9	24 saat
SPVH5-Pep5	[COOH]:[HBTU]:[DIPEA] = 1:3:6	[COOH]:[Peptid]=1:9	1 hafta
SPVH5-Pep6	[COOH]:[HBTU]:[DIPEA] = 1:5:10	[COOH]:[Peptid]=1:3	1 hafta

3.4 Karakterizasyon

3.4.1 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) Analizi

Kopolimerin yapısını ve kuarternize kopolimerlerin piridin halkalarının kuarternizasyon derecelerini belirlemek için FT-IR spektroskopisi kullanılmıştır. Tüm numuneler kuru toz halinde, ZnSe kristali içeren Pike MIRacle ATR aparatı ile Shimadzu IR-Prestige-21 FT-IR spektrometresi kullanılarak analiz edilmiştir. Ölçümler 4000-650 cm^{-1}'lik dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir.

3.4.2 NMR Spektroskopisi ile Analizi

Kopolimer ve kuarternize edilmiş tüm polimerlerin, ^{1}H-NMR spektrumları Bruker Avance 500 NMR spektroskopisi kullanılarak analiz edilmiştir. Polimer örnekleri dötero kloroform veya DMSO'da çözünerek spektrumları alınmıştır.

3.4.3 Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC)

Sentezlenen kopolimerlerin ve konjugatların molekül ağırlığı ve molekül ağırlığı dağılımı ile kromatogramları, kırılma indisi ve ışık saçılma detektörleri içeren Viscotek TDA302 GPC sistemi kullanılarak belirlenmiştir. Ayırma işlemi Eprogen CatSEC300 kolonuyla gerçekleştirilmiş ve akış hızı 0,15 veya 0,3 mL/dak olarak ayarlanmıştır. Mobil faz olarak, 0,15 M NaCl içeren 0,1 M asetik asit çözeltisi hazırlanmıştır. Kalibrasyon standardı olarak polietilen oksit (Mn = 21 kDa ve PDI = 1,15) kullanılmıştır. Örnekler 0,45 μm şırınga filtresi ile filtrelenmiştir.

3.4.4 UV-Vis Spektroskopisi

Numunelerin absorbansını belirlemek için CPS-240A sıcaklık kontrol üniteli Shimadzu UV-1700 UV-VIS spektrofotometre kullanılmıştır. Örnekler uygun bir çözücü içinde çözülüp 1 cm ışık yolu bulunan kuvars küvete eklenmiştir. Numuneyi çözmek için kullanılan çözücü, analiz sırasında spektrometrede kör çözelti olarak kullanılmıştır.

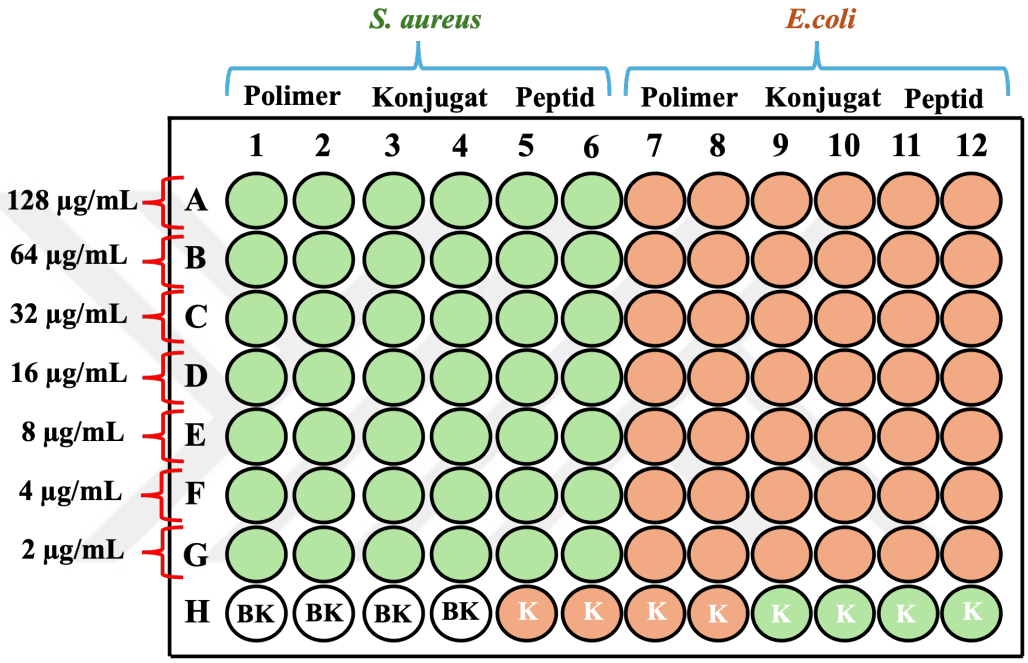
3.4.5 Floresans Spektroskopisi

Peptid dizisindeki triptofanın floresans özelliği yardımıyla polimerin peptide konjugasyonunu belirlemek için floresans spektroskopisi kullanılmıştır. Emisyon taraması Photon Technology International QM-4/2003 Quanta Master sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Numuneler 280 nm'de uyarılmış, numunelerin 290 ile 450 nm arasındaki emisyon spektrumları kaydedilmiştir.

3.4.6 Antibakteriyel Testler

Kuarternize edilmiş P(4VP-co-HPMA) kopolimerlerinin, peptidin ve üretilen konjugatların antibaleriyel aktiviteleri, Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) 2018 yönergelerine göre broth mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerleri belirlenmiştir [141]. Broth mikrodilüsyon yönteminde kullanılan *E.coli* ATCC 25922 ve *S.aureus* ATCC 25923 bakterilerinin kültürleri MHB besiyerinde hazırlanmıştır. Hazırlanan kültürler 37°C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında bakteri kültürlerinin 600 nm dalga boyundaki optik yoğunluk değerleri (OD) 0,1-0,2 (1,5-3,0x10^8 koloni oluşturan birimler (KOB), KOB/mL konsantrasyon) aralığında olacak şekilde UV spektroskopisi ile ayarlanmıştır. Kuarternize edilmiş P(4VP-co-HPMA) kopolimerleri, peptidi ve üretilen konjugatları steril suda çözülüerek stok çözeltileri hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu plaka kullanılarak, ilk kuyucuğa 100 μL stok çözeltiden eklenmiş ve diğer kuyucuklara her defasında

bu miktar yarısına düşürülerek örneklerin dilüsyonu sağlanmıştır. Ardından kuyucuklara bakteri kültüründen 100 μL eklenmiş ve kuyucuklardaki toplam hacim 200 μL olacak şekilde steril su eklenmiştir. Diğer bir yandan bakteri kültürü pozitif kontrol ve bakteri içermeyen sıvı besiyeri negatif kontrol grupları olarak çalışmaya eklenmiştir. Şekil 3.9'da test örneklerinin ilgili kuyucuklardaki konsantrasyonları şematik olarak 96 mikroplaka üzerinde gösterilmiştir. 96 kuyucuklu plakalar, 37°C'de 16 saat boyunca inkübe edilmiştir ve inkübasyon sonrasında her kuyucuktaki OD değerleri UV spektroskopisi ile belirlenmiştir.



Şekil 3.9 Broth mikrodilüsyon çalışması sırasında örneklerin 96'lı mikrolaka üzerindeki örnek konsantrasyon bilgilerinin şematik gösterimi

3.4.7 Biyouyumluluk Testleri

3.4.7.1 Hücre Kültürü

Kuarternize edilmiş P(4VP-co-HPMA) kopolimerlerinin, peptidin ve üretilen konjugatların biyouyumluluklarının değerlendirilmesi için L929 fibroblast hücrelerinde MTT analizi yapılmıştır. L929 hücreleri, %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin içiren DMEM/F12 besiyerinde ve %5 CO_2, %95 nem ve 37°C'deki inkübatörde çoğaltılmıştır. Hücreler 75T kültür kaplarında %70-80 konfluense ulaştığında %0,25 tripsin-EDTA çözeltisi ile pasajlanmıştır. Bu işlem sırasında toplanan hücreler 5°C sıcaklıkta ve 1000 rpm hızında 5 dakika boyunca santrifüjlenmiş ve daha sonra süpernatant ayrılarak kalan hücre pelleti 1 mL büyüme ortamı ile süspanse edilmiştir. Tripan mavisi kullanılarak Thoma lamında hücreler sayılarak gerekli miktardaki hücre büyüme ortamına alınmıştır.

3.4.7.2 MTT Yöntemi

Kuarternize edilmiş P(4VP-co-HPMA) kopolimerlerinin, peptidin ve üretilen konjugatların farklı konsantrasyonlardaki sitotoksisiteleri, hücresel metabolik aktiviteyi ölçmede kullanılan MTT yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. Bu yöntemde MTT tuzundaki suda çözünen sarı renkli tetrazolyum, hücrelerde mitokondriyal aktivite ile suda çözünmeyen mor renkli formazana dönüştürülmektedir. Bunun sonucunda formazan miktar tayini ile mevcut hücre canlılığı belirlenmektedir.

MTT analizi için her kuyuda 10^5 hücre/mL olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara hücre ekimi yapılarak 24 saat inkübasyon koşullarında bekletilmiştir. Uygulamaya başlamadan önce kopolimer, peptid ve konjugat örneklerinin UV ile 45 dakika boyunca sterilizasyon işlemi uygulanmış ve ardından belirlenen konsantrasyonlardaki örnekler sıvı besiyerinda hazırlanmıştır. Bu işlemin sonunda farklı konsantrasyonlarda hazırlanan kopolimer, peptid ve konjugat örnekleri hücrelere uygulanmıştır ve plakalar 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra herbir kuyuya 1X fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile hazırlanan 10 μg/mL konsantarsyonundaki MTT çözeltisinden 10 μL eklenmiştir. Ardından 4 saat boyunca karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır. 4 saat sonunda oluşan formazan kristallerini çözmek için herbir kuyuya 100 μL DMSO eklenmiş ve tekrar 30 dakika karanlık ortamda tutulmuştur. 96 kuyucuklu plakalardaki OD değerleri Biotek Epoch 2 marka mikroplaka okuyucuda 570 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Elde edilen OD değerlerinin Eşitlik 3.1'de hücre canlılığı % olarak hesaplanmıştır.

$$\text{Hücre Canlılığı } (\%) = \frac{\text{Örneğin OD değeri}}{\text{Kontrol grubunun OD değeri}} \times 100 \qquad (3.1)$$

Deneysel yöntemler Uluslararası Standardizasyon Örgütü (ISO) 10993-5'e uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubuna ait hücre canlılığı %100 olarak analiz edilmiş ve diğer örneklere ait sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırılarak grafiklendirilmiştir. Her grup örnek için 3 tekrar yapılmıştır ve analiz edilen değerlerin standart sapmaları ($\pm$ SD) hesaplanmıştır.

4
BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada biyolojik uygulamalarda kullanılmak üzere antibakteriyel özelliğe sahip, P(4VP-co-HPMA) kopolimerine göre iyileştirilmiş biyouyumluluğa sahip farklı mimarilerde P(4VP-co-HPMA)-peptid konjugatlarının üretilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda;

Lineer polimer-peptid konjugatı için

- 4VP ve HPMA monomerlerinin RAFT polimerizasyonu ile kopolimer sentezi gerçekleştirilmiş,
- RAFT ajanı ile üretilen kopolimerin uç grubu tiyol reaksiyonu ile -SH grubuna indirgenmiş ve peptid ile konjugasyona hazır hale getirilmiş ve maleimid uç gruba sahip RWWRWWR peptidi ile -SH uç grubuna sahip polimer kullanılarak lineer polimer-peptid konjugatı sentezlenmiş,
- Sentezlenen konjugat alkilleyici ajanla kuarternize edilerek katyonik lineer polimer-peptid konjugatı elde edilmiştir.

Graft polimer-peptid konjugatı için

- 4VP ve HPMA monomerlerinin serbest radikal polimerizasyonu ile kopolimer sentezi gerçekleştirilmiş,
- Serbest radikal polimerizasyonu ile sentezlenen kopolimer 2 farklı alkilleyici ajan ile kuarternize edilmiş ve bunun sonucunda kopolimer hem pozitif yüklenmiş hem de polimere COOH yan grupları eklenmiş,
- Polimerdeki COOH grupları peptiddeki NH_2 gruplarıyla kovalent bağlanarak graft yapıda polimer-peptid konjugatı üretilmiştir.

Farklı mimarilerde üretilen tüm polimer-peptid konjugatlarının Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler üzerinde antibakteriyel aktiviteleri incelemiştir. Üretilen

tüm polimer-peptid konjugatlarının biyolojik uygulamalarda kullanılabilmesi için sitotoksisitesi incelenmiştir.

4.1 Lineer Polimer-Peptid Konjugatı

4.1.1 RAFT polimerizasyonuyla P(4VP-co-HPMA) kopolimerinin sentezi

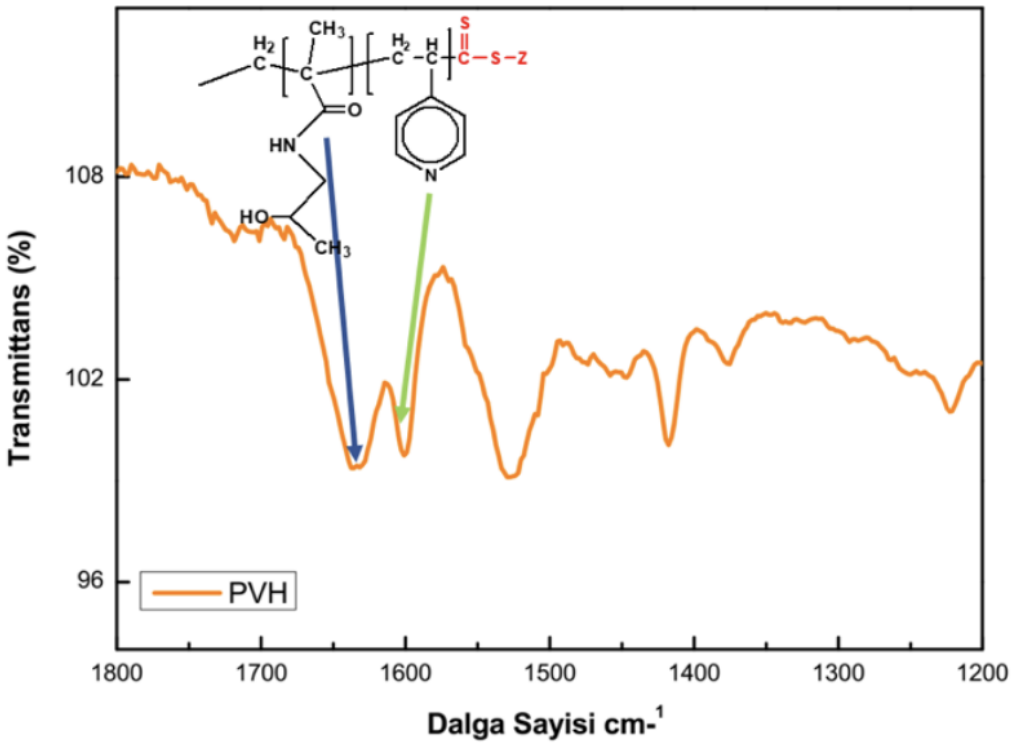
4VP ve HPMA monomerlerinin RAFT polimerizasyonu sonucunda pembe toz formunda bir P(4VP-co-HPMA) (PVH) kopolimeri elde edilmiştir. Polimerizasyon reaksiyonu sonunda Eşitlik 4.1'de yapılan hesaplamalar neticesinde PVH2 ve PVH4 kopolimerleri için polimerizasyon verimleri sırasıyla % 20,71 ve % 12,87 olarak belirlenmiştir.

$$\text{Polimerizasyon Verimi } (\%) = \frac{\text{Elde edilen polimerin kütlesi}}{\text{Toplam monomer kütlesi}} \times 100 \qquad (4.1)$$

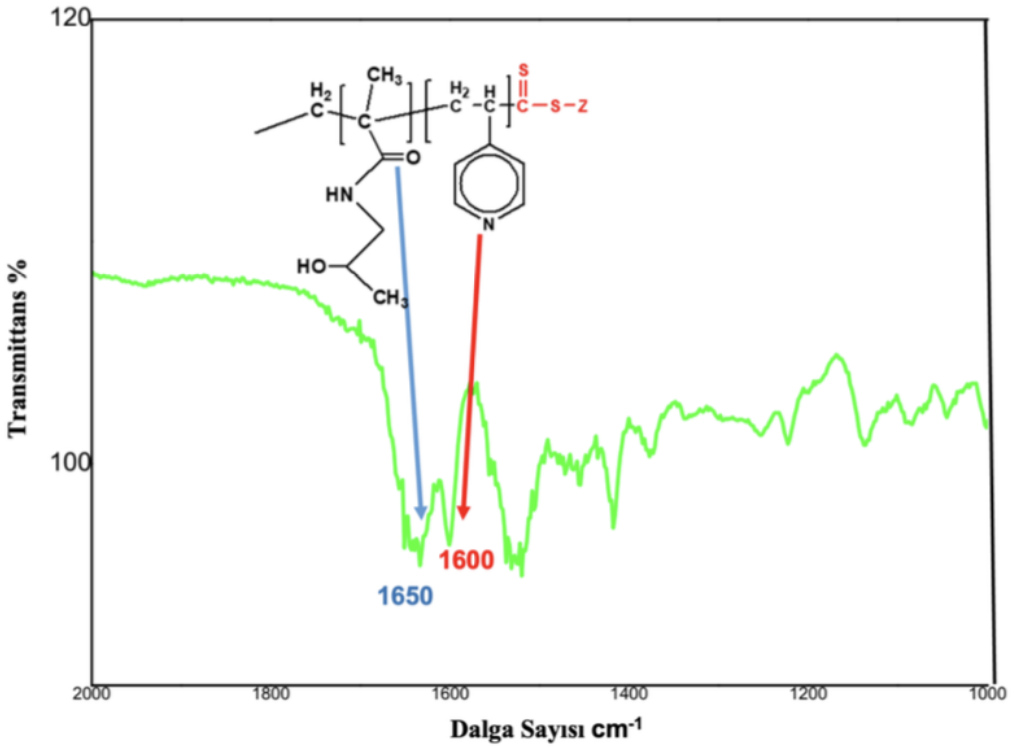
Kopolimerin moleküler ağırlığı ve moleküler ağırlık dağılımı GPC ile belirlenmiştir. Kopolimerin kimyasal yapısını analiz etmek için FT-IR ve NMR spektroskopileri kullanılmıştır.

Sentezlenen PVH2 ve PVH4 kopolimerlerinin FT-IR spektrumları Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de verilmiştir. 1600 cm^{-1}'deki bant piridin halkasına, 1652 cm^{-1}'de bulunan bant ise HPMA'nın (-C=O) karbonil grubuna aittir. Literatürde de görülebileceği gibi, FT-IR spektrumlarındaki 1600 ve 1652 cm^{-1}'deki bantlar piridin ve amid gruplarının varlığını kanıtlamaktadır [16, 138]. Diğer polimerler de benzer FT-IR spektrumları vermektedir.

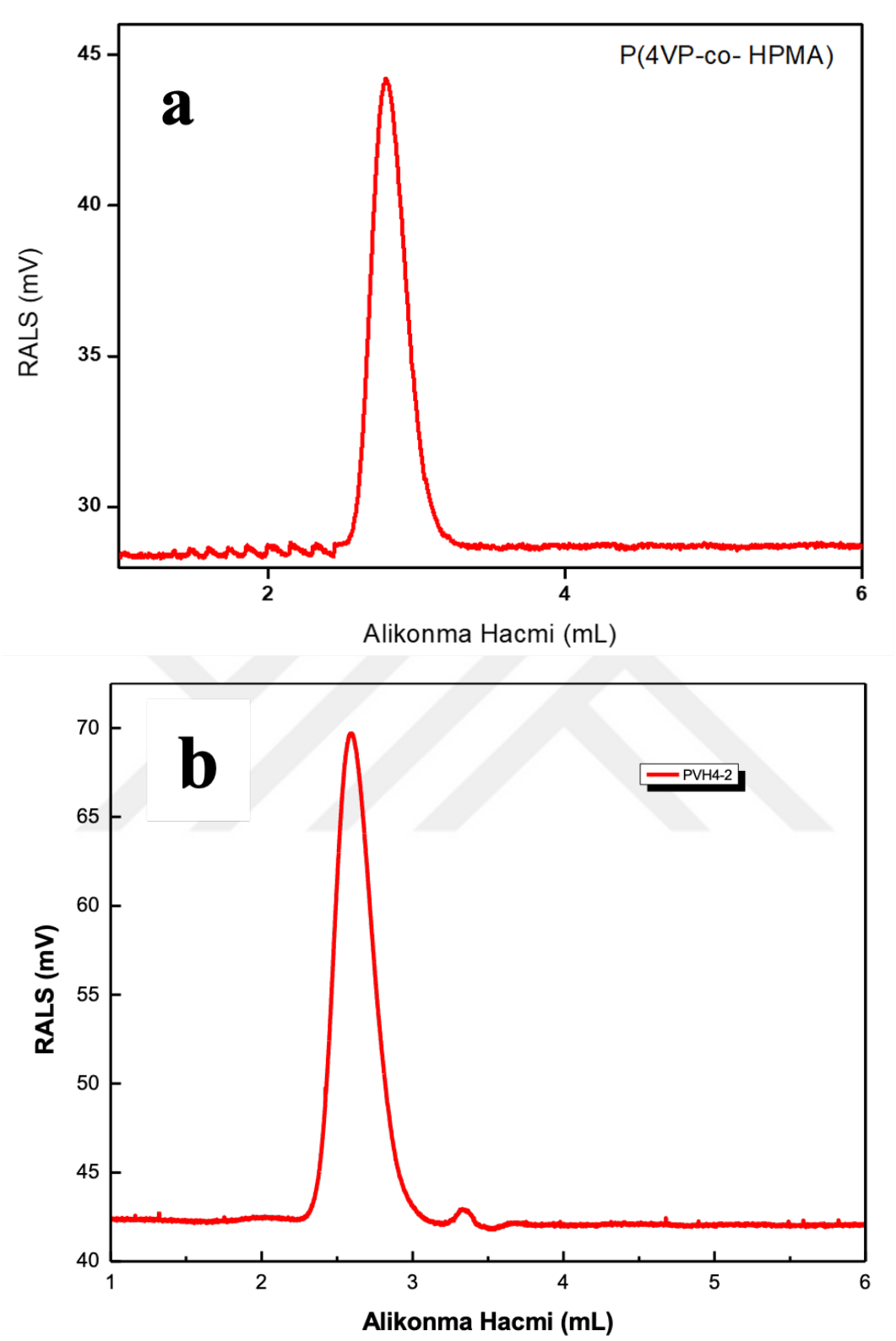
FT-IR spektroskopisinden sonra üretilen tüm kopolimerler GPC ile analiz edilmiştir. Üretilen tüm kopolimerlerin ışık saçılması dedektöründen alınan GPC kromatogramları Şekil 4.3'te verilmiştir. Bu dedektörden gelen sinyal doğrudan polimerin konsantrasyonu ve moleküler kütlesi ile ilişkilidir.



Şekil 4.1 PVH2'nin FT-IR spekturumu



Şekil 4.2 PVH4-2'nin FT-IR spekturumu



Şekil 4.3 Üretilen (a)PVH2 ve (b)PVH4-2 kopolimerlerinin ışık saçılması dedektöründen elde edilen GPC kromatogramları

Şekil 4.3a'daki kromatogram incelendiğinde PVH2 kopolimerinin yaklaşık olarak 3 mL'de elüe olduğu ve monomere ait pik veya piklerin bulunmadığı görülmüştür.

Şekil 4.3b'de verilen kromatogramda ise polimerin yaklaşık olarak 2,75 mL'de elüe olduğu ve monomerlere ait pik veya pikler bulunmadığı görülmektedir.

PVH kopolimerlerinin GPC analizi sonucunda ağırlıkça ortalama molekül ağırlıkları (Mw) ve polidispersite indeksleri Tablo 4.1'de belirtildiği gibi bulunmuştur.

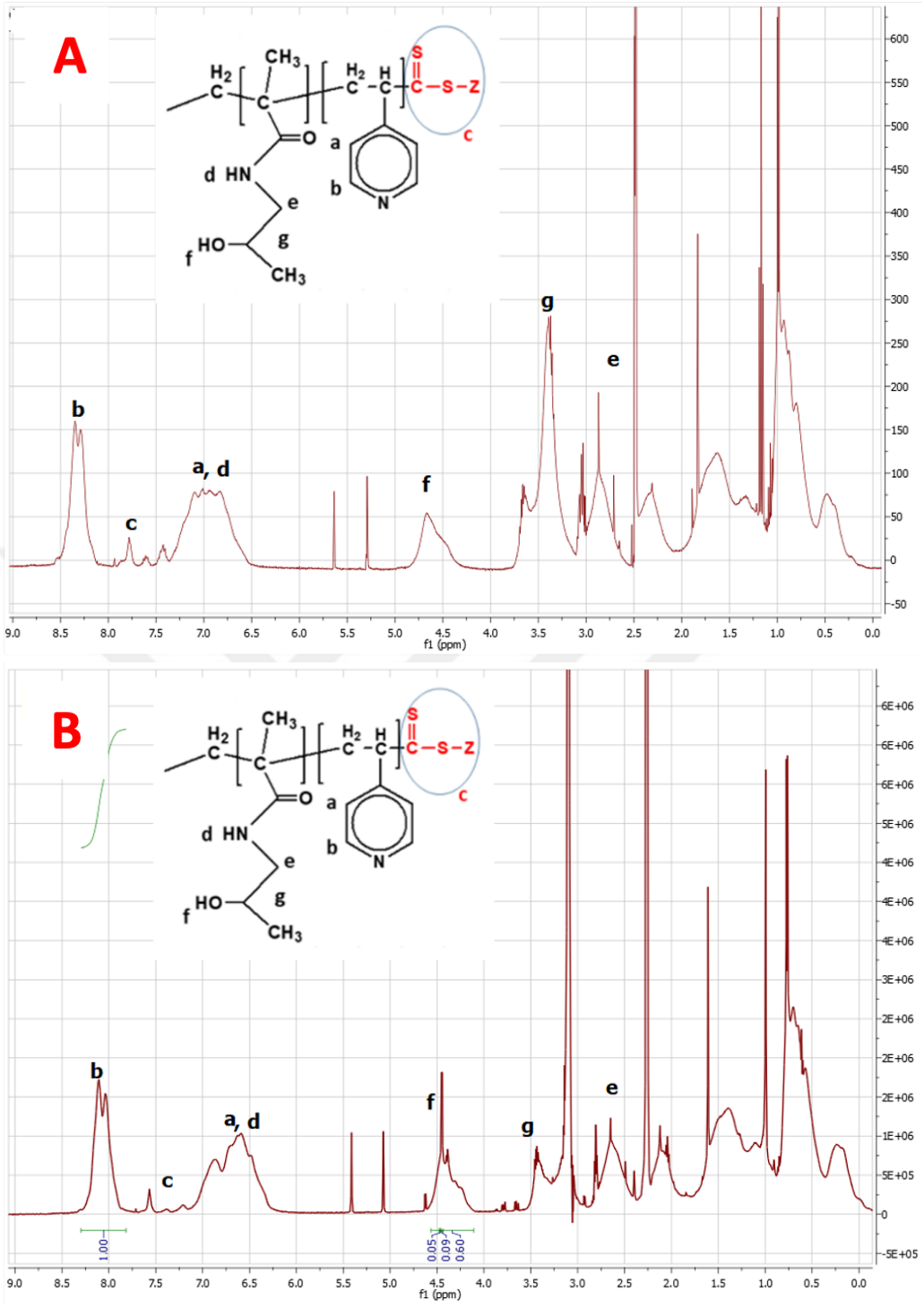
Tablo 4.1 Üretilen PVH kopolimerlerinin Mw ve Mw/Mn değerleri

Üretilen Polimer	$[M]_0$ **/** $[CTA]_0$ **/** $[I]_0$	**Mw (Da)**	**Mw/Mn**
PVH2	200/1/0,25	5215	1,10
PVH4-2	800/1/0,33	18400	1,09

GPC kromatogramları, üretilen kopolimerin unimodal dağılımda olduğunu ve reaksiyona girmemiş monomerlerin başarılı bir şekilde uzaklaştırıldığını göstermektedir. Ayrıca, tüm kopolimerlerin Mw/Mn değerleri de 1,2'den daha düşük çıkmıştır. Bu durumda, tüm polimerlerin RAFT polimerizasyonuna uygun bir şekilde dar bir molekül ağırlığı dağılımına sahip olduğunu çok net bir şekilde göstermektedir.

Bu çalışmada hedeflenen polimer minimum Mw değeri 10 kDa'dır. Bu değere ulaşabilmek için yapılan farklı sentezlerin sonuçları Tablo 4.1'de verilmiştir. İlk üretilen polimerin Mw değeri 10 kDa'nın altında kalmış ancak PVH4-2 polimerinde bu değerin üzerine çıkılabilmiştir.

Kopolimerler NMR spektroskopisi ile analiz edilerek ^{1}H-NMR spektrumları elde edilerek kimyasal yapıları ve monomer bileşimleri incelenmiştir. Şekil 4.4, PVH kopolimerlerinin dötero-DMSO içerisindeki ^{1}H-NMR spektrumların göstermektedir. PVH2 ve PVH4-2 kopolimerlerinin spektrumlarında görüldüğü üzere, 6,8 ve 8,3 ppm'deki (a ve b) pikler, 4VP'deki piridin halkasının protonlarına aittir. Spektrumda 0,5; 1,0; 1,8; 2,8; 3,8; 4,7; ve 6,8 ppm'de (h, i, j, e, g, f ve d) görülen pikler ise HPMA'daki grupların protonlara aittir. Ayrıca spektrumda 7,4-7,9 (c) arasındaki pikler CTA ajanına ait protonları göstermektedir. Spektrumlarda ayrıca 2,47 ppm'de DMSO'ya ait çözücü piki görülürken, 3,32 ppm'de su piki bulunmaktadır. Bu su piki, DMSO'nın havadan aldığı nemden kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.4 Üretilen (a) PVH2 ve (b) PVH4-2 kopolimerlerinin ^{1}H-NMR spektrumları

Spektrumdaki pik alanları kullanılarak sentezlenen polimerlerdeki monomerlerin molce yüzdeleri hesaplanmış ve Tablo 4.2'de verilmiştir. Üretilen kopolimerlerdeki monomerlerin zincirde bulunma yüzdelerinin her iki monomer için de % 45-55 aralığında olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Tablo 4.2 PVH kopolimerlerinin ^{1}H-NMR spektrumlarından elde edilen molce monomer yüzdeleri

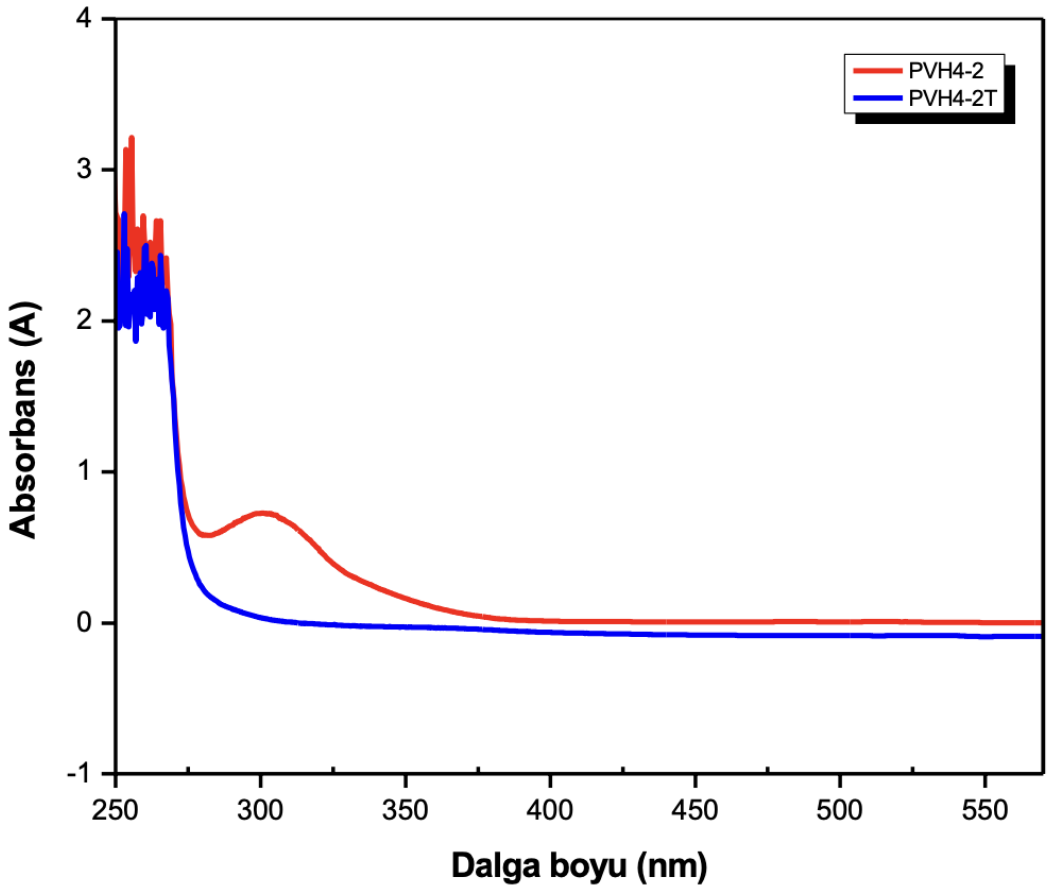
Üretilen Polimer	% 4VP	% HPMA
PVH2	56	44
PVH4-2	46	54

4.1.2 P(4VP-co-HPMA) kopolimerinin zincir uç grubunun tiyol grubuna indirgenmesi

Tez çalışmasının bu basamağında polimer zincir ucunda bulunan RAFT ajanı tiyol (-SH) grubuna indirgenmektedir. Bu grup sonraki aşamada peptidde bulunan maleimid grubuyla reaksiyona girmesi için kullanılacaktır. İndirgenme reaksiyonu sonrasında, polimere pembe rengini veren ditiyoester grubu tiyol grubuna indirgenmekte ve polimer pembe rengini kaybederek beyaza dönmektedir.

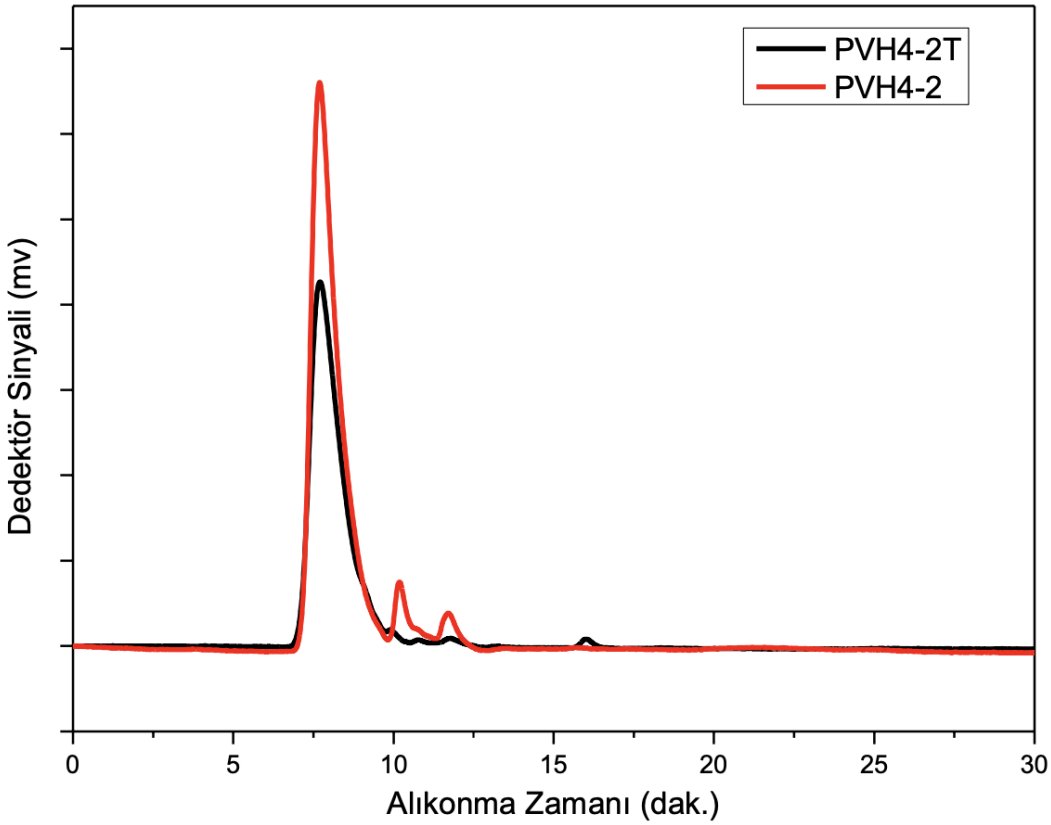
Tiyol uç gruba indirgenme reaksiyonundan sonra polimer UV spektroskopisi ve GPC ile incelenmiştir. PVH4-2 kopolimerinin zincir uç grubunun tiyol grubuna indirgenmesi sonucu zincir ucunda bulunan RAFT ajanının 300-320 nm'deki absorpsiyon bandının kaybolduğu Şekil 4.5'teki UV spektrumlarından gözlenmektedir.

RAFT polimerizasyonunda CTA ajanı ile sentezlenen kopolimerler zincir uçlarında CTA moleküllerinin fonksiyonel gruplarını taşımaktadır. Kopolimerin peptid ile konjugat oluşturabilmesi için CTA ajanında bulunan ditiyoester grubunun tiyol grubuna indirgenmesi gerekmektedir. Ditiyoester grubunun indirgenmesini belirlemenin en iyi yolu, polimerin UV spektrumunu indirgenmeden önce ve sonra analiz etmektir. Bu analizde, ditiyoester grubunun 300-320 nm arasındaki absorpsiyon bandı ya tamamen kaybolduğu ya da bandın absorpsiyon değeri ve maksimum dalga boyunun, ditiyoester grubunun azalmasından sonra daha düşük değerlere indiği görülmektedir [142]. UV spektrumu sonucunda kopolimerin zincir uç grubunun tiyol maleimid reaksiyonu için uygun hale geldiği sonucuna ulaşılmıştır.



Şekil 4.5 PVH4-2 kopolimerinin ve indirgenmiş halinin (PVH4-2T) UV spektrumu

İndirgenmiş kuarternize PVH4-2 kopolimeri sulu çözelti içerisinde yükseltgenerek zincir uçlarından disülfit bağı yaparak bir araya gelebilmekte ve peptidle konjugasyonunu engelleyebilmektedir. Bu durumu analiz etmek için GPC yöntemi kullanılmıştır. İndirgenmiş PVH4-2 kopolimerinin 280 nm'de UV dedektöründen alınan GPC kromatogramları Şekil 4.6'da verilmiştir. Eğer kopolimerler zincir uçlarından bağlanırlarsa polimerin molekül ağırlığında bir artış, molekül ağırlığı dağılımının unimodalden bimodale dönüşmesi gibi değişimler beklenmektedir.



Şekil 4.6 PVH4-2 kopolimerinin ve indirgenmiş halinin (PVH4-2T) 280 nm'deki UV dedektörü tarafından alınan GPC kromatogramları

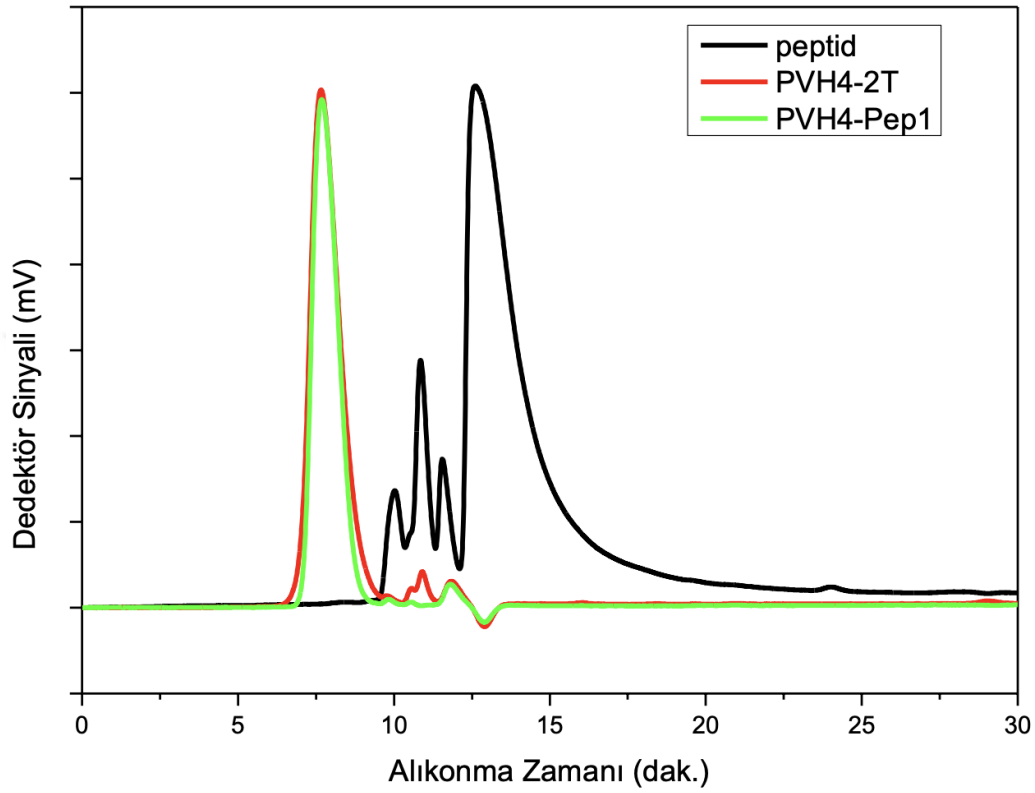
Kromatogramlar incelendiğinde indirgenmiş PVH4-2T kopolimerine ait pikin PVH4-2 kopolimerinin pikiyle yaklaşık aynı zamanda elüe olduğu görülmektedir. Bu sonuç indirgenme sonrasında polimerde disülfid bağlarının oluşmadığını ve polimerin tiyol uç gruba indirgenmesinin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.

4.1.3 P(4VP-co-HPMA) kopolimerinin maleimid uç grubuna sahip RWWR-WWR peptidi ile konjugasyonu

Tez çalışmasının bu basamağında, PVH4-2T kopolimerinin zincir ucundaki tiyol grubu katyonik peptidin (RWWRWWR) N-terminalindeki maleimid grubu ile kovalent bağ yaparak lineer polimer-peptit konjugatları elde edilmiştir.

PVH4-2T kopolimeri RWWRWWR peptidi ile konjuge edildiğinde PVH4-Pep1 kovalent konjugatı elde edilmiştir. Ardından bağlanmayan peptid molekülleri diyalizle uzaklaştırılmıştır. Üretilen saf konjugat, peptid ve PVH4-2T öncelikle GPC ile 280 nm'de UV dedektörü ile analiz edilmiş ve kromatogramları Şekil 4.7'de verilmiştir. Saflaştırmadan sonra elde edilen konjugatın, polimerin ve peptidin

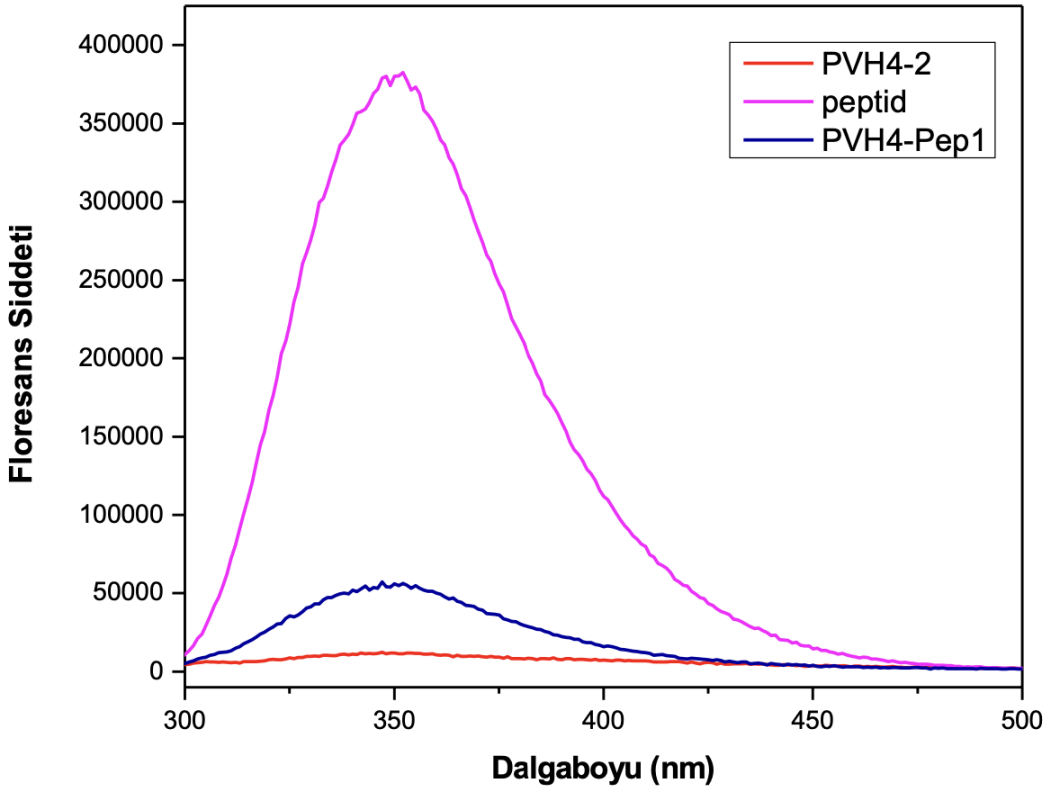
kromatogramlarına bakıldığında, konjugatın saflaştırıldıktan sonra herhangi bir bağlanmamış peptid içermediği görülmektedir. Bu durum da bağlanmayan peptidlerin başarılı bir şekilde uzaklaştırıldığını ortaya koymaktadır. Ayrıca polimerle aynı yerde bir pik görülmektedir. Bu pikin de konjugata ait olduğu düşünülmektedir. GPC'de elde edilen pikin peptid içerdiğini ve içerdiği peptid



Şekil 4.7 PVH4-2T, peptid ve PVH4-Pep1 konjugatının 280 nm'de UV dedektöründen elde edilen GPC kromatogramları

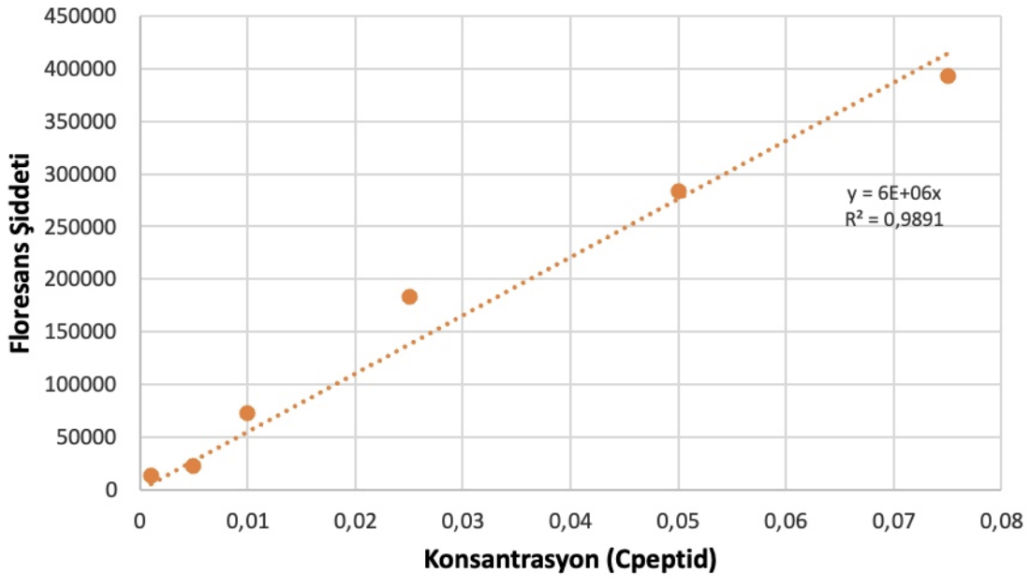
miktarını anlayabilmek için floresans spektroskopisi kullanıkmıştır. Peptit dizisi, karakteristik bir floresans emisyon spektrumuna sahip olan triptofan kalıntıları içermektedir. Peptid 280 nm'de uyarıldığında 350 nm'de floresans emisyon bandı vermektedir ve bu emisyon değeri miktar tayini için kullanılabilmektedir. Bu analiz ile PVH4-2 ve peptid ile konjugat incelenmiştir. Numuneler 280 nm'de uyarılmış ve emisyon spektrumları 290 ile 600 nm arasında kaydedilmiştir. Şekil 4.8'de PVH4-2 ve peptidin floresans spektrumlarını verilmiştir. Görüldüğü üzere peptid 350 nm'de maksimum verecek şekilde bir floresans emisyon bandı oluşturmaktadır. Ancak PVH4-2 kopolimeri 280 nm'de uyarıldığında 290-600 nm arasında herhangi bir emisyon bandı bulunmamaktadır. Konjugat saflaştırıldıktan sonra floresans spektrumu alındığında 350 nm'de maksimumu olan bir emisyon bandı verdiği görülmektedir. Polimerin ise bir emisyon bandı bulunmamaktadır. Konjugatın emisyon şiddetinin daha az olması polimere bağlanmayan serbest peptidlerin uzaklaştırılmasından kaynaklanmaktadır. Sonuç olarak, konjugat GPC'de tek bir

pik vermiş ve beklenen floresans özelliği göstermiştir. Bu durum konjugatın başarıyla sentezlendiğini göstermektedir.



Şekil 4.8 PVH4-2T polimeri, peptid ve PVH4-Pep1 konjugatının saflaştırma sonrası floresan emisyon spektrumları (uyarma: 280 nm; emisyon: 290-600 nm)

Floresans spektroskopisi ayrıca polimere konjuge edilmiş peptid miktarının da tespiti için kullanılmıştır. Bu amaçla öncelikle peptidin 350 nm'deki emisyon şiddetine bağlı bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Şekil 4.9'da bu eğri verilmektedir. Saflaştırmadan sonra elde edilen konjugat vakum etüvde 50°C'de kurutulup tekrar suda çözüldükten sonra 350 nm'de 55961,9 değerinde emisyon şiddeti göstermiştir. Bu değer kalibrasyon eğrisinden elde edilen formüle yerleştirilerek ve konjugatın konsantrasyonu kullanılarak hesap yapıldığında polimer zincirlerinin %64'ünün peptid molekülleri ile bağlandığı hesaplanmıştır.

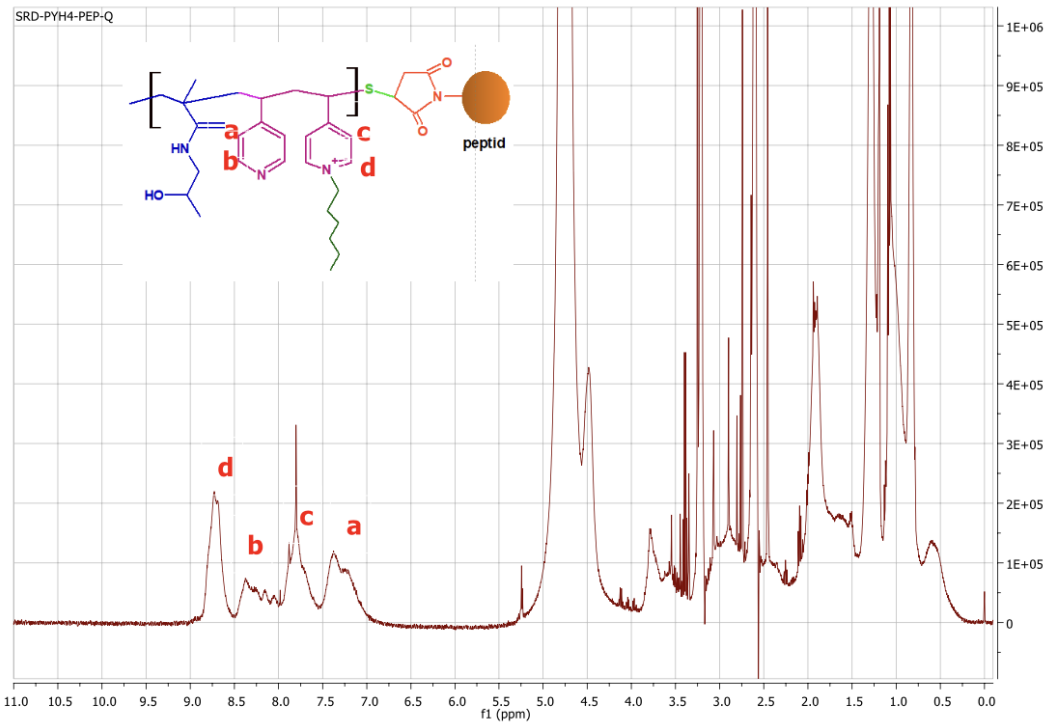


Şekil 4.9 PVH4-Pep1 konjugatının kalibrasyon eğrisi

4.1.4 RWWRWWR peptidi ile konjuge edilmiş P(4VP-co-HPMA) kopolimerinin kuarternerleştirilmesi

Üretilen PVH4-Pep1 konjugatının piridin grupları, kuarterner amonyum grubu içeren pozitif yüklü polimer elde etmek için hekzilbromürle ile kuarternize edilmiştir. Elde edilen kuarterner kopolimer NMR spektroskopisi ile analiz edilerek polimer yapısındaki 4VP birimlerinin kuarternerleştirildiği gösterilmiştir.

PVH4-Pep1 konjugatı kuarternize edildikten sonra QPVH4-Pep1'nin ^{1}H-NMR spektrumu Şekil 4.10'da verilmektedir. QPVH4-Pep1 konjugatının spektrumunda görüldüğü üzere, 7,81 ve 8,72 ppm'deki (c ve d) pikler kuarternize piridin halkalarındaki protonlara aittir. Spektrumda ayrıca kuarternize olmamış piridin halkalarının pikleri de 7,35 ve 8,37 ppm'de (a ve b) gözükmektedir. Kuarternizasyon sonrasında, kuarternize olmayan piridin halkalarına ait protonların pikleri de daha büyük değerlere kaydığı bilinmektedir [19]. Elde edilen spektrumda kuarternize olan ve olmayan piridin halkalarındaki protonların pik alanları oranlanarak kuarternizasyon derecesi bulunabilmektedir. Buna göre QPVH4-Pep1 konjugatının kuarternerleşme oranı (derecesi) %45 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.10 Kuarternize edilmiş QPVH4-Pep1 konjugatının ^{1}H-NMR spektrumu

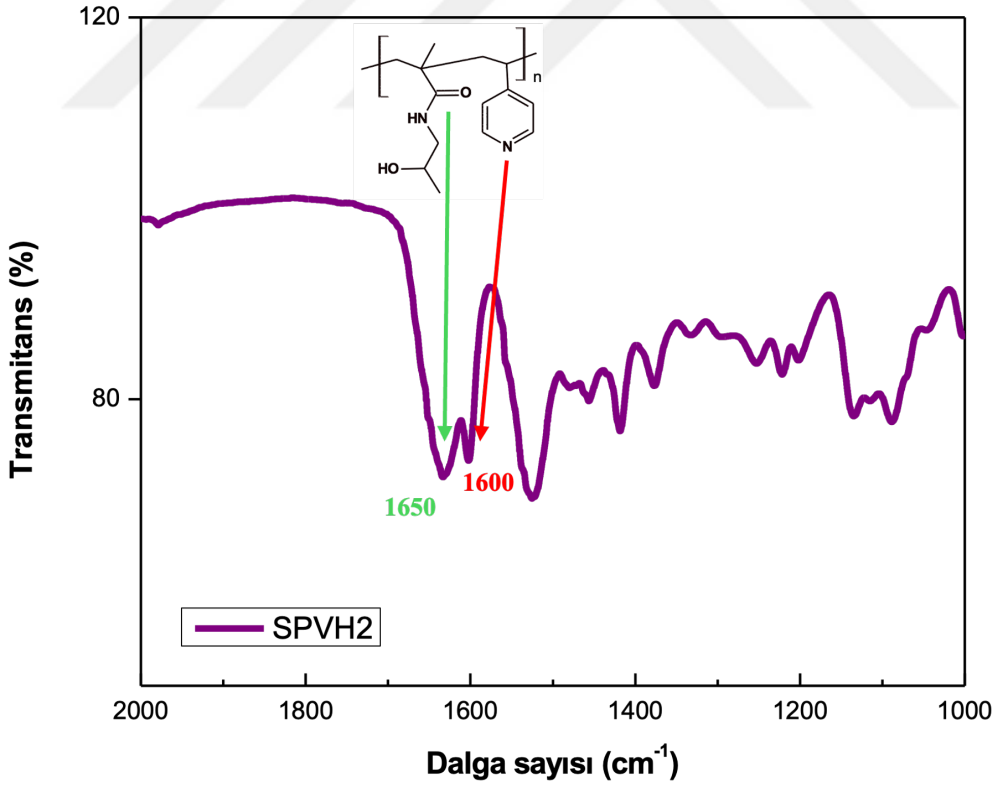
PVH4-2 kopolimeri 18.000 Da ağırlıkça ortalama molekül ağırlığında unimodal olarak başarılı bir şekilde sentezlenmiştir. Kopolimerin uç grubunu tiyol uç grubuna indirgenerek zincir ucuna -SH grubu eklenmiş ve konjugasyon reaksiyonuna hazır hale getirilmiştir. Zincir ucunda -SH grubu bulunan kopolimer uç grubunda malemid bulunduran RWWRWWR peptidi ile kopolimer zincirlerinin %64'üne peptid bağlanacak şekilde konjuge edilmiştir. Üretilen konjugat son olarak kuarternizasyon ajanı ile piridin halkalarının %45 kuarternize edilmiştir. Sonuç olarak lineer polimer-peptid konjugatı başarılı bir şekilde üretilmiştir.

4.2 Graft Polimer-Peptid Konjugatı

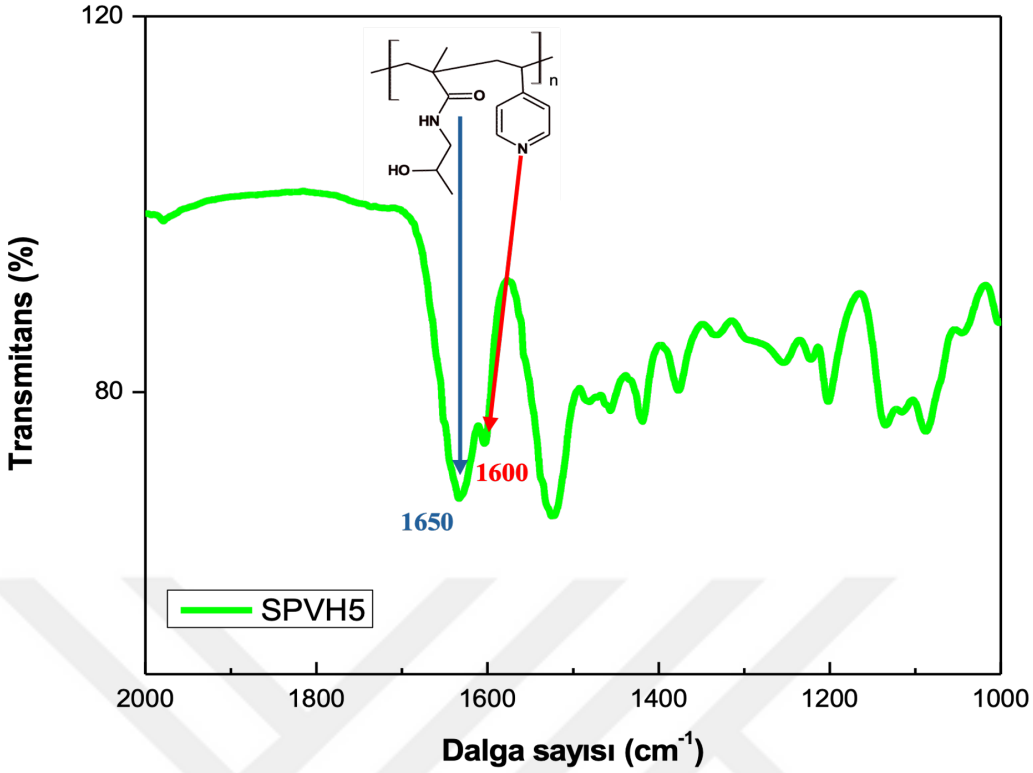
4.2.1 Serbest Radikal Polimerizasyonu ile P(4VP-co-HPMA) kopolimerinin sentezi

Konjugat üretiminde deneme reaksiyonları için yüksek miktarda polimer kullanımı gerektiğinden ve RAFT polimerizasyonu düşük verimle sonuçlandığı için, graft yapılı konjugat üretiminde kullanmak üzere 4VP ve HPMA monomerlerinin serbest radikal polimerizasyonu ile P(4VP-co-HPMA) (SPVH) kopolimerleri üretilmiştir. Polimerizasyon reaksiyonu sonucunda Eşitlik 4.1 kullanılarak SPVH2 ve SPVH5 kopolimerleri için polimerizasyon verimleri hesaplanmışt ve sırasıyla % 50,44 ve % 62,57 olarak belirlenmiştir.

Sentezlenen SPVH2 ve SPVH5 kopolimerlerinin FT-IR spektrumları Şekil 4.11'de ve Şekil 4.12'de verilmiştir. 1600 cm^{-1}'deki bant piridin halkasına, 1652 cm^{-1}'de bulunan bant ise HPMA'nın (-C=O) karbonil grubuna aittir. RAFT polimerizasyonu ile polimer sentezi basamağında da bahsedildiği gibi, FT-IR spektrumlarındaki 1600 ve 1652 cm^{-1}'deki bantlar piridin ve amid gruplarının varlığını kanıtlamaktadır [16, 138].



Şekil 4.11 SPVH2'nin FT-IR spekturumu



Şekil 4.12 SPVH5'in FT-IR spekturumu

FT-IR spektroskopisinden sonra üretilen tüm kopolimerler GPC ile analiz edilmiştir. Kopolimerlerin ağırlıkça ortalama moleküler ağırlığı ve moleküler ağırlık dağılımları GPC ile belirlenmiştir ve Tablo 4.3'te sunulmaktadır.

Tablo 4.3 Üretilen SPVH kopolimerlerinin Mw ve Mw/Mn değerleri

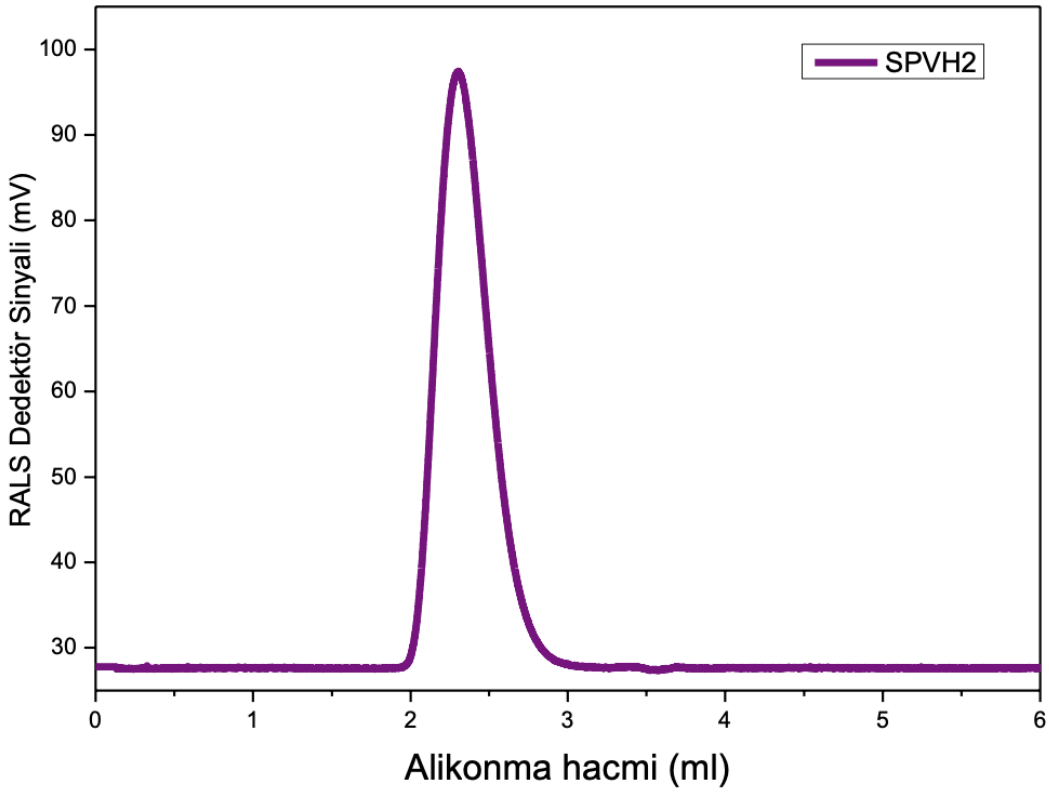
Üretilen Polimer	$[M]_0$ / $[I]_0$	**Mw (Da)**	**Mw/Mn**
SPVH2	400/1	180.000	1,50
SPVH5	100/1	65.000	1,3

Kopolimerlerin kimyasal yapısını analiz etmek için NMR spektroskopisi kullanılmıştır. Elde edilen ^{1}H-NMR spektrumlarından sentezlenen kopolimerlerdeki monomerlerin molce yüzdeleri belirlenmiştir ve Tablo 4.4'te sunulmaktadır.

Tablo 4.4 SPVH kopolimerlerinin ^{1}H-NMR spektrumlarından elde edilen molce monomer yüzdeleri

Üretilen Polimer	% 4VP	% HPMA
SPVH2	40	60
SPVH5	25	75

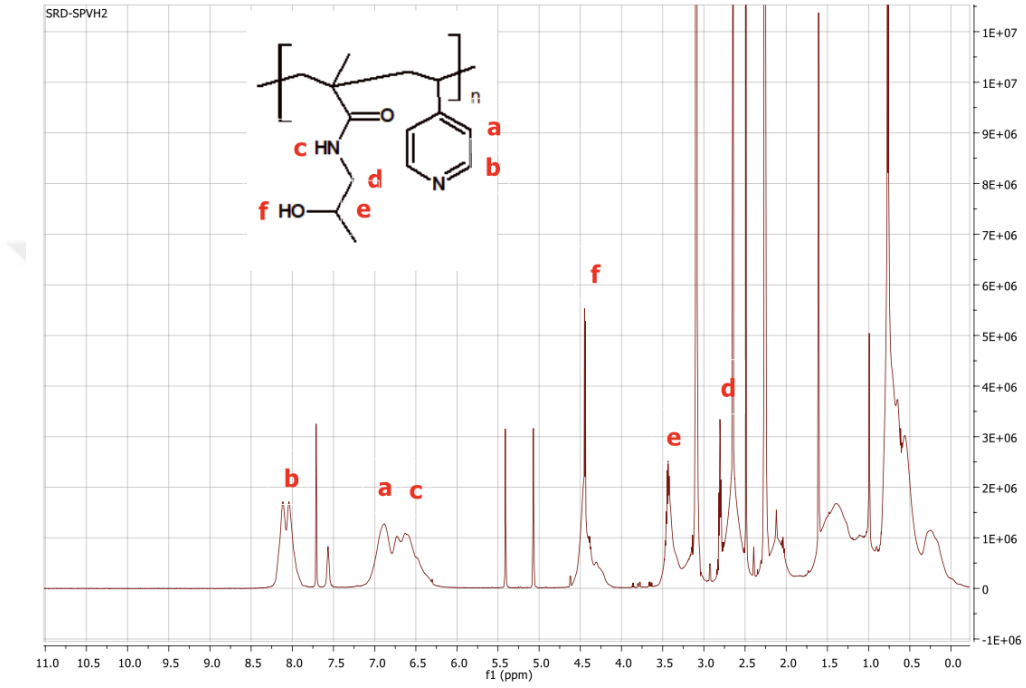
SPVH2 kopolimerinin ışık saçılması dedektöründen alınan GPC kromatogramı Şekil 4.13'te verilmiştir. Bu dedektörden gelen sinyal doğrudan polimerin konsantrasyonu ve moleküler kütlesi ile ilişkilidir. Kromatogramda SPVH2 kopolimerlerinin 2,4 mL'de elüe olduğu, monomere ait pik veya piklerin bulunmadığı görülmüştür.



Şekil 4.13 Üretilen SPVH2 kopolimerinin ışık saçılması dedektöründen elde edilen GPC kromatogramı

SPVH2 kopolimerinin GPC analizi sonucunda ağırlıkça ortalama molekül ağırlıkları (Mw) 180.000 Da ve polidispersite indeksi 1,5 olarak bulunmuştur. GPC kromatogramı, üretilen kopolimerin unimodal dağılımda olduğunu ve reaksiyona girmemiş monomerlerin başarılı bir şekilde uzaklaştırıldığını göstermektedir. SPVH2 kopolimerinin serbest radikal polimerizasyonuna uygun bir şekilde başarıyla sentezlendiği görülmektedir.

GPC analizi yapılan kopolimer ardından NMR spektroskopisi ile analiz edilerek ^{1}H-NMR spektrumları elde edilmiş ve kopolimerin kimyasal yapısı ve monomer bileşimi analiz edilmiştir. Şekil 4.14, SPVH2 kopolimerinin dötero-DMSO içerisindeki ^{1}H-NMR spektrumunu göstermektedir. SPVH2 kopolimerinin spektrumda görüldüğü üzere, 6,9 ve 8,1 ppm'deki (a ve b) pikler, 4VP'deki piridin halkasının protonlarına aittir. Spektrumda 6,6; 2,6; 3,4 ve 4,4 ppm'de (c, d, e, f) görülen pikler ise HPMA'daki grupların protonlarına aittir.



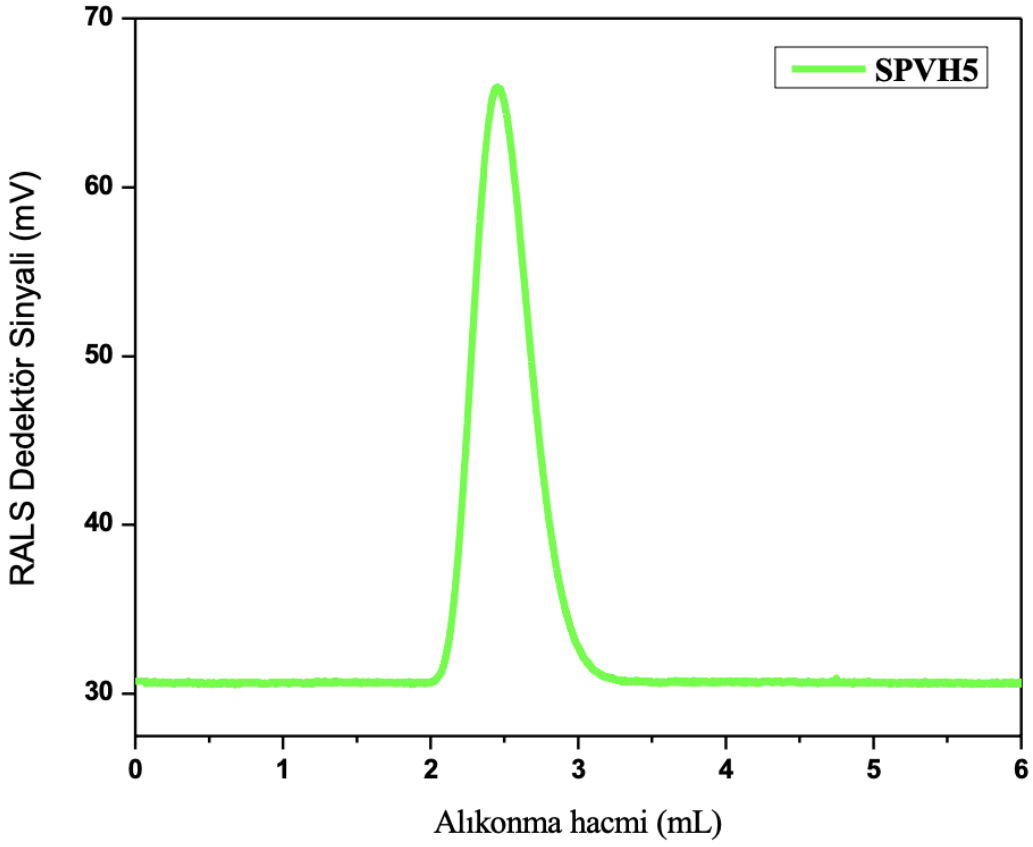
Şekil 4.14 SPVH2 kopolimerinin ^{1}H-NMR spektrumu

Spektrumdaki pik alanları kullanılarak sentezlenen polimerdeki monomerlerin molce yüzdeleri hesaplanmış, 4VP için %40 ve HPMA için %60 olarak bulunmuştur.

SPVH2 polimerininin su içerisindeki çözünürlüğü düşük olduğu için ilerleyen basamaklarda reaksiyonlardan düşük verim alınmasına yol açacağı düşünülmüştür. Bu sebeple daha düşük molekül ağırlığına sahip bir kopolimer serbest radikal polimerizasyon ile başlatıcı oranı değiştirilerek tekrar sentezlenmiştir. Sentezlenen SPVH5 kopolimerinin GPC kromatogramı Şekil 4.15'te verilmiştir.

SPVH5 kopolimerinin ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı (Mw) 65.000 Da ve polidispersite indeksi 1,3 olarak bulunmuştur. Kromatogramda SPVH5 kopolimerinin 2,5 mL'de elüe olduğu, monomere ait pik veya piklerin bulunmadığı görülmüştür.

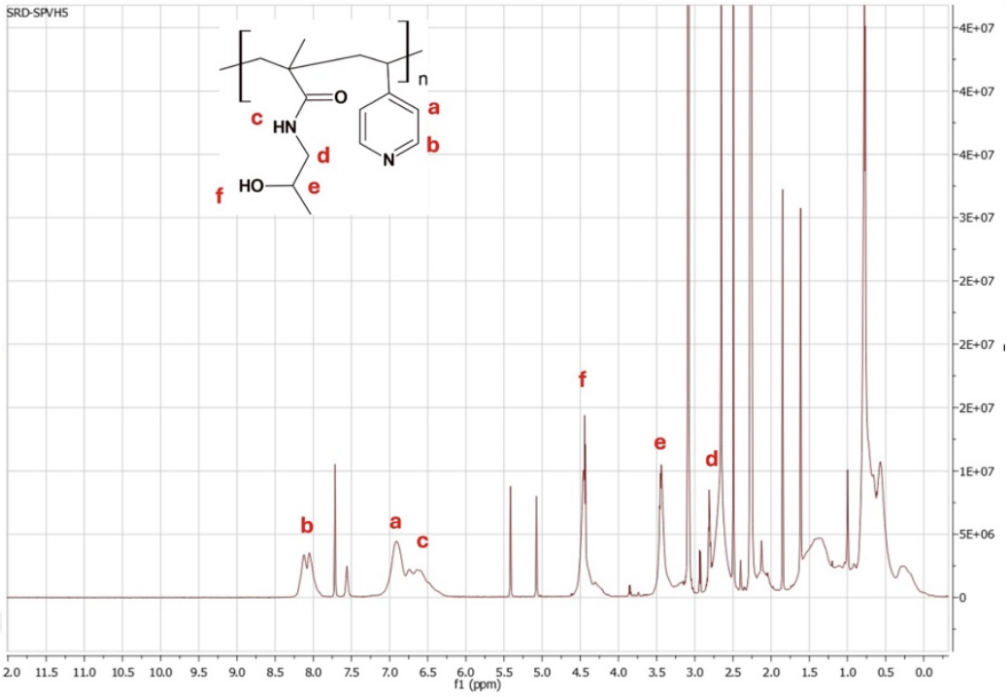
GPC analizi yapılan kopolimer, NMR spektroskopisi ile analiz edilerek polimerin



Şekil 4.15 SPVH5 polimerine ait GPC kromatogramı

kimyasal yapısı ve monomer bileşimi incelenmiştir. Şekil 4.16, SPVH5 kopolimerinin dötero-DMSO içerisindeki ^{1}H-NMR spektrumunu göstermektedir. SPVH5 kopolimerinin spektrumda görüldüğü üzere, 6,9 ve 8,1 ppm'deki (a ve b) pikler, 4VP'deki piridin halkasının protonlarına aittir. Spektrumda 6,6; 2,6; 3,4 ve 4,4 ppm'de (c, d, e, f) görülen pikler ise HPMA'daki grupların protonlara aittir.

Spektrumdaki pik alanları kullanılarak SPVH5 kopolimerindeki monomerlerin molce yüzdeleri hesaplanmış ve bu polimerin içeriğindeki monomer yüzdeleri 4VP ve HPMA için sırasıyla %25 ve %75 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.16 SPVH5 kopolimerinin ^{1}H-NMR spektrumu

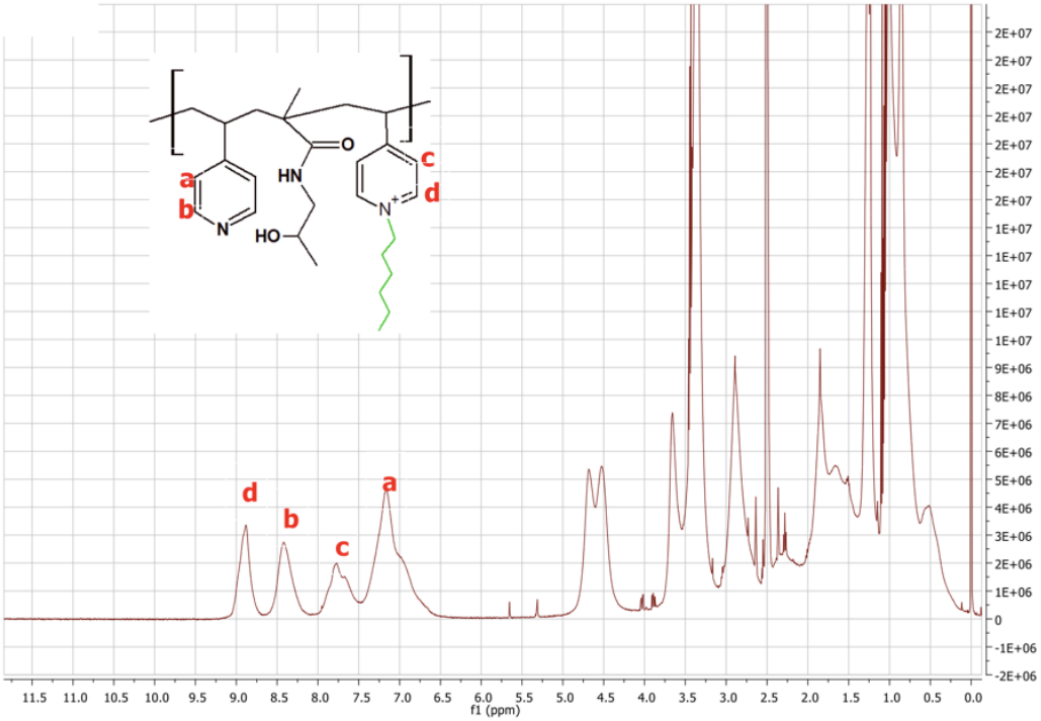
4.2.2 SPVH kopolimerlerinin kuarternerleştirilmesi (QSPVH)

SPVH2 ve SPVH5 kopolimerleri kuarternize edildikten sonra elde edilen QSPVH2 ve QSPVH5 kopolimerlerine ait ^{1}H-NMR spektrumları sırasıyla Şekil 4.17 ve Şekil 4.18'da verilmektedir.

QSPVH2 kopolimerinin spektrumu Şekil 4.17'de görüldüğü üzere, 7,78 ve 8,87 ppm'deki (c ve d) pikler kuarternize piridin halkalarındaki protonlara aittir. Spektrumda ayrıca kuarternize olmamış piridin halkalarının pikleri de 7,17 ve 8,43 ppm'de (a ve b) gözükmektedir. Kuarternizasyon sonrasında, kuarternize olmayan piridin halkalarına ait protonların pikleri de daha büyük değerlere kaydığı bilinmektedir.

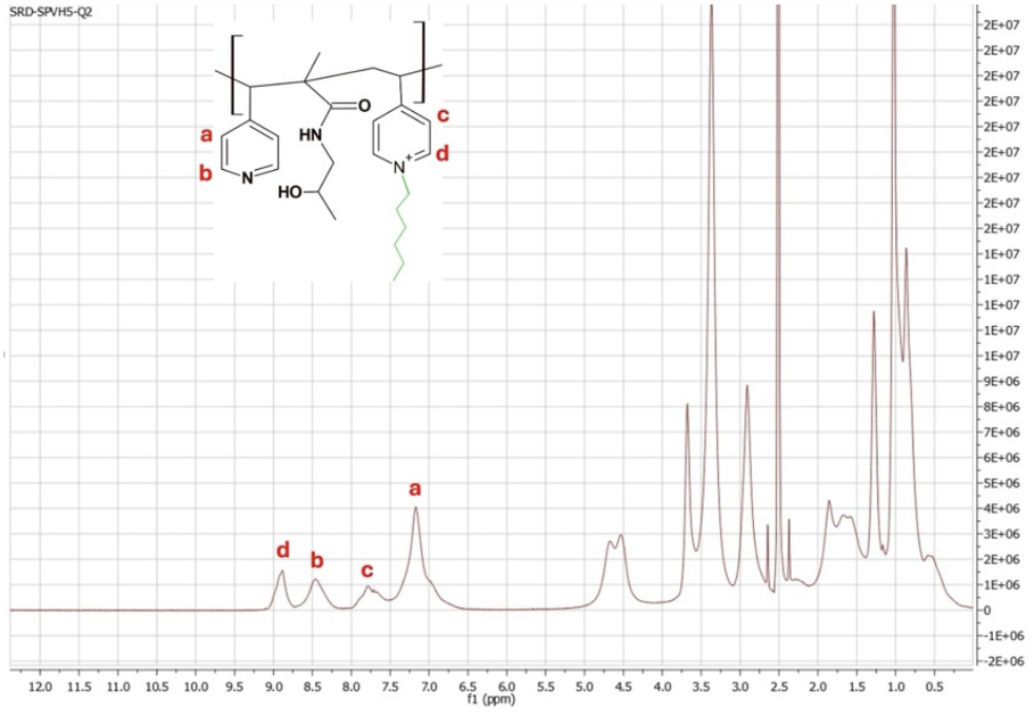
Elde edilen spektrumda kuarternize olan ve olmayan piridin halkalarındaki protonların pik alanları oranlanarak kuarternizasyon derecesi bulanabilmektedir. Buna göre QSPVH2 kopolimerinin kuarternerleşme oranı (derecesi) %48 olarak bulunmuştur.

SPVH5 polimeri piridin halkalarında bulunan piridin gruplarının bir kısmının pozitif yüklenmesi için 1-bromohekzan ile kuarternizasyon işlemi yapılmıştır (QSPVH5). QSPVH5 kopolimerinin, QSPVH2 kopolimerine benzer şekilde, Şekil 4.18'deki spektrumu incelendiğinde 7,80 ve 8,89 ppm'deki (c ve d) pikler görülmektedir. QSPVH5 kopolimerinin sahip olduğu bu pikler kuarternize piridin halkalarındaki protonlara aittir. Spektrumda ayrıca kuarternize olmamış piridin



Şekil 4.17 QSPVH2 kopolimerinin ^{1}H-NMR spektrumu

halkalarının pikleri de 7,22 ve 8,45 ppm'de (a ve b) gözükmektedir.

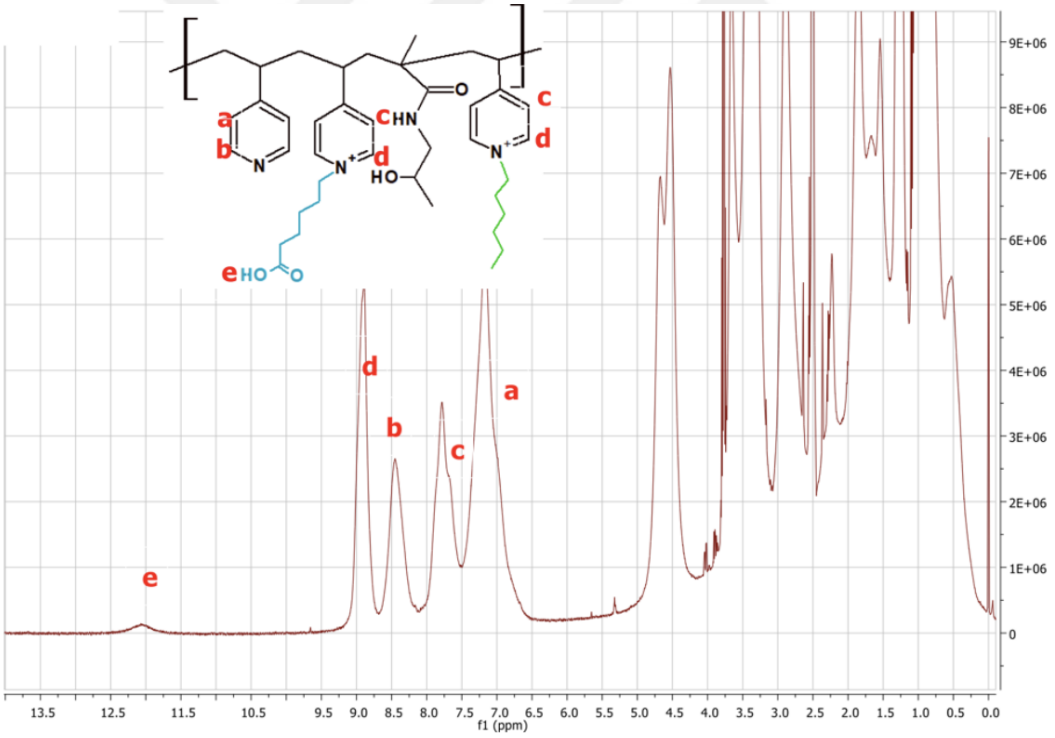


Şekil 4.18 QSPVH5 kopolimerinin ^{1}H-NMR spektrumu

Elde edilen ^{1}H-NMR spektrumundan yapılan hesaplamalar sonucunda kuarternizasyon derecesi %48 olarak hesaplanmıştır.

4.2.3 (QSPVH) kopolimerinin 6-bromohekzanoik asit ile kuarternizasyonu (QSPVH-C)

QSPVH2 kopolimeri 6-bromohekzaonoik asit ile kuarternize edilerek karboksilik gruplarına sahip QSPVH2-C kopolimeri elde edilmiştir. Bu kopolimerin de ^{1}H-NMR spektrumu Şekil 4.19'da verilmektedir. Spektrum incelendiğinde kuarternizasyon derecesinin %58'e çıktığı belirlenmiştir. Bu durum ilgili ajanın piridin halkalarının %10'una bağlandığını göstermektedir. Ayrıca, ^{1}H-NMR spektrumunda 12,08 ppm'de PVH kopolimerinin hiçbirisinde olmayan yeni bir pik görülmektedir. Bu pik COOH grubundaki protona aittir. Kuarternizasyon derecesinin artması ve COOH grubunun ^{1}H-NMR spektrumunda gözlenmesi karboksilik asit grubuna sahip kuarternize kopolimerin başarıyla sentezlendiğini göstermektedir.

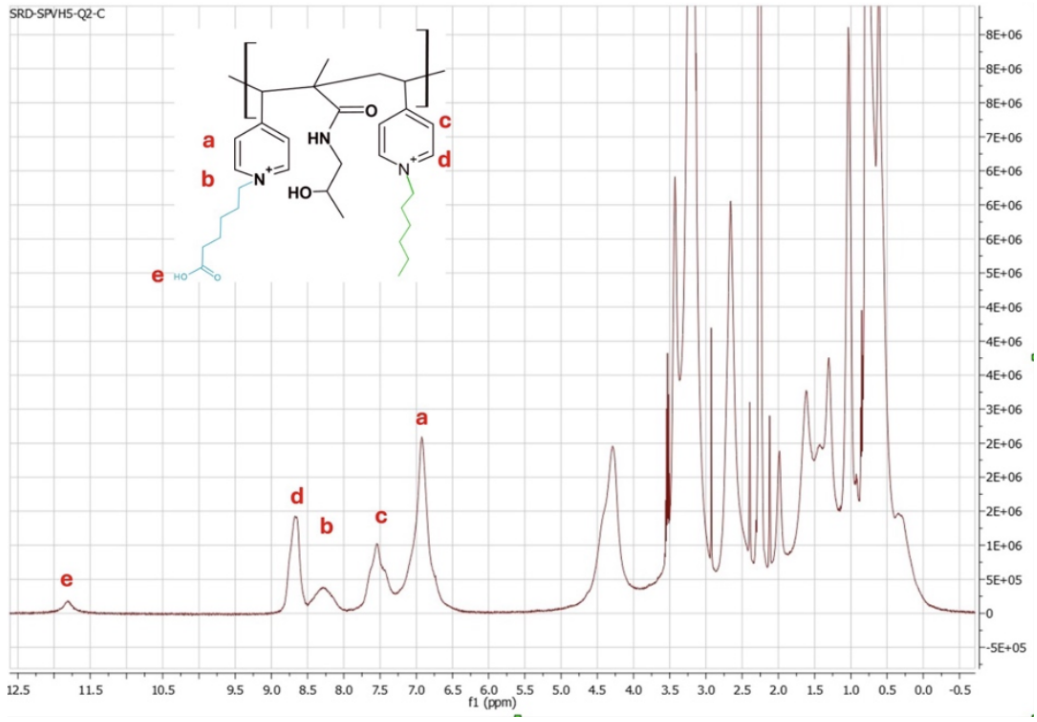


Şekil 4.19 COOH grubu takılmış QSPVH2-C kopolimerlerinin ^{1}H-NMR spektrumu.

Kuarternize edilmiş SPVH5 polimeri piridin halkalarının kuarternize edilmemiş kısımlarından 1-bromohekzanoik asit kullanılarak kuarternize edilmiştir (QSPVH5-C). Şekil 4.20'de verilen ^{1}H-NMR spektrumundan kuarternizasyon derecesi hesaplandığında %72'ye çıktığı görülmektedir. Bu durum SVPH5 polimerindeki piridin halkalarına %24'üne COOH bağlandığı kanıtlamaktadır.

Ayrıca, ^{1}H-NMR spektrumunda 12,08 ppm'de COOH grubundaki proton görülmektedir.

Kuarternizasyon derecesinin artması ve COOH grubunun ^{1}H-NMR spektrumunda gözlenmesi karboksilik asit grubuna sahip kuarternize kopolimerin başarıyla sentezlendiğini göstermektedir.



Şekil 4.20 COOH grubu takılmış QSPVH5-C kopolimerlerinin ^{1}H-NMR spektrumu.

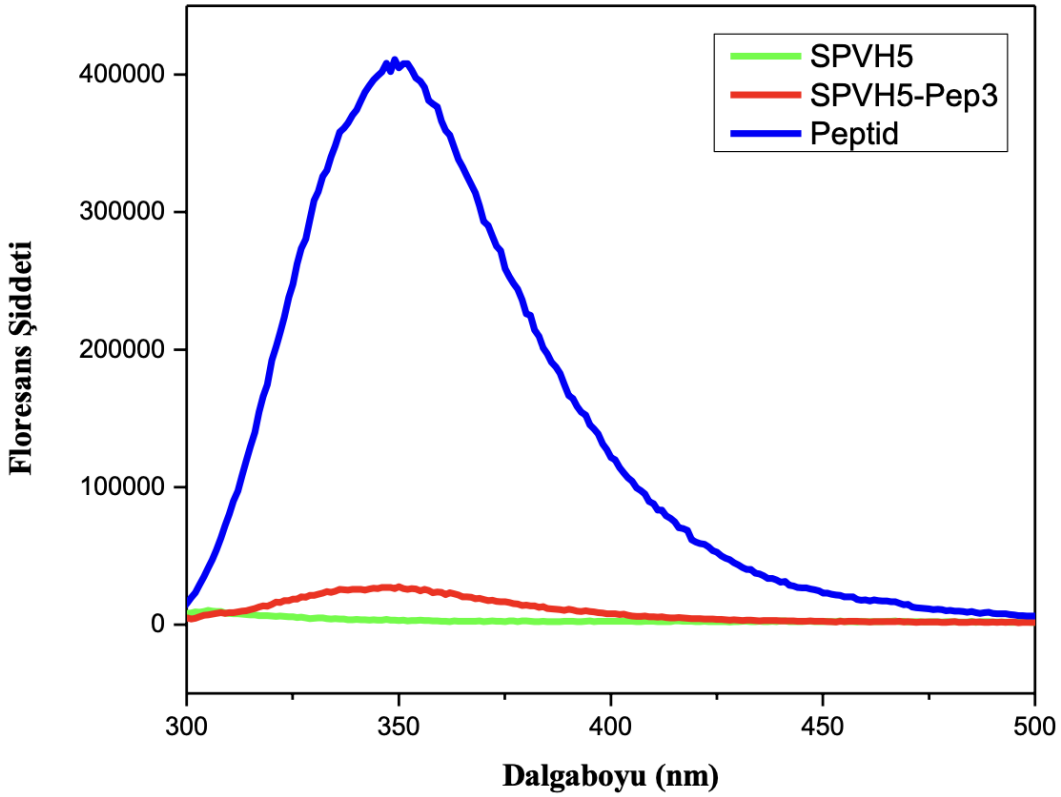
QSPVH2-C kopolimerinin molekül ağırlığının büyük olması ve COOH grubu takıldıktan sonra sudaki çözünürlüğünün düşük olması sebebiyle konjugasyon sentezi basamaklarına QSPVH5-C kopolimeri ile devam edilmiştir.

4.2.4 Kuarternize SPVH kopolimeri ve RWWRWWR peptidinin amid bağıyla konjugasyonu

QSPVH5-C polimeri CRWWRWWR dizisine sahip ABPep polimerdeki COOH grubu ve peptiddeki NH_2 gruplarının bir araya gelmesiyle amid bağı oluşumu yoluyla konjuge edilmiştir. Kopolimer ve peptid ile HBTU ve DIPEA varlığında DMF içerisinde reaksiyona sokulmuştur.

Sentezlenen konjugatlara ilk olarak soğuk dietil eter ile çöktürme işlemi uygulanmıştır. Daha sonra kuruyan konjugat 3 mL suda çözülerek diyaliz işlemi (MWCO: 3.500 Da) yapılmıştır. Saflaştırılan konjugat ilk olarak floresans spektroskopisi ile daha sonra GPC ile analiz edilmiştir.

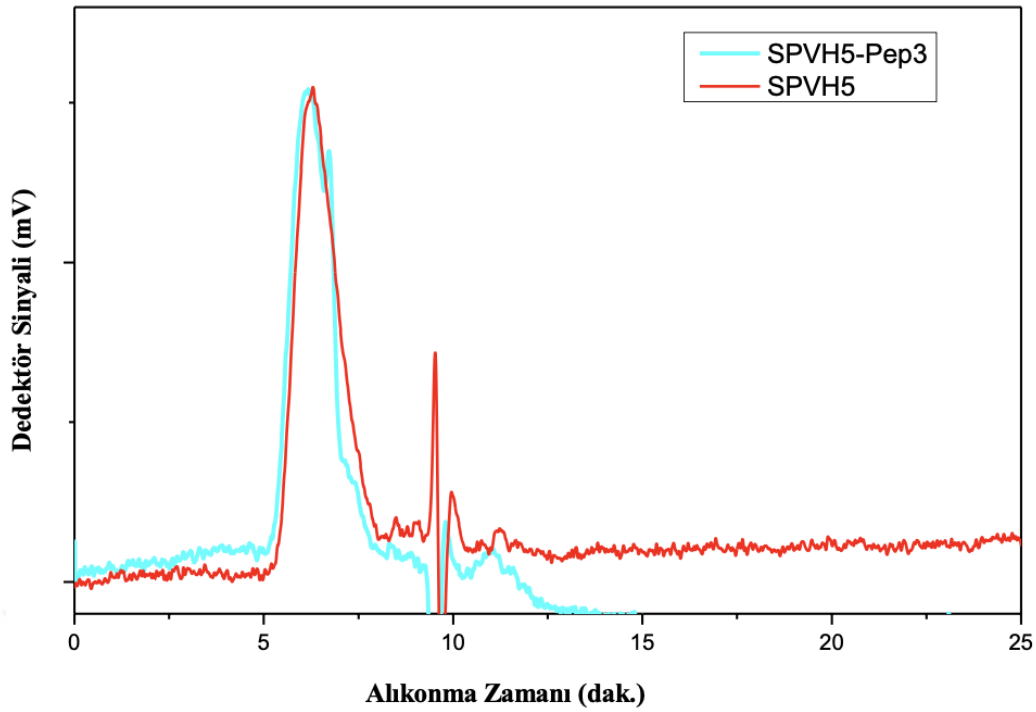
Üretilen SPVH5-Pep3 konjugatı ve SPVH5 polimerinin Şekil 4.21'de floresans spektrumları verilmiştir. Görüldüğü üzere peptid 350 nm'de maksimum veren bir floresans emisyon bandı oluşturmaktadır. Ancak SPVH5 kopolimeri 280 nm'de uyarıldığında 290-600 nm arasında herhangi bir emisyon bandı bulunmamaktadır. Konjugat saflaştırıldıktan sonra floresans spektrumu alındığında 350 nm'de maksimumu olan bir emisyon bandı verdiği görülmektedir. Polimerin ise bir emisyon bandı bulunmadığından bu bandın polimere bağlanan peptidlerden kaynaklandığı anlaşılmaktadır. Konjugatın emisyon şiddetinin azalması polimere bağlanmayan serbest peptidlerin uzaklaştırılmasından kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.21 SPVH5 polimeri ve SPVH5-Pep3 konjugatının saflaştırma sonrası floresan emisyon spektrumları (uyarma: 280 nm; emisyon: 290-600 nm)

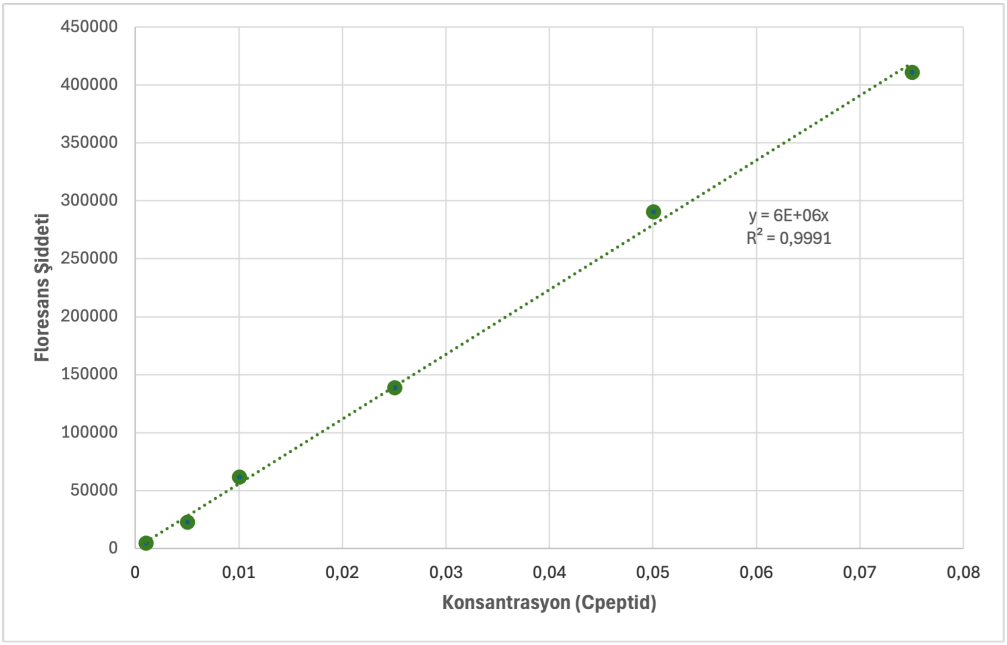
SPVH5-Pep3 konjugatı GPC ile analiz edilmiştir ve 280 nm'de UV dedektöründen elde edilen kromatogramları Şekil 4.22'de verilmiştir. Saflaştırmadan sonra elde edilen konjugatın ve polimerin kromatogramlarına bakıldığında, konjugatın saflaştırıldıktan sonra herhangi bir bağlanmamış peptid (ikincil bir pik) içermediği görülmektedir. Bu durum da bağlanmayan peptidlerin başarılı bir şekilde uzaklaştırıldığını ve floresans emisyonun sadece polimerin yapısındaki peptidden kaynaklandığı anlaşılmaktadır.

Saflaştırmadan sonra elde edilen SPVH5-Pep3 konjugat liyofilizatörde kurutulup tekrar suda çözüldükten sonra 350 nm'de 25000,9 değerinde emisyon şiddeti



Şekil 4.22 SPVH5 polimeri ve SPVH5-Pep3 konjugatının 280 nm'de UV dedektöründen elde edilen GPC kromatogramları

göstermiştir. Bu değer Şekil 4.23'teki kalibrasyon eğrisinden elde edilen formüle yerleştirilerek ve konjugatın konsantrasyonu kullanılarak hesap yapıldığında her bir polimer zincirine 0,74 adet peptid molekülünün bağlandığı hesaplanmıştır.

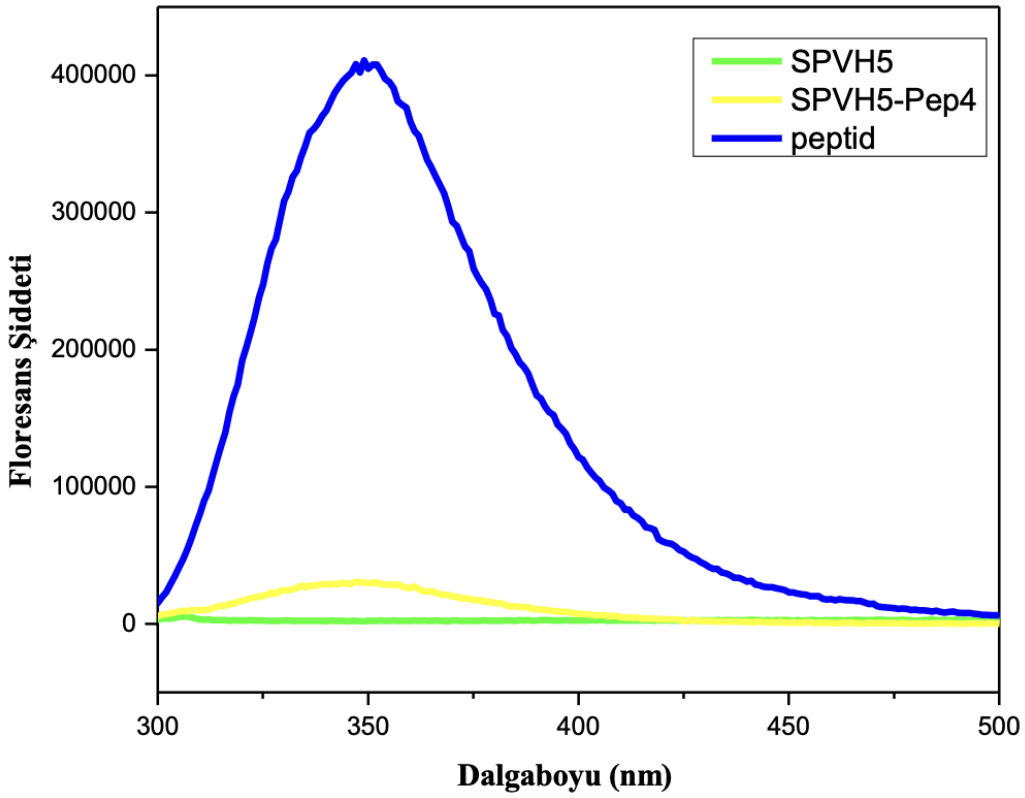


Şekil 4.23 SH-RWWRWWR peptidinin kalibrasyon eğrisi

Bu değerin polimerin COOH gruplarına graft olarak peptid bağlanmasının hedeflenenden düşük olması sebebi ile deney koşulları ve peptid miktarı

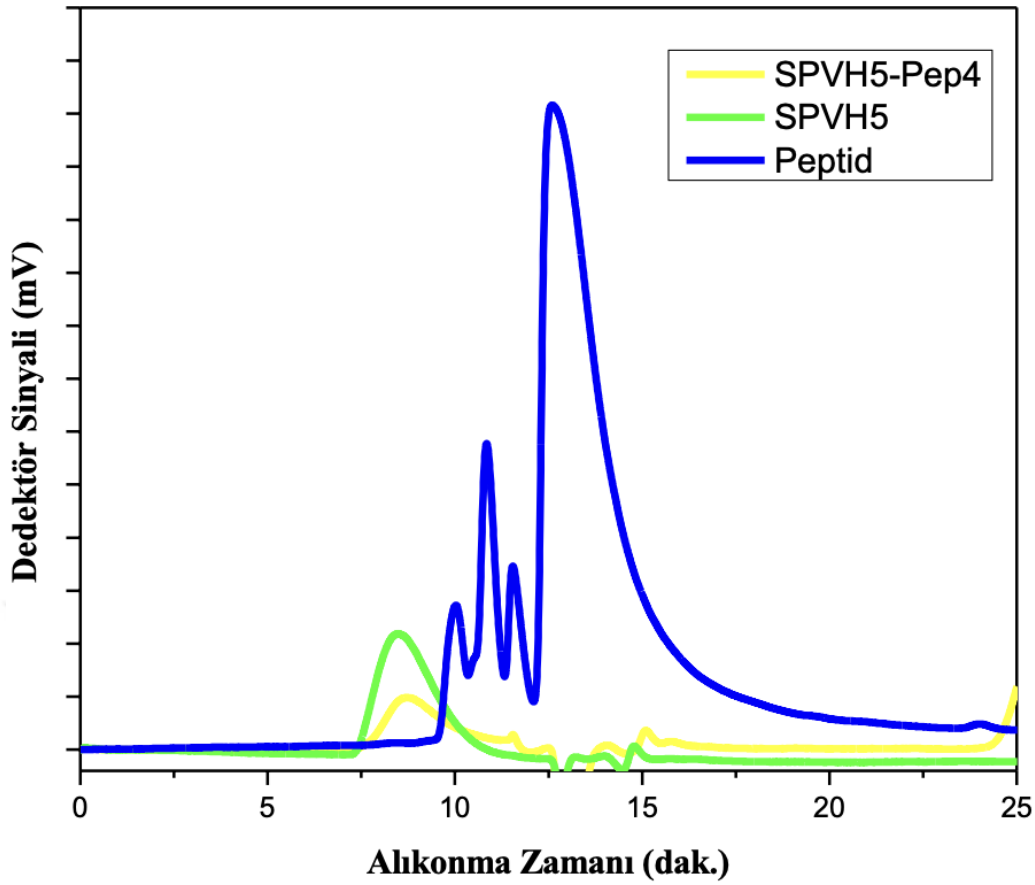
değiştirilerek konjugasyon reaksiyonu tekrarlanmıştır.

Aktivatör, aktivatör bazı ve peptid miktarları molce arttırılarak QSPVH5-C polimeri ve peptid reaksiyon süresi 24 saat olacak şekilde tekrar reaksiyona alınmıştır. Sentezlenen SPVH5-Pep4 konjugatı saflaştırma basamaklarından sonra tekrar sulu çözeltisi hazırlanarak floresans spektroskopisinde Şekil 4.24'te verildiği gibi analiz edilmiştir.



Şekil 4.24 SPVH5 polimeri ve SPVH5-Pep4 konjugatının saflaştırma sonrası floresan emisyon spektrumları (uyarma: 280 nm; emisyon: 290-600 nm)

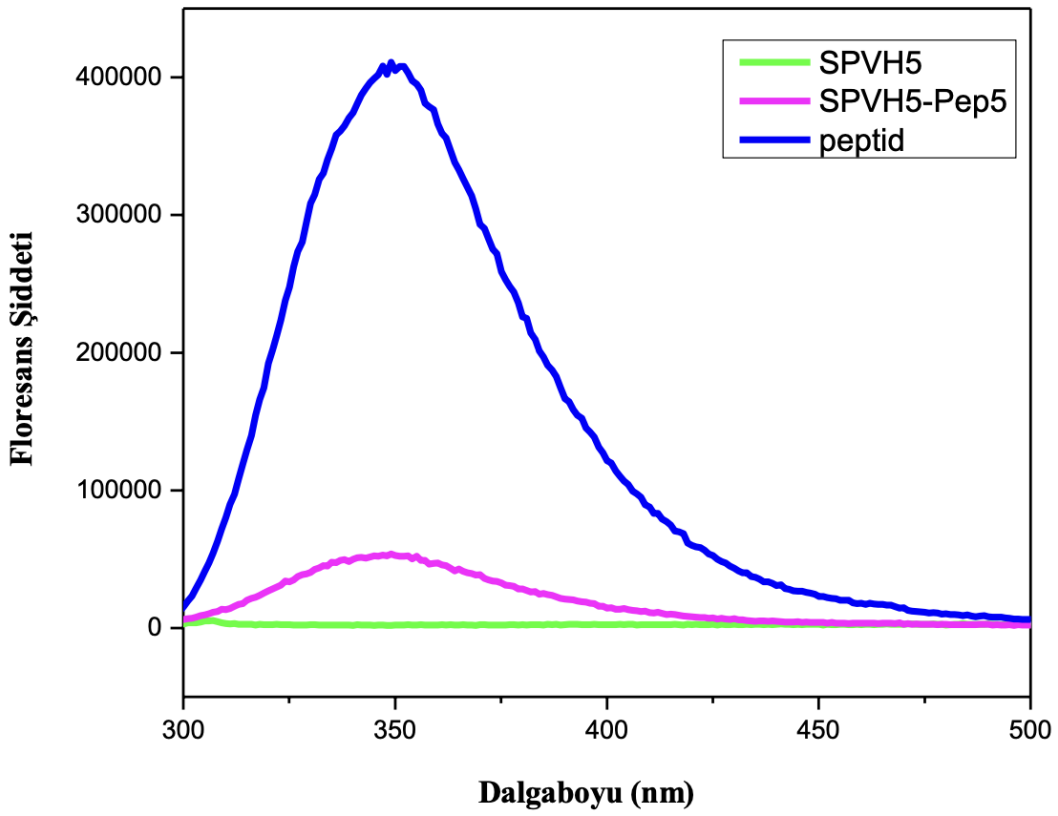
SPVH5-Pep4 konjugatı, SPVH5 polimeri ve peptidi GPC ile analiz edilmiştir. 280 nm'de UV dedektöründen elde edilen GPC kromatogramları Şekil 4.25'te verilmiştir. Saflaştırmadan sonra elde edilen konjugatın ve polimerin kromatogramlarına bakıldığında, konjugatın saflaştırıldıktan sonra herhangi bir bağlanmamış peptid içermediği görülmektedir. Bu durum da bağlanmayan peptidlerin başarılı bir şekilde uzaklaştırıldığını ortaya koymaktadır. Ayrıca polimerle aynı yerde bir pik görülmektedir. Bu pikin de konjugata ait olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.25 SPVH5 polimeri ve SPVH5-Pep4 konjugatının 280 nm'de UV dedektöründen elde edilen GPC kromatogramları

Elde edilen SPVH5-Pep4 konjugatı 350 nm'de 29990 değerinde emisyon şiddeti göstermiştir. Bu değer kalibrasyon eğrisinden elde edilen formüle yerleştirilerek ve konjugatın konsantrasyonu kullanılarak hesap yapıldığında her bir polimer zincirine 0,53 adet peptid molekülünün bağlandığı hesaplanmıştır. Bu değerin polimerin COOH gruplarına graft olarak peptid bağlanmasının hedeflenenden düşük olması sebebi ile deney koşulları ve peptid miktarı değiştirilerek konjugasyon reaksiyonu tekrarlanmıştır.

Sentezlenen diğer konugatlar ile aynı saflaştırma basamaklarından geçirilen SPVH5-Pep5 konjugatı floresans spektoskopisi ile analiz edilmiştir. Üretilen SPVH5-Pep5 konjugatı ve SPVH5 suda çözündükten sonra floresans spektroskopisinden alınan spektrumları Şekil 4.26'da verilmiştir.



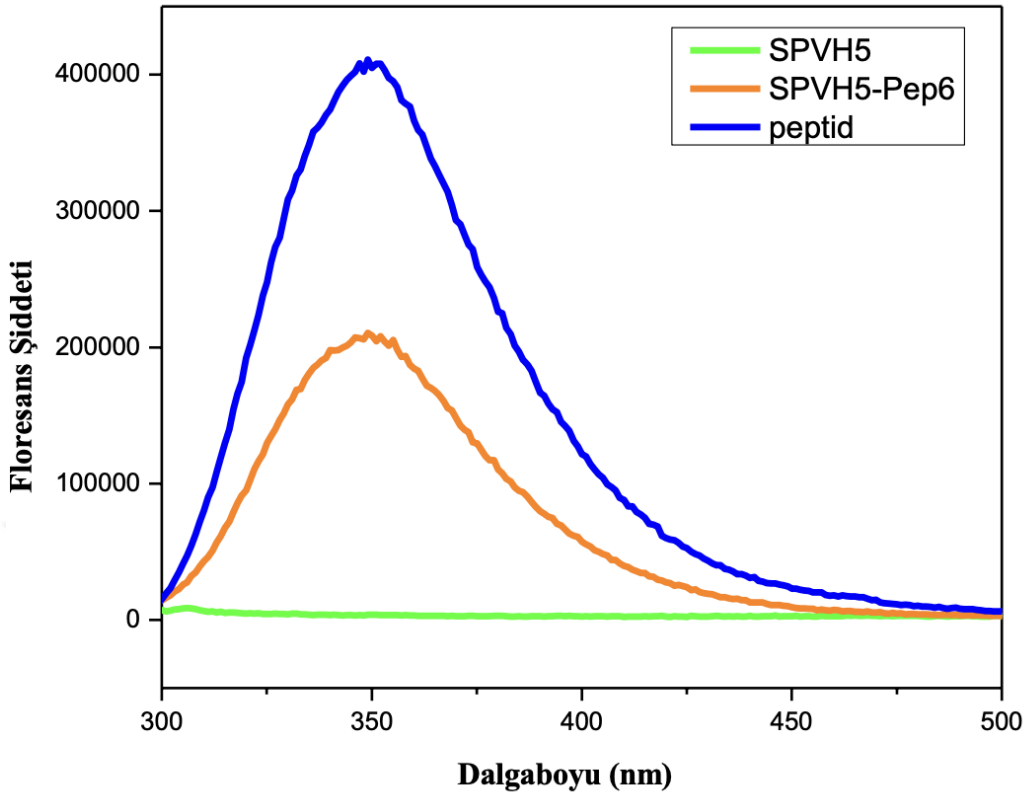
Şekil 4.26 SPVH5 polimeri ve SPVH5-Pep5 konjugatı saflaştırma sonrası floresan emisyon spektrumları (uyarma: 280 nm; emisyon: 290-600 nm)

Konjugatın floresans spektrumu Şekil 4.26'da görüldüğü üzere 350 nm'de 52961,9 değerinde emisyon şiddeti göstermiştir. Bu değer kalibrasyon eğrisinden elde edilen formüle yerleştirilerek ve konjugatın konsantrasyonu kullanılarak hesap yapıldığında her bir polimer zincirine 0,97 adet peptid molekülünün bağlandığı hesaplanmıştır. Bu hesaplanan değer de hala graft olarak peptid bağlanmasına karşılık düşük olarak görülmektedir. Bu durumun reaksiyon süresinin kısa geldiğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Son olarak Tablo 3.5'te gösterildiği gibi SPVH5-Pep6 konjugatı HBTU, DIPEA molce ilk denemenin oranlarından 5'er kat arttırılarak 1 hafta boyunca oda sıcaklığında reaksiyona bırakılmıştır. Sentezlenen SPVH5-Pep6 konjugatının saflaştırma basamaklarından sonra sulu çözeltisinin floresans spektrumu Şekil 4.27'de verildiği gibidir.

Görüldüğü üzere peptid 350 nm'de maksimum verecek şekilde bir floresans emisyon bandı oluşturmaktadır. Ancak SPVH5 kopolimeri 280 nm'de uyarıldığında 290-600 nm arasında herhangi bir emisyon bandı bulunmamaktadır. Konjugat saflaştırıldıktan sonra floresans spektrumu alındığında 350 nm'de maksimumu olan

bir emisyon bandı verdiği görülmektedir.

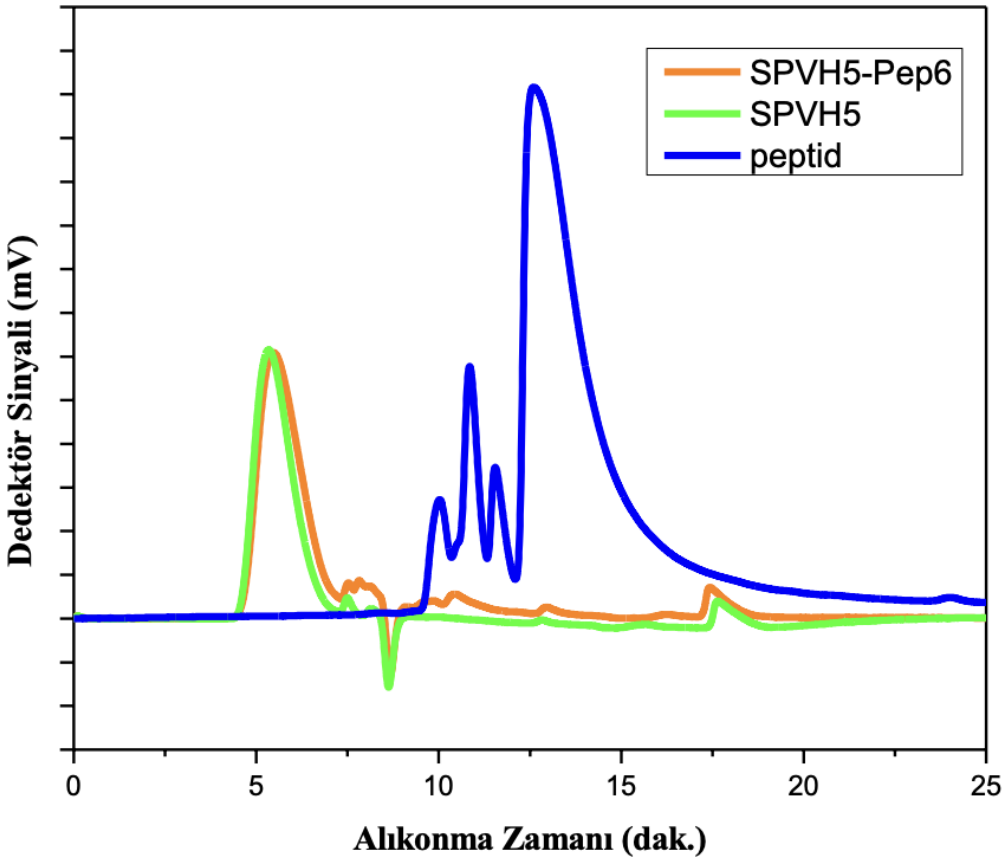


Şekil 4.27 SPVH5 polimeri ve SPVH5-Pep6 konjugatı saflaştırma sonrası floresan emisyon spektrumları (uyarma: 280 nm; emisyon: 290-600 nm)

Üretilen SPVH5-Pep6 konjugatı ve SPVH5 polimeri GPC ile 280 nm'de UV dedektörü ile analiz edilmiş ve kromatogramları Şekil 4.28'de verilmiştir.

Saflaştırmadan sonra elde edilen konjugatın ve polimerin kromatogramlarına bakıldığında, konjugatın saflaştırıldıktan sonra herhangi bir bağlanmamış peptid içermediği görülmektedir.

Bu durum da bağlanmayan peptidlerin başarılı bir şekilde uzaklaştırıldığını ortaya koymaktadır. Polimer piki ile karşılaştığında bağlanmayan polimer zincirlerinin tamamıyla uzaklaştırıldığı görülmektedir. Sonuç olarak, konjugat GPC'de tek bir pik vermiş ve beklenen floresans özelliği göstermiştir. Bu durum konjugatın başarıyla sentezlendiği göstermektedir.



Şekil 4.28 SPVH5 polimeri, peptid ve SPVH5-Pep6 konjugatının 280 nm'de UV dedektöründen elde edilen GPC kromatogramları

SPVH5 polimeri, peptid ve SPVH5-Pep6 konjugatının floresans spektrumları Şekil 4.27'de görüldüğü üzere 350 nm'de 207.000 değerinde emisyon şiddeti göstermiştir. Bu değer Şekil 4.23'teki kalibrasyon eğrisinden elde edilen formüle yerleştirilerek ve konjugatın konsantrasyonu kullanılarak hesap yapıldığında her bir polimer zincirine 1,97 adet peptid molekülünün bağlandığı hesaplanmıştır.

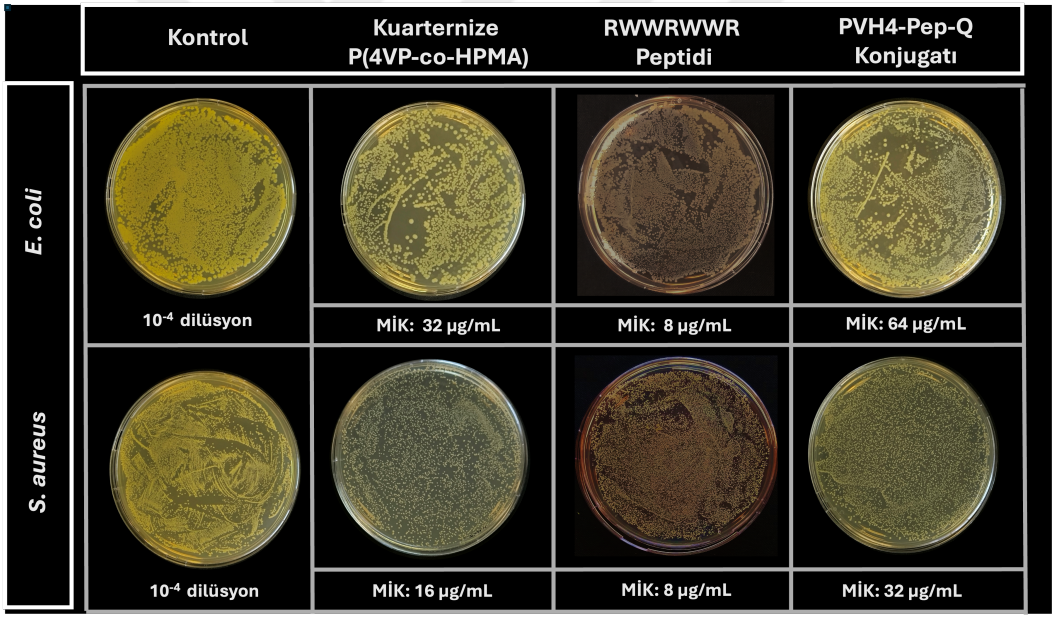
Bu reaksiyon sonucunda polimere graft olarak lineer konjugata göre yaklaşık 3 kat daha fazla peptid bağlandığını ortaya koymaktadır.

4.3 Antibakteriyel Aktivitenin Değerlendirilmesi

Üretilen kopolimer ve konjugatlar ile peptidlerin antibakteriyel aktiviteleri, broth mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak Gram negatif model organizma *Esherichia coli* (ATCC 25922), Gram pozitif model organizma *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) üzerinde değerlendirilmiştir. Lineer ve graft konjugatlara ait çalışmaları ayrı olarak sunulmaktadır.

4.3.1 Lineer Polimer-Peptid Konjugatının Antibakteriyel Aktivitesi

RWWRWWR peptidi, PVH4-Q2 polimeri, PVH4-Pep-Q konjugatı örnekleri için Broth mikrodilüsyon yöntemine göre elde edilen sonuçlar Şekil 4.29'da sunulmaktadır. Şekilde 10^{-4} seyreltmede elde edilen petri görüntüleri ve mikrodilüsyon testinden elde edilen MİK değerleri verilmektedir. MİK değerleri, turbidimetrik, spektrofotometrik ve standart "plate count" sonuçları dikkate alınarak belirlenmiştir.



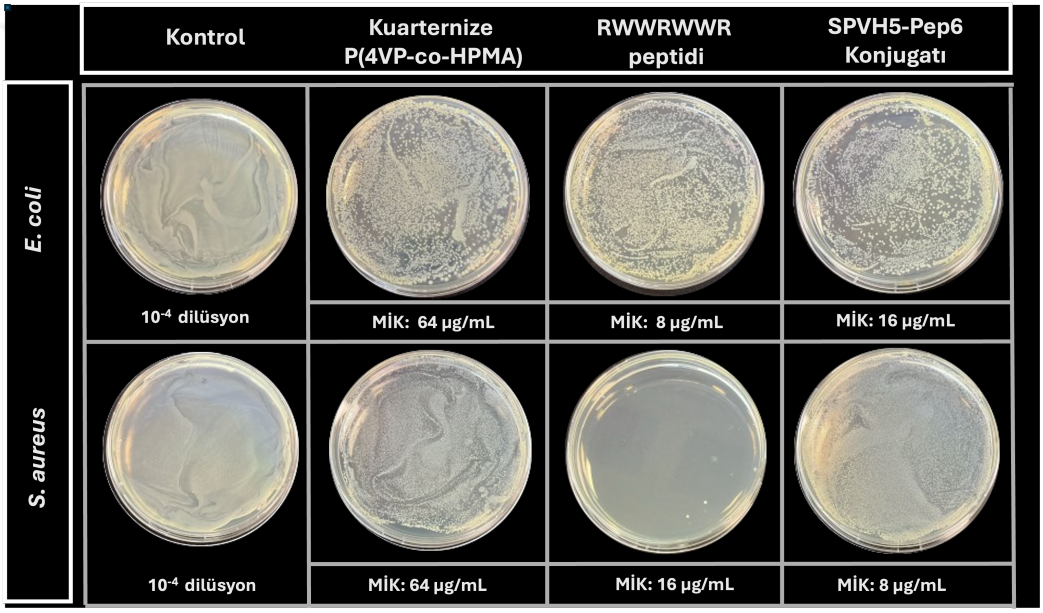
Şekil 4.29 RWWRWWR peptidi, PVH4-Q2 polimeri, PVH4-Pep-Q konjugatının farklı bakterilere karşı MİK değerleri ve 10^{-4} seyreltmedeki petri görüntüleri

Sonuçlar incelendiğinde en düşük MİK değerlerine peptid (8 μg/mL) ile ulaşılmıştır. Polimer ile de *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı sırasıyla 32 ve 16 μg/mL'lik Mİ değerlerine ulaşılmıştır. Peptid kopolimerin zincir ucuna konjuge olduktan sonra ise konjugatın MİK değerleri *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı sırasıyla 64 ve 32 μg/mL olmuştur. Kopolimere peptid konjugasyonu sonrasında sinerjik etki olması beklenmekteyken elde edilen MİK değeri, iki molekülün bağlanmasının MİK değerini yükselttiğini yani antibakteriyel aktiviteyi düşürdüğünü göstermiştir. Buna benzer aktivite kayıpları geçmiş çalışmalarda da bulunmaktadır. Örneğin,

Pranantyo ve diğerleri, tiyol-maleimid 'click' konjugasyon yöntemiyle kitosan ve CysHHC10 peptidini kullanarak antibakteriyel konjugatlar sentezlemiştir [35]. Sonuçta ortaya çıkan konjugatlar, serbest peptide kıyasla daha yüksek MİK değerleri göstermiş ve bu da antibakteriyel etkinlikte bir azalmayı işaret etmiştir.

4.3.2 Graft Polimer-Peptid Konjugatının Antibakteriyel Aktivitesi

RWWRWWR peptidi, SPVH5-Q polimeri, SPVH5-Pep6 konjugatı örnekleri için Broth mikrodilüsyon yöntemine göre elde edilen sonuçlar Şekil 4.30'da verilmiştir. Şekilde 10^{-4} seyreltmede elde edilen petri görüntüleri ve mikrodilüsyon testinden elde edilen MİK değerleri verilmektedir. MİK değerleri, turbidimetrik, spektrofotometrik ve standart "plate count" sonuçları dikkate alınarak belirlenmiştir.



Şekil 4.30 RWWRWWR peptidi, SPVH5-Q polimeri ve SPVH5-Pep6 konjugatının farklı bakterilere karşı MİK değerleri ve 10^{-4} seyreltmedeki petri görüntüleri

Antibakteriyel sonuçlar incelendiğinde peptidin MİK değerleri *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı sırasıyla 8 μg/mL ve 16 μg/mL olarak bulunmuştur. Bu çalışmada kullanılan peptid dizisinde ek olarak bir sistein bulunmaktadır. Bu sebeple de Şekil 4.30'daki peptid sonuçlarından farklı çıkmasına yol açtığı düşünülmüştür. Polimerin ise MİK değerleri *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı her ikisi için de 64 μg/mL olarak bulunmuştur. Polimerin bu MİK değerlerinin PVH4-Q2'nin MİK değerlerinden farklı çıkmasının sebebi ise kullanılan kopolimerin molekül ağırlığının daha yüksek olmasıyla ilişkilendirilmiştir. Graft konjugatın MİK değerleri ise *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı sırasıyla 16 ve 8 μg/mL olarak bulunmuştur. Konjugatın *S. aureus*'a karşı antibakteriyel etkinliğinin hem kopolimer hem de

peptide oranla belirgin derecede daha yüksek olduğu, graft konjugasyonun sinerjik etki oluşturduğu görülmektedir. Lineer kojugatta bu antibakteriyel etki artışı gözlenmiyorken graft konjugatta gözleniyor olması polimere peptidin bağlanma konumu ve sayısının biyolojik etkinliğe etkisini net olarak göstermektedir.

Thappeta ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada kitosan bazlı oligolizin ABPep'in tek başına kitosana göre antibakteriyel dirençli patojenlere karşı daha güçlü bir etki sağladığını ortaya koyulmuştur [143]. Graft konjugat da bu çalışmadaki gibi *S. aureus*'a karşı daha güçlü bir antibakteriyel etki ortaya çıkarmıştır. Yapılan başka bir çalışmada polimer zinciri üzerindeki peptid bağlanma yoğunluğundaki artışın, daha güçlü bir bakterisidal özellik gösterdiği ortaya koyulmuştur [128]. Konjugatlardaki daha yüksek peptid oranının, daha yüksek mikrobiyal öldürme etkinliği göstermesinin sebebinin katyonik peptidin yük yoğunluğunun bakteri hücre zarlarının bozulması ve sitoplazmik sızıntı üzerindeki etkisinden kaynaklandığı belirtilmektedir.

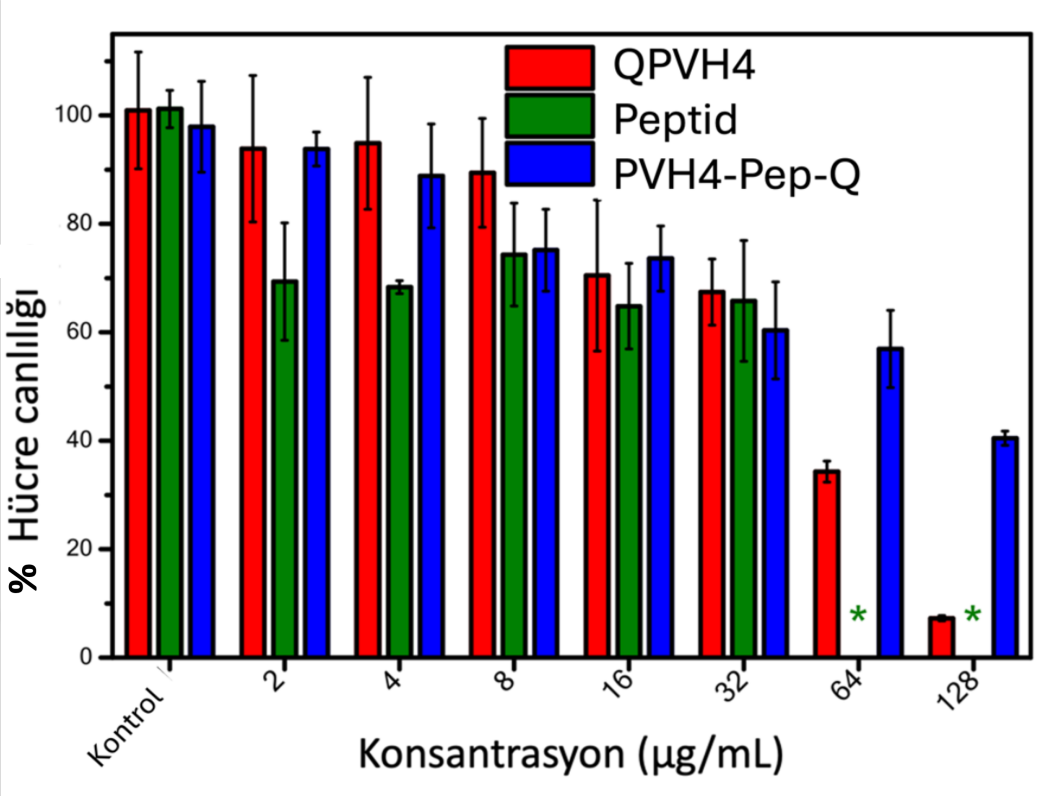
Graft ve lineer yapıda sentezlenen her iki konjugat karşılaştırıldığında, graft yapıdaki konjugatta polimer zincirine daha fazla peptid bağlanmasının antibakteriyel etkinliği doğrudan arttırdığı sonucuna ulaşılmaktadır.

4.4 Hücre Canlılık Testi

Polimerle peptidin konjugasyonu sonfrasında oluşan yapının biyolojik etkinliğine yönelik olarak yapılan diğer bir çalışma da biyouyuyumluluk çalışmasıdır. Üretilen konjugatların kopolimer ve peptidle karşılaştırmalı biyouyumluluk çalışmaları aşağıda sunulmaktadır.

4.4.1 Lineer Polimer-Peptid Konjugatının Hücre Canlılık Testi

Üretilen antibakteriyel malzemelerin bakterilere karşı etkinliğinin araştırılması, biyolojik performanslarını ortaya koymak için çok önemli olsa da, bu malzemelerin sağlıklı memeli hücreleri üzerindeki etkileri de kapsamlı şekilde incelenmelidir. Hücre canlılık testleri, bu malzemelerin biyouyumluluğunu ve potansiyel terapötik uygulamalardaki güvenliğini belirlemek için gereklidir. Bu nedenle, örneklerin L929 hücreleri üzerindeki etkisi MTT testi kullanılarak incelenmiştir. Kuaternerleştirilmiş P(4VP-co-HPMA) kopolimeri, RWWRWWR peptidi ve P(4VP-co-HPMA)-RWWRWWR konjugatı, hücrelere farklı konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Herhangi bir işlem uygulanmayan L929 hücreleri kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Şekil 4.31, 24 saat boyunca örneklerle muamele edilen hücrelerin canlılık oranlarını göstermektedir.



Şekil 4.31 RWWRWWR peptidi, PVH4-Q2 polimeri ve lineer PVH4-Pep-Q konjugatıyla muamele edilmiş L929 hücrelerinin 24 saat inkübasyon sonrasında konsantrasyona bağlı hücre canlılığı değerleri

Peptide maruz kalan hücrelerin canlılık oranı, 2–32 μg/mL konsantrasyon aralığında %65'in üzerinde kalmıştır. Biyouyumluluk çalışmalarında, örnekle muamele edilmiş hücrelerin canlılığının %70 veya üzerinde kalması sitotoksik olmadığını göstermektedir [144]. Bu çalışmada, katyonik amino asit olan arjininin (R) özellikle negatif yüklü lipitlerle etkileşimi nedeniyle yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığı üzerinde zararlı bir etki gösterdiği görülmüştür. Aynı zamanda, hidrofobik bir amino asit olan triptofanın zarla etkileşimi üzerinden toksik etkiye sebep olduğu bilinmektedir [37]. Benzer şekilde, Bacalum ve diğerleri tarafından yapılan katyonik ABPep'lerin sitotoksisitesi üzerine bir çalışmada, Melittin peptidinin memeli hücrelerine karşı önemli derecede toksisite gösterdiği vurgulanmıştır. Çalışmalar, katyonik antibakteriyel peptidlerin farklı konsantrasyonlarda memeli hücreleri üzerindeki etkilerinin yapısal özelliklerine bağlı olarak değiştiğini ortaya koymuştur [145].

Kuaternerleştirilmiş P(4VP-co HPMA)'nın Şekil 4.31'de hücre canlılığı üzerindeki etkisi incelendiğinde L929 hücrelerine karşı önemli derecede toksisiteye sahip olduğu görülmektedir. Buna karşın, polimerin RWWRWWR peptidi ile konjüge edilmesinin ardından antibakteriyel aktivitede bir azalma görülmesine rağmen,

özellikle 64 ve 128 μg/mL konsantrasyonlarında konjugatın hücre canlılığı üzerinde olumlu bir etkisi olduğu görülmektedir. Konjugatın geliştirilmiş biyouyumluluğu ve azalmış antibakteriyel aktivitesi, yapısal modifikasyonlar nedeniyle hem bakteri hem de memeli hücre zarlarıyla olan etkileşimlerinde bir azalmayı işaret etmektedir.

Özellikle, polimer içindeki HPMA gruplarının konjugatın toksisitesini azaltmaya katkıda bulunduğu düşünülmektedir, çünkü HPMA, biyouyumluluğu ve hücresel etkileşimleri azaltma kapasitesiyle geniş çapta tanınmaktadır. Ayrıca, peptidin konjugasyonu, polimerde konformasyonel değişikliklere yol açarak HPMA gruplarını daha dışta, pozitif yüklü ve hidrofobik grupları ise daha içte konumlandırabilmektedir. Bu yeniden düzenlenme, zar etkileşimlerini daha da azaltarak konjugatın düşük toksisitesine ve kısmen azalmış antibakteriyel aktivitesine katkıda bulunabilmektedir.

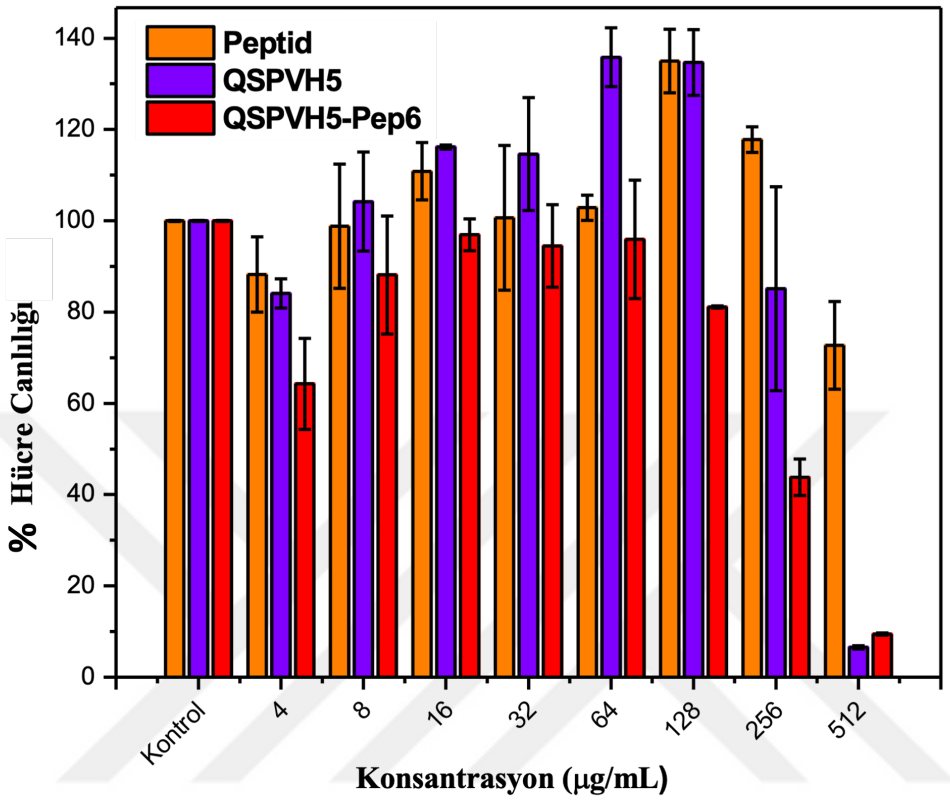
Antibakteriyel etki ve hücre canlılığı sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, literatürde de benzer bir eğilim gözlemlenmiştir; bu, artırılmış biyouyumluluk ile azalmış antibakteriyel aktivite arasındaki dengeyi göstermektedir. Örneğin bir çalışmada, glikopolimerler ve antibakteriyel polipeptitler içeren bir dizi dört kollu yıldız kopolimer geliştirilmiştir [146]. Bu konjugatlar, yalnızca polipeptide kıyasla hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakterilere karşı daha düşük antibakteriyel aktivite sergilerken, daha biyouyumlu bulunmuştur. Chiloeches ve diğerleri, katyonik biyobazlı bir polimer ile ABPep olan Temporin L'nin sinerjistik antibakteriyel etkilerini de incelemiştir [147]. Bulguları, polimer-peptid konjugatlarının yalnızca peptide kıyasla daha yüksek MİK değerlerine sahip olduğunu ve bu durumun antibakteriyel etkinlik ile biyouyumluluk arasındaki dengeyi daha da vurguladığını göstermiştir. Bu çalışmalar, konjugasyonun antibakteriyel aktiviteyi azaltabilmesine rağmen biyouyumluluğu iyileştirdiğini ve bu tür antibakteriyel malzemelerin tasarımında dikkatle değerlendirilmesi gereken bir dengeyi işaret ettiğini kolektif olarak ortaya koymaktadır.

Sentezlenen lineer polimer-peptid konjugatının antibakteriyel aktivitenin en yüksek olduğu *S. aureus*'a karşı 32 μg/mL konsantrasyonda uygulandığında, L929 fibroblast hücrelerinin canlılık yüzdesini %60'ın üzerinde tuttuğu görülmektedir. Bu durum, üretilen konjugatın dozaja bağlı bir profil sergilediğini göstermektedir.

4.4.2 Graft Polimer-Peptid Konjugatının Hücre Canlılık Testi

SPVH5-Q polimeri RWWRWWR-SH peptidi ve SPVH5-Pep6 konjugatının L929 hücreleri üzerindeki etkisi MTT testi uygulanarak incelenmiştir. Bu analizde herhangi bir işlem uygulanmayan L929 hücreleri kontrol grubu olarak kullanılmış

ve 24 saat boyunca örneklerle muamele edilen hücrelerin canlılık oranları analiz edilmiştir. L929 hücrelerinin uygulanan malzemelerin konsantrasyonlarına bağlı olarak canlılık değerleri Şekil 4.32'de sunulmaktadır.



Şekil 4.32 RWWRWWR peptidi, QSPVH5 polimeri ve graft SPVH5-Pep6 konjugatıyla muamele edilmiş L929 hücrelerinin 24 saat inkübasyon sonrasında konsantrasyona bağlı hücre canlılığı değerleri

Peptide maruz kalan hücrelerin canlılık oranının, 4-128 μg/mL konsantrasyon aralığında %70'in üzerinde kaldığı saptanmıştır. Ayrıca düşük konsantrasyonlarda (64-128 μg/mL) toksik olmamakla birlikte hücre çoğalmasını teşvik etmektedir. Peptidin daha yüksek konsantrasyon aralığı olan 128-256 μg/mL'de hücre canlılığının yaklaşık olarak %60'a kadar düştüğü görülmektedir. Biyouyumluluk çalışmalarında, üretilen malzemelerin genellikle hücre canlılığını %70 veya üzerinde tutması beklenir. Bu çalışmada kullanılan peptid zincirindeki katyonik amino asit olan arjininin (R) özellikle zwitteriyonik lipitlerden oluşan memeli hücre membranlarında geçici küçük hasarlar ve delikler oluşturarak lokal membran bozulmalarına sebep olarak geçirgenliği arttırabilmekte ve membran bütünlüğünü zayıflatabilmektedir [148]. Aynı zamanda peptid zincirinde bulunan bir diğer amino asit olan triptofan da hidrofobik özellik göstermektedir. Triptofanın hidrofobikliği sebebiyle bu amino asit hücre membranına gömülmeye yatkınlık gösterebilmekte ve bu da hücre zarının zarar görmesine sebep olabilmektedir. R ve W

amino asitlerinden oluşan peptidin yapısında kolesterol bulunduran memeli hücre membranlarına daha yüksek oranda bağlanarak α-helix yapısı oluşturmasından dolayı L929 hücre yapısını etkileyebileceği düşünülmektedir [149]. Ayrıca peptidin uç grubunda bulunan tiyol grubunun, disülfid bağları veya oksidatif etkileşimler sebebiyle yapı değişikliği ortaya çıkarabileceği ve bu durumun da hücre canlılığını düşürebileceği düşünülmektedir.

Benzer şekilde kuarternize polimerin de hücrelerin canlılık oranını 4-128 μg/mL konsantrasyon aralığında %70'in üzerinde tuttuğu görülmektedir. Aynı zamanda 8-128 μg/mL konsantrasyon aralığında polimerin konsantrasyonunun artmasıyla birlikte hücre proliferasyonunu desteklediği gözlenmektedir. Polimerin 128 μg/mL'de %80'in üzerinde canlılık göstermesine karşılık polimer konsantrasyonu arttıkça (128-256 μg/mL) hücre canlılığı peptide nazaran daha hızlı bir şekilde düşerek %60 olarak belirlenmiştir. 512 μg/mL'de ise kopolimerin yaklaşık olarak tüm hücreleri öldürdüğü görülmektedir.

Konjugatla L929 hücrelerinin inkübe edilmesi sonucunda ise 8-64 μg/mL konsantrasyon aralığında hücre canlılığını %70'in üzerinde koruduğu ancak artan konsantrasyonu karşılığında hücre canlılığının hızlı bir şekilde %40'lara kadar düştüğü görülmektedir. 512 μg/mL'de ise kopolimerin yaklaşıkolarak ütm hücreleri öldürdüğü görülmektedir. Peptid ve kuarternize polimerle karşılaştırıldığında üretilen konjugatın daha düşük biyouyumluluk gösterdiği ve doza bağımlı bir şekilde sitotoksik bir profile sahip olduğu ortaya koyulmaktadır. Bu durum konjugasyon reaksiyonu sonrasında hücre membranı ile etkileşiminde meydana gelen değişikliklerden veya polimerin peptid ile konjugasyonu sonucunda sinerjik olarak toksik etki yaratmasından kaynaklanabilmektedir. Konjugatın biyouyumluluğunun daha düşük olması, polimer zincirine birden fazla peptid bağlanması sonucunda polimerin zaten yüksek olan molekül ağırlığının daha da artmasına bağlı olarak hücreler üzerinde daha fazla yük birikmesine sebep olabilmektedir. Daha büyük bir yapı oluşması sonucunda konjugatın hücre zarı ile sterik engel oluşturması da bu durum ile ilişkilendirilebilmektedir.

Polikatyonların biyolojik sistemlerde kullanımı sırasında en büyük sınırlayıcı faktörlerden biri toksisiteleridir. Yapılan pek çok çalışma, polikatyonların moleküler ağırlığı arttıkça toksisitelerinin de arttığını göstermektedir ve bu ilişki araştırılmaya devam edilmektedir [150, 151]. Monnery ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada farklı moleküler ağırlıklara sahip doğrusal PEI'ler (l-PEI), 25 kDa dallanmış PEI (b-PEI) ve çeşitli PLL'ler ile hücre canlılık testleri yapılmıştır. Hem mitokondri aktivitesi hem de hücre zarı hasarı değerlendirilmiş ve moleküler ağırlık arttıkça toksisitenin de arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca hücre zarındaki

toksisite mekanizması olarak iki teori önerilmiştir: hidroliz ve yüzey aktif madde etkisi. Yapılan gözlemler, hücreler ve lipozomlar üzerinde, toksisitenin ilk etkisinin hücre zarındaki hidroliz olduğuna işaret etmektedir [152].

Buna ek olarak graft yapıdaki konjugat yapılarının daha büyük yüzey alanlarına sahip olması sonucunda daha yoğun etkileşim potansiyeli göstererek biyouyumluluğu düşürebilmektedir. Peptitin serbest hâlde hücre için zararsız olmasına rağmen, polimerle birlikte olduğunda hücreye giriş şekli, membranla teması farklılaşabilmekte ve apoptoz/nekroz gibi hücresel hasarlar oluşabilmektedir.

Bunlarla birlikte serbest SH grubu içeren konjugatlar, hücre içine alındıklarında bazı mekanizmalarla redoks dengesini bozabilmektedirler. Serbest SH grupları hücre içinde reaktif oksijen türleri (ROS) ile etkileşerek disülfid bağları oluşturabilmekte ve bu durum da hücre protein fonksiyonlarını etkileyebilmektedir. Bu tür redoks değişiklileri apoptozu tetikleyebilmektedir. Ayrıca mitokontrinin yapısında bulunan bazı proteinlerde -SH grupları bulunmaktadır. Serbest tiyol grubuna sahip konjugat buradaki -SH gruplarıla etkileşip disüfit bağı oluşturabilmekte ve bunun sonucunda proteinin yapısı bozulabilmektedir [153, 154]. Bu sebeple hücre ölümü gerçekleşebilmektedir. Bu durumun, özellikle konjugatın moleküler ağırlığı, sahip olduğu yük yoğunluğu ve hücre içi dağılımı gibi faktörlere bağlı olarak sitotoksisiteye yol açabileceği düşünülmektedir.

Üretilen graft polimer-peptid konjugatının antibakteriyel aktivitenin en yüksek olduğu *S. aureus*'a karşı 8 μg/mL konsantrasyonda uygulandığında, L929 fibroblast hücrelerinde %80'in üzerinde hücre canlılığını koruduğu, yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığını düşürdüğü görülmektedir. Bu durum, konjugatın biyouyumluluğunun uygulanacak dozaja bağlı değişkenlik gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Polimerin ve konjugatın antibakteriyel aktiviteleri ve hücre canlılıkları birlikte karşılaştırıldığında, konjugatın biyouyumluluğunun polimere karşı düşük olmasına karşın konjugatın sahip olduğu antibakteriyel aktivitenin polimerin sahip olduğu antibakteriyel aktiviteden daha iyi olduğu görülmektedir. Bu durum, çalışmanın asıl hedefi olan moleküler mimarinin biyolojik etkinliğe olan etkisini göstermektedir. Lineer konjugatın antibakteriyel etkinliği kopolimerine göre düşükken biyouyumluluğu daha yüksektir. Buna karşın, graft konjugatın antibakteriyel etkinliği kopolimerine kıyasla daha yüksekken biyouyumluluğu daha düşüktür. Peptid molekülünün kopolimerin farklı konumlarına ve farklı sayılarda bağlanmasının bu etkileri ortaya çıkarmış olduğu anlaşılmaktadır.

Ayrıca, elde edilen tüm bu sonuçlar konjugatların terapötik etki potansiyellerinin değerlendirilebilmesi için dozaj optimizasyonunun önemli olduğu da net olarak görülmektedir.

5
SONUÇ

Bakteriyel enfeksiyonlar, artan antibiyotik kullanımının etkisiyle antibiyotik dirençli hale gelmekte ve bu durum halk sağlığı açısından önemli bir tehdit haline gelmektedir. Bu sebeple, bakterilere karşı farklı mekanizmalarla etki gösteren malzemelerin geliştirilmesi büyük önem arz etmektedir. Tez çalışmasında bakterilere karşı etkinlikleri bilinen bir ABPol ile ABPep farklı mimarilerde bir araya getirilerek lineer ve graft yapıda ABPol-ABPep konjugatları elde edilmiş ve bu farklı mimarilerin antibakteriyel etki ve biyouyumlulukları üzerine etkisi incelenmiştir. Çalışma sonunda aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

- Lineer ABPol-ABPep konjugatı sentezinde kullanılmak üzere P(4VP-co-HPMA) kopolimeri (PVH4-2) (Mw=18.400 Da ve Mw/Mn=1,2) RAFT polimerizasyonu ile başarılı bir şekilde sentezlenmiştir.
- Kopolimer zincir uç grupları tiyol grubuna çevrilmiş ve bu P(4VP-co-HPMA) kopolimeri, RWWRWWR peptidi ile lineer yapıda olacak şekilde başarılı bir şekilde tiyol maleimid yöntemiyle konjuge edilerek lineer ABPol-ABPep konjugatı (PVH4-Pep1) oluşturulmuştur.
- Sentezlenen konjugatın kuarternizasyonu sonucunda nihai lineer ABPol-ABPep konjugatı elde edilmiş ve bu konjugattaki kopolimerin kuarternizasyon derecesinin %45 olduğu saptanmıştır.
- Kuarternize PVH4 kopolimerinde *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı sırasıyla 32 ve 16 μμg/mL'lik MİK değerlerine ulaşılmıştır.
- Kuarternize yapıdaki lineer ABPol-ABPep konjugatının MİK değerleri *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı sırasıyla 64 ve 32 μg/mL olarak bulunmuştur.
- Kopolimerin RWWRWWR peptidi ile konjüge edilmesinin ardından antibakteriyel aktivitede bir azalma görülmesine rağmen, özellikle 64 ve 128 μg/mL konsantrasyonlarındaki konjugatın literatürle karşılaştırıldığında hücre canlılığı üzerinde olumlu bir etkisi olduğu görülmüştür.

- Lineer yapıda ve antibakteriyel özellikte biyouyumlu bir ABPol-ABPep konjugatı başarılı bir şekilde üretilmiştir.

- Graft ABPol-ABPep konjugatında kullanılmak üzere P(4VP-co-HPMA) kopolimeri (SPVH5) (Mw=65.000 Da ve Mw/Mn=1,3) serbest radikal polimerizasyonu ile başarılı bir şekilde sentezlenmiştir.
- SPVH5 kopolimerinin 1-bromohekzan ile kuarternizasyonu sonucu kuarternizasyon derecesi %48 olarak belirlenmiştir.
- Kuarternize SPVH5 kopolimerinin 1-bromohekzanoik asit ile kuarternize edilmesi sonucunda piridin halkalarının %24'üne COOH grupları başarılı bir şekilde bağlanmıştır.
- COOH uç grubuna sahip kuarternize SPVH5 kopolimeri ve RWWRWWR peptidi konjuge edilerek graft ABPol-ABPep konjugatı başarılı bir şekilde sentezlenmiştir.
- Kuarternize SPVH5 kopolimerinin (ABPol) MİK değerleri *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı her ikisinde de 64 μg/mL olarak bulunmuştur.
- Graft ABPol-ABPep konjugatının MİK değerleri *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı sırasıyla 16 ve 8 μg/mL olarak bulunmuştur.
- Graft ABPol-ABPep konjugatının biyouymluğu ise kopolimer ve peptide kıyasla daha düşük çıkmış yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik etki göstermiştir.

Çalışmada üretilen lineer ve graft ABPol-ABPep konjugatlarının biyolojik etkinlikleri bir arada incelendiğinde lineer yapının kopolimerine göre daha biyouyumlu ama antibakteriyel etkinliği daha az, graft yapının ise kopolimerine göre daha antibakjteriyel ama biyouyumluluğu daha düşük olduğu görülmektedir. Bu sonuç, polimer-peptid konjugatlarında bağlanma şeklinin ve bağlanma sayısının yani moleküler mimarinin üretilen konjugatların biyolojik etkinlikleri üzerinde önemli bir etkisi olduğunu göstermiştir. Ayrıca, polimer ve peptid entegrasyonunun antibakteriyel etkinliği daha düşük olan polimerin yapısal kararlılığı ile peptidin yüksek maliyeti ve sınırlı stabilitesi gibi dezavantajlarını dengeleyerek, düşük miktarlarda peptid kullanımıyla yüksek biyolojik etkinliğe sahip malzemelerin üretilmesini sağlayarak bu moleküllerin karşılıklı dezavantajlarını dengede tutmada da etkili olduğunu göstermektedir.

Gelecekteki çalışmalar, çoklu peptid entegrasyonu veya ara bağlayıcıların kullanımı gibi stratejik sentez yaklaşımlarıyla bu konjugatların optimize edilmesine odaklanarak, biyouyumluluğu yüksek ve güçlü antibakteriyel aktiviteye sahip formülasyonların geliştirilmesini hedefleyecektir. Ayrıca, peptid dizisi, polimer yapısı, monomer oranı, moleküler ağırlık, polimer mimarisi, yan grup fonksiyonalitesi ve konjugasyon yöntemleri üzerinde yapılacak sistematik değişikliklerle, antibakteriyel etkinlik ile sitotoksisite arasındaki dengenin optimize edilmesine yönelik araştırmalar, konjugatların performans ve güvenlik profilinin iyileştirilmesi açısından önem arz etmektedir.

Tez çalışmasının devamında, üretilen farklı mimarilerdeki konjugatların yüksek antibakteriyel aktiviteye sahip olmaları sebebi ile bu aktivitelerin detaylandırılması için moleküler düzeydeki farklı yöntemlerle incelenmesi önem kazanmaktadır. Bu kapsamda üretilen konjugatların bakteri hücre duvarına bağlanma şekli, hücre duvarı bütünlüğünü bozma potansiyelleri ve hücre içi metabolik etkilere sahip olup olmadıkları gibi çeşitli mekanizmaların anlaşılması için konfokal lazer taramalı mikroskopisi, Disc3(5) membran depolarizasyon testi gibi analizler yapılması planlanmaktadır. Ayrıca sıklıkla karşılaşılan önemli sorunlardan birisi de çoklu ilaç dirençli bakterilerdir. Üretilen konjugatların Metisiline dirençli *S. aureus*, Vankomisine dirençli Enterokoklar ve *P. aeruginosa* gibi çeşitli patojenlere karşı antibakteriyel aktivitelerinin incelenmesi konjugatların terapötik potansiyelini ilerletmek adına önemli bir basamak olacaktır. Yapılması planlanan başka bir çalışma da iki farklı mimaride sentezlenen konjugatlara alternatif olarak jel formunda ABPol-ABPep konjugatı üretilmesidir. Bu yaklaşımın, farklı mimari yapılarının aktivitelerinin çeşitlendirilmesine ve biyomedikal alanlardaki kullanım potansiyelinin artmasına olanak sağlayabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

[1] A. G. Ross, G. R. Olds, A. W. Cripps, J. J. Farrar D. P. McManus, "Enteropathogens and chronic illness in returning travelers," *New England Journal of Medicine*, c. 368, no. 19, ss. 1817–1825, 2013.

[2] A. E. Clatworthy, K. P. Romano D. T. Hung, "Whole-organism phenotypic screening for anti-infectives promoting host health," *Nature chemical biology*, c. 14, no. 4, ss. 331–341, 2018.

[3] D. Sun, M. Babar Shahzad, M. Li, G. Wang D. Xu, "Antimicrobial materials with medical applications," *Materials Technology*, c. 30, no. sup6, B90–B95, 2015.

[4] W. H. Organization, "Global research agenda for antimicrobial resistance in human health," 2024.

[5] Y. Zou, Y. Zhang, Q. Yu H. Chen, "Dual-function antibacterial surfaces to resist and kill bacteria: Painting a picture with two brushes simultaneously," *Journal of Materials Science & Technology*, c. 70, ss. 24–38, 2021.

[6] Y. Qu ve diğ., "Regenerable smart antibacterial surfaces: full removal of killed bacteria via a sequential degradable layer," *Journal of Materials Chemistry B*, c. 6, no. 23, ss. 3946–3955, 2018.

[7] Q. Borjihan A. Dong, "Design of nanoengineered antibacterial polymers for biomedical applications," *Biomaterials science*, c. 8, no. 24, ss. 6867–6882, 2020.

[8] F. Qi ve diğ., "Practical preparation of infection-resistant biomedical surfaces from antimicrobial β-peptide polymers," *ACS applied materials & interfaces*, c. 11, no. 21, ss. 18 907–18 913, 2019.

[9] S. Mukhopadhyay, A. Bharath Prasad, C. H. Mehta U. Y. Nayak, "Antimicrobial peptide polymers: No escape to ESKAPE pathogens—A review," *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, c. 36, ss. 1–14, 2020.

[10] L. Bock, C. Hind, J. Sutton M. Wand, "Growth media and assay plate material can impact on the effectiveness of cationic biocides and antibiotics against different bacterial species," *Letters in applied microbiology*, c. 66, no. 5, ss. 368–377, 2018.

[11] A. Arora A. Mishra, "Antibacterial polymers–a mini review," *Materials Today: Proceedings*, c. 5, no. 9, ss. 17 156–17 161, 2018.

[12] K.-S. Huang, C.-H. Yang, S.-L. Huang, C.-Y. Chen, Y.-Y. Lu Y.-S. Lin, "Recent advances in antimicrobial polymers: a mini-review," *International journal of molecular sciences*, c. 17, no. 9, s. 1578, 2016.

[13] Q. Yu, Z. Wu H. Chen, "Dual-function antibacterial surfaces for biomedical applications," *Acta biomaterialia*, c. 16, ss. 1–13, 2015.

[14] P. Salas-Ambrosio, A. Tronnet, P. Verhaeghe C. Bonduelle, "Synthetic polypeptide polymers as simplified analogues of antimicrobial peptides," *Biomacromolecules*, c. 22, no. 1, ss. 57–75, 2020.

[15] Y. Xue, H. Xiao Y. Zhang, "Antimicrobial polymeric materials with quaternary ammonium and phosphonium salts," *International journal of molecular sciences*, c. 16, no. 2, ss. 3626–3655, 2015.

[16] D. Gokkaya, M. Topuzogullari, T. Arasoglu, K. Trabzonlu, M. M. Ozmen S. Abdurrahmanoğlu, "Antibacterial properties of cationic copolymers as a function of pendant alkyl chain length and degree of quaternization," *Polymer International*, c. 70, no. 6, ss. 829–836, 2021.

[17] J. C. Tiller, C.-J. Liao, K. Lewis A. M. Klibanov, "Designing surfaces that kill bacteria on contact," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, c. 98, no. 11, ss. 5981–5985, 2001.

[18] M. Topuzogullari, V. Bulmus, E. Dalgakiran S. Dincer, "pH-and temperature-responsive amphiphilic diblock copolymers of 4-vinylpyridine and oligoethyleneglycol methacrylate synthesized by RAFT polymerization," *Polymer*, c. 55, no. 2, ss. 525–534, 2014.

[19] M. S. Kadayifci ve diğ., "Core-crosslinking as a pathway to develop inherently antibacterial polymeric micelles," *Journal of Applied Polymer Science*, c. 137, no. 8, s. 48 393, 2020.

[20] S. J. Shirbin ve diğ., "Polypeptide-based macroporous cryogels with inherent antimicrobial properties: the importance of a macroporous structure," *ACS Macro Letters*, c. 5, no. 5, ss. 552–557, 2016.

[21] B. C. Allison, B. M. Applegate J. P. Youngblood, "Hemocompatibility of hydrophilic antimicrobial copolymers of alkylated 4-vinylpyridine," *Biomacromolecules*, c. 8, no. 10, ss. 2995–2999, 2007.

[22] Y. Wang ve diğ., "Design of novel analogues of short antimicrobial peptide anoplin with improved antimicrobial activity," *Journal of Peptide Science*, c. 20, no. 12, ss. 945–951, 2014.

[23] Q. Wu, J. Patočka K. Kuča, "Insect antimicrobial peptides, a mini review," *Toxins*, c. 10, no. 11, s. 461, 2018.

[24] P. Kumar, J. N. Kizhakkedathu S. K. Straus, "Antimicrobial peptides: diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo," *Biomolecules*, c. 8, no. 1, s. 4, 2018.

[25] L. M. Yin, M. A. Edwards, J. Li, C. M. Yip C. M. Deber, "Roles of hydrophobicity and charge distribution of cationic antimicrobial peptides in peptide-membrane interactions," *Journal of Biological Chemistry*, c. 287, no. 10, ss. 7738–7745, 2012.

[26] E.-R. Kenawy, S. Worley R. Broughton, "The chemistry and applications of antimicrobial polymers: a state-of-the-art review," *Biomacromolecules*, c. 8, no. 5, ss. 1359–1384, 2007.

[27] L. Di, "Strategic approaches to optimizing peptide ADME properties," *The AAPS journal*, c. 17, ss. 134–143, 2015.

[28] M. Sobczak, C. Dębek, E. Olędzka R. Kozłowski, "Polymeric systems of antimicrobial peptides—Strategies and potential applications," *Molecules*, c. 18, no. 11, ss. 14 122–14 137, 2013.

[29] M. Liu, Y. Xu, F. Niu, J. J. Gooding J. Liu, "Carbon quantum dots directly generated from electrochemical oxidation of graphite electrodes in alkaline alcohols and the applications for specific ferric ion detection and cell imaging," *Analyst*, c. 141, no. 9, ss. 2657–2664, 2016.

[30] J. Chen, F. Wang, Q. Liu J. Du, "Antibacterial polymeric nanostructures for biomedical applications," *Chemical communications*, c. 50, no. 93, ss. 14 482–14 493, 2014.

[31] M. L. Becker, J. Liu K. L. Wooley, "Functionalized micellar assemblies prepared via block copolymers synthesized by living free radical polymerization upon peptide-loaded resins," *Biomacromolecules*, c. 6, no. 1, ss. 220–228, 2005.

[32] Y. Xi, T. Song, S. Tang, N. Wang J. Du, "Preparation and antibacterial mechanism insight of polypeptide-based micelles with excellent antibacterial activities," *Biomacromolecules*, c. 17, no. 12, ss. 3922–3930, 2016.

[33] C. Pinese ve diğ., "Simple and specific grafting of antibacterial peptides on silicone catheters," *Advanced healthcare materials*, c. 5, no. 23, ss. 3067–3073, 2016.

[34] S.-X. Xie ve diğ., "Antimicrobial peptide–polymer conjugates for dentistry," *ACS applied polymer materials*, c. 2, no. 3, ss. 1134–1144, 2020.

[35] D. Pranantyo, L. Q. Xu, E.-T. Kang M. B. Chan-Park, "Chitosan-based peptidopolysaccharides as cationic antimicrobial agents and antibacterial coatings," *Biomacromolecules*, c. 19, no. 6, ss. 2156–2165, 2018.

[36] X. Ju ve diğ., "Combating Pseudomonas aeruginosa biofilms by a chitosan-PEG-peptide conjugate via changes in assembled structure," *ACS applied materials & interfaces*, c. 12, no. 12, ss. 13 731–13 738, 2020.

[37] S. Clark, T. A. Jowitt, L. K. Harris, C. G. Knight C. B. Dobson, "The lexicon of antimicrobial peptides: a complete set of arginine and tryptophan sequences," *Communications biology*, c. 4, no. 1, s. 605, 2021.

[38] N. F. Kamaruzzaman ve diğ., "Antimicrobial polymers: the potential replacement of existing antibiotics?" *International Journal of Molecular Sciences*, c. 20, no. 11, s. 2747, 2019.

[39] I. V. da Cunha ve diğ., "Photosensitizer associated with efflux pump inhibitors as a strategy for photodynamic therapy against bacterial resistance," *European Journal of Medicinal Chemistry*, c. 284, s. 117 197, 2025.

[40] M. Ahmad, S. V. Aduru, R. P. Smith, Z. Zhao A. J. Lopatkin, "The role of bacterial metabolism in antimicrobial resistance," *Nature Reviews Microbiology*, ss. 1–16, 2025.

[41] Y. Wang ve diğ., "Design of salt-responsive and regenerative antibacterial polymer brushes with integrated bacterial resistance, killing, and release properties," *Journal of Materials Chemistry B*, c. 7, no. 38, ss. 5762–5774, 2019.

[42] L. Guo, W. Yuan, Z. Lu C. M. Li, "Polymer/nanosilver composite coatings for antibacterial applications," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, c. 439, ss. 69–83, 2013.

[43] H. Luo, X.-Q. Yin, P.-F. Tan, Z.-P. Gu, Z.-M. Liu L. Tan, "Polymeric antibacterial materials: Design, platforms and applications," *Journal of Materials Chemistry B*, c. 9, no. 12, ss. 2802–2815, 2021.

[44] A. Muñoz-Bonilla M. Fernández-García, "Polymeric materials with antimicrobial activity," *Progress in Polymer Science*, c. 37, no. 2, ss. 281–339, 2012.

[45] J. Hoque, S. Ghosh, K. Paramanandham J. Haldar, "Charge-switchable polymeric coating kills bacteria and prevents biofilm formation in vivo," *ACS Applied Materials & Interfaces*, c. 11, no. 42, ss. 39 150–39 162, 2019.

[46] M. Liu, L. Bauman, C. L. Nogueira, M. G. Aucoin, W. A. Anderson B. Zhao, "Antimicrobial polymeric composites for high-touch surfaces in healthcare applications," *Current Opinion in Biomedical Engineering*, c. 22, s. 100 395, 2022.

[47] Y. Gong ve diğ., "Ammonium, phosphonium, and sulfonium polymers for antimicrobial applications: a comparative study," *ACS Applied Polymer Materials*, c. 6, no. 12, ss. 6966–6975, 2024.

[48] Z. Wang, W. Hu, W. Wang, Y. Xiao, Y. Chen X. Wang, "Antibacterial electrospun nanofibrous materials for wound healing," *Advanced Fiber Materials*, c. 5, no. 1, ss. 107–129, 2023.

[49] S. K. Samal ve diğ., "Cationic polymers and their therapeutic potential," *Chemical Society Reviews*, c. 41, no. 21, ss. 7147–7194, 2012.

[50] M. Billuri, J. S. Bonner, C. B. Fuller M. S. Islam, "Impact of natural cationic polymers on charge and clarification of microalgae suspensions," *Environmental engineering science*, c. 32, no. 3, ss. 212–221, 2015.

[51] S. S. Das ve diğ., "Natural cationic polymer-derived injectable hydrogels for targeted chemotherapy," *Materials Advances*, c. 4, no. 23, ss. 6064–6091, 2023.

[52] M. Farshbaf, S. Davaran, A. Zarebkohan, N. Annabi, A. Akbarzadeh R. Salehi, "Significant role of cationic polymers in drug delivery systems," *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, c. 46, no. 8, ss. 1872–1891, 2018.

[53] T. Jiang, M. Deng, R. James, L. S. Nair C. T. Laurencin, "Micro-and nanofabrication of chitosan structures for regenerative engineering," *Acta biomaterialia*, c. 10, no. 4, ss. 1632–1645, 2014.

[54] A. Jain, L. S. Duvvuri, S. Farah, N. Beyth, A. J. Domb W. Khan, "Antimicrobial polymers," *Advanced healthcare materials*, c. 3, no. 12, ss. 1969–1985, 2014.

[55] L. Shih, M.-H. Shen Y.-T. Van, "Microbial synthesis of poly (ε-lysine) and its various applications," *Bioresource technology*, c. 97, no. 9, ss. 1148–1159, 2006.

[56] A. Y. Kostritskii, D. A. Kondinskaia, A. M. Nesterenko A. A. Gurtovenko, "Adsorption of synthetic cationic polymers on model phospholipid membranes: Insight from atomic-scale molecular dynamics simulations," *Langmuir*, c. 32, no. 40, ss. 10 402–10 414, 2016.

[57] S. Alfei A. M. Schito, "Positively charged polymers as promising devices against multidrug resistant gram-negative bacteria: A Review," *Polymers*, c. 12, no. 5, s. 1195, 2020.

[58] K. Mavronasou ve diğ., "Poly (vinyl pyridine) and its quaternized derivatives: understanding their solvation and solid state properties," *Polymers*, c. 14, no. 4, s. 804, 2022.

[59] E. F. Palermo, I. Sovadinova K. Kuroda, "Structural determinants of antimicrobial activity and biocompatibility in membrane-disrupting methacrylamide random copolymers," *Biomacromolecules*, c. 10, no. 11, ss. 3098–3107, 2009.

[60] R. M. Fuoss, M. Watanabe B. D. Coleman, "Quaternization kinetics of poly-4-vinylpyridine," *Journal of Polymer Science*, c. 48, no. 150, ss. 5–15, 1960.

[61] W. Jaeger, J. Bohrisch A. Laschewsky, "Synthetic polymers with quaternary nitrogen atoms—Synthesis and structure of the most used type of cationic polyelectrolytes," *Progress in Polymer Science*, c. 35, no. 5, ss. 511–577, 2010.

[62] E. F. Palermo K. Kuroda, "Chemical structure of cationic groups in amphiphilic polymethacrylates modulates the antimicrobial and hemolytic activities," *Biomacromolecules*, c. 10, no. 6, ss. 1416–1428, 2009.

[63] Y. Liu, J. Chen, Y. Tang, S. Li, Y. Dou J. Zheng, "Synthesis and characterization of quaternized poly (β-amino ester) for highly efficient delivery of small interfering RNA," *Molecular pharmaceutics*, c. 15, no. 10, ss. 4558–4567, 2018.

[64] G. Lu, D. Wu R. Fu, "Studies on the synthesis and antibacterial activities of polymeric quaternary ammonium salts from dimethylaminoethyl methacrylate," *Reactive and Functional Polymers*, c. 67, no. 4, ss. 355–366, 2007.

[65] J. H. Koh, J. A. Seo, J. T. Park J. H. Kim, "Synthesis and characterization of AgBr nanocomposites by templated amphiphilic comb polymer," *Journal of colloid and interface science*, c. 338, no. 2, ss. 486–490, 2009.

[66] B. D. Coleman R. M. Fuoss, "Quaternization kinetics. I. Some pyridine derivatives in tetramethylene sulfone," *Journal of the American Chemical Society*, c. 77, no. 21, ss. 5472–5476, 1955.

[67] M. Topuzogullari, "Microwave assisted quaternization of poly (4-vinylpyridine) with 1-bromohexane," *Journal of Polymer Research*, c. 25, no. 8, s. 188, 2018.

[68] Z. Zhang, M. M. Rahman, C. Abetz, B. Bajer, J. Wang V. Abetz, "Quaternization of a polystyrene-block-poly (4-vinylpyridine) isoporous membrane: an approach to tune the pore size and the charge density," *Macromolecular Rapid Communications*, c. 40, no. 3, s. 1 800 729, 2019.

[69] Y. Li, L. Hong M. Yang, "Crosslinked and quaternized poly (4-vinylpyridine)/polypyrrole composite as a potential candidate for the detection of low humidity," *Talanta*, c. 75, no. 2, ss. 412–417, 2008.

[70] X. Briones ve diğ., "Synthesis and characterization of poly (ionic liquid) derivatives of N-alkyl quaternized poly (4-vinylpyridine)," *Reactive and Functional Polymers*, c. 124, ss. 64–71, 2018.

[71] Y. Zhang M. Lang, "Facile preparation of effective and durable antibacterial coatings based on poly (Q4VP-co-4VP-co-BA)," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, s. 136 214, 2025.

[72] M. TopuzoĞullari, "Effect of polyelectrolyte complex formation on the antibacterial activity of copolymer of alkylated 4-vinylpyridine," *Turkish Journal of Chemistry*, c. 44, no. 3, ss. 634–646, 2020.

[73] M. Daaboul ve diğ., "Polycationic nanoparticle-integrated inherently antibacterial cryogels," *Materials Letters*, c. 368, s. 136 636, 2024.

[74] K. Steward, "Essential amino acids: Chart, abbreviations and structure," *Technology Network*, ss. 1–18, 2019.

[75] C. Ciobanasu, A. Rzeszutek, U. Kubitscheck R. Willumeit, "NKCS, a mutant of the NK-2 peptide, causes severe distortions and perforations in bacterial, but not human model lipid membranes," *Molecules*, c. 20, no. 4, ss. 6941–6958, 2015.

[76] C. Deshayes, M. N. Arafath, V. Apaire-Marchais E. Roger, "Drug delivery systems for the oral administration of antimicrobial peptides: Promising tools to treat infectious diseases," *Frontiers in Medical Technology*, c. 3, s. 778 645, 2022.

[77] H. F. Hetta ve diğ., "Antimicrobial Peptides: The Game-Changer in the Epic Battle Against Multidrug-Resistant Bacteria," *Pharmaceuticals*, c. 17, no. 11, s. 1555, 2024.

[78] J. Batista Araujo, G. Sastre de Souza E. N. Lorenzon, "Indolicidin revisited: biological activity, potential applications and perspectives of an antimicrobial peptide not yet fully explored," *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, c. 38, ss. 1–11, 2022.

[79] J. Lei ve diğ., "The antimicrobial peptides and their potential clinical applications," *American journal of translational research*, c. 11, no. 7, s. 3919, 2019.

[80] S. Zheng ve diğ., "Antimicrobial peptide biological activity, delivery systems and clinical translation status and challenges," *Journal of Translational Medicine*, c. 23, no. 1, s. 292, 2025.

[81] M.-L. Heymich, "The generation of antimicrobial peptides from plants for the preservation of food," dok. tezi, Ocak 2021.

[82] S. Ji ve diğ., "Antimicrobial peptides: An alternative to traditional antibiotics," *European Journal of Medicinal Chemistry*, c. 265, s. 116 072, 2024.

[83] Y. Wei ve diğ., *Efficacy and safety of PL-5 (peceleganan) spray for wound infections: A phase IIb randomized clinical trial*, 2023.

[84] K. P. Rakesh, S. Ramesh, Shivakumar D. C. Gowda, "Effect of low charge and high hydrophobicity on antimicrobial activity of the quinazolinone-peptide conjugates," *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, c. 44, ss. 158–164, 2018.

[85] M. Rohde, "The Gram-positive bacterial cell wall," *Microbiology spectrum*, c. 7, no. 3, ss. 10–1128, 2019.

[86] N. A. Mohamad, N. A. Jusoh, Z. Z. Htike, S. L. Win ve diğ., "Bacteria identification from microscopic morphology: a survey," *International Journal on Soft Computing, Artificial Intelligence and Applications (IJSCAI)*, c. 3, no. 1, ss. 2319–1015, 2014.

[87] T. J. Beveridge, "Use of the Gram stain in microbiology," *Biotechnic & Histochemistry*, c. 76, no. 3, ss. 111–118, 2001.

[88] T. Lithgow, C. J. Stubenrauch M. P. Stumpf, "Surveying membrane landscapes: a new look at the bacterial cell surface," *Nature Reviews Microbiology*, c. 21, no. 8, ss. 502–518, 2023.

[89] G. K. Auer D. B. Weibel, "Bacterial cell mechanics," *Biochemistry*, c. 56, no. 29, ss. 3710–3724, 2017.

[90] M. Varghese M. Balachandran, "Antibacterial efficiency of carbon dots against Gram-positive and Gram-negative bacteria: A review," *Journal of Environmental Chemical Engineering*, c. 9, no. 6, s. 106 821, 2021.

[91] J.-H. Lee, *Perspectives towards antibiotic resistance: from molecules to population*, 2019.

[92] Y. Zhu, W. E. Huang Q. Yang, "Clinical perspective of antimicrobial resistance in bacteria," *Infection and drug resistance*, ss. 735–746, 2022.

[93] E. M. Darby ve diğ., "Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited," *Nature Reviews Microbiology*, c. 21, no. 5, ss. 280–295, 2023.

[94] G.-Y. Liu ve diğ., "Antimicrobial resistance crisis: could artificial intelligence be the solution?" *Military Medical Research*, c. 11, no. 1, s. 7, 2024.

[95] I. N. Okeke ve diğ., "The scope of the antimicrobial resistance challenge," *The Lancet*, c. 403, no. 10442, ss. 2426–2438, 2024.

[96] I. Francolini, G. Donelli, F. Crisante, V. Taresco A. Piozzi, "Antimicrobial polymers for anti-biofilm medical devices: state-of-art and perspectives," içinde *Biofilm-based Healthcare-associated Infections: Volume II*, Springer, 2014, ss. 93–117.

[97] Y. Yang, Z. Cai, Z. Huang, X. Tang X. Zhang, "Antimicrobial cationic polymers: From structural design to functional control," *Polymer Journal*, c. 50, no. 1, ss. 33–44, 2018.

[98] M. Aquib ve diğ., "Effect of cyclic topology versus linear terpolymers on antibacterial activity and biocompatibility: antimicrobial peptide avatars," *Chemical Science*, c. 15, no. 45, ss. 19 057–19 069, 2024.

[99] C. Gonnot ve diğ., "Cyclic and linear cationic polymers based on metathesis polymerization for antibacterial and antifungal Applications," *European Polymer Journal*, c. 230, s. 113 875, 2025.

[100] A. Chen ve diğ., "Antimicrobial anilinium polymers: The properties of poly (N, N-dimethylaminophenylene methacrylamide) in solution and as coatings," *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, c. 57, no. 18, ss. 1908–1921, 2019.

[101] R. Bansala, S. Chatterjee ve diğ., "Antibacterial cationic polymers: A novel approach for combating bacterial infections," *International Journal of Science and Research Archive*, c. 10, no. 1, ss. 611–621, 2023.

[102] H. Moravej ve diğ., "Antimicrobial peptides: features, action, and their resistance mechanisms in bacteria," *Microbial Drug Resistance*, c. 24, no. 6, ss. 747–767, 2018.

[103] N. Chen C. Jiang, "Antimicrobial peptides: Structure, mechanism, and modification," *European Journal of Medicinal Chemistry*, c. 255, s. 115 377, 2023.

[104] P. Pham, S. Oliver C. Boyer, "Design of antimicrobial polymers," *Macromolecular Chemistry and Physics*, c. 224, no. 3, s. 2 200 226, 2023.

[105] Y. Luo Y. Song, "Mechanism of antimicrobial peptides: antimicrobial, anti-inflammatory and antibiofilm activities," *International journal of molecular sciences*, c. 22, no. 21, s. 11 401, 2021.

[106] T. A. Ahmed R. Hammami, "Recent insights into structure–function relationships of antimicrobial peptides," *Journal of food biochemistry*, c. 43, no. 1, e12546, 2019.

[107] P. M. Alves, C. C. Barrias, P. Gomes M. C. L. Martins, "How can biomaterial-conjugated antimicrobial peptides fight bacteria and be protected from degradation?" *Acta Biomaterialia*, c. 181, ss. 98–116, 2024.

[108] S. Huhmann B. Koksch, "Fine-tuning the proteolytic stability of peptides with fluorinated amino acids," *European Journal of Organic Chemistry*, c. 2018, no. 27-28, ss. 3667–3679, 2018.

[109] A. Giuliani A. C. Rinaldi, "Beyond natural antimicrobial peptides: multimeric peptides and other peptidomimetic approaches," *Cellular and Molecular Life Sciences*, c. 68, ss. 2255–2266, 2011.

[110] S. Paul, S. Verma Y.-C. Chen, "Peptide dendrimer-based antibacterial agents: synthesis and applications," *ACS Infectious Diseases*, c. 10, no. 4, ss. 1034–1055, 2024.

[111] K. Harini, K. Girigoswami, A. Thirumalai A. Girigoswami, "Polymer-based antimicrobial peptide mimetics for treating multi-drug resistant infections: therapy and toxicity evaluation," *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, c. 30, no. 6, s. 64, 2024.

[112] H. Sun, Y. Hong, Y. Xi, Y. Zou, J. Gao J. Du, "Synthesis, self-assembly, and biomedical applications of antimicrobial peptide–polymer conjugates," *Biomacromolecules*, c. 19, no. 6, ss. 1701–1720, 2018.

[113] Y. Sun ve diğ., "Thiol Michael addition reaction: a facile tool for introducing peptides into polymer-based gene delivery systems," *Polymer International*, c. 67, no. 1, ss. 25–31, 2018.

[114] G. Gao, K. Yu, J. Kindrachuk, D. E. Brooks, R. E. Hancock J. N. Kizhakkedathu, "Antibacterial surfaces based on polymer brushes: investigation on the influence of brush properties on antimicrobial peptide immobilization and antimicrobial activity," *Biomacromolecules*, c. 12, no. 10, ss. 3715–3727, 2011.

[115] B. A. Abel C. L. McCormick, ""One-Pot" Aminolysis/Thiol–Maleimide End-Group Functionalization of RAFT Polymers: Identifying and Preventing Michael Addition Side Reactions," *Macromolecules*, c. 49, no. 17, ss. 6193–6202, 2016.

[116] A. Reinhardt I. Neundorf, "Design and application of antimicrobial peptide conjugates," *International journal of molecular sciences*, c. 17, no. 5, s. 701, 2016.

[117] S. P. Selvaraj J.-Y. Chen, "Conjugation of antimicrobial peptides to enhance therapeutic efficacy," *European Journal of Medicinal Chemistry*, c. 259, s. 115 680, 2023.

[118] J. Zhou ve diğ., "A novel peptide-drug conjugate for glioma-targeted drug delivery," *Journal of Controlled Release*, c. 369, ss. 722–733, 2024.

[119] Y. Yang, "Applications of Benzotriazol-1-yloxy Compounds in Peptide Synthesis," *Advances in Chemistry Research*, s. 31, 2024.

[120] S. Agudo-Álvarez, S. S. Díaz-Mínguez R. Benito-Arenas, "The amide group and its preparation methods by acid-amine coupling reactions: An overview," *Pure and Applied Chemistry*, c. 96, no. 5, ss. 691–707, 2024.

[121] A. Singh, K. Kumari P. P. Kundu, "Synthesis of biopolymer-polypeptide conjugates and their potential therapeutic interests," *Physical Sciences Reviews*, c. 9, no. 9, ss. 2947–2964, 2024.

[122] S. R. Dennison, S. M. Reddy, L. H. Morton, F. Harris, K. Badiani D. A. Phoenix, "PEGylation enhances the antibacterial and therapeutic potential of amphibian host defence peptides," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, c. 1864, no. 1, s. 183 806, 2022.

[123] W. Li, F. Separovic, N. M. O'Brien-Simpson J. D. Wade, "Chemically modified and conjugated antimicrobial peptides against superbugs," *Chemical Society Reviews*, c. 50, no. 8, ss. 4932–4973, 2021.

[124] Z. Cui ve diğ., "Molecular engineering of antimicrobial peptide (AMP)–polymer conjugates," *Biomaterials science*, c. 9, no. 15, ss. 5069–5091, 2021.

[125] A. Guiotto, M. Pozzobon, M. Canevari, R. Manganelli, M. Scarin F. M. Veronese, "PEGylation of the antimicrobial peptide nisin A: problems and perspectives," *Il Farmaco*, c. 58, no. 1, ss. 45–50, 2003.

[126] D. G. Ozburun, H. Hancer, B. Findikli, T. Ozbek, M. M. Ozmen M. Topuzogullari, "Quaternized Poly (4-vinylpyridine-co-N-2-hydroxypropylmethacrylamide) and antibacterial peptide linear conjugates: Synthesis, characterization, and bioactivity," *European Polymer Journal*, c. 222, s. 113 615, 2025.

[127] Y. Su ve diğ., "Cationic peptidopolysaccharides synthesized by 'click'chemistry with enhanced broad-spectrum antimicrobial activities," *Polymer chemistry*, c. 8, no. 25, ss. 3788–3800, 2017.

[128] D. Pranantyo, L. Q. Xu, E.-T. Kang, M. K. Mya M. B. Chan-Park, "Conjugation of polyphosphoester and antimicrobial peptide for enhanced bactericidal activity and biocompatibility," *Biomacromolecules*, c. 17, no. 12, ss. 4037–4044, 2016.

[129] K. Yu ve diğ., "Toward infection-resistant surfaces: achieving high antimicrobial peptide potency by modulating the functionality of polymer brush and peptide," *ACS applied materials & interfaces*, c. 7, no. 51, ss. 28 591–28 605, 2015.

[130] N. Hadjesfandiari, K. Yu, Y. Mei J. N. Kizhakkedathu, "Polymer brush-based approaches for the development of infection-resistant surfaces," *Journal of Materials Chemistry B*, c. 2, no. 31, ss. 4968–4978, 2014.

[131] B. D. Ilieş, I. Yildiz M. Abbas, "Peptide-conjugated Nanoparticle Platforms for Targeted Delivery, Imaging, and Biosensing Applications," *ChemBioChem*, c. 25, no. 10, e202300867, 2024.

[132] S. Wu, X. Liu, K. W. Yeung, C. Liu X. Yang, "Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering," *Materials Science and Engineering: R: Reports*, c. 80, ss. 1–36, 2014.

[133] A. Xu ve diğ., "A carboxymethyl chitosan and peptide-decorated polyetheretherketone ternary biocomposite with enhanced antibacterial activity and osseointegration as orthopedic/dental implants," *Journal of Materials Chemistry B*, c. 4, no. 10, ss. 1878–1890, 2016.

[134] F. M. Costa, S. R. Maia, P. A. Gomes M. C. L. Martins, "Dhvar5 antimicrobial peptide (AMP) chemoselective covalent immobilization results on higher antiadherence effect than simple physical adsorption," *Biomaterials*, c. 52, ss. 531–538, 2015.

[135] Q. Gao ve diğ., "Rationally designed dual functional block copolymers for bottlebrush-like coatings: In vitro and in vivo antimicrobial, antibiofilm, and antifouling properties," *Acta biomaterialia*, c. 51, ss. 112–124, 2017.

[136] K. Ulbrich, K. Hola, V. Subr, A. Bakandritsos, J. Tucek R. Zboril, "Targeted drug delivery with polymers and magnetic nanoparticles: covalent and noncovalent approaches, release control, and clinical studies," *Chemical reviews*, c. 116, no. 9, ss. 5338–5431, 2016.

[137] R. Pola ve diğ., "Polymer-antimicrobial peptide constructs with tailored drug-release behavior," *Pharmaceutics*, c. 15, no. 2, s. 406, 2023.

[138] Z. Özdemir, M. Topuzoğulları, İ. A. İşoğlu S. Dinçer, "RAFT-mediated synthesis of poly (N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide-b-4-vinylpyridine) by conventional and microwave heating," *Polymer bulletin*, c. 70, ss. 2857–2872, 2013.

[139] M. Li, P. De, H. Li B. S. Sumerlin, "Conjugation of RAFT-generated polymers to proteins by two consecutive thiol–ene reactions," *Polymer Chemistry*, c. 1, no. 6, ss. 854–859, 2010.

[140] K. Kiss, S. Ránky, Z. Gyulai L. Molnár, "Development of a novel, automated, robotic system for rapid, high-throughput, parallel, solid-phase peptide synthesis," *SLAS technology*, c. 28, no. 2, ss. 89–97, 2023.

[141] M. A. Wikler, "Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard," *Clsi (Nccls)*, c. 26, 2006.

[142] N. M. Bingham, Z. Abousalman-Rezvani, K. Collins P. J. Roth, "Thiocarbonyl chemistry in polymer science," *Polymer Chemistry*, c. 13, no. 20, ss. 2880–2901, 2022.

[143] K. R. Thappeta, Y. S. Vikhe, A. M. Yong, M. B. Chan-Park K. A. Kline, "Combined efficacy of an antimicrobial cationic peptide polymer with conventional antibiotics to combat multidrug-resistant pathogens," *ACS Infectious Diseases*, c. 6, no. 5, ss. 1228–1237, 2020.

[144] International Organization for Standardization (ISO), *Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*, INTERNATIONAL STANDARD, International Organization for Standardization (ISO), Haz. 2009. erişim adresi: `https://www.iso.org/standard/36406.html`.

[145] M. Bacalum M. Radu, "Cationic antimicrobial peptides cytotoxicity on mammalian cells: an analysis using therapeutic index integrative concept," *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, c. 21, ss. 47–55, 2015.

[146] D. Pranantyo, L. Q. Xu, Z. Hou, E.-T. Kang M. B. Chan-Park, "Increasing bacterial affinity and cytocompatibility with four-arm star glycopolymers and antimicrobial α-polylysine," *Polymer Chemistry*, c. 8, no. 21, ss. 3364–3373, 2017.

[147] A. Chiloeches ve diğ., "Synergistic Combination of Antimicrobial Peptides and Cationic Polyitaconates in Multifunctional PLA Fibers," *ACS Applied Bio Materials*, c. 6, no. 11, ss. 4805–4813, 2023.

[148] M.-L. Jobin ve diğ., "Biophysical insight on the membrane insertion of an arginine-rich cell-penetrating peptide," *International Journal of Molecular Sciences*, c. 20, no. 18, s. 4441, 2019.

[149] H. A. Rydberg, A. Kunze, N. Carlsson, N. Altgärde, S. Svedhem B. Nordén, "Peptide-membrane interactions of arginine-tryptophan peptides probed using quartz crystal microbalance with dissipation monitoring," *European Biophysics Journal*, c. 43, ss. 241–253, 2014.

[150] B. D. Monnery, S. Shaunak, M. Thanou J. H. Steinke, "Improved synthesis of linear poly (ethylenimine) via low-temperature polymerization of 2-isopropyl-2-oxazoline in chlorobenzene," *Macromolecules*, c. 48, no. 10, ss. 3197–3206, 2015.

[151] S. Vaidyanathan, B. G. Orr M. M. Banaszak Holl, "Role of cell membrane–vector interactions in successful gene delivery," *Accounts of chemical research*, c. 49, no. 8, ss. 1486–1493, 2016.

[152] B. D. Monnery ve diğ., "Cytotoxicity of polycations: Relationship of molecular weight and the hydrolytic theory of the mechanism of toxicity," *International journal of pharmaceutics*, c. 521, no. 1-2, ss. 249–258, 2017.

[153] F. Yin, H. Sancheti E. Cadenas, "Mitochondrial thiols in the regulation of cell death pathways," *Antioxidants & redox signaling*, c. 17, no. 12, ss. 1714–1727, 2012.

[154] M. Benhar, "Oxidants, antioxidants and thiol redox switches in the control of regulated cell death pathways," *Antioxidants*, c. 9, no. 4, s. 309, 2020.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Makale

1. Ozburun, D. G., Hancer, H., Findikli, B., Ozbek, T., Ozmen, M. M., Topuzoğulları, M. (2025). Quaternized Poly(4-vinylpyridine-co-N-2-hydroxypropylmethacrylamide) and Antibacterial Peptide Linear Conjugates: Synthesis, Characterization, and Bioactivity. European Polymer Journal, 222, 113615.

Konferans Bildirisi

1. Ozburun, D. G., Hancer, H., Findikli, B., Ozbek, T., Ozmen, M. M.,Topuzogullari, M. (2024). Synthesis and Characterization of Inherently Antibacterial Polymer-Peptide Conjugate BIOMED2023, 27th National Biomedical Science and Technology Symposium, İzmir, 2023

Proje

1. Özburun, D. G., Özbek, T., Özmen, M. M.,Topuzoğulları, M., Antibakteriyel Polimer-Peptid Konjugatlarının Geliştirilmesi, Türkiye Sağlık Enstitüleri (TÜSEB), Grup A Acil Ar-Ge Projeleri Destek Programı, 11940, 2022-2024