

**ROMATOİD ARTRİT HASTALIĞININ
PROİNFLAMATUVAR
SİTOKİNİ OLAN TNF- α TABANLI
NANOTERANOSTİK GELİŞTİRİLMESİ**

Suzan YAZAR

Yüksek Lisans Tezi

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı
Ocak 2010

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Suzan YAZAR'ın " Romatoid Artrit hastalığının proinflamatuvar sitokini olan TNF-alfa tabanlı nanoteranostik geliştirilmesi" başlıklı İleri Teknolojiler Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi 29 Aralık 2009 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. RIDVAN SAY
Üye	: Doç. Dr. LÜTFÜ GENÇ
Üye	: Yard. Dr. SİBEL EMİR DİLTEMİZ

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ROMATOİD ARTRİT HASTALIĞININ PROİNFLAMATUVAR SİTOKİNİ OLAN TNF- α TABANLI NANOTERANOSTİK GELİŞTİRİLMESİ

Suzan YAZAR

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Biyoteknoloji

Danışman: Prof. Dr. Rıdvan SAY

2010, 67 sayfa

Romatoid artrit (RA), bağışıklık sisteminin eklemlere saldırmasına yol açan kronik, inflamatuvar ve ağrılı bir otoimmün hastalıktır. RA' da hastalığın başlangıç sürecinde immün sistemine (bağışıklık) ait hücreler aktif hale gelirler ve bir otoimmünite süreci başlayarak hücreler kendi vücutlarına karşı savunmaya geçerler. RA tetiklendiğinde, vücudun bağışıklık yanıtı sinovyumun inflamasyonuna sebep olur. Bu süreç, inflamasyonun erken ve orta moleküler medyatörlerden sitokinlerin ve diğer inflamasyon araçlarının tetiklenmesi ile gerçekleşmektedir. RA oluşumunda, en önemli proinflamatuvar sitokinlerinden biri Tümör Nekroz Faktör- α (TNF- α) olarak kabul edilmektedir. Bu sebeple TNF- α tayini, RA hastalığında, hastalığın aktivitesi konusunda doğru bilgi edinilmesini, hastalığın lokalizasyonunun belirlenmesini ve görüntülenmesini sağlayarak hastalık sürecinin anlaşılmasında önemli bir parametreyi teşkil etmektedir.

Bu çalışmada, TNF- α blokasyonuna yönelik yeni nanobiyobloklayıcılar sentezlenmiştir. TNF- α ve anti- TNF- α ile sentezlenen konjugatlar, floresan özelliğe sahip nano polimerik bir formata dönüştürülmüş ve aktiviteleri test edilmiştir. Aynı zamanda TNF- α ve anti-TNF- α eklem ve kıkırdığın en önemli bileşeni olan hiyaluronik asite ve superparamanyetik nanopartiküllere konjuge edilmiştir. Karakterizasyon çalışmaları nano formatta ve konjuge haldeki TNF- α ve anti-TNF- α 'nın aktivitelerini koruduğunu göstermiştir. Böylece; RA hasta örneklerinde TNF- α tayini ve blokasyonu gerçekleştirilebilir.

Anahtar Kelimeler: Romatoid Artrit (RA), TNF- α , Anti-TNF- α Antikoru

ABSTRACT

Master of Science Thesis

INVESTIGATION OF NANOTHERANOSTIC BASED ON TNF- α WHICH IS THE PROINFLAMMATORY CYTOKINE OF RHEUMATOID ARTHRITIS

Suzan YAZAR

Anadolu University

Graduate School of Sciences

Advanced Technologies Program

Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Ridvan SAY

2010, 67 pages

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic, inflammatory and painful autoimmune disease that causes immune system to attack joints. Within initial period of RA, cells belonged to immune system become an active and an autoimmune process begins and cells create a defense mechanism against their body. When RA is triggered, immune response of body cause to synovium inflammation. This period eventuates with triggered of inflammation by pro and medial molecular mediators such cytokine and other inflammatory agents. TNF- α is accepted the most important proinflammatory cytokine to cause RA. For this reason, detection of TNF- α is an important parameter that is used getting right information about activity of the disease, determining and displaying its localization to understand duration of the disease period in RA.

In this study, novel nanobioblockers have been synthesized for TNF- α blocking. The conjugates that have synthesized using TNF- α and anti- TNF- α have converted to nano polymeric form which has fluorescence property and activities have been tested. Also TNF- α and anti- TNF- α have been conjugated to hyaluronic acid which is a major component of joint and cartilage and superparamagnetic nanoparticles. Characterization studies have been shown nano and conjugate form of TNF- α and anti- TNF- α still save their activities. So that TNF- α can be detected and blocked in the sample of rheumatoid arthritis patients.

Key Words: Rheumatoid Arthritis (RA), TNF- α , Anti-TNF- α Antibody

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmalarım boyunca beni her zaman destekleyen, motive eden ve hep anlayıőla bana yol gösteren Danıőmanım Sayın Prof. Dr. Rıdvan SAY'a,

Her konuda bana destek olan Fen Fakóltesi Dekan Yardımcısı Sayın Doç. Dr. Arzu ERSÖZ'e,

Bitki İlaç ve Bilimsel Araőtırmalar Merkezinde (BİBAM) yapmış olduğum deneyler sırasında bana yardımcı olan BİBAM M¼d¼r Yardımcısı Sayın Doç. Dr. L¼tf¼ GENÇ'e,

Hem laboratuvar hem de teorik çalıőmalarım sırasında bana bilgi ve tecr¼beleriyle katkıda bulunan Sayın Yrd. Doç. Sibel EMİR DİLTEMİZ 'e ve Sayın Yrd. Doç. Ayça ATILIR ÖZCAN'a

Çalıőmam boyunca her zaman destekleriyle bana yardım eden sevgili arkadaşlarım Bahar Tuba FINDIK, Sibel B¼Y¼KTİRYAKI, Őenay ARIKAYA, Özlem BİÇEN, R¼stem KEÇİLİ ve G¼ner SAKA'ya,

Ve maddi-manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan canım Ailem'e ve çok sevgili niőanlım Serdar ÇELİK'e

Sonsuz teőekk¼rlerimi sunarım...

Suzan YAZAR

Ocak 2010

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Romatoid Artrit Hastalığı.....	2
1.1.1. Romatoid Artrit Hastalığının Patogenezi.....	2
1.1.2. Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF- α).....	5
1.1.3. Romatoid Artrit Hastalığında TNF- α 'ya Yönelik Çalışmalar..	6
1.1.4. Romatoid Artrit Hastalığının Tedavisi.....	8
1.1.5. TNF- α İnhibitörleri.....	10
1.2. Hyaluronik Asittin Romatoid Artrit Hastalığı İle İlişkisi.....	13
1.3. Mikroemülsiyon Polimerizasyon Tekniği.....	15
1.4. Akış Sitometrisi.....	19
1.5. Fourier-Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR)	21
1.6. Reflektometrik İnterferans Spektroskopisi	22
1.7. Kuantum Noktaları (QD).....	23
1.8. Floresan Spektrofotometre.....	26
1.9. Biyokonjugasyon.....	27
1.10. Biyokonjugasyon İşlemlerinde Kullanılan Çapraz Bağlayıcı Ajanlar (EDC ve NHS).....	31
1.10.1. EDC.....	31
1.10.2. NHS ve Sulfo NHS.....	33
1.11. Rutenyum Bipiridin Kromoforu.....	35
1.12. Teranostik Kavramı.....	37

2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	39
2.1. Materyal.....	39
2.1.1. Kullanılan Kimyasallar.....	39
2.1.2. Kullanılan Cihazlar.....	39
2.2. Yöntem.....	40
2.2.1. Fotosensitif Mikroemülsiyon Tekniği ile Polimerik nano TNF- α 'nın Sentezi.....	40
2.2.2. Polimerik nano TNF- α ile Metotreksat (MTX) Konjugasyonu.....	41
2.2.3. Süperparamanyetik Nanopartiküllerinin (SPN) trimetoksisilil propil metakrilat (TMSPM) ile Modifikasyonu.....	41
2.2.4. Silanlanmış SPN Partiküllerine Anti-TNF- α Antikorunun Konjugasyonu.....	42
2.2.5. Hyaluronik Asit (HA) Biyopolimerine TNF- α 'nın Fotosensitif Konjugasyonu.....	42
2.2.6. Hiyaluronik Asit (HA) Biyopolimerine Anti-TNF- α Antikorunun Fotosensitif Konjugasyonu.....	43
2.2.7. CdS/Kuantum Noktacıklarına (QD) TNF- α Konjugasyonu.....	43
2.2.8. Polimerik Nano Anti-TNF- α Sentezi.....	44
2.2.9. Reflektometrik İnterferans Spektrofotometresi ile Polimerik Nano Anti TNF- α 'nin Etkinliğinin Analizi.....	45
2.2.10. Hücre Kültürü.....	47
2.2.11. Polimerik nano TNF- α 'nın Kansere Hücrelerine Etkisi.....	47
2.2.12. Akış Sitometrisi.....	48
2.2.13. Karakterizasyon Çalışmaları.....	49
2.2.13.1. Boyut Analizi.....	49
2.2.13.2. FTIR Analizi.....	49
3. BULGULAR.....	49
3.1. Floresan Spektrofotometre Sonuçları.....	49
3.1.1. Hyaluronik Asit ile TNF- α Konjugasyonu.....	49

3.1.2. TNF- α Konjuge Edilmiş HA Çözeltilisi ile Anti TNF- α Konjuge Edilmiş Süperparamanyetik Nanopartiküllerinin Etkileşimi.....	50
3.1.3. Hyaluronik Asit ile Anti TNF- α Konjugasyonu.....	51
3.1.4. Hyaluronik Asit Çözeltilisi ile Anti-TNF- α Konjugasyonu ve QD ile TNF- α Konjugasyonunun Etkileşimi.....	52
3.1.5. MTX Konjuge Edilmiş Polimerik Nano TNF- α	53
3.1.6. MTX Konjuge Edilmiş Polimerik Nano Anti-TNF- α	53
3.1.7. Polimerik Nano Anti-TNF- α ile Ticari TNF- α Etkileşimi.....	54
3.1.8. Polimerik Nano Anti-TNF- α ile Polimerik Nano TNF- α Karışımı.....	55
3.2. Karakterizasyon Çalışmaları.....	56
3.2.1. FTIR Analizi.....	56
3.2.2. Boyut Analizi.....	57
3.2.3. Reflektometrik İnterferans Spektrofotometresi ile Polimerik Nano Anti-TNF- α 'nin Etkinliğinin Analizi.....	57
3.3. Akış Sitometrisi Sonuçları.....	59
4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER	61
KAYNAKLAR.....	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Romatoid artrit hastalığından dolayı zarar görmüş diz eklemi.....	3
1.2. Romatoid artrit hastalığının evreleri.....	3
1.3. RA hastalığının oluşumu	5
1.4. TNF- α inhibitörleri.....	11
1.5. Trimerik yapıdaki TNF- α ve etanercepte bağlanmış TNF- α	12
1.6. Hyaluronik asitin yapısı.....	13
1.7. Mikroemülsiyon polimerizasyonu	18
1.8. Hücrelerde erken ve geç apoptoz.....	20
1.9. Akış sitometrisinde hücrelerin işaretlenmesi.....	21
1.10. FTIR Spektroskopisi.....	22
1.11. Reflaktometrik interferans spektroskopisi.....	23
1.12. Tipik bir kuantum noktasının yapısı.....	24
1.13. QD partiküllerin boyutlarına bağlı olarak yaydıkları farklı renkler.....	25
1.14. Uyarılmış enerji haline göre floresan emisyonu.....	27
1.15. Floresan dedektör şeması.....	27
1.16. Reaktif aminlere biyokonjugasyon.....	28
1.17. Reaktif kaboksilik asitlere biyokonjugasyon.....	29
1.18. Reaktif tiyollere biyokonjugasyon.....	29
1.19. Biyokonjugasyon yöntemiyle yeni grupların sentezi.....	30
1.20. EDC'nin molekül yapısı.....	31
1.21. EDC reaksiyonu.....	32
1.22. NHS ve SulfoNHS yapısı.....	33
1.23. Rutenyumun moleküler yapısı.....	35
1.24. Ru(bpy) ₃ ⁺² mekanizması.....	36
1.25. Biyolojik moleküllerin ECL ile işaretlenmesi için Ru Ru(bpy) ₃ ⁺² -NHS....	37
1.26. Teranostik kavramı.....	37
2.1. Azot ortamında fotosensitif mikroemülsiyon yöntemiyle polimerik nano TNF- α 'nın sentezi.....	40
2.2. CMD kaplı sensörlerin aktivasyon şeması.....	46

2.3. Aktive edilmiş sensörlere antikor bağlanma şeması.....	46
3.1. HA çözeltisi ile TNF- α konjugasyonunun floresan spektroskopik değerleri.....	50
3.2. HA çözeltisi/TNF- α konjugasyonu ile anti TNF- α /SPN konjugasyonunun etkileşimi.....	51
3.3. HA çözeltisi ile anti-TNF- α konjugasyonunun floresan spektroskopik değerleri.....	51
3.4. HA çözeltisi-anti TNF- α konjugasyonu ile QD-TNF- α konjugasyonunun etkileşimi.....	52
3.5. Polimerik nano TNF- α ve MTX konjuge edilmiş polimerik nano TNF- α 'nın floresan şiddet değerleri.....	53
3.6. Polimerik nano anti-TNF- α ve MTX konjuge edilmiş polimerik nano anti-TNF- α 'nın floresan şiddet değerleri.....	54
3.7. Polimerik nano anti-TNF- α ve ticari TNF- α 'nın etkileşimi.....	55
3.8. Polimerik nano anti-TNF- α ile polimerik nano TNF- α etkileşimi.....	55
3.9. a) SPN'lerin FT-IR spektrumu b) TMSPM ile modifiye edilmiş SPN'lerin FT-IR spektrumu.....	56
3.10. CMD kaplı sensörlerin aktivasyonuna ait sensogram.....	57
3.11. Aktive edilmiş sensör yüzeylerine 10 mgL ⁻¹ 'lik anti-TNF- α immobilizasyonuna ait sensogram.....	58
3.12. Antijen ile muamele sonucu bağlanma ve rejenerasyon.....	58
3.13. BIAffinity cihazı ile ticari TNF- α 'nın polimerik nano anti-TNF- α 'ya bağlanmasını gösteren sensogram.....	59
3.14. Kontrol hücresi ve polimerik nano TNF- α 'nın akış sitometri sonuçları.....	60

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1 : NHS, Sulfo-NHS ve EDC' nin Özellikleri.....	35
--	----

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

MTX	: Metotreksat
PI	: Propidium iyodür
PS	: Fosfotidil serin
RA	: Romatoid Artrit
TNF- α	: Tümör Nekroz Faktör Alfa

1. GİRİŞ

Romatoid artrit (RA) yani iltihaplı romatizma, dünyadaki en yaygın romatizmal hastalıktır. Dünya nüfusunun % 0,5-1'ini etkilemektedir ve hastalığın % 75'i kadınlarda görülmektedir [Scott and Kingsley 2006]. Romatoid artrit her yaşta insanda, hatta küçük çocuklarda dahi görülebilen, kronik, iltihaplı ve otoimmün bir hastalıktır. Bu hastalık ağırlıklı olarak eklemleri etkilemekte ve nadirde olsa göz gibi diğer organları da etkileyebilmektedir [Smolen ve Steiner 2003]. RA hastalığını tetikleyen en önemli molekül tümör nekroz faktör- α (TNF- α)'dır. İlaç tedavileri TNF- α 'nın bloke edilmesi doğrultusunda olsa da pahalı olmaları ve uzun süre kullanılmaları gerektiği için hastalığın tedavisine yönelik yeni biyoteknolojik ve moleküler yaklaşımlar üzerine çalışılmaktadır [Christopher 2005].

Biyoteknoloji ve nano yapıları platform teknolojisine dayanan sensör sistemleri günümüzde dünya çapında oldukça yoğun çalışılan ve ülkelerin biyoteknoloji standardını yükseltip, ülke ekonomisi için önemli ve öncelikli alanlarda yer alan konulardır. Bu doğrultuda, RA hastalığına yönelik biyoteknolojik çalışmalar da hız kazanmıştır.

Bu çalışmada, RA hastalık sürecinde önemli bir yeri olan TNF- α 'nın hem tayini hem de inhibisyonunu içeren yeni bir teranostik (terapi + diyagnostik) çalışma denenmiştir. Bu teranostik yaklaşımda, TNF- α 'nın bloke edilerek iltihaplı dokuya ulaşması engellenmeye çalışılmış ayrıca iltihaplı alandaki TNF- α reseptörlerinin sentezlenen antagonistlerle etkileşerek sinyal iletiminin bloke edilmesi hedeflenmiştir. TNF- α 'nın blokasyonu için anti-TNF- α antikorunu modifiye edilmiştir. Bu antikorun uzun ömürlü, ısı değişimi gibi ortam koşullarından etkilenmeyecek ve rejenere edilebilir özellikler kazanabilmesi için, polivinil alkol ile fotosensitif mikroemülsiyon polimerizasyon tekniği ile polimerizasyonu yapılmış ve böylece nano boyuttaki polimerik bir yapıda uzun süre muhafaza edilebilmesi, farklı ortam koşullarına yüksek dayanıklılık gösterebilmesi ve polimerik nano boyutundan dolayı TNF- α ile polivalan etkileşimler yapabilmesi sağlanmıştır.

Aynı zamanda polimerik nano anti-TNF- α 'ya süperparamanyetik demir nanopartikülleri konjuge edilmiş ve manyetik rezonans görüntülenme özelliği kazandırılarak, hastalık ilerlemeden TNF- α 'nın tayin edilebilmesi hedeflenmiştir. TNF- α 'nın iltihaplı dokularda TNF- α reseptörüne bağlanarak, iltihabı artırıcı sinyalleri iletmesini engellemek için yukarıda bahsedilen sentez yöntemiyle nano TNF- α sentezlenmiş ve TNF- α reseptörünü bloke etmesi amaçlanmıştır. Kanser hücrelerinde de TNF- α tetikleyici bir rol oynadığı için nano TNF- α 'nın etkinliği kanser hücrelerinde denenmiş ve hücrelerin apoptoza sürüklendiği gözlenmiştir. Bu sonuç doğrultusunda polimerik nano TNF- α 'nın TNF- α gibi işlev görerek kanser hücrelerindeki TNF- α reseptörlerine bağlanıp onları bloke ettiği ve sinyal iletimi gerçekleştirilemediği için kanser hücrelerini apoptoza süreklediği öngörülmüştür. Sentezlenen yapılara tedavi edici unsur olarak RA gibi otoimmün hastalıkların tedavisinde oldukça sık kullanılan metotreksat ilacı konjuge edilmiştir. Ayrıca sinovyal sıvı ve kıkırdağın temel ögesi olup hasarlı eklemi iyileştirebilen hyaluronik asit bu çalışmada modifiye edilerek TNF- α ve anti-TNF- α 'nın konjuge edileceği bir kalıp haline getirilmiş ve etkili bir teranostik molekül hazırlanmıştır. Son aşamada floresan spektrofotometresi, akış sitometrisi ve reflektometrik interferans spektroskopisi ile sentezlenen nano yapıların etkinliği belirlenmiştir.

1.1. Romatoid Artrit Hastalığı

1.1.1. Romatoid artrit hastalığının patogenezi

Romatoid artrit, bağışıklık sisteminin eklemlere saldırmasına yol açan kronik, inflamatuvar ve ağrılı bir otoimmün hastalıktır. Ağrı ve eklem aşınması sebebiyle önemli oranda hareket kaybına yol açabilir (Şekil 1.1). Hastalığın oluşumuna neyin sebep olduğu konusu halen kesin olarak çözülmüş değildir [Rindfleisch ve Muller 2005]. Eklem tutulumu, şekil bozukluğu yaparak zaman içinde önemli sakatlıklara yol açabilmektedir. Vücuttaki diğer organları da etkileyebilmesi nedeni ile bu hastalığı saf bir eklem rahatsızlığı olarak görmek doğru değildir. Klinik seyri, hastadan hastaya büyük değişiklikler gösterir. Bazı

hastalarda az sayıda, hafif seyirli ve kısa süreli eklem tutulmaları görülürken, bir grup hastada ise, tedavi ne kadar yoğun olursa olsun, kısa sürede sakatlıklar ve önemli organ hasarları gelişebilmektedir (Şekil 1.2). En çok 35 – 60 yaşlarında başlamakta ve kadınlarda erkeklere oranla iki - üç kat daha fazla görülmektedir [Rindfleisch ve Muller 2005].



Şekil 1.1. Romatoid artrit hastalığından dolayı zarar görmüş diz eklemi

Romatoid Artrit Hastalığının Evreleri



Erken Evre

Orta Evre

İleri Evre

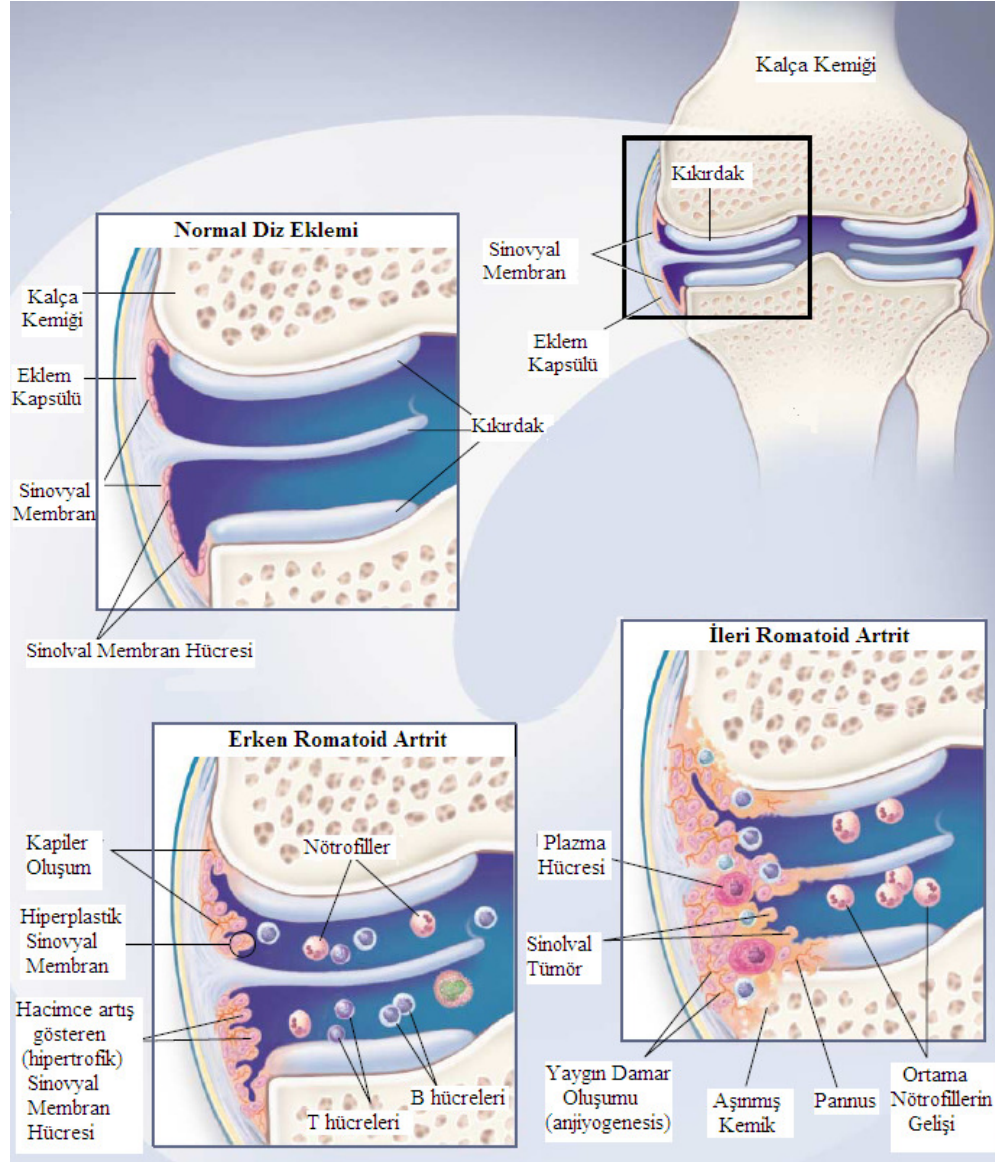
Şekil 1.2. Romatoid artrit hastalığının evreleri

Hastalığın sebebi henüz tam olarak açıklanamamıştır. Genetik faktörlerle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Romatoid artritli bir kişinin birinci derece akrabaları arasında hastalığın bulunma sıklığı %10 kadardır. Tek yumurta ikizleri arasında hastalığın birlikte görülme sıklığı %30, çift yumurta ikizlerinde ise %5 oranındadır. Kromozom 6p21 üzerindeki insan lökosit antijeni, HLA DR4,

romatoid artrit yatkınlık yaratan genlerin başında gelmektedir [Dinant ve Dijkmans 1999]. Bu gen, romatoid faktörü (romatoid artritli hastaların %85'inde IgG'nin Fc parçasına karşı oluşmuş otoantikor) pozitif olan hastalarda % 60-70 oranında bulunurken, normal toplumda da yaklaşık %25 oranında bulunabilmektedir. Romatoid artrit ile ilişkili bulunan alellerin hepsinin yapısında, benzer amino asit dizilimi gösteren bir bölge olduğu görülmüştür. Ortak epitop olarak adlandırılan bu bölgenin romatoid artrit hastalığına genetik yatkınlık yarattığı düşünülmektedir. Romatoid artriti başlatan çevresel faktörler arasında üzerinde en çok durulanlar enfeksiyonlar olmuştur. Birçok bakterinin romatoid artrit patogeneğinde yeri olabileceği ileri sürülmüşse de hiçbiri yeterli kabul görmemiştir. Rubella, parvovirus gibi çeşitli virüslerin akut poliartrit yaptıkları bilinmekle birlikte bu ajanların romatoid artrit gibi kronik bir poliartrit yaptıklarına ilişkin veri yoktur. Viral ajanlar arasında son zamanlarda en güncel olanları retrovirüsler ve epstein barr virüsüdür [Costenbader ve Karlson 2006].

Hastalığın başlangıç sürecinde immün (bağışıklık) sistemine ait hücrelerin aktif hale gelerek, bir oto immünite sürecinin başlaması ile bu hücrelerin kendi vücutlarına karşı savunmaya geçmeleriyle hastalık ilerlemektedir [Tracey ve ark. 2008]. Bu süreç sitokinlerin (hücrelerin birbirleriyle iletişimini sağlayan proteinler) ve diğer inflamasyon araçlarının tetiklenmesi ile birkaç adımda gerçekleşmektedir. Sitokinler yıkıcı etkilerini, bağışıklık sistemi hücreleri ile bağ dokusu hücrelerini teşvik ederek, vücudun kendine ait dokuları ile karşı karşıya gelmelerini sağlayarak ortaya çıkartırlar. Romatoid artrit hastalığının oluşumunda en çok yer alan sitokin tümör nekroz faktör- α (TNF- α) olarak kabul edilmektedir [Maini ve ark. 1995]. T hücrelerinin koordine ettiği inflamatuvar olayda, TNF- α 'nın romatizmalı ekleme gelmesiyle fibroblastların çoğalması ve akyuvarların bölgeye göçü hızlanır (=iltihabın oluşması). Bu durum ise ilave sitokinlerin ve metabolik ürünlerin oluşumunu stimüle eder. Sitokinlerin etkisi ile sinovyalden yumru şeklinde bir doku oluşur. Pannus denilen bu doku belli bir süre sonra kıkırdak, kemik, tutucu aparatlar ile söz konusu ekleme ait diğer yapıları bozmaktadır. İnflamatuvar reaksiyon oluşuktan sonra, sinovyum kalınlaşır, kıkırdak ve altta yatan kemik parçalanmaya başlar (Şekil 1.3). Bu yıkıcı iltihap

sürecinin sorumlusu olarak TNF- α görülmektedir [Scott ve Kingsley 2006]. Romatoid artrit modern farmakolojik tedavileri bu mediyatörleri hedef alır.



Şekil 1.3. RA hastalığının oluşumu [Choy ve Panayi 2001 modifiye edilmiş]

1.1.2. Tümör nekroz faktör alfa (TNF- α)

Tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), doğal ve kazanılmış bağışıklık, hücre regülasyonu ve farklılaşma süreçlerinde önemli rollere sahip, kanserli hücrelerin

yıkımını sağlayan polipeptid yapıda bir sitokindir. Pek çok sistemde fonksiyonu olan ondokuz üyesi vardır ve TNF- α bu ailenin tanımlanan ilk üyelerindendir [Jones ve Stuart 1989]. TNF- α 233 aminoasit ve 26 kDA ağırlığında proproteinden sentezlenir. Proprotein spesifik metalloproteaz (TNF-alfa dönüştürücü enzim-TACE) tarafından 17 kDA, 157 aminoasitten oluşan monomerik formuna bölünür. TNF- α etkisini membran bağımlı TNF- α reseptörlerine [(TNFRI, p55) ve TNFRII (p75)] bağlanarak gösterir. Ayrıca çözülebilir yapıda da TNF- α reseptörü olduğu için serbest haldeki TNF- α 'nın bu reseptöre bağlanması da söz konusudur [Kassiotis ve Kollias 2001].

RA hastalığında TNF- α öncelikli olarak, iltihap sürecinden sorumlu olan anahtar bir sitokindir. İltihabın devamını sağlar, başka sitokinlerin uyarılmasını teşvik eder ve böylece ilave savunma hücrelerini de harekete geçirir. TNF- α sağlıklı eklem kıkırdağı ile romatizmaya bağlı olarak değişime uğramış dokuların sınırında özellikle yüksek miktarda bulunmaktadır [Maini ve ark. 1995].

TNF- α iltihaplı hastalıkla ilişkili birçok biyolojik fonksiyonu olan bir sitokindir. RA ile ilişkili birkaç iltihap mediyatörü üretilmesine rağmen deneysel veriler, TNF- α 'nın sitokin düzeninde baskın bir pozisyona sahip olduğunu ve bu yüzden RA hastalığında immunterapi başlangıcında TNF- α 'ya yönelik tedavilerin uygulanması gerektiğini göstermektedir [Elliott ve ark. 1995; Andreakos 2002].

TNF- α 'nın kanserle olan ilişkisi incelendiğinde ise; iyi yönde mi yoksa kötü yönde mi etki ettiği henüz kesinlik kazanamamıştır. Yakın geçmişte kanserin tetiklenmesi konusunda TNF- α 'nın rolü; TNF- α 'nın pro-kanserojen etkiye sahip olduğu şeklinde belirtilmiştir. Bir fare derisi deneyinde TNF- α 'nın karsinogeneze sebep olduğu bulunmuştur. Ayrıca bir sıçan modelinde TNF- α 'nın metastazı ve tümör anjiyogenesisini (damarlanma) teşvik ettiği görülmüştür. Anti-TNF- α 'ya yönelik tedaviler ile kanser hastalarında bu sitokinin bloke edilmesi beklenmektedir [Waterston ve Bower 2004].

1.1.3. RA hastalığında TNF- α 'ya yönelik çalışmalar

RA hastalarına uygulanan ilaç tedavisinde ilaçların çoğundan sağlanan fayda kalıcı değildir ve hali hazırdaki ilaç tedavileri, göze çarpan yıkıcı hastalık

sürecini durdurmadan bulguları kontrol eder bu sebepten dolayı sınırlı değerde kullanılmaktadır. RA hastalığının başlaması ve gelişimi sürecinin anlaşılmasına yönelik yapılan çalışmalarda moleküler teknolojilerin kullanılması, hastalığın direkt tedavisi yolunda yeni yolların açılmasına olanak sağlamıştır. Hastalığın tayini, durdurulması ve iyileştirilmesine yönelik yeni stratejilerin geliştirilmesi doğrultusunda yapılan çalışmalarla spesifik moleküler biyolojik müdahalelerin gelişmesi hız kazanmıştır [Elliott ve Maini 1994]. Bu konu ile ilgili çalışan birçok araştırmacının RA'in patogenezi anlamaya ve yeni bir tedavi edici hedef bulmaya yönelik yaklaşımları, sitokinlerin aktivitesinin in vitro ortamda mononükleer sinovyal hücre kültüründe antikorlarla bloklanmasına yöneliktir. Bu araştırmalarda TNF- α 'nın, anti-TNF- α antikorları ile nötralizasyonunun RA oluşumundan sorumlu diğer pro-inflamatuar sitokinlerin üretimini inhibe ettiği öne sürülmüştür. Maini ve ark. (1995), 20 hasta üzerinde kimerik (insan/fare) anti-TNF- α antikoru ile yapmış oldukları tedavi etmeye yönelik çalışmada, bütün hastaların yüksek oranlarda iyileşme gösterdiklerini ispatlamışlardır. Yapmış oldukları çalışmaların verileri TNF- α 'nın RA hastalığının oluşumunda etkin olduğu önerilerini desteklemiştir. Böylece TNF- α yeni tedavilerin hedeflenmesinde anahtar rol oynamıştır [Maini ve ark. 1995].

Dinant ve Dijkmans (1999), RA hastalığı için yeni terapötik hedef geliştirmek üzere yoğun çalışmalarda bulunmuşlar, RA hastalığına neden olduğu bilinen TNF- α ve diğer tüm sitokinlere yönelik hastalar üzerinde deneyler yapmışlardır. TNF- α 'ya yönelik yaptıkları çalışmada 73 hastaya 1 yıl boyunca 1-10 mg/kg oranında kimerik anti-TNF- α antikor tedavisi uygulamışlar ve hastalarda klinik düzelmeler gözlemlemişlerdir. Ayrıca kimerik anti-TNF- α antikoru ile yaptıkları tedaviden önce ve sonra birkaç hastanın dizinden sinovyal biyopsi yapmışlar ve biyopsi sonuçları da iltihaplı hücrelerde azalma olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu araştırmacılar anti-TNF- α antikoru dışında diğer bir TNF- α inhibitörü olan çözülebilir TNF- α reseptörü (TNFR:Fc) ile de çalışmalar yürütmüşlerdir. RA hastalığı ileri düzeyde olan hastalara belirlenen dozlar haftada iki kere deri altından üç ay boyunca verilmiş. Sonuçta TNFR:Fc ile yapılan tedavi, hastalığın aktivitesinde dozla ilişkili olarak kayda değer bir iyileşme göstermiştir [Dinant ve Dijkmans 1999].

Carteron (2000), RA hastalığına sitokinlerin etkisi üzerine yapmış olduğu 'review' çalışmada, çözülebilir TNF- α reseptörünün (etanercept) US Food and Drug Administration (FDA) tarafından ilk onaylanan biyolojik ajan olduğunu ve deri altından etanercept uygulanan hastalarda, hastalık aktivitesine yönelik tüm ölçümlerde büyük oranda iyileşme olduğunu ve hastaların hayat kalitelerinin tedavi ile arttığını göstermiştir. Ayrıca anti-TNF- α ile yapılan çalışmalara da dikkat çekerek, biyolojik ajanların güvenli, uyumlu profillerinden dolayı onların RA'nın erken tedavisinde kullanılabileceklerini belirtmiştir [Carteron 2000].

Barrera ve ark. (2003), sinovitin (sinovyal membran iltihabı) hastalar üzerinde görüntülenmesi için yaptıkları deneyde, radyoaktif olarak işaretlenmiş anti-TNF- α monoklonal antikoru (anti-TNF mAb) kullanmışlar ve 10 RA hastasına, 100 μ g 99m Tc insan anti-TNF mAb uygulanmışlardır. İki hafta sonunda radyoaktif işaretli anti-TNF- α antikorun TNF- α 'ya olan spesifitesinin ve değişen inflamasyona göre antikor duyarlılığının değerlendirilmesi için prosedürü tekrarlamışlardır. Sonuçta radyoaktif işaretli insan anti-TNF- α antikorunun RA hastalarının sinovitinin görülmesine olanak verdiği, bu ajanın katılması ile TNF- α hedeflenmesi (tayini) yapılabildiği ve yüksek oranda inflamasyonu tahmin ettiğini göstermişlerdir [Barrera ve ark. 2003].

1.1.4. RA hastalığının tedavisi

RA hastalarında, hastalığın sebep olacağı zararları engellemek veya geciktirmek için uygun tedavinin vakit geçirilmeden başlaması önemlidir. Tedavi boyutunu belirleyen ise hastalığın hangi süreçlerde olduğunun belirlenmesidir. Teşhisin konulmasında hastalığın geçmişi ile el ve ayakların röntgen filmleri belirleyici olmakla birlikte laboratuvar çalışmaları ile TNF- α 'nın sorunlu bölgedeki lokalizasyonu hastalık süreci için geçerli fikirler vermektedir. RA hastalarında tedavi, temel ilaçlar denilen, hastalık modifiye edici anti-romatik ilaçlar (disease-modifying antirheumatic drugs [DMARD]) ve anti-inflamatuvar ajanlar ile analjezikler ile yapılmaktadır. DMARD'ların hastalığın semptomlarını uzun vadede azaltıcı veya yok edici ve hastalığın gelişimini yavaşlatıcı veya

sonlandırıcı etkilere sahip oldukları bilinmektedir [Ramdomized 1999]. Bu anti-inflamatuvarlar için söylenemez.

DMARD'lar kendi içlerinde zenobiyotik ajanlar ve biyolojik ajanlar olarak ayrılabilir. Zenobiyotik ajanlar, biyolojik ajanların tersine, vücutta doğal olarak bulunmayan temel ilaçlar olarak adlandırılan DMARD'lardır. Bu ilaçlar hastalığın seyrini olumlu yönde etkileyebilirler ancak belirli bir sürede etkilerini gösterebilirler ve yan etkileri bulunmaktadır. Zenobiyotik ajanlar arasında yüksek etkisi ve kabul edilebilir yan etkileriyle "metotreksat" özel bir yer almaktadır. Metotreksat, esasen daha yüksek dozlarda kanser tedavisinde kullanılmaktadır [Josef ve Steiner 2003].

Romatoid artrit oluşumu ile ilgili yeni bulgular tıp dünyasına tamamen yeni yollar açmıştır. Hastalık modifiye edici anti-romatik ilaçlar olarak biyolojik ajanların kullanılması, hastalığa sebep olan sitokinlerin nötralizasyonunun hedeflenmesi, RA tedavisi için yüksek verimli yeni ilaçların geliştirilmesine yeni bir yön vermiştir [Christopher 2005]. RA hastalığında proinflamatuvar işlev gören TNF- α 'ya yönelik iki tane anti-TNF- α antikoru ve bir tane de çözülebilir TNF- α reseptörü olmak üzere onaylı olarak üç tane biyolojik ajan kullanılmaktadır. Anti-TNF- α antikorundan birisi Adalimumab (Humira), tamamen insan monoklonal antikoru diğeri ise İnflksimab (Remicade) kimerik bir monoklonal antikordur. Çözünmüş TNF- α reseptörü ise Etanercept (Enbrel) dir. Bu biyolojik ajanların fiyatları çok yüksek olduğu için çok yüksek maliyetlerde tedaviler yapılabilmektedir [Scott ve Kingsley 2006].

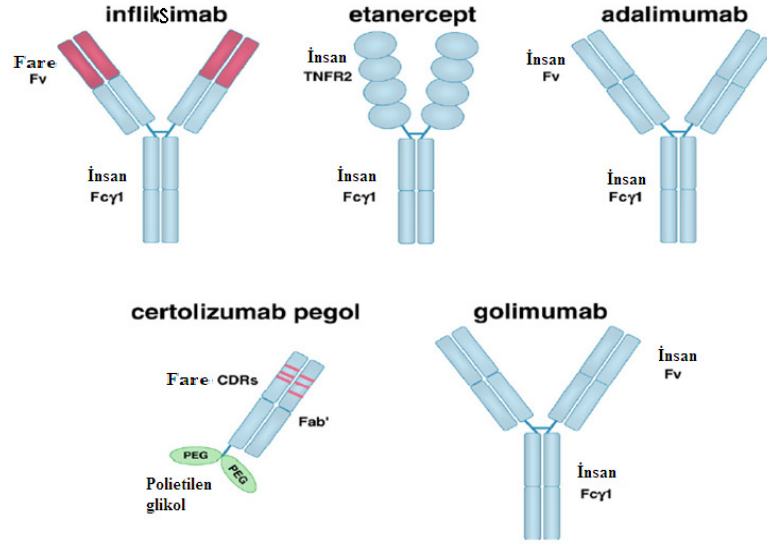
TNF- α gibi sitokinlerin bloke edilmesini hedef alan biyolojik tedavilerin geliştirilmesi ilaç sektöründe son 20 yılın en önemli gelişmelerindendir [Christopher 2005]. Bu sebeple TNF- α 'nın tayininin yapılabilmesi etken olduğu hastalıklar için ilaç geliştirilmesi konusunda atılması gereken en önemli adımdan biridir.

Anti-inflamatuvar ajanlar ile analjezikler, eklem ağrısı ve sabah tutukluğunun giderilmesinde oldukça etkili olmalarına rağmen etkileri sadece alındıkları süre ile kısıtlıdır ve sedimentasyon gibi akut faz yanıtlarını baskılamazlar. Ayrıca hastalığın ilerlemesini ve eklem hasarının gelişmesini engelleyememektedirler. Etki bakımından aralarında büyük bir fark olmayan bu

ilaçların seçiminde yarılanma süreleri, en başta gastrointestinal sisteme ait olan yan etkiler, hasta uyumu ve fiyat rol oynamaktadır [Hamuryudan 2003].

1.1.5. TNF- α inhibitörleri

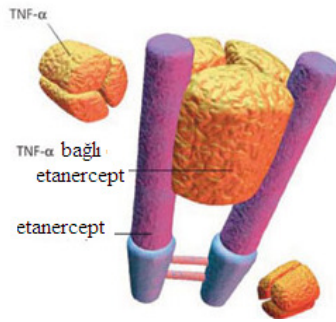
TNF- α , RA ve diğer birçok iltihablı hastalığın patogenezinde önemli rol oynayan proinflamatuvar bir sitokindir. Son yıllarda TNF- α 'nın biyolojik aktivitelerini antagonize eden anti-TNF- α ilaçları, romatizmal hastalıkların tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır [Feldmann ve Maini 2001]. Bu amaçla dünyada ve ülkemizde kullanıma girmiş 3 adet anti-TNF- α ilacı bulunmaktadır. Bunlardan etanersept (enbrel) dimerik TNF- α reseptörü, infliksimab (remicade) %75 insan %25 sıçan antikorlarından oluşmuş kimerik bir antikor ve adalimumab (humira) ise %100 insan monoklonal antikorudur. Bu üç anti-TNF- α ilacı, genel anlamda antiinflamatuvar etkilerini TNF- α 'yı antagonize ederek göstermelerine karşın, kimyasal yapıları ve fizyolojik özelliklerine bağlı olarak immün sistem ve iltihap üzerinde farklı etkileri de vardır. Bu farklı etkinlik bu ilaçların hem klinik endikasyonlarını hem de yan etki profillerini belirlemektedir. Diğer tüm ilaçlarda olduğu gibi bu ajanlarda da etkinliğin yanı sıra yan etkiler de önemli bir konudur. Bunların dışında iki tane TNF- α antagonisti daha vardır: certolizumab ve golimumab (Şekil 1.4). Bunlar klinikte geliştirilmiştir. TNF- α inhibitörleri, dozaj başına binlerce dolara mal olabilmektedir [Tracey ve ark. 2008; Wong ve ark. 2008].



Şekil 1.4. TNF- α inhibitörleri [Tracey ve ark. 2008 modifiye edilmiştir]

Hem çözülebilir hem de membrana bağlı TNF- α 'ları bağlamaları ve böylece onların fonksiyonlarını bloke etmelerine karşın anti-TNF- α antikorları ile çözülebilir TNF- α reseptörlerinin arasındaki farklara; anti-TNF- α monoklonal antikorların sadece TNF- α 'yı bağladığı için TNF- α ve ona bağlı sitokinlerin aktivitelerini baskılaması, çözülebilir reseptörlerin ise TNF- α 'nın yanı sıra makrofajlar ve T hücrelerinden salgılanan lenfotoksin- α (LT- α) veya eski adıyla TNF- β 'yı da bağlaması örnek olarak verilebilir. LT- α 'nın majör rol oynadığı bilinen juvenil idiyopatik artrit (JİA) tedavisinde etanerseptin etkili olmasında bu özellik önemlidir. Diğer bir fark, anti-TNF- α monoklonal antikorlar TNF- α 'nın hem TNFR1 (55 kDa; p55) hem de TNFR2 (75 kDa; p75) reseptörüne bağlanmasını önleyerek her iki reseptöründe fonksiyonunu bloke etmektedir. Çözünabilir reseptörler ise sadece bir reseptörün özelliklerine sahip olacak şekilde üretilmektedir [Wong ve ark. 2008]. Diğer önemli bir unsurda, bu ilaçların membrana bağlı TNF- α 'lara bağlanmada ve buna bağlı gelişen reaksiyonlarda farklılıkların olmasıdır. Hücre dışı mesafede olan bir TNF- α 'nın çözülebilir reseptör veya monoklonal antikorlar ile bağlanması için affinitenin, IgG tipinin, çözülebilir reseptörlerin p75 veya p55 olmasının önemi yoktur. Membrana bağlı TNF- α ile bağlanma ise farklıdır. Membrana bağlı TNF- α tam olarak aktif formda bir sitokindir. Prokürsör TNF- α , metalloproteaz TACE tarafından parçalanır ve

TNF- α olarak ortama salınır. TACE makrofaj ve dentritik hücrelerde eksprese olan bir enzimdir ve çok çeşitli mekanizmalarla aktive olmaktadır. T lenfositlerinde ise TACE aktivasyonu etkin değildir. Bu nedenle T hücrelerinde sentez edilen TNF- α 'lar membrana bağlı olarak kalır. Makrofajlarda sentez edilenler ise TACE ile parçalanarak ortama salınırlar [Dinarello 2005; Choy ve ark. 2001]. TNF- α 'nın aktif hale gelmesi için trimerik yapı oluşturmaya gerekir (Şekil 1.5). Yapılan çalışmalarda, membran TNF- α 'larında trimerik yapı oluşturduğu ve bu nedenle membrana bağlı TNF- α 'larda aktif formda oldukları gösterilmiştir. Membran TNF- α hücre-hücre iletişimde önemlidir. Sitokinlere bağlı otoimmün ve iltihaplı hastalıkların patogeneğinde hücre dışı boşlukta yer alan çözülebilir sitokinden daha çok hücre-hücre arası iletişim ile aktivasyona sebep olan membran sitokinlerinin daha önemli olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle bir hastalığın anti-TNF- α ilaçlar ile etkin tedavisi için membran TNF- α aktivitesinde baskılanması gereklidir. Serbest haldeki ve membrana bağlı TNF- α 'ların TNFR2 reseptörüne ve dimerik yapıdaki çözülebilir TNF- α reseptörü etanerseptte bağlanması hızlı ve geri dönüşümlüdür. Monoklonal antikor olan infliksimab ise membran TNF- α 'ları ile daha stabil bir kompleks oluşturmaktadır. Ayrıca daha yüksek avidite ile daha çok sayıda infliksimab molekülü membran TNF- α 'larını bağlamaktadır. Bu nedenle membran TNF- α 'larının etanersept ile bağlanması infliksimabe göre daha düşük affiniteli, geri dönüşümlü ve buna bağlı olarak biyolojik aktivite inhibisyonu daha azdır [Scallon 2002]. Yapılan in vitro çalışmalarda membran TNF- α eksprese eden hücreler infliksimab ile bağlanması sonucu komplemana bağlı hücre lizisi veya antikora bağlı sitotoksiste ile ölüme gittikleri gösterilmiştir [Reimold 2003; Scallon 1995].

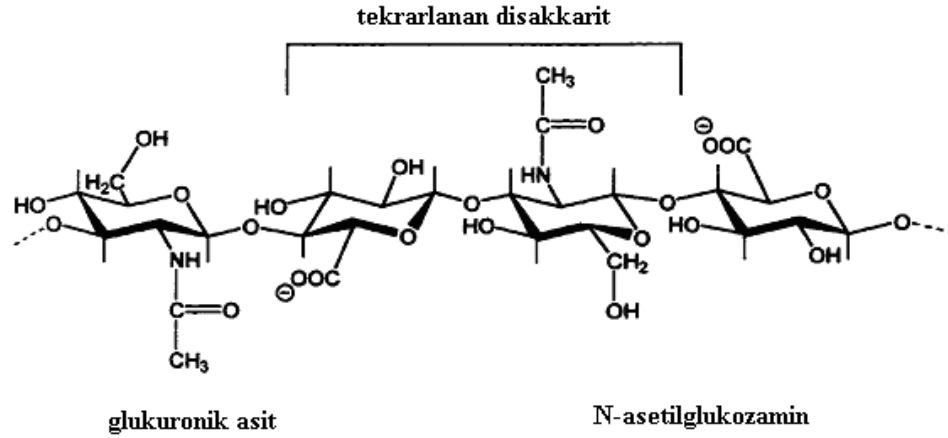


Şekil 1.5. Trimerik yapıdaki TNF- α ve etanercepte bağlanmış TNF- α

Anti-TNF- α ilaçların olasılıkla etki mekanizmalarındaki farklılıklar nedeniyle romatizmal hastalıklar üzerine farklı etkinlikleri vardır. Ülkemizde bu ilaçlardan infliksimab RA, AS, psöriatik artrit (PsA) ve CH, etanersept RA, AS, psöriazis, PsA, juvenil kronik artrit ve adalimumab ise sadece RA için ruhsatlanmış durumdadır.

1.2. Hyaluronik Asitin RA Hastalığı İle İlişkisi

Hyaluronik asit (HA) sinovyal sıvının ve kıkırdağın en önemli bileşenidir. Yapısı 1934 yılında Karl Meyer tarafından tanımlanmıştır. HA yüksek moleküler ağırlığa sahip asidik, negatif yüklü ve lineer bir mukopolisakkarittir. N-asetil-D-glukozamin ve D-glukoronik asitten oluşmuş ve β -1,4 ve β -1,3 glikosit bağları ile bir araya gelmiştir (Şekil 1.6) [Meyer ve Palmer 1934].



Şekil 1.6. Hyaluronik asit'in yapısı

HA 25,000 disakkaritin tekrarından oluşmuş bir biyopolimerdir. HA biyopolimeri in vivo ortamda 5,000 ila 20×10^6 Da büyüklüğünde, insan sinovyal sıvısında ise ortalama 3-4 milyon Da büyüklüğündedir [Saari ve ark. 1993]. Hyaluronik asit, dokuların hidrasyonu ve nemlenmesinde, dokulardan madde geçişinde, hücrelerin hareketinde ve farklılaşmasında önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle ortopedi, romatoloji, dermatoloji ve kozmetolojide kullanılmaktadır.

Hyaluronik asitin yara iyileşmesinde de olumlu etkilerinin olduğu bilinmektedir. HA kırıkdağın beslenmesinde pek çok rol oynar. Bağ dokunun bir bileşeni olarak, vücut boyunca geniş ölçüde dağılıp proteoglikan kompleksleri oluşturur ve bir matris malzemesi olarak hücre tutunmasında rol oynamaktadır. Kırıkdağ hücreleri gibi hücreler için HA'nın su tutma kapasitesi bu hücrelerde besinin sağlanması ve atıkların hücrelerden uzaklaştırılması gibi önemli biyolojik fonksiyonların gerçekleşmesine yardımcı olur. Aynı zamanda subkutan dokuların büyümesi, gelişmesi ve tamirinde rol oynayan önemli bir bileşiktir [Luo ve ark. 2005].

HA sinovyal sıvının viskoelastik özelliklerinden sorumludur ve iltihaplı eklemlerde sağlıklı eklemlere oranla daha düşük konsantrasyonlarda bulunur. RA hastalarının sinovyal sıvılarında da HA moleküler ağırlığı normal sinovyal sıvıdaki oranına göre daha düşüktür [Chou ve ark. 2008]. Pek çok klinik çalışma HA'nın RA içeren eklem enjeksiyonunun iltihabı azalttığını göstermiştir [Kobayashi ve ark. 2004; Moreland 2003]. HA'nın bahsedilen özelliklerinden dolayı bu çalışmada, HA modifiye edilerek biyoyumlu polimerik yapıda HA tabanlı kargolar sentezlenmiştir. Polimerik yapıdaki nano TNF- α ve anti-TNF- α HA tabanlı kargolara konjuge edilerek RA hastalarının çok fonksiyonelli tanı ve tedavisi amaçlanmıştır.

Hyaluronik asit reseptörlerinden biri CD44'dür [Shigemori ve ark. 2002]. CD44 tümör yayılımı ve metastazında önemli olan bir adezyon molekülüdür. CD44, hücre-hücre ve hücre-matriks ilişkisini sağlayan bir transmembran glikoproteinidir. Ekstrasellüler matrikste bulunur ve hyaluronik asit ile iletişime geçerek adezyon özelliklerini yerine getirir [Naor ve Nedvetzki 2003]. CD44'ün HA ile uyarılması sinyalleri hücre içine iletir. Bu da T hücrelerinin aktivasyonunu ve sitokinlerin monositlerden salınımını tetikler. RA hastalarının sinovyal sıvılarındaki lenfositlerden CD44 ekspresyonu belirgin şekilde artar. CD44 iltihabın şiddetine oranla iltihaplı alanda çok fazla eksprese olur. HA'nın CD44 ile etkileşerek RA hastalarında iltihabı artırıcı özellik göstermesini, sentezlenen HA kargo molekülü ile engellemek amaçlanmıştır.

HA'nın yapısı doku mühendisliğinde ve ilaç taşıma sistemlerinde kullanılmak üzere yeni, biyoyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerin üretilmesine olanak sağlamaktadır.

1.3. Mikroemülsiyon Polimerizasyon Tekniği

Mikroemülsiyon polimerizasyonu sıvı ve organik faz arasında monomerlerin, serbest radikallerin ve zincir transfer ajanları, ko-yüzey aktif ajanlar ve inhibitörler gibi diğer türlerin yer değiştirdiği kompleks heterojen bir prostedir. Süspansiyon ya da emülsiyona göre çok daha karmaşık bir sistemdir. Polimerizasyon hızını monomerlerin fazlar, parçacık çekirdeklenmesi, radikallerin adsorpsiyonu ve desorpsiyonu arasındaki dağılımını kontrol eder. Parçacık kararlılığı yüzey aktif ajanların miktarından, cinsinden ve dispersiyon ortamının pH'sından etkilenmektedir. Mikroemülsiyon polimerizasyon kinetiği ile emülsiyon polimerizasyon kinetiği arasında birçok ortak nokta vardır. En karakteristik özellik radikallerin partiküllerin içine girip diğerlerinde ayrı bölmelere ilerlemesidir böylece büyük ölçüde sonlanmanın baskılanması ve sonuç olarak polimerizasyonun yüksek hıza ulaşması sağlanır.

Mikroemülsiyon polimerizasyonu, bir radikal polimerizasyonun tipidir. Bir emülsiyon içeren su, monomer ve yüzey aktif madde ile polimerizasyon gerçekleşir. Monomer faz dağıtma fazı içinde emüsyon halinde dağılmıştır. Süspansiyon polimerizasyonundan farklı olarak burada başlatıcı dağıtma fazında çözünmüştür. Çeşitli emülsiyon yapıcı maddeler kullanılarak monomer fazı dağıtma fazı içinde emülsiyon halde stabil olarak tutulur. Suda çözünebilen polimerler örneğin polivinil alkol emülsifiye edici/stabilize edici ajan olarak kullanılmaktadır. Mikroemülsiyon polimerizasyonunun avantajları şu şekilde sıralanabilir;

- Yüksek moleküler ağırlıktaki polimerler hızlı polimerizasyon yapabilmektedir, yığın ve çözeltili serbest radikal polimerizasyonlarına karşın, moleküler ağırlık ve polimerizasyon hızı arasında bir denge vardır.
 - Sürekli su fazı mükemmel bir ısı iletkenidir ve sistemden ısının uzaklaşmasına olanak sağlar.
 - Polimer molekülleri, partiküllerin içinde bulunduğundan dolayı, viskozite moleküler ağırlığa bağlı kalmadan suyun viskozitesine yakın kalır.
 - Son ürün işlenmesine ve değiştirilmesine gerek kalmadan kullanılabilir.
- Mikroemülsiyon polimerizasyonunun dezavantajları ise şu şekilde sıralanabilir;

- Yüzey aktif maddeler ve diğer polimerizasyon adjuvantları polimerde kalır ya da uzaklaştırılmaları zordur.
- Kuru (izole edilmiş) polimer için suyun uzaklaştırılması enerji gerektiren bir işlemdir [O'dian, 1970].

Mikroemülsiyon polimerizasyonunun mekanizması şu basamaklarla özetlenebilir:

Monomer, su içinde büyük damlacıklar halinde olacak şekilde yüzey aktif madde ve suyun olduğu solüsyonda dispers olur –emülsiyonlaşır-. Fazla yüzey aktif madde ya da yüzey aktif madde olmayan emülsiyon/stabilize ediciler suyun içinde misel oluştururlar. Az miktarda monomer suyun içinden misellerin içine doğru difüze olur. Suda çözünebilen başlatıcı sulu faza ilave edilir. Misellerin toplam yüzey alanı suyun içindeki monomerlerin alanlarına göre çok daha fazladır bu nedenle başlatıcı suyun içindeki monomerlere değil de misellere müdahale ederek polimerizasyonu başlatır. Misellerin içindeki monomerler hızlı bir şekilde polimerize olur ve zincir sonlanmasına gelinir. Bu noktada monomerlerle şişmiş misel polimer partikülü haline gelir. Ortamdaki diğer monomerler polimerleşen partiküle difüze olur, daha fazla başlatıcı da son olarak reaksiyona girer. Sonuçta serbest haldeki tüm monomerler polimerik partiküle yerleşir ve serbest halde monomer kalmaz. Ürüne ve monomere bağlı olarak, ek monomer ve başlatıcı ortama yavaşça ilave edilebilir. Final ürün su içinde dispers olmuş polimerik partiküllerdir. Aynı zamanda final ürüne polimerik kolloid, polimer lateksi denebilir.

Mikroemülsiyon Polimerizasyonunun Malzemeleri (Şekil 1.7):

Monomerler :

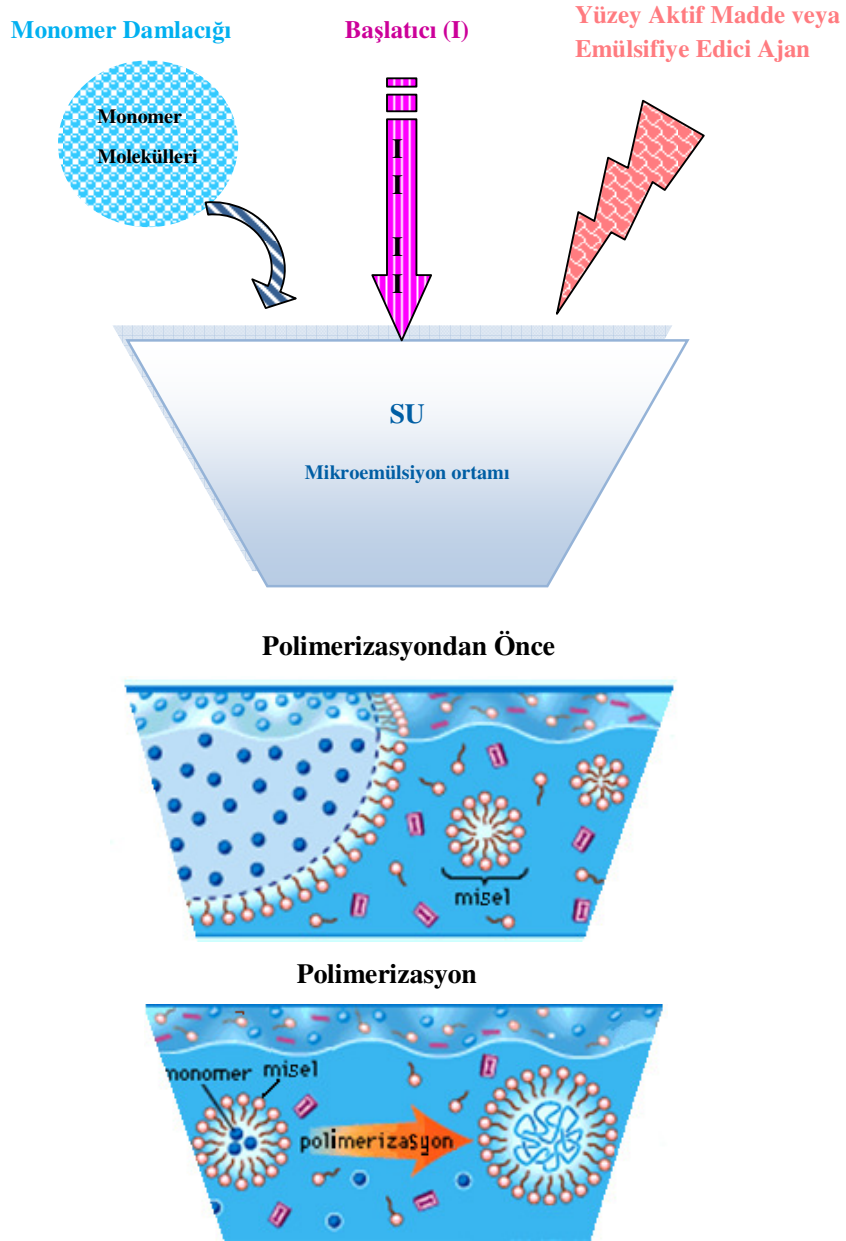
Tipik monomerler, radikal polimerizasyonunda da kullanılırlar, tepki koşullarında sıvı veya gazdır ve suda az çözülebilirler. Katı monomerlerin suda dispersiyonu daha zordur. Eğer monomer çözünürlüğü çok fazla ise, partikül oluşumu gerçekleşmeyebilir ve reaksiyon kinetiği azalır. Etilen ve diğer olefinler çok yüksek basınçta polimerize olurlar (800 bardan daha fazla). Antikorlar gibi biyolojik moleküller de monomer olarak uygun çözücüde çözündürülerek ya da dispers edilerek kullanılabilirler.

Komonomerler:

Özellikle vinil asetat kopolimerizasyonunda etilen ve diğler olefinler yardımcı komonomer olarak kullanılmaktadırlar. Akrilik asit ve diğler iyonize olabilen monomelerin az bir miktarı dispersiyona koloidal stabilite kazandırmak için bazen kullanılmaktadır. Kopolimerizasyon kinetiğı monomerin suda çözünlüğünden oldukça etkilenmektedir.

Başlatıcı:

Hem termal hem de redoks üretimde serbest radikaller başlatıcı olarak kullanılmaktadır. Genellikle persülfat tuzları başlatıcı mod olarak kullanılır. Persülfat iyonu 50 °C üstünde kolayca sülfat radikal iyonlarına ayrılır böylece başlatma işlemi için ısı kaynağı sağlanmış olur.



Şekil 1.7. Mikroemülsiyon Polimerizasyonu

Yüzey Aktif Maddeler:

Mikroemülsiyon polimerizasyon prosesinde doğru yüzey aktif maddenin seçilmesi oldukça önemlidir. Yüzey aktif madde hızlı polimerizasyon oranına olanak sağlamalıdır. En az düzeyde pıhtı oluşturmalıdır. Anyonik, katyonik ve iyonik olmayan yüzey aktif maddeler kullanılabilir. Anyonik ve iyonik olmayan

yüzey aktif maddelerinin karışımı gibi karışım halindeki yüzey aktif maddeler de tercih edilmektedir. Katyonik ve anyonik karışımlar ise çözülmeyen tuz şeklindedir ve kullanışlı değildirler. Genellikle kullanılan yüzey aktif maddelere yağ asitleri, sodyum lauril sülfat ve alfa olefin sülfonat örnek olarak verilebilir.

Yüzey aktif madde olmayan emülsiyer/stabilizer ediciler:

Polivinil alkol ve diğer suda çözünen polimerler misel formu oluşturmadıkları ve yüzey aktif madde gibi davranmadıkları halde polimerizasyonda kullanılabilirler. Bu polimerler polimer partiküllerinin oluşumunu sağlar ve onları stabilize ederler [Kim ve ark. 2004]. Yüzey aktif madde olmayan emülsiyer/stabilizer ediciler, suda çözünebilir yapılarından dolayı, suya oldukça duyarlı bir ürünle sonuçlanmalarına rağmen, dispersiyon mükemmel koloidal stabilite gösterir.

Diğer Malzemeler:

Zincir transfer ajanları, tampon ajanları ve inert tuzlar da polimerizasyonda kullanılan malzemelerdendir.

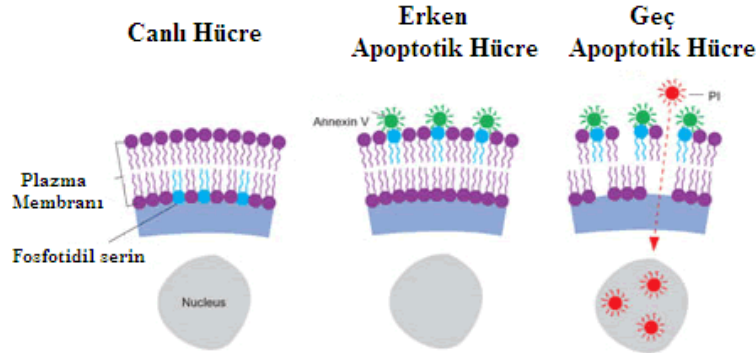
1.4. Akış Sitometrisi

Sitometri hücrelerin veya biyolojik partiküllerin fiziksel ya da kimyasal karakterlerinin ölçülmesidir. Akış sitometrisi, örnekteki her hücrenin tek tek ölçülmesini sağlar. Süspansiyondaki hücreler teker teker bir kanaldan akarlar, bu sırada ışığı dağıtarak floresan yayarlar. Her bir hücre veya partikül lazer demetinin içinden geçerken saptırılan lazer ışığı ve hücreler tarafından yayılan floresan ışığı bir araya getirilip, optik filtreler ve aynalar tarafından farklı dalga boylarına göre ayrılarak, analog sinyallere dönüştürülürler. Bu sinyaller dijitalleştirilerek, histogramlar olarak ekrana aktarılır.

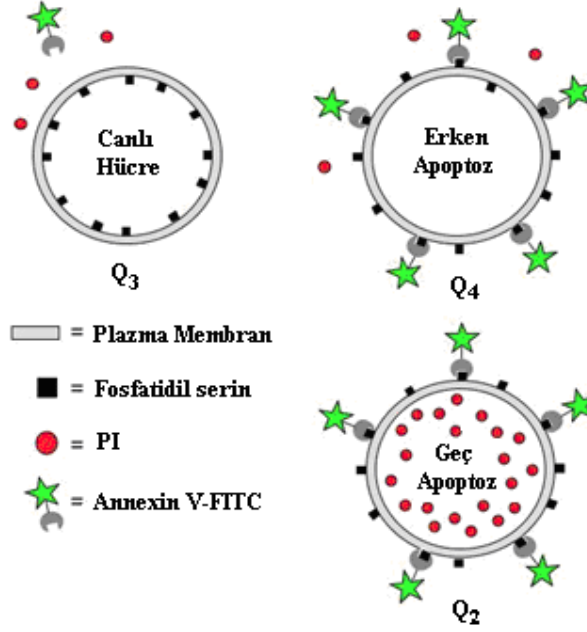
Akış sitometrisi, hücrelerin hücre çapı ile orantılı olarak düşük açıda ileri saçılma yoğunluğunu, hücre içindeki granül sayısı ile orantılı olarak saçılma yoğunluğunu ve birçok dalga boyundaki floresan yoğunluğunu ölçer. Aynı zamanda hücreler arası serbest kalsiyum, zar potansiyeli, pH veya serbest yağ asitlerindeki hızlı değişiklikleri de izleyebilir [Karaboz 2008].

Normal hücrelerde, fosfotidil serin (PS) bölgeleri sitoplazmik membranın iç kısmında bulunurlar. Apoptoz sürecinde, PS bölgeleri yer değiştirir ve dış membrana yönelir. Annexin-V, PS bölgelerine bağlanan spesifik bir proteindir ve apoptoz hücrelerini ayırt etmek için kullanılır. Propidium iyodür (PI) ise geç apoptoz (nekroz) olan hücrelerin belirlenmesinde kullanılan bir boyadır. Aşağıdaki Şekil 1.8'de fosfotidil serinin hücrenin sitoplazmik iç membranında olduğu görülmektedir. Hücre erken apoptoza gittiğinde fosfotidil serin bölgeleri hücrenin dış kısmına geçmekte ve Annexin-V proteini tarafından tanınmaktadır. En sağdaki şekilde ise hücreler geç apoptoza gittiğinde (nekroza) yani iyice zarar gördüklerinde PI boyası hücre içine girebilmekte ve nekrotik hücreleri bu şekilde işaretlemektedir. Bu çalışmada kullanılan kit Annexin-V –PI kitidir. Yani nekrotik ve apoptotik hücreler belirlenmektedir.

FITC (floresanzosiyanat), Annexin V proteine bağlı olan ve apoptoza uğrayan hücreleri akış sitometrisindeki laser yardımıyla sayılmasını sağlayan floresan özellikte bir boyadır. PI ise dış koşullar nedeniyle parçalanmış hücreleri boyayan bir boyadır. Apoptoza uğrayan hücreler Annexin V-FITC boyası ile boyanır ve akış sitometrisinde hücre popülasyonundaki erken apoptoza uğrayan hücrelerin sayısı belirlenir (Q_4), nekroza uğramış hücreler PI boyası ile boyanır ve akış sitometrisinde nekrotik hücrelerin sayısı belirlenir (Q_1), Annexin V-FITC ve PI boyaları birlikte hücreleri boyarsa akış sitometrisinde hücrelerin apoptoza ve sonra nekroza uğradığı gösteren geç apoptoz değeri belirlenir (Q_2) ve her iki boyanın da bağlanmadığı hücreler ile sağlıklı hücre sayısı belirlenmektedir (Q_3) (Şekil 1.9).



Şekil 1.8. Hücrelerde erken ve geç apoptoz

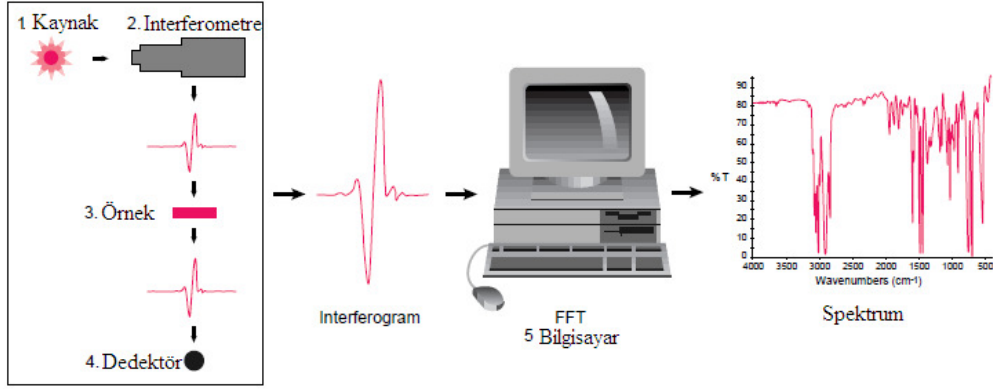


Şekil 1.9. Akış sitometrisinde hücrelerin işaretlenmesi

1.5. Fourier-Transform InfraRed Spektroskopisi (FTIR)

Fourier-Transform InfraRed (FT-IR), infrared spektroskopisinde kullanılan bir metottur. Infrared spektroskopisinde, IR ışını örneğin içinden geçer. Bazı IR ışınları örnek tarafından absorblanır ve bazıları içinden geçerek iletilmiş olur. Sonuç spektrumu, moleküler absorpsiyonu ve iletimi göstermekte, örneğin moleküler parmak izini oluşturmaktadır (Şekil 1.10). Böylece bilinmeyen moleküllerin tanımlanması, örneğin kalitesi veya tutarlılığı ve karışımındaki bileşenlerin miktarı belirlenebilir.

Çözünmeyen polimerlerin infrared spektrumu polimerlerin KBr peletlerinin hazırlanması ile kolayca elde edilir. Monomer bandları ile polimerlerinki karşılaştırılarak monomerlerin birleşme boyutu belirlenebilir.



Şekil 1.10. FT-IR spektroskopisi

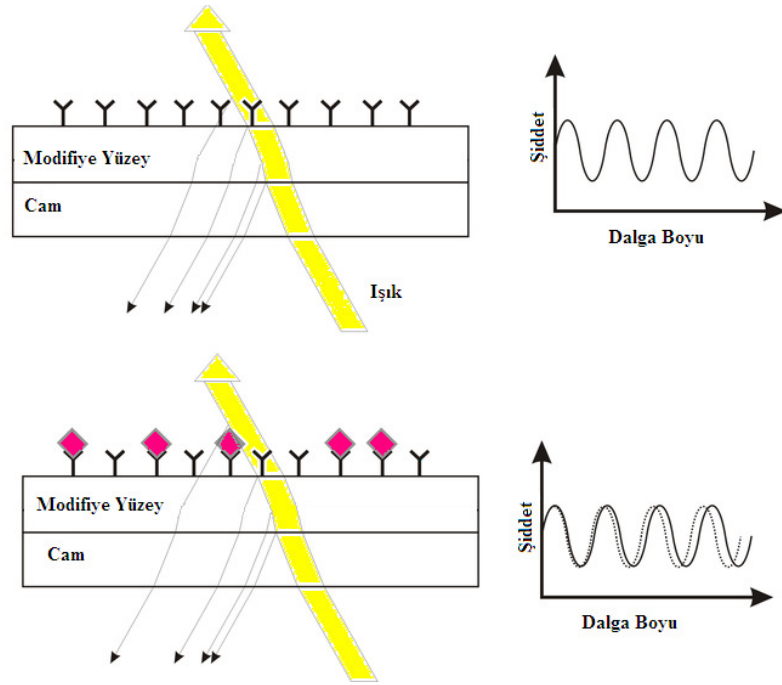
1.6. Reflektometrik İnterferans Spektroskopisi

Bu optik tayin yöntemi ince ve geçirgen bir tabakadaki beyaz ışığın yansımalarını kullanarak bu tabakanın optik kalınlığını belirlemek için kullanılır. Böylece çok düşük miktarlarda sensör çipin yüzeyine bağlanan moleküllerin duyarlı ve zamana bağımlı tayini gerçekleştirilebilir. Reflektometrik interferans spektroskopisi, hızlı ve basit bir yöntemdir ve yüzeye bağlanan molekül etkileşimlerini belirlemek için kullanışlı bir tekniktir.

Reflektometrik interferans spektroskopisinde kullanılan biyoçipler cam yüzeye sahiptir. Böylelikle yüzeyde fonksiyonel grupların oluşturulması kolaylaşır ve biyoyumlu, spesifik olmayan bağlanmaların minimum olduğu yüzeyler elde edilebilir. Proteinler, peptitler, nükleik asitler ve DNA-oligonükleotitleri, karbonhidratlar, lipitler ve küçük ilaçlar karboksil, amino veya tiol grupları aracılığıyla yüzeye kovalent olarak immobilize edilebilir (Şekil 1.11).

Hücre-hücre etkileşimi, reseptörler, fiziksel bağ ve aynı zamanda sinyal iletilici moleküller vasıtasıyla sağlanmaktadır. Sağlıklı ve hasta hücre-hücre etkileşiminin belirlenme oldukça önemlidir ve bundan dolayı kinetik, etki ve sinyal prosesinin anlaşılmasına olanak sağlayan analitik tekniklerin geliştirilmesine yönelik büyük bir ilgi vardır. Reflektometrik interferans spektroskopisi (RIfS), solüsyon içindeki analit ile transdüserin yüzeyine immobilize edilmiş molekülün biyomoleküler etkileşimini tanımlayabilen, işaret gerektirmeyen ve zamana bağlı spektrum veren bir tekniktir. Analitin bağlanması

molekülün transdüserine bağlı tabakasının optik kalınlığında bir artışa sebep olur. Kalınlıktaki bu artış, tabakanın sınırlarında yansıyan ışığın interferans spektrumunda bir değişiklik ile sonuçlanır. RİFS metodu ısıdan bağımsızdır [Pröll ve ark. 2005] ve dalga boyuna bağılı olarak solüsyonun içinden 300 nm’den 40 µm’ ye kadar çıkabilen yüksek yoğunlukta penetrasyona (nüfus edebilme) sahiptir [Möhrle ve ark. 2006]. RİFS, antikolar, peptitler gibi çeşitli biyomoleküller etkileşimlerin, etkileşim kinetiklerinin ölçülmesinde kullanılmaktadır [Pröll ve ark. 2004].



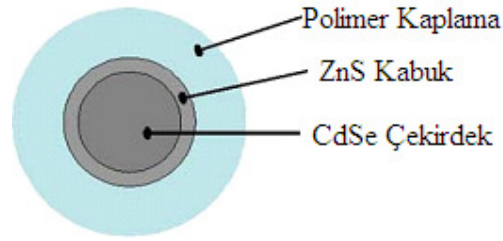
Şekil 1.11. Reflaktometrik interferans spektroskopisi

1.7. Kuantum Noktaları (QD)

Kuantum noktaları nanometrik partiküller olup 1980’lerin ortalarında optoelektronik (fotonik) uygulamalar için geliştirilmiştir. QD’ler ışık yayma özellikleri olan, tipik çapları 2-10 nm, inorganik yarıiletken nanokristallerdir. Yarı iletkenler, elektrik iletkenliği iletkenlerle yalıtkanlar arasında olan maddelerdir. Yarı iletkenler çok düşük sıcaklıklarda yalıtkan gibi davranırlar, oda sıcaklığında

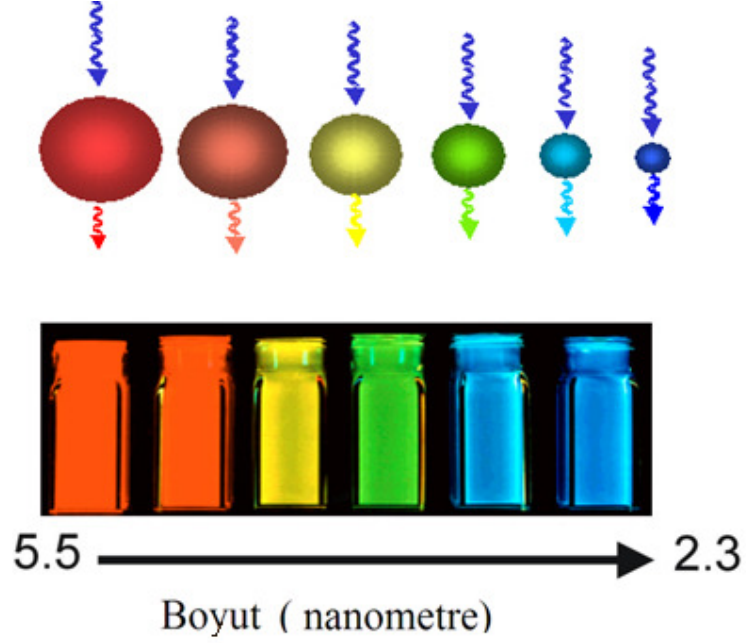
ise iletkenler kadar olmasa da fark edilebilir bir elektriksel iletkenliğe sahiptirler. Yaygın olarak kullanılan yarı iletken maddeler silikon, germanyum, galyum arseniddir [Bimberg ve ark. 1999].

Boyutları kimyasal sentezleri sırasında nanometrik olarak düzenlenir ve bu onların şaşırtıcı optik özellik kazanmalarını sağlar. Bir kuantum noktası, yarı iletken nanokristal olarak da adlandırılır. Genelde periyodik tablodaki grup II ve VI elementlerinden (ör: CdSe ve CdTe) ya da grup III ve V (ör: InP ve InAs) elementlerinden oluşurlar. En sık kullanılan QD sistemi yarı iletken CdSe (kadminyum selenid) çekirdeğin ZnS (çinko sülfür) kabuğuyla kaplanması ile elde edilir. ZnS kabuk, CdSe çekirdeğin kimyasal ve optik kararlılığı için gereklidir (Şekil 1.12).



Şekil 1. 12. Tipik bir kuantum noktasının yapısı

Farklı boyutlardaki kuantum noktalarından oluşan bir karışım tek bir dalgaboyuna sahip ışık kaynağıymış gibi davranabilir ve eşzamanlı işaretleme ve boyamaya izin verir. Kuantum noktalarının, biyolojik olarak en iyi yanı, onları hücre içinde, mikroskop altında veya aynı ışık altında farklı renklerde görebilmemizdir. Yani ışığı absorblarlar ve absorbladıkları ışığı farklı renklerde yayarlar, ışığı farklı renklerde yaymalarını sağlayan özellikleri QD'lerin angstrom ölçeğindeki boyutlarıdır (Şekil 1. 13). Bir kuantum noktasıyla belirgin hale gelen madde, boyutla birlikte daha da belirginleşir. Yani nokta büyüdükçe spektrumun sonuna doğru kırmızı renk ortaya çıkar. Küçük noktalarda ise renk mavidir. Örneğin; 3 nm'lik kadminyum selenidten yapılmış bir partikül 520 nm dalgaboyunda yeşil ışık yayarken aynı partikül 5.5 nm boyutunda iken 630 nm dalga boyunda kırmızı ışık yayar.



Şekil 1. 13. QD partiküllerinin boyutlarına bağlı olarak yaydıkları farklı renkler

Renk, direk olarak kuantum noktasının enerji seviyesi ile ilişkilidir. Büyük kuantum noktalarının enerji seviyeleri çoktur ve birbirine daha yakındır. Bu özellik, kuantum noktasının daha az enerji içeren fotonları absorblamasını sağlar.

QD'lerin dar bir spektrum bandı vardır, parlaklıkları fazladır, geniş bir spektrum aralığındaki ışığı absorbe edebilir, fotostabilitesi yüksektir ve çoklu tespit yetenekleri vardır. İn vitro ve karmaşık in vivo ortamlar da bile oldukça parlak ve stabildirler. Bu sayede gelişmiş moleküler ve hücrenel görüntüleme, ilaç taşınımı, çok duyarlı biyoanaliz ve tanı için uygundur. Çözünürlüğü fazla, yüksek hassaslıkta gerçek zamanlı görüntüleme QD konjugatlarıyla mümkün olmuştur [Gao ve ark., 2004].

Bu kuantum noktası elektronlar, boşluklar veya elektron-boşluk çiftleri ile sınırlıdır. Bu sınırlamalar, enerji seviyelerini nitelendirmek için kullanılır. Kuantum noktaları, teorik olarak sahip oldukları kuantum verimliliğinden dolayı optik uygulamalarda kullanılabilir.

Elektron-boşluk çiftleri kuantum noktalarının göbeğinde bir ışık huzmesi ile bulduklarında, direk olarak kristalin boyutuna bağlı dar ve simetrik bir ışık

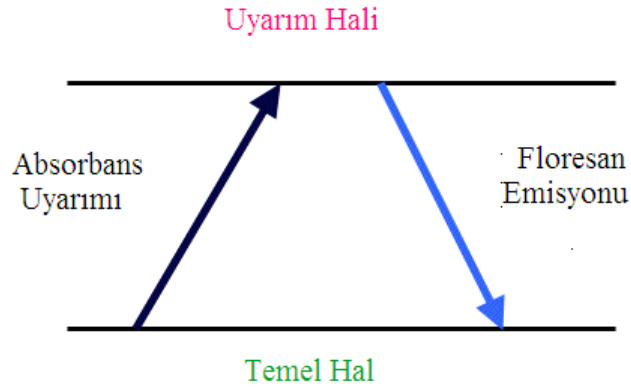
yayarlar. Kuantum noktalarının atomlarda olduğu gibi farklı enerji seviyeleri vardır. Bunun için yapay atom ismini de alırlar. Enerji seviyeleri, kuantum noktalarının şeklinin ve büyüklüğünün değişmesi ve potansiyelin derinliği ile kontrol edilir. Atomlarda olduğu gibi, küçük kuantum noktalarının enerji seviyeleri de optik spektroskopi teknikleriyle araştırılabilir.

Kuantum noktalarının non-toksik olmalarının anlaşılması ve hücrelerde veya organizmalarda belli hedefleri fark edebilmeleri özelliklerinden dolayı biyolojik sistemlerde kullanılabilmesi için modifiye edilmişlerdir. Örneğin, az sayıda altın atomundan oluşan suda çözülebilen kuantum noktaları, yeni biyolojik etiketleme sistemlerinin temelini oluşturmaktadır. Bu multi-elektronlu yapay atomlar, soy metallerdeki atomlar veya nano tanecikler arasında kayıp bağlar sağlayarak, enerji transfer çiftleri ve nanoölçekli optoelektroniklerde ışık yayma kaynakları olarak iş görürler. Bu suda çözülebilen kuantum noktalarının biyolojik etiketlemede önemli olmasının sebebi kuvvetli floresans özelliğe ve kesikli emisyon spektra özelliğine sahip olmasıdır [Hezinger ve ark. 2008].

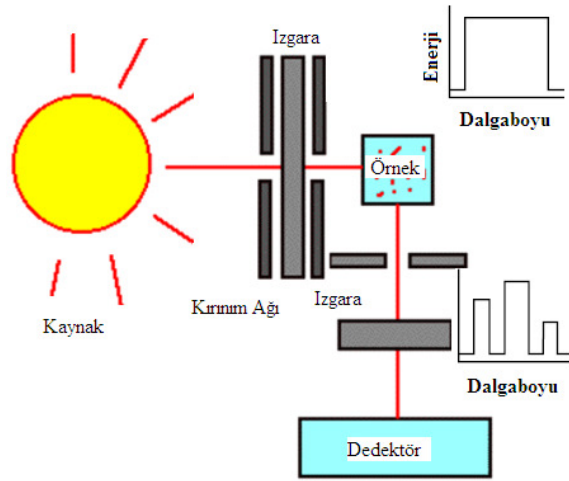
1.8. Floresan Spektrofotometre

Floresan spektrofotometre basitçe geniş bir bant aralığında ışık kaynağı, bir monokromatör, bir örnek hücresi ve bir diyot dizi sensöründen oluşmaktadır. Kaynaktan gelen ışık monokromatörün içinden geçer ve uyarılan ışık dalga boyu seçilir. Uyarılan ışık örnek hücresindeki örnek üzerine odaklanır ve floresan ışık ızgaraya ve diyot dizi sensör üzerine odaklanır. Monokromometre programlanabilir ve böylece ya çözünen maddenin floresans spektrumu sabit bir uyarılma dalga boyunda elde edilebilir veya emisyon spektrumu sabit bir floresan dalga boyunda kaydedilebilir. Aşağıdaki şekillerde uyarılmış enerji haline göre floresan emisyonu (Şekil 1.14) ve temel bir floresan detektör şeması (Şekil 1.15) görülmektedir.

Emisyon ve floresan spektrumları, yapıların saptanması konusunda kullanışlı değildirler. Fakat maddelerin benzerliklerinin saptanmasında çok etkin bir şekilde kullanılırlar.



Şekil 1. 14. Uyarılmış enerji haline göre floresan emisyonu



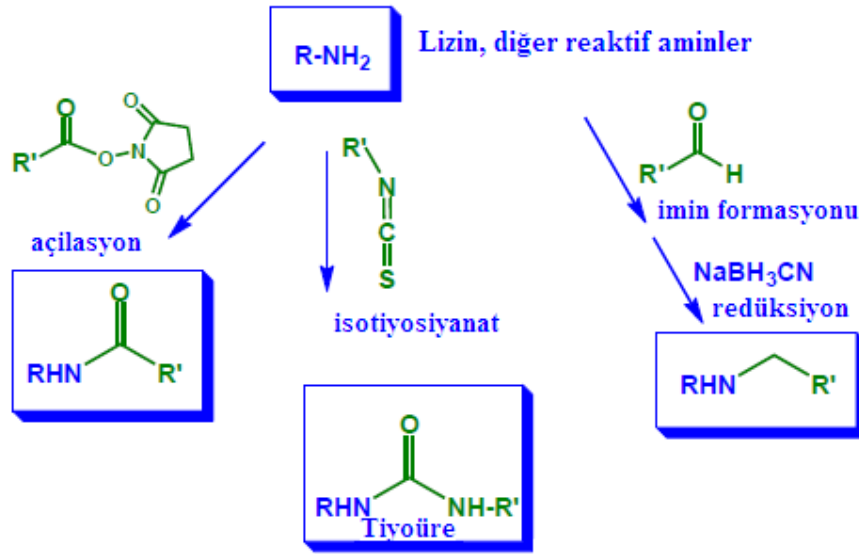
Şekil 1.15. Floresan detektör şeması

1.9. Biyokonjugasyon

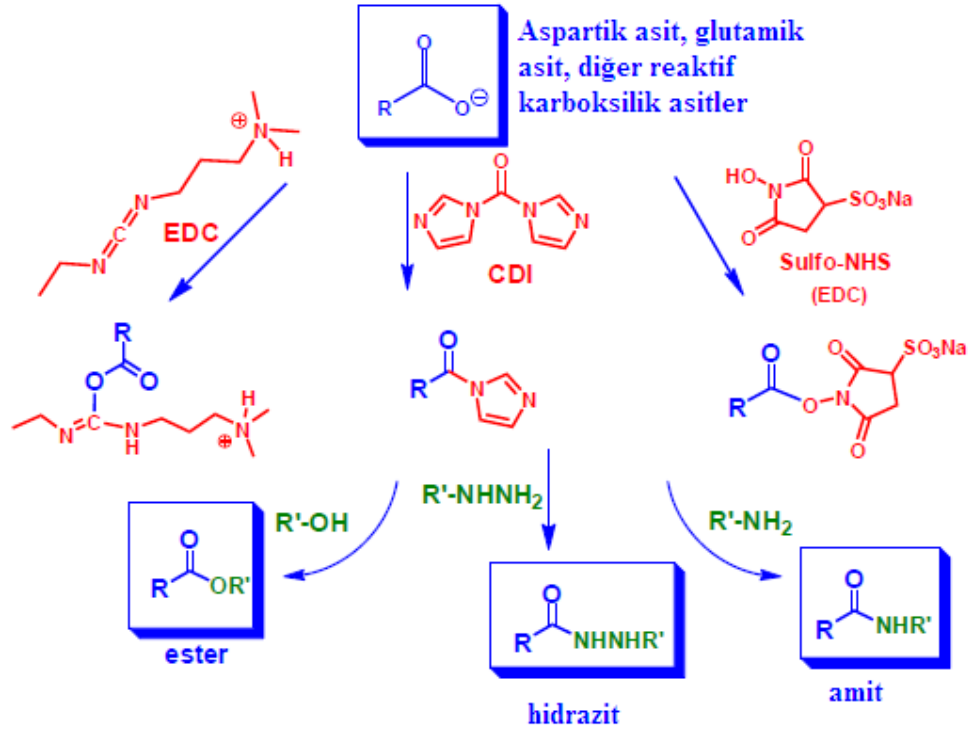
Biyokonjugasyon kovalent bağ ile iki biyomolekülün birbirine bağlanması işlemidir [Hermanson 1996]. En sık rastlanılan biyokonjugasyonlara, biyotin veya floresan boyaların bir proteine bağlanması ya da bir antikorun bir enzime bağlanması gibi protein-protein biyokonjugasyonu örnek verilebilir. Biyokonjugasyonda daha az kullanılan moleküllere oligosakkaritler, nükleik asitler, polietilen glikol (PEG) gibi sentetik polimerler örnek olarak verilebilir. Biyokonjugasyon kimyasına lizin aminoasidine amin-reaktif süksinimidil ester

vasıtasıyla amin bağlanması, sisteine sülfhidril-reaktif maleimid aracılığıyla sülfhidril bağlanması örnek verilebilir. Biyokonjugasyon ürününe biyokonjugat denmektedir. Nano boyuta indirgenmiş biyolojik moleküllerin birbirine konjuge edilmesi işlemine ise nanobiyokonjugasyon denmektedir.

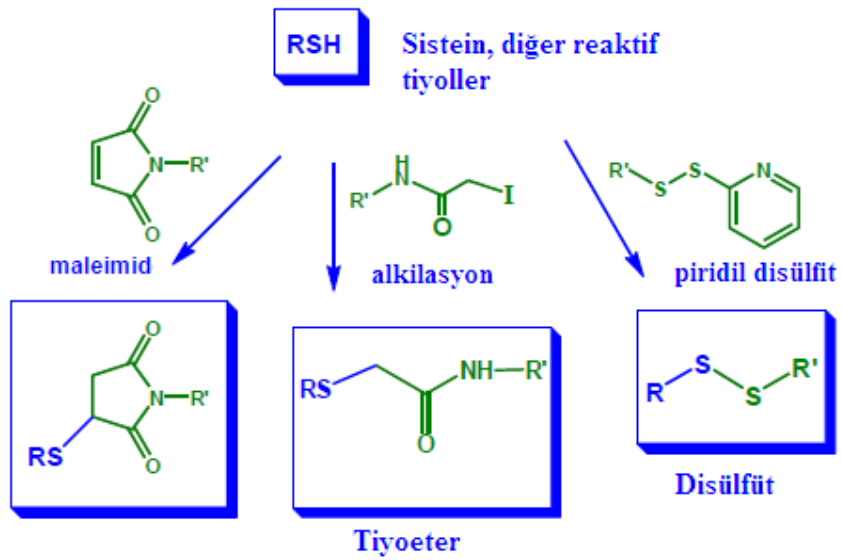
Bazı fonksiyonel grupların biyokonjugasyonu Şekil 1.16, Şekil 1.17 ve Şekil 1.18’de gösterilmiştir:



Şekil 1.16. Reaktif aminlere biyokonjugasyon

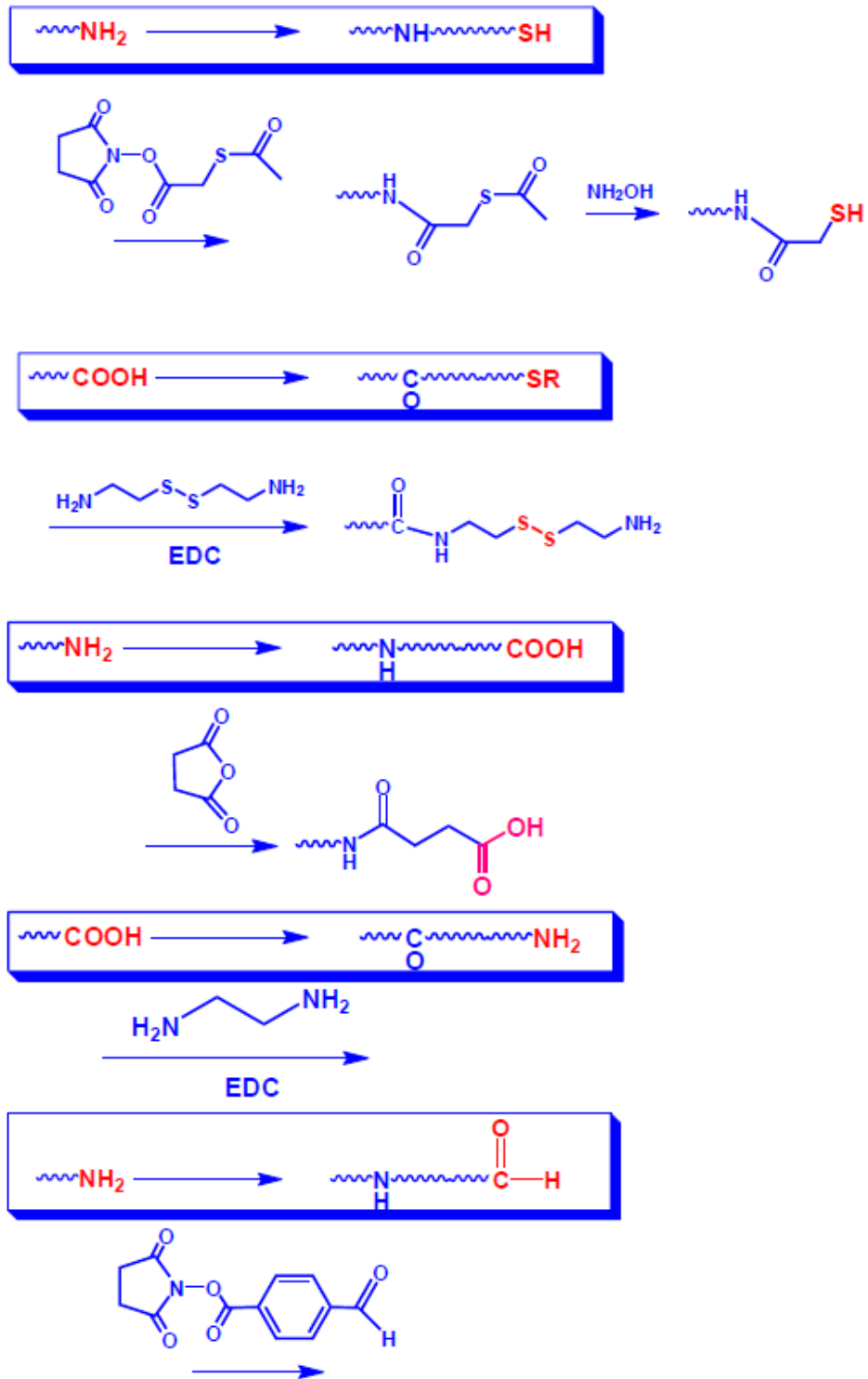


Şekil 1.17. Reaktif karboksilik asitlere biyokonjugasyonu



Şekil 1.18. Reaktif tiyollere biyokonjugasyon

Biyokonjugasyon yöntemiyle yeni grupların sentezlenmesine Şekil 1.19 örnek gösterilebilir:

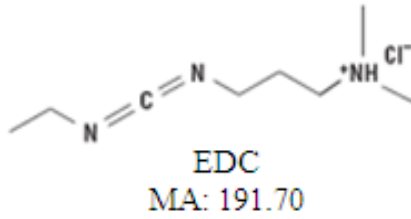


Şekil 1.19. Biyokonjugasyon yöntemiyle yeni grupların sentezlenmesi

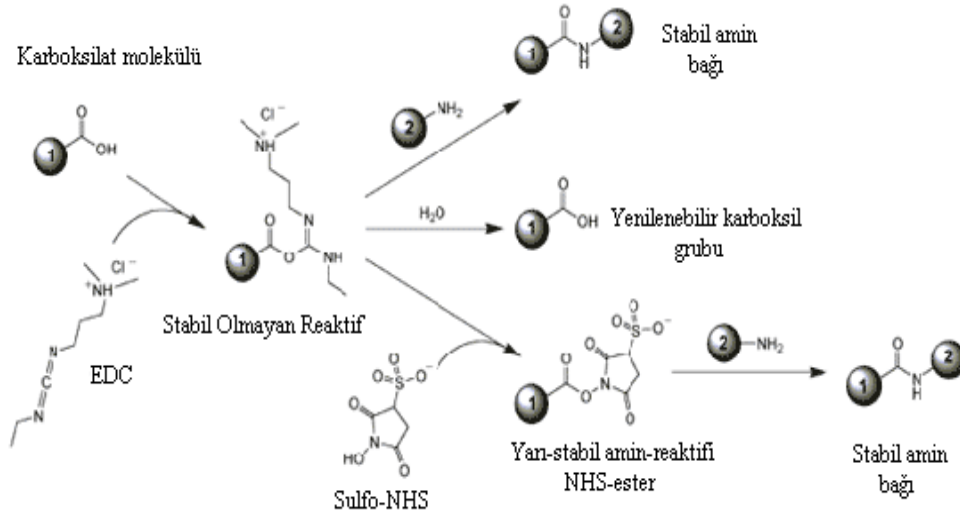
1.10. Biyokonjugasyon İşlemlerinde Kullanılan Çapraz Bağlayıcı Ajanlar (EDC ve NHS)

1.10.1. EDC

Etil-3-[3-dimetilaminopropil]karbodiimid hidroklorid (EDC veya EDAC), karboksil grupları birincil amidlere bağlamak üzere kullanılan bir çapraz bağlayıcıdır (Şekil 1.20). Bu çapraz bağlayıcı, peptit sentezinde amid bağları kurmak, haptenlerin (immonujenlerin oluşturulması için tek başlarına immün sistemi uyarıp antikor oluşturamadıkları halde, bir protein molekülü ile birleştikleri zaman bu etkiyi gösterebilen moleküller) taşıyıcı proteinlere bağlanması, nükleik asitlerin 5' fosfat gruplarından işaretlenmesi ve biyomoleküllerin amin-reaktif NHS-esterini oluşturması gibi çeşitli uygulamalar için kullanılır. EDC, *O*-açilizoürea aracı molekülü sayesinde bir karboksil ile bir amin-reaktifi oluşturmak için tepkimeye girer. Eğer bu ara molekül bir amin ile karşılaşmazsa, hidrolizlenir ve karboksik grubuna rejenere olur. EDC, bir karboksil grubunu amin-reaktif *N*-hidroksisulfosüksinimid (Sulfo NHS) esterlerine dönüştürmek için kullanılır.



Şekil 1. 20. EDC'nin molekül yapısı



Şekil 1. 21. EDC reaksiyonu

Şekil 1. 21’de görüldüğü gibi EDC karboksil grubu içeren molekül 1 ile *O*-açilizourea aracılığıyla tepkimeye girer. Aracı molekül hidrolize duyarlı sulu ortamda kısa ömürlü olsada , molekül 2 üzerindeki bir amin ile reaksiyona girerek stabil amin bağı oluşturur. Ayrıca Sulfo-NHS amin-reaktif aracıyı amin-reaktif Sulfo-NHS esterine dönüştürerek stabilize eder, bu EDC aracılı konjugasyon işleminin etkinliğini artırır [DeSilva, 2003; Grabarek ve Gergely, 1990]. Amin-reaktif Sulfo-NHS ester, bir protein üzerindeki karboksil grubunun değişmeden kalmasına olanak sağlayacak iki basamaklı çapraz bağlama işlemi için yeterli stabillığe sahiptir.

EDC molekülü:

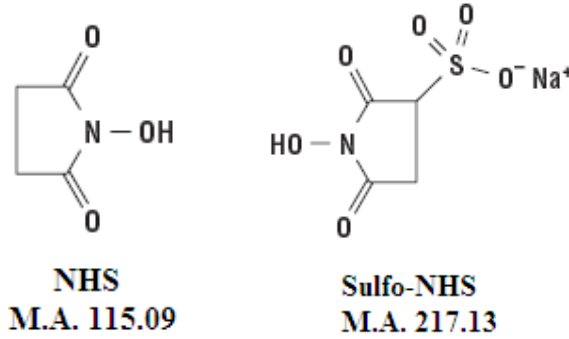
- Suda çözülebilir böylece herhangi bir organik çözücüye gerek kalmadan fizyolojik çözeltilerde çapraz bağlama işlemi yapılabilir.
- Yüksek saflıkta kristalize EDC’ nin kullanılması yüksek saflıkta aktive olmuş türevlerin oluşturulmasında kullanılabilir.
- Fazla kullanılan çapraz bağlayıcı kolaylıkla su veya seyreltilmiş asit ile ortamdan uzaklaştırılır.
- Bu çapraz bağlayıcı ile amin bağı oluşumlarının tepkimeye girmesi nötral bir bağlantı sağlar.
- EDC aracılı bağlanmanın verimi Sulfo-NHS varlığında artar.

EDC'nin Uygulamaları

- Peptit ve proteinlerdeki amin gruplarına karboksil konjuge etmek,
- Karboksilleri amin-reaktif Sulfo-NHS esterlerine dönüştürmek,
- Çapraz bağlı proteinlere karboksil kaplı yüzey oluşturmak,
- Amin-reaktif Sulfo-NHS esterleri ile aktive edilmiş nanopartiküller oluşturmak,
- Taşıyıcı proteinlere çeşitli molekülleri bağlamak,
- DNA'yı 5' fosfat ucundan işaretlemek için kullanılır.

1.10.2. NHS ve Sulfo-NHS

Sulfo-NHS (*N*-hidroksisulfosüksinimid) ve onun yüksüz analogu NHS (*N*-hidroksisüksinimid), biyokonjugasyon ve çapraz bağlamanın çeşitli uygulamaları için karboksil gruplarını amin-reaktif Sulfo-NHS esterlerine dönüştürmek için kullanılan kimyasal modifikasyon reaktifleridir (Şekil 1.22). Sulfo-NHS'nin, bir karboksil içeren molekül ve karbodiimid EDC gibi bir dehidrasyon ajanı ile karıştırılarak rahatlıkla türevleri sentezlenebilir. Metodun temeli amin-reaktif floresan boyalar, biyotine afinite gösteren kuyruklar gibi çok çeşitli protein işaretli reaktifler üretmektir.



Şekil 1.22. Kimyasal modifikasyon reaktifleri NHS ve Sulfo-NHS'nin yapısı

NHS ve Sulfo-NHS, amin-reaktif işaretleyiciler, çapraz bağlayıcılar ve konjugatlar sentezleyebilmek için EDC ile konjugasyon işlemlerinde kullanılırlar.

Biotin ya da peptit gibi karboksilik asit (-COOH) içeren herhangi bir molekül NHS veya Sulfo-NHS ile aktive edilebilirler böylece birincil amin (-NH₂) içeren proteinler ya da diğer moleküller ile kovalent bağlanarak kendiliğinden tepkimeye girebilirler.

NHS ve Sulfo-NHS karboksil grupları amin-reaktif ester formuna modifiye etmek için kullanılırlar. Bu başarı NHS ile karboksil içeren bir molekül ve karbodiimid EDC'nin karışımı sonucu oluşmaktadır. EDC, karboksil ve NHS hidroksil grubu arasında bir dehidrasyona neden olur, NHS-ester aktive olmuş molekül meydana getirir. Aktive olmuş molekül birincil amin içeren bir molekül ile kendiliğinden tepkimeye girebilir. Karboksil-molekülü EDC kullanılarak aminler ile direkt olarak tepkimeye girebilmesine rağmen, NHS ile reaksiyon çok daha fazla verimli olabilmektedir çünkü stabil bir aracı oluşturulmaktadır. Böylece, NHS esteri olarak aktive olan moleküller kurutulabilir ve daha sonra amin içeren hedef moleküller ile reaksiyona girebilecek bir şekilde depo edilebilirler.

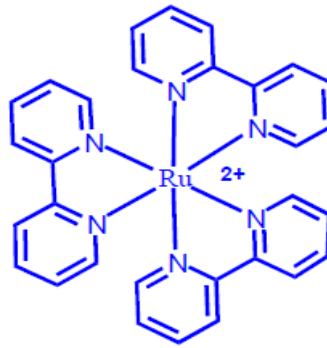
NHS ile Sulfo-NHS arasındaki farklar ise şu şekildedir; sulfo-NHS, NHS'nin sülfonat sodyum tuzudur, suda çözülebilir fakat membran geçirgenliği yoktur. NHS ise membran geçirgendir ve suda çözülebilir. NHS organik solventlerde de çözülürken, Sulfo-NHS ise daha az ölçüde çözülebilir. NHS reaksiyonuna müdahale eden moleküller mevcuttur. Reaksiyonda karboksil veya amin molekülleri içermemelidir. Böylelikle tris, glisin, lizin, etanolamin ya da diğer amin içeren tamponlardan kaçınılmalıdır [Grabarek ve Gergely 1990; Staros ve ark. 1986].

Çizelge 1. : NHS, Sulfo-NHS ve EDC'nin özellikleri

	NHS	Sulfo-NHS	EDC
Molekül Formülü	C ₄ H ₅ NO ₃	C ₄ H ₄ NNaO ₆ S	C ₈ H ₁₇ N ₃ -HCl
Moleküler Ağırlık	115.09	217.13	191.7
Depolama Koşulu	2. 4°C'de nemden uzakta saklanmalıdır, sadece taze solüsyonu kullanılmalıdır		3. -20°C'de nemden muhafaza edilmelidir, sadece taze solüsyonu kullanılmalıdır

1.11. Rutenyum Bipiridin Kromoforu

Rutenyumun, simgesi Ru, atom numarası 44, atom ağırlığı 101.07 akb, ergime noktası 2250.0 °C, kaynama noktası 4900.0 °C olan bir geçiş metalidir (Şekil 1.23). Oda sıcaklığında yoğunluğu 12.2 g/cm³ olup gümüşü bir rengi vardır. 1844 yılında Kazan'da Karl Klaus tarafından bulunmuştur.

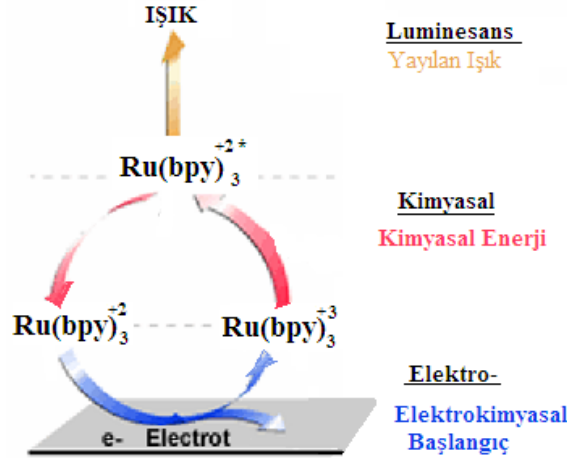


Şekil 1. 23. Rutenyumun moleküler yapısı

Genellikle rutenyum kompleksleri örneğin [Ru(Bpy)₃]⁺² elektrot yüzeyine immobilize olmuş bir monolayer olarak ya da bir koreaktant ya da Ru konjuge

antikor olarak elektrokimyasal luminesans (ECL) özellik gösterir. ECL, elektrokimyasal tepkimeler sırasında çözelti içinde üretilen bir çeşit luminesanstır. ECL, elektrokimyasal olarak reaksiyon sırasında oluşan ara maddelerin, yüksek bir eksergonik reaksiyon geçirmesi ve böylece elektronik olarak uyarılmış hal sonucu ışık yayılmasının ortaya çıkmasıyla oluşmaktadır [Forster 2009]. ECL uyarımına elektrotüremeli *-electrogenerated-* türlerin elektron transfer (redoks) reaksiyonu sebep olur. Bütün reaktantların elektrotların üzerinde elektrokimyasal olarak üretildiği kimyasal luminesansın *-chemiluminescence-* bir formu olan luminesans uyarımı ECL uyarımına örnek olarak verilebilir [Bard 2004].

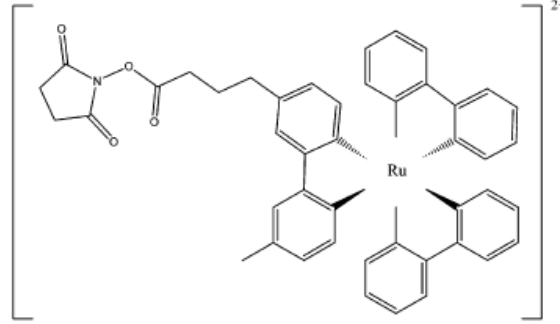
ECL, yüksek hassas ve duyarlı bir yöntem olarak analitik uygulamalar için oldukça kullanışlıdır. Örneğin $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ gibi bir ECL luminoforun varlığında bir elektroda bir voltajın uygulanması ışık emisyonuyla sonuçlanmakta ve çok düşük konsantrasyonlardaki yayılmanın tanımlanmasına olanak sağlamaktadır. $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ asetonitrilin içinde tetrabutylamonyum tetrafloroborat elektrolit olarak kullanılmasıyla ilk defa 1972 yılında rapor edilmiştir (Şekil 1.24) [Richter 2004].



Şekil 1.24. $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ mekanizması

ECL'nin günümüzde moleküler tanımlama veya moleküler prob gibi alanlarda kullanımı artmıştır. Hastalıkların tanımlanması için gerekli test ve metotların üretilmesinde çeşitli biyoaktif bağlayıcı ajanlar örneğin *N-*

hidroksisüksinimid (NHS) rutenyum bipyridin kromoforuna bağlandığında daha aktif metotlar sentezlenebilmektedir (Şekil 1.25) [Richter 2004].



Şekil 1.25. Biyolojik molekülerin ECL işaretlenmesi için Ru(bpy)₃⁺²- NHS

1.12. Teranostik Kavramı

Teranostik, diyagnostik ve terapatik terimlerinin kombinasyonudur; kişiye özel ilaç salınımının temel parçasıdır (Şekil 1.26).



Şekil 1.26. Teranostik kavramı

Teranostik [diyagnostik (tanı)+terapi (tedavi)] : tanımlanan hastalıklı bölgenin tedavi edilebilmesi anlamında kullanılan bir terimdir. Teranostik terimini ilk kez, “PharmaNetics” şirketinin genel müdürü John Funkhouser kullanmış ve şirketinin misyonunu, “Bir diagnostik (tanı) test geliştirilirken, spesifik bir tedavinin uygulanabilmesiyle direkt ilişkili olması gerekmektedir.” şeklinde tanımlamıştır.

Teranostik (diyagnostik & terapatik) hızlı tanı aygıtları ile algılanan hastalıklı dokuya ilaç tedavisinin uygulanmasıdır. Böylece hastalıklı alan

belirlendiği için her hasta için ayrı ve etkili bir tedavi uygulanabilir, ilaç etkinliği artar ve hastalıklı alanın teşhisi ile ilacın belli bir alana etki etmesi sağlanabilmektedir [Espina ve ark. 2008]. Teranostik ürün üretmek için ilaç şirketlerinin ve diyagnostik test geliştirici firmaların sayıları gittikçe artmaktadır. Bir diyagnostik test, yeni bir ilacın hasta üzerindeki olumlu ya da olumsuz etkisini tanımlar ve bu test sonucuna göre hedef ilaç tedavisi uygulanır. Teranostik testler geleneksel olanlardan farklıdır, çünkü yeni testler mikroçip gibi karmaşık teknolojiler üzerine kurulmuştur. Ayrıca genetik, moleküler biyoloji gibi bilim dallarıyla ortak çalışılarak bu alanda yeni ürünler ortaya konabilmektedir. Teranostik teknolojisi farmasötik Ar&Ge'sinde gittikçe artan bir öneme sahiptir. Kişiyeye özel ilaç uygulaması, hastaların ve ödeme yapacak kişilerin yararına bir uygulamadır. Teranostik aynı zamanda, FDA gibi kurumlardan teşvik edici destek almıştır. Doktorlara hasta için en uygun tedavinin tanımlanması için yardımcı olarak, ilaç tedavisinin etkinliğini geliştirmede anahtar bir rol oynar. Ek olarak, teranostikler ile hastalara uygulanan gereksiz tedaviler çok iyi elimine edilir, böylece hastaların tedavisi için uygun olmayan yüksek maliyetli ilaçların alınmasını önler. Teranostikler medikal tedavilerde sınırsız olarak uygulanabilme olanağı taşıdıkları halde, hala kayda değer engeller mevcuttur. Hasta bilgilerinin gizlenmesi sorunu ve teranostik uygulamalarının sosyal güvence kapsamına girmeme ihtimalinden dolayı gerekli donanım maliyetinin yükselmesi sayılabilecek engellerdendir. Bu engellere rağmen, kesin koşulları duyarlı bir şekilde önceden haber verebilen diyagnostik testleri geliştiren şirketler vardır.

Teranostik sektörü ölü kalmış çoğunlukla kullanılmamıştır, fakat moleküler tanı teknolojisi ile kişiyeye özel ilaç tedavisinde hareketlilik bu sektörde canlandırmıştır. Diyagnostik testlerin geliştirilmesi, ilaç ve hasta arasındaki uyumluluğun, ilacın hastaya en etkin hangi yolla verilebileceği ve ilacın nasıl iyi bir geri besleme sağladığının anlaşılması için oldukça önemlidir.

Teranostik hastalığın yönetilmesi için yeni bir medikal yaklaşımdır. Hastalığın ilerleyişini durum olarak görmekten ziyade tanının konmasıyla hastalığı bir proses olarak görerek ona göre tedavi uygulanmaktadır. Verilen terapötik ilacın klinik yararını uygulanan bir tanı testi arttırabilmektedir.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan kimyasallar

Poli(vinil alkol) (PVA; molekül ağırlığı: 100.000, % 98 hidrolize olabilen) Aldrich (ABD) firmalarından temin edilmiştir. Etilenglikoldimetakrilat (EGDMA) Fluka A. G. (Buchs, İsviçre) firmasından sağlanarak kullanılmadan önce hidrokinon varlığında düşük basınçta damıtılmış ve kullanıncaya kadar 4°C'da muhafaza edilmiştir. Diğer bütün kimyasallar analitik saflıkta olup, Merck AG (Darmstadt, Almanya) firmasından sağlanmıştır. Deneylerde kullanılan su, yüksek akışlı selüloz membranlı Barnstead (Dubuque, IA) Ropure LP® ters ozmoz ünitesinde işleme tabi tutulduktan sonra Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloidal uzaklaştırma ve dolgulu iyon değişim sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun iletkenliği 18 megaohm/cm'dir.

2.1.2. Kullanılan cihazlar

Modifiye süperparamanyetik demir oksit nanopartiküllerinin karakterizasyonu için Shimadzu 8000 model FT-IR kullanılmıştır. Polimerik nano TNF- α ve nano anti-TNF- α 'nın boyut analizi için Malvern Zeta Sizer Nano-ZS cihazı kullanılmıştır. Cary Eclipse marka floresan spektrofotometre cihazı; çeşitli konjugasyonlar sonucu MATyr-Ru(bipy)₂-MATyr monomeri ile floresan özellik kazanan partiküllerdeki floresan değişimi belirlemek için, Analytik Jena BIAffinity model reflektometrik interferans spektroskopisi cihazı; aktive edilmiş sensörlere polimerik nano anti-TNF- α yönlendirilmesi yapılarak nano anti-TNF- α ile ticari TNF- α molekülü arasındaki bağlanmanın belirlenmesi, BD FACS Aria akış sitometrisi ise sentezlenen polimerik nano TNF- α 'nın insan kan kanseri hücre hattı (HL-60) ile inkübe edilerek kanser hücreleri üzerindeki etkinliğinin belirlenmesi için kullanılmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Fotosensitif mikroemülsiyon tekniği ile polimerik nano TNF- α 'nın sentezi

Polimerik nano TNF- α fotosensitif mikroemülsiyon polimerizasyon tekniği ile hazırlanmıştır. Mikroemülsiyon sistemi 1.1 gram polivinil alkolün (PVA) 100 mL distile su içinde dispersiyonu ile hazırlanmıştır. Daha sonra fosfat tamponu (pH: 7.0) içinde 1000 ppm TNF- α solüsyonu hazırlanmıştır. 25 μ L MATyr-Ru(bipy₂)-MATyr kompleksi 1000 ppm 500 μ L TNF- α solüsyonu içine ilave edilmiş ve karışım 4 saat karıştırılmıştır. TNF- α -MATyr-Ru(bipy₂)-MATyr kompleksi PVA dispersiyon ortamının içine aktarılmıştır. Başlatıcı solüsyon olarak amonyum persülfat (APS) çözeltisi hazırlanmıştır. 0.02 gram APS 45 mL distile su içinde çözdürülmüş ve bu çözeltiden 25 mL alınarak reaksiyon ortamının içine eklenmiş ve ortam 48 saat manyetik karıştırıcı üzerinde oda sıcaklığında, gün ışığında ve azot ortamında karıştırılmıştır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Azot ortamında fotosensitif mikroemülsiyon tekniği ile polimerik nano TNF- α 'nın sentezi

48 saat sonunda sentezlenen nanopartiküller reaksiyon ortamından 12000 rpm hızda ve 10 dakika süre ile santrifüjlenerek ayrılmıştır. Fosfat tamponu (pH: 7.4) ile 3 kez yıkama yapılarak reaksiyona girmeyen materyaller uzaklaştırılmıştır. MATyr-Ru(bipyridine)₂-MATyr kompleksi sayesinde floresan özellik kazanan polimerik nano TNF- α 'nın floresan spektrumunu ölçülmüştür.

2.2.2. Polimerik nano TNF- α ile metotreksat (MTX) konjugasyonu

150 mg polimerik nano TNF- α 1 mL fosfat tamponu (pH:7.4) içinde dispers edilmiş ve üzerine 250 μ L 0.1 M N-hidroksisüksinimid (NHS) ile 250 μ L 0.4 M 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid (EDC) ilave edilmiş ve 2 saat karıştırılmıştır. 2 saatin sonunda karışıma 20 mg/mL 0.1 M NaOH içinde hazırlanmış metotreksat stok çözeltisinden (Fluka'nın MTX hazırlama protokolüne göre) fosfat tamponunda (pH: 7.4) seyreltilmiş 0.01 M 2 mL ilave edilmiş ve 24 saat karışım manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılmıştır. 24 saat sonunda 12000 rpm hızda 10 dakika süre ile polimerik nano TNF- α -metotreksat konjugasyonu santrifüjlenerek polimerik nano TNF- α 'ya konjuge olmayan metotreksat molekülleri uzaklaştırılmıştır. Santrifüj sonunda pellet 3 kere fosfat tamponu (pH:7.4) ile santrifüjlenerek yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Metotreksat konjuge edilmiş polimerik nano TNF- α floresan spektrofotometresinde incelenmiş ve metotreksat konjugasyonu sonucu floresan spektrumundaki değişim belirlenmiştir.

2.2.3. Süperparamanyetik nanopartiküllerinin (SPN) 3-trimetoksisilil propil metakrilat (TMSPM) ile modifikasyonu

0.08 gram SPN üzerine 5 mL toluen ve 1 mL TMSPM ilave edilmiş ve karışım 24 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Sonra manyetik ayırıcı ile çözüldüğü alman SPN toluen ve etanol ile yıkanmış ve sonra kurutulmuştur.

2.2.4. Silanlanmış SPN partiküllerine anti-TNF- α antikorunu konjugasyonu

Silanlanmış SPN üzerine 3 mL fosfat tamponu (pH: 7.4) ilave edilerek silanlanmış SPN dispers edilmiştir. Sonra karışımının üzerine 100 μ L MATyr-Ru(bipyridine)₂-MATyr ilave edilmiş ve 24 saat karıştırılmıştır. Daha sonra fosfat tamponu (pH: 7.4) içinde hazırlanmış anti-TNF- α antikorunun stok çözeltisinden 1mg/mL 500 μ L karışıma ilave edilmiş ve son olarak 100 μ L APS ilavesi ile karışım 24 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Sonra karışım fosfat tamponu (pH 7.4) ile 3 kez yıkanarak bağlanmayan antikor molekülleri uzaklaştırılmıştır.

2.2.5. Hyaluronik asit (HA) biyopolimerine TNF- α 'nın fotosensitif konjugasyonu

15 mg HA tartılıp 10 mL distile suda çözündürülerek 1500 ppm HA çözeltisi elde edilmiştir. 1.5 mL çözelti alınarak üzerine 25 μ L 0.1 M NHS ile 25 μ L 0.4 M EDC ilave edilmiş ve 2 saat karıştırılmıştır. 2 saat sonra karışıma 1,5 mmol 10 μ L etilendiamin eklenip karışım 24 saat karıştırılarak HA'in fonksiyonel uzantılar kazanması sağlanmıştır. Ertesi gün karışım üzerine tekrar 25 μ L 0.1 M NHS ile 25 μ L 0.4 M EDC ilave edilmiş ve 2 saat karıştırılmıştır. 2 saat sonra karışıma 50 μ L MATyr-Ru(bipyridine)₂-MATyr kompleksi ilave edilmiş ve karışım 4 saat karıştırılmıştır. 4 saatin sonunda HA çözeltisine 500 ppm 50 μ L proinflatuvar sitokin olan TNF- α ilave edilmiş ve ardından 50 μ L 100 mM fosfat tamponu (pH: 7.4) içinde hazırlanmış APS karışıma ilave edilerek polimerizasyon başlatılmış ve 24 saat oda sıcaklığında, gün ışığında manyetik karıştırıcıda TNF- α 'nın HA karışımı içinde foto-polimerizasyon ile konjugasyonu sağlanmıştır.

24 saat sonunda karışım ikiye ayrılmıştır. Karışımın yarısına 100 μ L 0.1 M NHS ile 100 μ L 0.4 M EDC ilave edilmiştir. 2 saat sonra karışımın üzerine 20 mg/mL 0.1 M NaOH içinde hazırlanmış (Fluka'nın MTX hazırlama protokolüne göre) stok metotreksat çözeltisinden fosfat tamponunda (pH: 7.4) seyreltilmiş 0.01 M 2 mL ilave edilmiş ve 24 saat karışım manyetik karıştırıcı üzerinde

kariştirilmiştir. MATyr-Ru(bipyridine)₂-MATyr kompleksi içeren HA özeltisinin, TNF- α /HA konjugasyonunun ve MTX bağlanmiş TNF- α /HA konjugasyonunun floresan değerleri floresan spektrofotometresi ile ölçülmüştür.

Karişimin diğer yarısı SPN üzerine konjuge edilmiş anti-TNF- α karişımı üzerine eklenmiş ve karişım 24 saat manyetik kariştırıcıda kariştırılarak anti-TNF- α antikoru ve TNF- α 'nın etkileştirilmesi sağlanmiştir. Etkileşim floresan spektroskopisinde floresandaki değişim baz alınarak belirlenmiştir.

2.2.6. Hyaluronik asit (HA) biyopolimerine anti-TNF- α antikorunun fotosensitif konjugasyonu

TNF- α konjugasyonunda olduğu gibi etilendiamin ve MATyr-Ru(bipyridine) - MATyr ile fonksiyonel hale gelen HA karişımı üzerine 500 ppm 50 μ L RA hastalığının proinflatuvar sitokini olan TNF- α 'yı bloklayıcı biyoaktif anti-TNF- α antikoru ilave edilmiş ve üzerine polimerizasyonu başlatıcı 50 μ L 100 mM fosfat tamponu (pH: 7.4) içinde hazırlanmiş APS ilave edilmiştir. 24 saat oda sıcaklığında, gün işiğında manyetik kariştırıcı üzerinde anti-TNF- α antikorunun HA karişımına foto-polimerizasyonla konjugasyonu sağlanmiştir.

24 saat sonunda 100 μ L 0.1 M NHS ile 100 μ L 0.4 M EDC anti-TNF- α antikoru konjuge edilmiş HA çözeltisine ilave edilmiştir. 2 saat sonra karişımın üzerine 20 mg/mL 0.1 M NaOH içinde hazırlanmiş (Fluka'nın MTX hazırlama protokolüne göre) metotreksat çözeltisi ilave edilmiş ve 24 saat karişım manyetik kariştırıcı üzerinde kariştırılmıştır. MATyr-Ru(bipyridine)₂-MATyr kompleksi içeren HA özeltisinin, anti-TNF- α /HA konjugasyonunun ve MTX bağlanmiş anti-TNF- α /HA konjugasyonunun floresan değerleri floresan spektrofotometresi ile ölçülmüştür.

2.2.7. CdS/kuantum noktalarına (QD) TNF- α konjugasyonu

Öncelikle CdS/kuantum noktaları (QD) sentezlenmiştir. Bunun için etanol ile 24 mL 0.01 M Cd(OAc)₂.H₂O solüsyonu hazırlanmiştir. Hazırlanan solüsyon azot ortamında 30 dakika oda sıcaklığında kariştırılmıştır. Daha sonra sodyum

sülfid (0.01 M, 24 mL) yavaşça ortama eklenmiş ve karışım 30 dakika azot ortamında tekrar karıştırılmış ve sonra santrifüjlenmiştir. Çökelti iki kere distile su ile yıkanmış ve hava ile oda sıcaklığında kurutulmuştur.

CdS nanokristalleri Hür ve ark. (2007) tarafından sentezlenen metakriloilamido sistidin (MAC) içeren 0,018 M, 10 mL etanole ilave edilmiş ve 24 saat karıştırılmıştır. Böylece metakriloil grupları CdS nanokristalinin yüzeyine bağlanmıştır. Daha sonra nanokristaller etanol ve distile su ile 10 dakika yıkanarak fazla tiyol grupları uzaklaştırılmıştır.

Sentezlenen CdS-MAC solüsyonuna Hür ve ark. (2007) tarafından sentezlenen metakriloilamido tirozin (MAT) bağlanması için 5,08 mg MAT 1 mL suda dispers edilmiş ve 1 mL CdS-MAC solüsyonu üzerine ilave edilmiş ve 24 saat karıştırılmıştır.

TNF- α 'nın kuantum noktalarına konjugasyonu için, 5 ppm 0.6 mL TNF- α solüsyonu hazırlanmış ve 2 mL CdS-MAC-MAT solüsyonuna ilave edilmiştir. Üzerine 100 μ L Hür ve ark. (2007) tarafından sentezlenen P[MATrp-Ru-Guanine] ilave edilmiş ve 2 saat karıştırılmıştır. Daha sonra fosfat tamponunda (pH:7.4) hazırlanmış 100 μ L 100 mM APS ilave edilerek polimerizasyon başlatılmış ve gün ışığında oda sıcaklığında 24 saat polimerizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. 24 saat sonunda bağlanmayan TNF- α 'nın uzaklaştırılması için fosfat tamponu (pH:7.4) ile iki kere yıkama işlemi yapılmıştır.

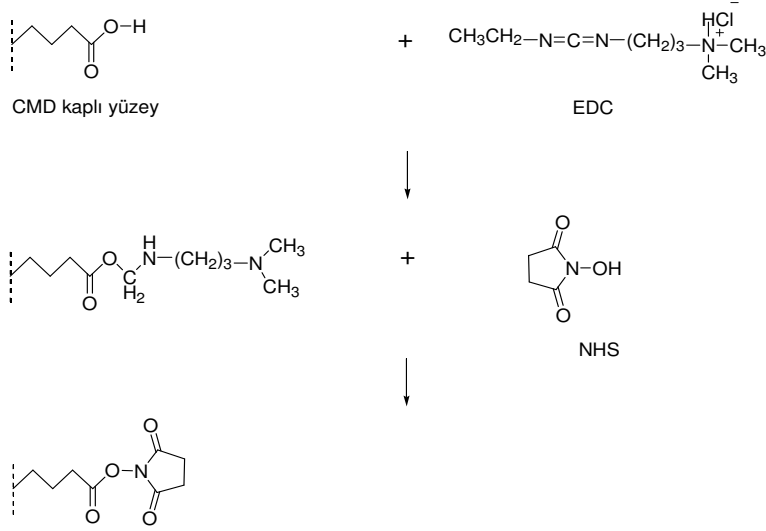
2.2.8. Polimerik nano anti-TNF- α sentezi

Nano anti-TNF- α 'da polimerik nano TNF- α sentezi gibi fotosensitif mikroemülsiyon polimerizasyon tekniği ile hazırlanmıştır. Mikroemülsiyon sisteminde 1.1 gram polivinil alkol (PVA) 100 mL distile su içinde disperse edilmiştir. 1 mL fosfat tamponu (pH: 7.0) içinde toz halindeki 1 mg anti-TNF- α antikoru çözdürülerek 1000 ppm çözelti hazırlanmıştır. 25 μ L MATyr-Ru(bipyridine)₂-MATyr kompleksi, 1000 ppm 500 μ L anti-TNF- α antikor solüsyonu içine ilave edilmiş ve karışım 4 saat karıştırılmıştır. Anti-TNF- α -MATyr-Ru(bipyridine)₂-MATyr kompleksi PVA dispersiyon ortamının içine aktarılmıştır. 0.02 gram APS 45 mL distile su içinde çözdürülmüş ve bu çözülden 25 mL alınarak reaksiyon

ortamının içine eklenmiş ve ortam 48 saat manyetik karıştırıcı üzerinde oda sıcaklığında, gün ışığında ve azot ortamında karıştırılmıştır. 48 saat sonunda sentezlenen nanopartiküller reaksiyon ortamından 12000 rpm hızda ve 10 dakika süre ile santrifüjlenerek ayrılmıştır. Fosfat tamponu (pH: 7.4) ile 3 kez yıkama yapılarak reaksiyona girmeyen materyaller uzaklaştırılmıştır. 150 mg polimerik nano anti-TNF- α tartılarak 1 mL fosfat tamponu (pH: 7.4) içinde dispers edilmiştir. Üzerine 250 μ L 0.1 M NHS ile 250 μ L 0.4 M EDC ilave edilerek karışım 2 saat manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılmıştır. Daha sonra karışımın üzerine 20 mg/mL 0.1 M NaOH metokresat stok çözeltisinden 0.011 M 500 μ L olacak şekilde alınarak 24 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Polimerik nano anti-TNF- α 'nın ve MTX bağlanmış polimerik nano anti-TNF- α 'nın floresan değerleri floresan spektrofotometresinde ölçülmüştür.

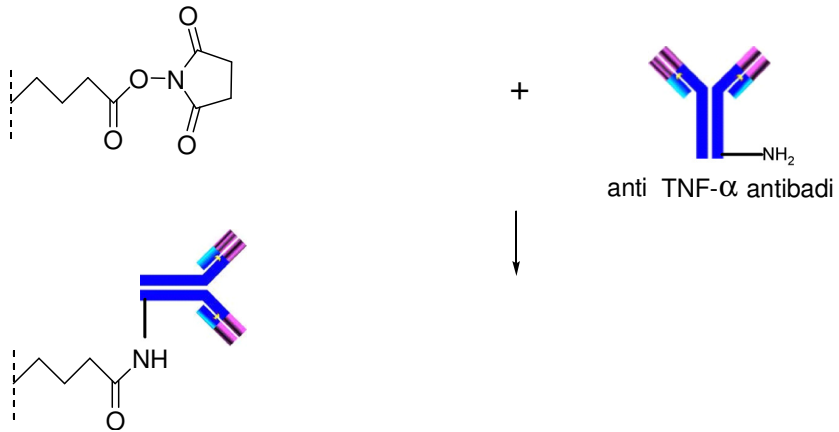
2.2.9. Reflektometrik interferans spektrofotometresi ile polimerik nano anti-TNF- α 'nin etkinliğinin analizi

Öncelikle literatürde ilk defa reflektometrik interferans spektroskopisi cihazına ticari anti-TNF- α antikorunu immobilize edilmiş ve TNF- α ligand olarak kullanılmış ve cihazda anti-TNF- α ile TNF- α etkileşimi kaydedilmiş daha sonra çip yüzeyine sentezlenen polimerik nano anti-TNF- α immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ticari anti-TNF- α antikorunun immobilize edildiği ilk deney için öncelikle karboksimetildekstran (CMD) polimer tabakası ile kaplı çipler cihaza takılmış ve HBS pH:7.4 (HEPES:NaCl:EDTA) tampon sistemi kullanılarak yıkanmıştır. Sonra 0,1 M NHS ve 0,1 M EDC çözeltileri ile aktive edilmiştir (Şekil 2.1). Sensör yüzeylerinin NHS/EDC ile aktivasyonu sonucunda yüzey morfolojisinin değişmesi ışığın kırınım açısını değiştirdiği için sensogram sinyalinde artma meydana gelmiştir. Bu artış etkileşimin gerçekleştiğinin bir göstergesidir.



Şekil 2.2. CMD kaplı sensörlerin aktivasyon şeması

Sensör yüzeyinde uygun geometrili antikor yönlenmesi sağlamak üzere modifiye edilen reflektometrik sensörler farklı konsantrasyonlardaki anti-TNF- α antikor çözeltileri ile etkileştirilerek (Şekil 2.2) TNF- α tayini için hazırlanmıştır. Yapılan ölçümler sonucunda sensör yüzeylerine bağlanacak uygun antikor konsantrasyonu 10 mgL^{-1} olarak belirlenmiştir. Sensör yüzeyine anti-TNF- α antikorunun bağlanması sonucunda sinyalde artış olmuş ve bağlanma bölgelerinin tamamlanmasına kadar artma devam etmiştir.



Şekil 2.3. Aktive edilmiş sensörlere antikor bağlanma şeması

Uygun yönlendirilmiş antikor immobilizasyonu gerçekleştirilmiş çipler RİfS cihazı kullanılarak farklı konsantrasyonlarda (10, 25 ve 50 ngmL⁻¹) TNF- α çözeltileri ile etkileştirilmiş ve antikor ile TNF- α molekülü arasında bağlanma gözlenmiştir. Ticari anti-TNF- α immobilizasyonu ile elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda çip yüzeyine polimerik nano anti-TNF- α 'nın immobilizasyonu denenmiştir. Bunun için öncelikle CMD polimer tabakası ile kaplı çipler HBS pH:7.4 (HEPES:NaCl:EDTA) tampon sistemi kullanılarak yıkanmış sonra 0,1 M NHS ve 0,1 M EDC çözeltileri ile aktive edilmiştir. 0.1 g/mL HBS tamponu (pH:7.4) içinde stok polimerik nano anti-TNF- α çözeltisi hazırlanmış ve bu çözeltilerden NaAc ile seyreltilmiş farklı derişimlerde örnekler hazırlanarak modifiye edilen reflektometrik sensörler ile etkileştirilmiştir. Yapılan ölçümler sonucunda sensör yüzeylerine bağlanacak uygun antikor konsantrasyonu 10000 ppm nano anti-TNF- α olarak belirlenmiştir. Sensör yüzeyine polimerik nano anti-TNF- α 'nın bağlanması sonucunda sinyalde artış olmuş ve bağlanma bölgelerinin tamamlanmasına kadar artma devam etmiştir. Uygun yönlendirilmiş olduğu düşünülen polimerik nano anti-TNF- α immobilize edilmiş çipler RİfS cihazı kullanılarak HBS içinde farklı konsantrasyonlarda (25, 50 ve 100 ngmL⁻¹) hazırlanmış TNF- α çözeltileri ile etkileştirilmiştir. En iyi etkileşim 100 ngmL⁻¹ hazırlanmış TNF- α çözeltisi kullanıldığı zaman elde edilmiştir.

2.2.10. Hücre kültürü

Bu çalışmada insan kan kanseri hücre hattı (HL-60) kullanılmıştır. HL-60 hücreleri, % 10 (v/v) fetal sığır serumu (FBS) ve penisilin/streptomisin antibiyotiklerini içeren RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) hücre kültürü ortamda 5×10^4 hücre/mL olacak şekilde steril hücre kültürü test kaplarında 37°C'de ve % 5 CO₂ içeren inkübatörlerde yetiştirilmiştir.

2.2.11. Polimerik nano TNF- α 'nın kanser hücrelerine etkisi

Bu çalışmada, polimerik nano TNF- α 'nın hücre kültüründe TNF- α gibi işlev göreyerek kanser hücrelerinin TNF- α reseptörünü bloke etmesi ve böylece

kontrollü hücre ölümüne (apoptoz) sebebiyet vermesi amaçlanmıştır. Polimerik nano TNF- α 'dan 0,05 gram alınarak 1 mL DMSO içinde dispers edilmiş ve karışımdan 25 μ L alınarak 50 000 hücre/mL HL-60 hücre hattının olduğu hücre kültürü test kabına aktarılmış ve 24 saat inkübe edilmiştir. DMSO'nun hücrelere etkisini incelemek için 25 μ L DMSO kullanılarak DMSO kontrolü ve normal kontrol hücreleri oluşturulmuştur. Akış sitometrisinde normal kontrol hücrelerinin canlılık oranı belirlenmiş daha sonra sadece DMSO'nun hücrelere etkisi ve son olarak polimerik nano TNF- α 'nın HL-60 hücrelerine etkisi incelenmiştir.

2.2.12. Akış sitometrisi

HL-60 hücrelerindeki apoptoz ve nekroz değerleri Annexin V-FITC/PI kiti (BD Company, USA) kullanılarak akış sitometrisi cihazında (FACS Aria, BD Corporation, USA) belirlenmiştir. Hücreler 1200 rpm hızda 5 dk santrifüjlenerek toplanmış ve sonra soğuk fosfat tamponu (pH: 7.4) ile iki kere yıkayıp santrifüjlenerek hücre kültürü ortamının kalıntılarından uzaklaştırılmıştır. Daha sonra hücre pelletleri 100 mL bağlanma tamponu (kitte mevcut bulunmaktadır) ile süspanse hale getirilmiştir. 100 mL hücre süspansiyonu (5×10^4 hücre/mL) akış sitometrisi tüplerinin içine alınmış üzerlerine 5 μ L Annexin V- FITC boyası ve 5 μ L propidyum iyodid (PI) boyası ilave edilmiş ve 15 dakika karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edilmişlerdir. Sonra 400 μ L bağlanma tamponu her örneğe ilave edilmiş ve akış sitometrisinde Diva yazılımında ikili boyama analizine göre okutulmuştur. Bu boyamaya göre hücreler dört gruba ayrılmaktadır. Apoptoza uğramış hücrelerde fosfotidilserin yapısı ortaya çıkmakta ve Annexin V-FITC hücreleri tarafından boyanmaktadır. Nekroza uğramış hücreleri PI boyası boyamakta ve canlı hücreler boyanmayan kalmaktadır. Boyanmamış hücreler canlı hücrelerdir (Q₃), Annexin V ile boyanmış PI ile boyanmamış hücreler erken apoptoza uğramış hücrelerdir (Q₄), geç apoptoza uğramış hücreler hem Annexin V hem de PI ile boyanmış hücrelerdir (Q₂), sadece PI ile boyanmış hücreler ise nekroza uğramış hücrelerdir (Q₁).

2.2.13. Karakterizasyon çalışmaları

2.2.13.1. Boyut analizi

Polimerik nano TNF- α ve polimerik nano anti-TNF- α 'nın boyut analizi Zeta Sizer (Malvern Zeta Sizer Nano-ZS) kullanılarak elde edilmiştir.

2.2.13.2. FTIR analizi

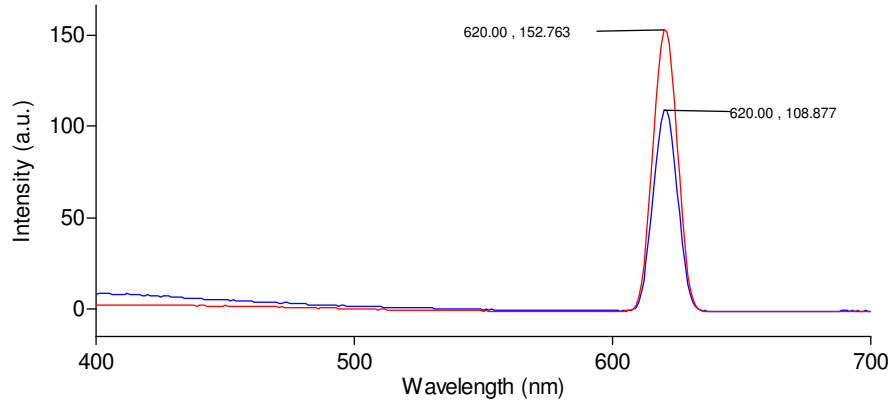
SPN ve silanlanmış SPN FTIR spektrumu, FTIR spektrometresi (Shimadzu FTIR 8000 Series) kullanılarak elde edilmiştir. Kuru SPN ve modifiye SPN molekülleri KBr ile karıştırılarak tablet hazırlanmış ve FTIR spektrumu çekilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Floresan Spektrofotometre Ölçüm Sonuçları

3.1.1. Hyaluronik asit ile TNF- α konjugasyonu

Hyaluronik asit çözeltisi MATyr-Ru(bipyridine)₂-MATyr kompleksi ile hazırlandığı için floresan özellik kazanmıştır. Floresan spektrofotometresinde HA çözeltisinin en yüksek floresan şiddeti ve buna bağlı olarak dalga boyu belirlenmiştir (Şekil 3.1 kırmızı pik). HA çözeltisinin TNF- α ile konjugasyonu floresan spektroskopisinde aynı dalga boyunda ölçülmüş ve şiddetindeki değişiklik belirlenmiştir (Şekil 3.1 mavi pik).

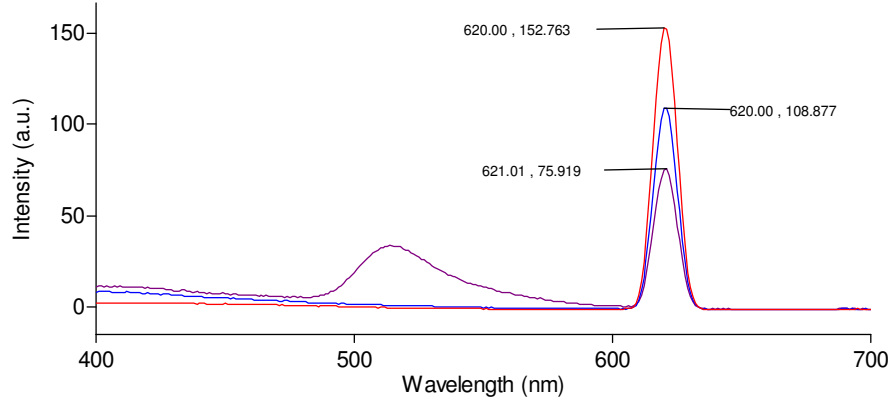


Şekil 3.1. HA çözeltisi ile TNF- α konjugasyonunun floresan spektroskopi değerleri

HA çözeltisi 310 nm’de uyarılmıştır ve emisyon değeri 620.00 nm olarak belirlenmiştir. Floresan şiddeti ise 152.763 olarak ölçülmüştür (kırmızı pik). HA çözeltisi ile TNF- α konjugasyonu 310 nm’de uyarılmıştır ve emisyon değeri 620.00 nm olarak belirlenmiştir. Floresan şiddetinde ise düşme gözlenmiş ve 108.877 (mavi pik) olarak ölçülmüştür

3.1.2. TNF- α konjuge edilmiş HA çözeltisi ile anti-TNF- α konjuge edilmiş süperparamanyetik nanopartiküllerinin etkileşimi

TNF- α konjuge edilmiş HA çözeltisi ile anti-TNF- α antikorunu konjuge edilmiş SPN birbirleri ile aynı oranda alınarak 6 saat manyetik karıştırıcıda etkileştirilmiş ve TNF- α ile anti-TNF- α ’nın etkileşiminin floresan spektrumlarındaki değişimi gözlenmiştir (Şekil 3.2).

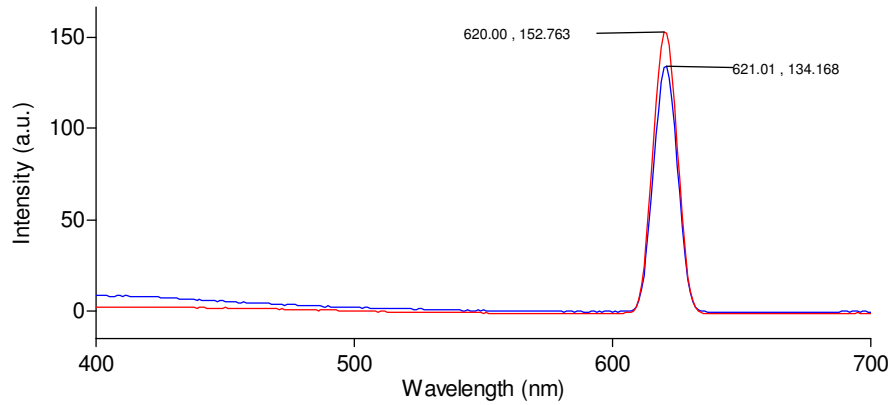


Şekil 3.2. HA çözeltisi/TNF- α konjugasyonu ile anti-TNF- α /SPN konjugasyonunun etkileşimi

Şekil 3.2’de görüldüğü gibi HA çözeltisinin floresan şiddeti 152.763 (kırmızı pik), HA çözeltisi ile TNF- α konjugasyonunun floresan şiddeti 108.877 (mavi pik) ölçülmüştür. HA çözeltisi/TNF- α konjugasyonu ile anti-TNF- α /SPN konjugasyonunun karıştırılması sonucu TNF- α ile anti-TNF- α ’nın etkileşimi floresan şiddetini 75.919 değerine düşürmüştür (mor pik).

3.1.3. Hyaluronik asit ile anti-TNF- α konjugasyonu

HA çözeltisinin anti-TNF- α antikoruna ile konjugasyonu floresan spektrofotometresinde aynı dalga boyunda ölçülmüş ve HA çözeltisinin floresan şiddetindeki değişiklik belirlenmiştir (Şekil 3.3).

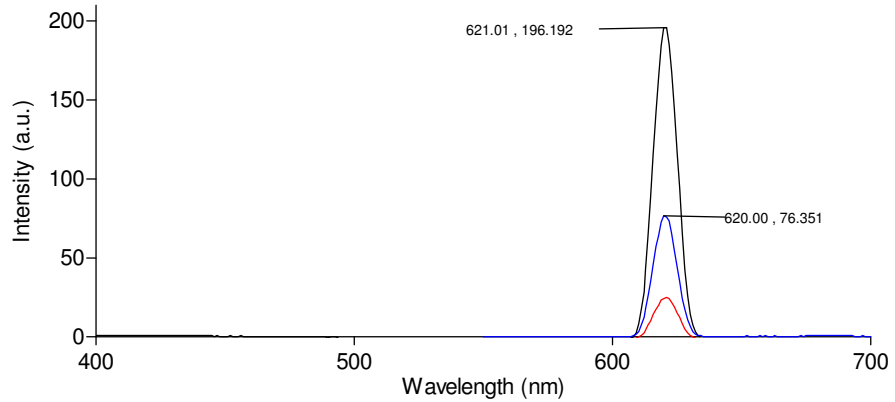


Şekil 3.3. HA çözeltisi ile anti-TNF- α konjugasyonunun floresan spektroskopi değerleri

Şekil 3.3.'de görüldüğü gibi HA çözeltisinin floresan şiddeti 152.763 olarak ölçülmüştür (kırmızı pik). HA çözeltisi ile anti-TNF- α konjugasyonu 310 nm'de uyarılmıştır ve emisyon değeri 621.01 nm olarak belirlenmiştir. Floresan şiddetinde ise düşme gözlenmiş ve 134.168 (mavi pik) olarak ölçülmüştür.

3.1.4. HA çözeltisi ile anti-TNF- α konjugasyonu ve QD ile TNF- α konjugasyonunun etkileşimi

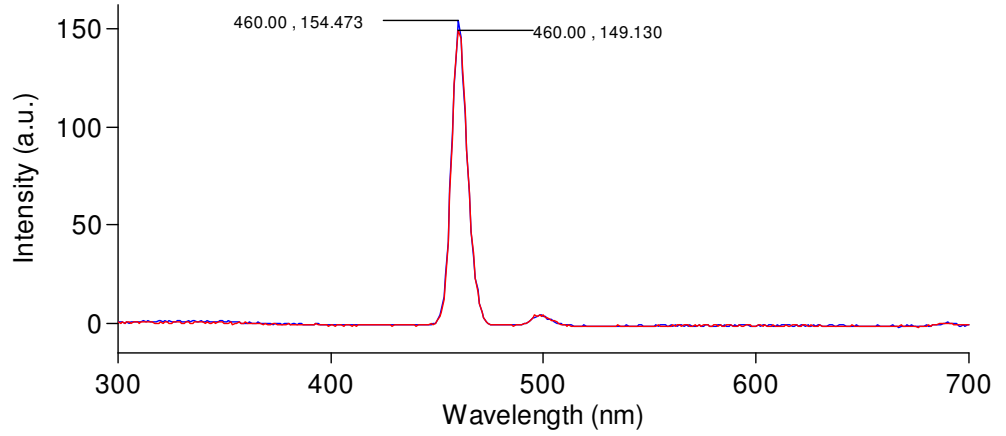
HA çözeltisi-anti-TNF- α konjugasyonu ile QD-TNF- α konjugasyonunun etkileşimi floresan spektrometresinde ölçülmüştür. 3.1.3. bulguda verilen HA-anti TNF- α konjugasyonu ile aynı seyreltme oranı kullanıldığında QD-TNF- α konjugasyonu oldukça yüksek floresan şiddeti göstermiş (yaklaşık 940.062). Sonuçların daha sağlıklı değerlendirilebilmesi için QD-TNF- α konjugasyonu 50 kat fosfat tamponu (pH:7.4) ile seyreltilmiş ve 310 nm'de uyarılmıştır. QD-TNF- α konjugasyonunun emisyon değeri 621.01 nm olarak belirlenmiştir. Floresan şiddeti ise 76.351 olarak ölçülmüştür (Şekil 3.4 mavi pik). HA çözeltisi-anti-TNF- α konjugasyonunun floresan şiddeti 50'nin altındadır (Şekil 3.4 kırmızı pik). HA çözeltisi-anti-TNF- α konjugasyonu ile QD-TNF- α konjugasyonunun etkileşiminin floresan şiddetinde ise artma gözlenmiş 196.192 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.4 siyah pik).



Şekil 3.4. HA çözeltisi-anti-TNF- α konjugasyonu ile QD-TNF- α konjugasyonunun etkileşimi

3.1.5. MTX konjuge edilmiş polimerik nano TNF- α

Polimerik nano TNF- α sentezlenirken MATyr-Ru(bipyridine)₂-MATyr kompleksi kullanıldığı için nanopartikül floresan özellik kazanmıştır. Floresan spektrofotometresinde polimerik nano TNF- α 'nın en yüksek floresan şiddeti ve buna bağlı olarak dalga boyu belirlenmiştir. 230 nm dalga boyunda en yüksek floresan şiddet değeri elde edilmiştir (Şekil 3.5 mavi pik). MTX konjuge edilmiş polimerik nano TNF- α 'da polimerik nano TNF- α 'nın uyarıldığı dalga boyunda uyarılmış ve floresan şiddetinde düşme gözlenmiştir (Şekil 3.5 kırmızı pik).



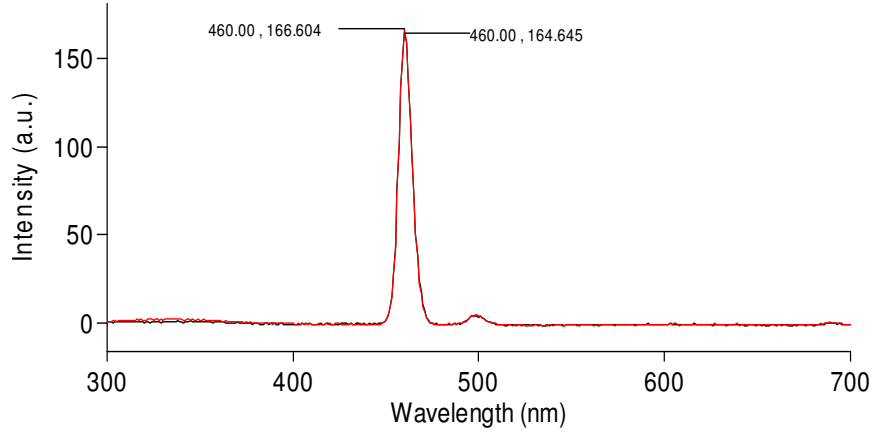
Şekil 3.5. Polimerik nano TNF- α ve MTX konjuge edilmiş polimerik nano TNF- α 'nın floresan şiddet değerleri

Polimerik nano TNF- α 230 nm'de uyarılmıştır. Emisyon değeri 460.00 nm olarak belirlenmiştir. Floresan şiddeti ise 154.473 olarak ölçülmüştür (Şekil 3.5 mavi pik). MTX konjuge edilmiş polimerik nano TNF- α 'da 230 nm'de uyarılmıştır. Emisyon değeri 460.00 nm olarak belirlenmiştir. Floresan şiddeti ise 149.130 olarak ölçülmüştür (Şekil 3.5 kırmızı pik).

3.1.6. MTX konjuge edilmiş polimerik nano anti-TNF- α

Polimerik nano anti-TNF- α 'nın sentezinde de MATyr-Ru(bipyridine)₂-MATyr kompleksi kullanıldığı için nanopartikül floresan özellik kazanmıştır. Floresan spektrofotometresinde polimerik nano anti-TNF- α 'nın en yüksek floresan şiddeti

230 nm dalga boyu belirlenmiştir (Şekil 3.6 kırmızı pik). MTX konjuge edilmiş polimerik nano anti-TNF- α 'da polimerik nano anti-TNF- α 'nın uyarıldığı dalga boyunda uyarılmış ve floresan şiddetinde düşme gözlenmiştir (Şekil 3.5 siyah pik).

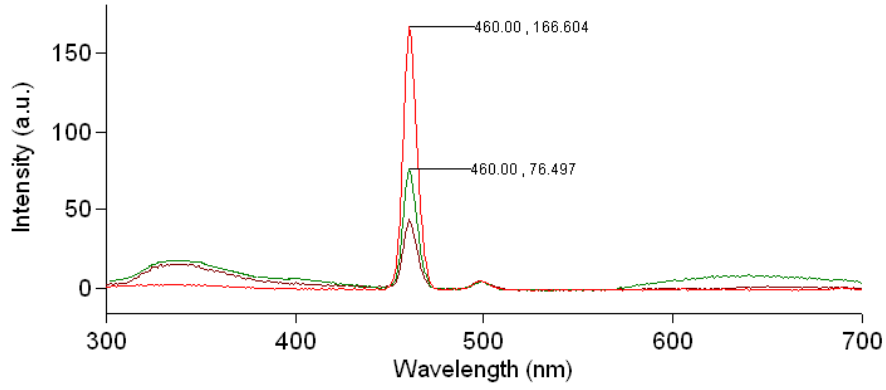


Şekil 3.6. Polimerik nano anti-TNF- α ve MTX konjuge edilmiş polimerik nano anti-TNF- α 'nın floresan şiddet değerleri

Polimerik nano anti-TNF- α 230 nm'de uyarılmıştır. Emisyon değeri 460.00 nm olarak belirlenmiştir. Floresan şiddeti ise 166.604 olarak ölçülmüştür (Şekil 3.6 kırmızı pik). MTX konjuge edilmiş polimerik nano anti-TNF- α 'da 230 nm'de uyarılmıştır. Emisyon değeri 460.00 nm olarak belirlenmiştir. Floresan şiddeti ise 164.645 olarak ölçülmüştür (Şekil 3.6 siyah pik).

3.1.7. Polimerik nano anti-TNF- α ile ticari TNF- α etkileşimi

Bu çalışmada, polimerik nano anti-TNF- α 'nın etkinliği, ticari TNF- α ile etkileştirilip floresanındaki değişime bağlı olarak belirlenmiştir. Polimerik nano anti-TNF- α 'nın floresan şiddeti Şekil 3.6'da da görüldüğü gibi 166.604 olarak belirtilmiştir. Ticari TNF- α 'nın floresan şiddeti ölçülmüş ve 50'nin altında küçük bir pik görülmüştür. Polimerik nano anti-TNF- α ile ticari TNF- α etkileşimi sonucu polimerik nano anti-TNF- α 'nın floresan şiddetinde düşme gözlenmiştir (Şekil 3.7).

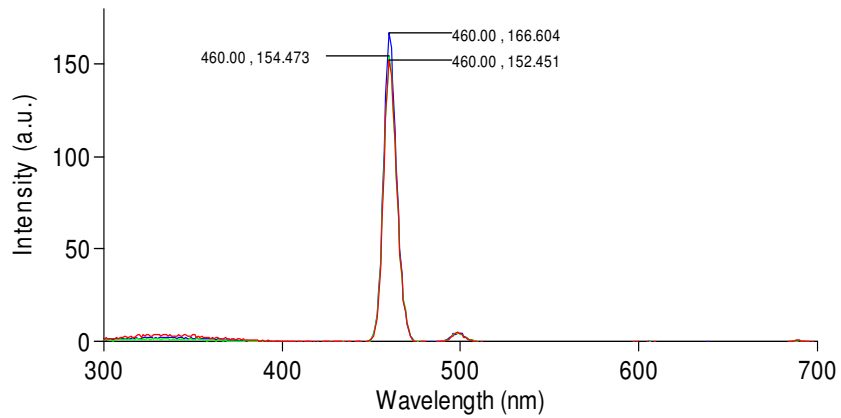


Şekil 3.7. Polimerik nano anti-TNF- α ve ticari TNF- α 'nın etkileşimi

Polimerik nano anti-TNF- α 'nın floresan şiddeti 166.604 olarak ölçülmüştür (Şekil 3.7 kırmızı pik). Ticari TNF- α 'da 230 nm'de uyarılmıştır. Floresan şiddeti 50' nin altındadır (Şekil 3.7 kahverengi pik), polimerik nano anti-TNF- α ve ticari TNF- α 'nın etkileşimi de 230 nm'de uyarılmıştır. Floresan şiddeti 76.497 düşmüştür.

3.1.8. Polimerik nano anti-TNF- α ile polimerik nano TNF- α karışımı

Eşit derişimlerde polimerik nano anti-TNF- α ile polimerik nano TNF- α 6 saat karıştırılmış ve karışımın floresan şiddeti ölçülmüştür (Şekil 3.8).



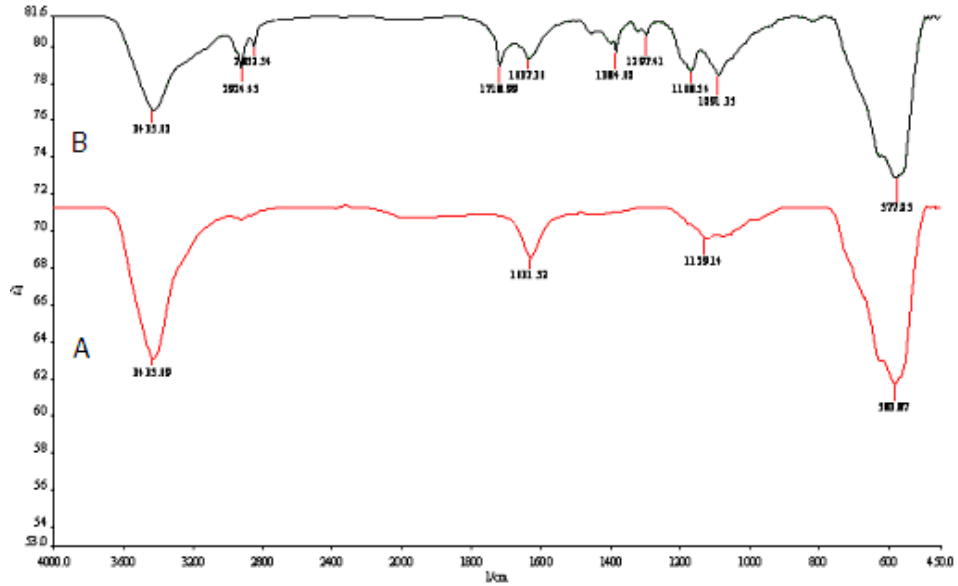
Şekil 3.8. Polimerik nano anti-TNF- α ile polimerik nano TNF- α etkileşimi

Polimerik nano anti-TNF- α 'nın floresan şiddeti 166.604 (Şekil 3.8 mavi pik), nano TNF- α 'nın floresan şiddeti 154.473 (Şekil 3.8 yeşil pik), polimerik nano anti-TNF- α ile polimerik nano TNF- α karışımının floresan şiddeti ise 152.451'dir.

3.2. Karakterizasyon Çalışmaları

3.2.1. FTIR analizi

Şekil 3.9'da SPN'lerin FT-IR spektrumu incelendiğinde CH anti simetrik ve simetrik gerinimi 2924 cm^{-1} 'de, O'ye bağlı CH_3 2852 cm^{-1} 'de görülmektedir. 1711 cm^{-1} de görülen pik TMSPM nin metakriloline ait karbonil bandına aittir. 1168 cm^{-1} ve 1091 cm^{-1} deki pikler ise Si-O-C gerinimine ait olup TMSPM yapısına ait karakteristik piklerdir.



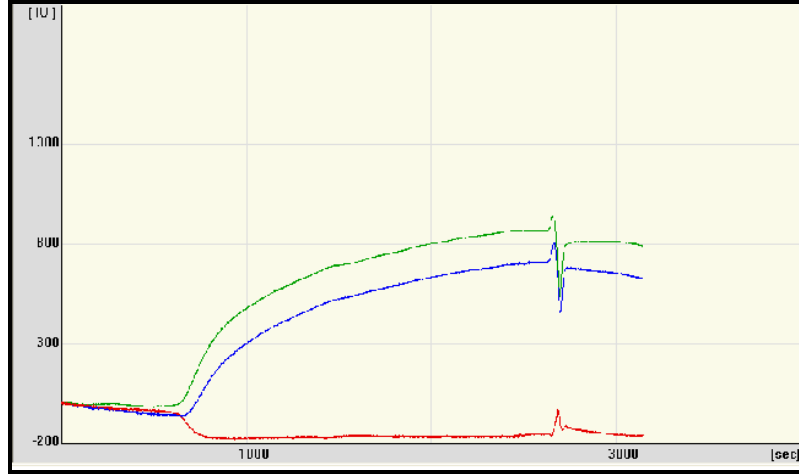
Şekil 3.9. a) SPN'lerin FT-IR spektrumu b) TMSPM ile modifiye edilmiş SPN'lerin FT-IR spektrumu

3.2.2. Boyut analizi

Polimerik nano TNF- α 'nın çapı 38.19 nm, polimerik nano anti-TNF- α 'nın çapı ise 38,86 nm olarak Zeta Sizer (Malvern Zeta Sizer Nano-ZS) kullanılarak elde edilmiştir.

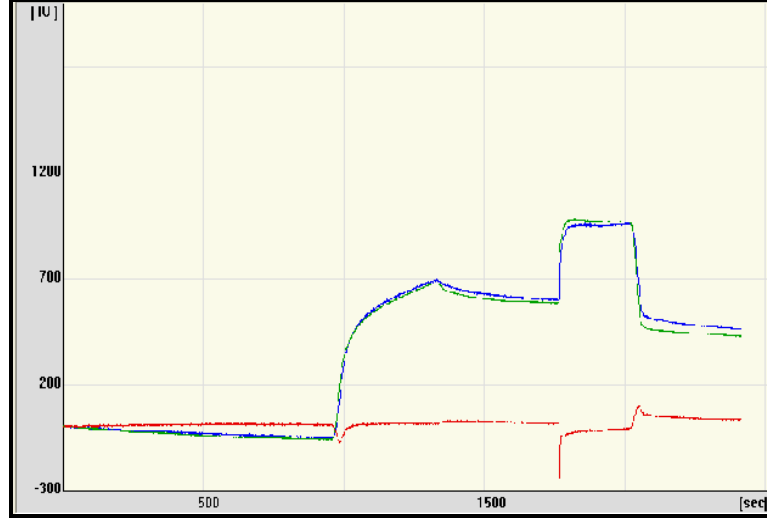
3.2.3. Reflektometrik interferans spektrofotometresi ile polimerik nano anti-TNF- α 'nin etkinliğinin analizi

CMD kaplı sensörler Şekil 3.10'da görüldüğü gibi artan pik doğrultusunda NHS/EDC ile aktive edilmişlerdir. Daha sonra HBS buffer ile yıkama yapılmış bağlanmayan NHS/EDC uzaklaştırıldığı için pikte düşme gözlenmiştir.



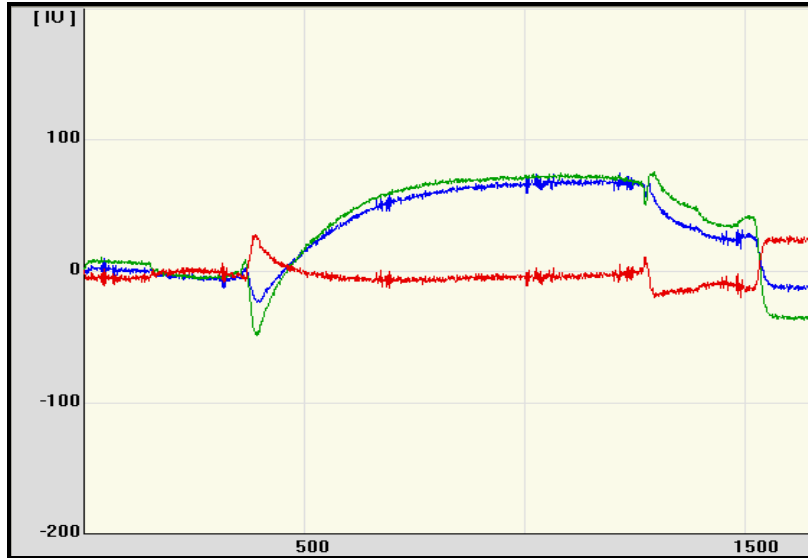
Şekil 3.10. CMD kaplı sensörlerin aktivasyonuna ait sensogram

Öncelikle RİFS cihazı ile TNF- α antikor ve antijeni arasındaki etkileşimi belirleyebilmek için sensör yüzeyine farklı konsantrasyonlarda ticari anti-TNF- α antikor immobilize edilmiş ve immobilizasyonun gerçekleştiği sensogram incelenerek belirlenmiştir (Şekil 3.11).



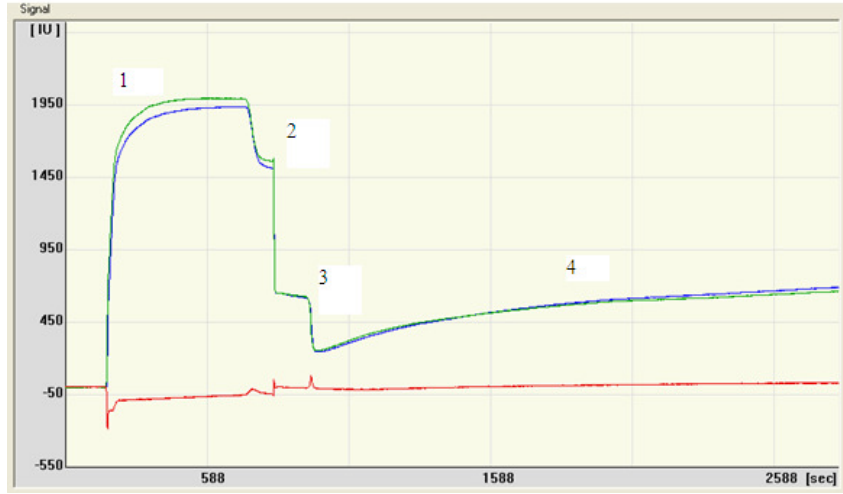
Şekil 3.11. Aktive edilmiş sensör yüzeylerine 10 mgL^{-1} lik anti-TNF- α immobilizasyonuna ait sensogram

Ticari anti-TNF- α immobilize edilmiş sensör yüzeyinden geçirilen TNF- α antijeni sensör yüzeyine bağlanmıştır ve böylece pikte artma gözlenmiştir. Yıkama sonucu antijen uzaklaştırılmış ve sensörün rejenerasyonu gerçekleştirilmiş ve pikte düşme gözlenmiştir (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. Antijen ile muamele sonucu bağlanma ve rejenerasyon

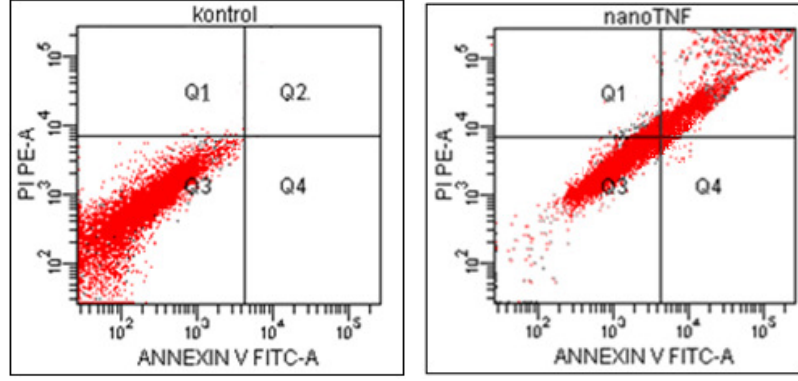
Elde edilen sonuçlar doğrultusunda yeni bir CMD sensör yüzeyi NHS/EDC ile aktive edilmiş ve artan pik gözlenmiş (Şekil 3.13-1), sonra yıkama ile bağlanmayan ajanlar uzaklaştırılmış böylece pikte düşme gözlenmiş (Şekil 3.13-2), daha sonra sentezlenen 1000 ppm polimerik nano anti-TNF- α sensör yüzeyine immobilize edilmiş (Şekil 3.13-3) ve son olarak 100 ngmL⁻¹ miktarında ticari TNF- α çözeltisi ortama verilmiş ve ticari TNF- α 'nın polimerik nano anti-TNF- α 'ya bağlandığı görülmüştür.



Şekil: 3.13. BIAffinity cihazı ile ticari TNF- α 'nın polimerik nano anti-TNF- α 'ya bağlanmasını gösteren sensogram

3.3. Akış Sitometrisi Sonuçları

Aşağıdaki Şekil 3.14-a kontrol hücrelerini göstermekte ve canlı hücre oranı Q₃ % 98.9'dir. 25 μ L DMSO ilavesi hücre kültüründe toksik etki göstermemiş canlılık oranı Q₃ % 90'ın üzerindedir. Polimerik nano TNF- α 'nın hücre kültüründeki etkisi ise Şekil 3.14-b gösterilmiştir.



Şekil 3.14. Kontrol hücresi ve polimerik nano TNF- α 'nın akış sitometri sonuçları

Şekil 3.14.'te görüldüğü gibi ilk şekil kontrol hücrelerinin akış sitometri sonuçları canlı hücre oranı (Q₃: % 98.9). İkinci şekil ise polimerik nano TNF- α 'nın akış sitometri sonuçları nekrotik hücre oranı (Q₁: % 8.5, geç apoptoz oranı (Q₂ : % 21.0), canlı hücre oranı (Q₃: % 62.9) ve erken apoptoz oranı (Q₄ : % 7.6).

4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada romatoid artrit hastalığının proinflamatuvar sitokinlerinden en önemlisi olan TNF- α 'nin ve iltihaplı dokudaki TNF- α reseptörlerinin bloke edilerek hastalık sürecinin durdurulması hedeflenmiştir. Sentezlenen yapılar MATyr-Ru(bipyridine)₂-MATyr sayesinde floresan özellik taşımaktadır bu da TNF- α antagonisti bu yeni nesil nanobiyobloklayıcılar hasta örnekleri ile etkileştirildiğinde floresan ve konfokal mikroskoplarında RA tayininin yapılabilmesine olanak sağlayacaktır. Ayrıca nanobiyobloklayıcıların sentez aşamasında superparamanyetik nanopartiküllerin kullanılması tayin aşamasında manyetik rezonans görüntüleme (MRI) cihazlarında hastalıklı dokunun tayin edilmesini sağlayacaktır. Metotreksatın sentez ürünlerine konjugasyonu ise hastalığın tanısı ve blokasyonunun yanı sıra tedavisinin de yapılabilmesini sağlayacaktır. Tüm bu sonuçlar doğrultusunda nanoteranostik özellik taşıyan yeni nesil nanobiyobloklayıcılar sentezlenmiştir. Ayrıca iltihaplı alana enjekte edilen polimerik yapıdaki TNF- α ve anti-TNF- α biyoajanları konjuge edilmiş HA korgosu, hem CD44 ile etkileşebilecek ve onu bağlayarak iltihaplı dokuda serbest halde dolaşan HA molekülüne bağlanması ve dolayısıyla iltihabı arttırıcı etki etmesi bloke edilmiş olacak hem de biyoajanlar ve metotreksat konjugasyonu ile tanı ve tedavi edici yönde etki edebilecektir.

Karakterizasyon çalışmalarında boyut analizi biyolojik numunelerin nano boyutta polimerize edilebileceğini göstermiştir. Yapılan floresan spektrofotometresi sonuçlarında görülen düşmeler moleküllerin birbirleri ile etkileştiğini, nanobiyo konjugasyonların istenen doğrultuda gerçekleştiğini ve oda sıcaklığında gerçekleşen polimerizasyon ile biyolojik numunelerin bozulmadan kalabileceğini göstermektedir. Kuantum noktalarının partikül boyutu onların floresan şiddetini arttırabilmektedir [Liu ve ark., 2008]. Bu bağlamda, kuantum noktalarına konjuge edilmiş TNF- α ve HA konjuge anti-TNF- α etkileşimi sonucu TNF- α ve anti-TNF- α 'nın etkinliğini korumasından dolayı birbirleri ile etkileşmesi böylece kuantum noktalarının boyutlarının büyümesi ve floresan değerinde artış olması beklenmiştir. Floresan spektrofotometre sonuçları da beklenen doğrultuda çıkmış ve sentez moleküllerindeki biyoaktif ajanların

etkinliğini koruduğunu göstermiştir. Ayrıca TNF- α ve anti-TNF- α konjuge edilmiş yapıların birbirileri ile etkileşimi sonucu emisyon şiddetinde azalmanın meydana gelmesi, moleküllerin bağlanması sonucunda elektronların hareket serbestisinin değişmiş olduğunu, konjuge haldeki anti-TNF- α 'nın antijen bağlama bölgesinin kapanmadığını ve TNF- α konjuge yapılar ile etkileştirildiğinde TNF- α 'yı bağlayabildiğini göstermiştir. Diğer bir analiz yöntemi ise reflektometrik interferans spektroskopisi ile yapılmıştır. Reflektometrik interferans spektroskopisinin sensör yüzeyi NHS/EDC ile aktive edilmiş ve nano anti-TNF- α sensör yüzeyine immobilize edilmiştir. Elde edilen pikler immobilizasyonun düzgün bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Bu sonuç nano anti-TNF- α 'nın NHS/EDC çapraz bağlayıcı ajanlar ile etkileşime girebileceğini göstermiştir. Bu doğrultuda NHS/EDC'nin nano anti-TNF- α 'ya konjugasyonu sağlanabilmekte ve metotreksat gibi ilaç unsurları sentezlenen nano yapılara konjuge edilebilmektedir. Reflektometrik interferans spektroskopisinin nano anti-TNF- α immobilize edilmiş sensör yüzeyinden ticari TNF- α geçirildiğinde, birbirleriyle olan etkileşimleri sonucu meydana gelen pik, nano anti-TNF- α 'nın etkinliğini koruduğunu ve antijen bağlama bölgesi ile TNF- α 'yı bağladığını göstermektedir.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda romatoid artrit hastalarından alınan örneklerle yapılan işlemler tekrarlandığında hastalığın tayininin ve tedavisinin gerçekleşeceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Akdamar, H. A. (2007), "Hyaluronik asit saflaştırılması ve yara iyileştirme amaçlı kullanımı," Tez (yüksek lisans) - Anadolu Üniversitesi
- Andreaskos, E.T., Foxwell, B.M., Brennan, F.M., Maini, R.N. ve Feldmann, M. (2002) "Cytokines and anti-cytokine biologicals in autoimmunity: present and future", *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **13**, 299–313
- Bard, A.J. (2004) "Electrogenerated chemiluminescence", *Marcel Dekker, Inc.*, Sayfa 3
- Barrera, P., Oyen, W.J.G., Boerman, O.C., Van Riel, P.L.C.M. (2003), "Scintigraphic detection of tumour necrosis factor in patients with rheumatoid arthritis," *Ann. Rheum. Dis.*, **62**, 825–828
- Bimberg, D., Grundmann, M., Ledentsov, N.N (1999) Quantum Dot Heterostructures", John Wiley&Sons Ltd.
- Carteron, N. L. (2000), "Cytokines in rheumatoid arthritis: trials and tribulations," *Molecular Medicine Today*, **6**, 315-323
- Chou, C.L., Li, H.V., Lee, S.H., Tsai, K.L., Ling H.Y. (2008), "Effect of Intra-articular Injection of Hyaluronic Acid in Rheumatoid Arthritis Patients with Knee Osteoarthritis," *J. Chin. Med. Assoc.*, **71**, 411–415
- Choy, E. H. S., Panayi, G.S. (2001), "Cytokine Pathways and Joint Inflammation in Rheumatoid Arthritis," *N. Engl. J. Med.*, **344**,907
- Christopher, J. E. (2005)," Immunological therapies for rheumatoid arthritis," *British Medical Bulletin*, **73**, 71–82
- Costenbader, K.H. ve Karlson, E.W. (2006), "Epstein–Barr virus and rheumatoid arthritis: is there a link?", *Arthritis Res Ther.* , **8**, 204
- DeSilva, N.S. (2003) "Interactions of Surfactant Protein D with Fatty Acids", *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **29**, 757-770
- Dinant, H.J. ve Dijkmans, B.A.C. (1999), "New therapeutic targets for rheumatoid arthritis," *Pharm. World Sci.*, **21**, 49-59

- Dinarello, CA. (2005), "Differences between anti-tumor necrosis factor- α monoclonal antibodies and soluble TNF receptors in host defense impairment," *J Rheumatol Suppl*, **74**, 40-7
- Elliott, M.J., Maini R.N. (1994), "New directions for biological therapy in rheumatoid arthritis," *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **104**, 112-25
- Elliott, M.J., Feldmann, M. ve Maini, R.N. (1995), "TNF α blockade in rheumatoid arthritis: Rationale, clinical outcomes and mechanisms of action," *International Journal of Immunopharmacology*, **17**, 141-145
- Espina, V., Wulfkühle, J., Calvert, V.S., Liotta, L.A., (2008) "Reverse phase protein microarrays for theranostics and patient-tailored therapy", *Methods Mol Biol.* **441**, 113-28.
- Feldmann, M. ve Maini, R.N. (2001), "Anti-TNF- α therapy of Rheumatoid Arthritis : What have we learned?", *Annu. Rev. Immunol.*, **19**, 163-96
- Forster, R.J., Bertoncello, P. ve Keyes T.E. (2009) "Electrogenerated Chemiluminescence", *Annual Review of Analytical Chemistry*, **2**, 359-385
- Gao ve ark., (2004) "In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots", *Nature Biotechnology*
- Grabarek, Z. and Gergely, J. (1990) "Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters", *Anal. Biochem.* **185**, 131-135
- Hamuryudan, V. (2003), Romatolojik Hastalıklar Sempozyum Dizisi, **34**, 19-29
- Hermanson, G.T. (1996), "Bioconjugate Techniques", *Academic Press*
- Hezinger A.F.E., TeBmar J., Göbferich A., (2008) "Polymer coating of quantum dots – A powerful tool toward diagnostics and sensorics", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **68**, 138–152
- Hür, D., Ekti, S.F., Say, R. (2007), "N-Acylbenzotriazole Mediated Synthesis of Some Methacrylamido Amino Acids," *Letters in Organic Chemistry*, **4**, 585-587
- Jones, E.Y., Stuart, D.I., Walker, N.P.C. (1989), "Structure of tumour necrosis factor", *Nature* **338**, 225-228
- Josef, S. S. ve Günter, S. (2003), "Therapeutic Strategies For Rheumatoid Arthritis", *Nature Reviews Drug Discovery*, **2**, 473-488

- Karaboz, İ., Kayar, E., Akar, S. (2008) "Flow Sitometri ve Kullanım Alanları" *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, **6**, 2, 01-18
- Kassiotis, G. ve Kollias, G. (2001), "TNF and receptors in organ-specific autoimmune disease: multi-layered functioning mirrored in animal models", *The Journal of Clinical Investigation*, **107**, 1507-1508
- Kim, N., Sudol, E.D., Dimonie, V.L., El-Aasser, M.S. (2004), "Comparison of Conventional and Miniemulsion Copolymerizations of Acrylic Monomers Using Poly(Vinyl Alcohol) (PVA) as the Sole Stabilizer", *Macromolecules*, **37**, 2427
- Kobayashi, K., Matsuzaka, S., Yoshida, Y., Miyauchi, S., Wada, Y., Moriya, H. (2004), "The effects of intraarticularly injected sodium hyaluronate on levels of intact aggrecan and nitric oxide in the joint fluid of patients with knee osteoarthritis", *Osteoarthritis Cartilage*, **12**, 536-42
- Lee, D.M. ve Weinblatt, M.E. (2001), "Rheumatoid arthritis", *Lancet*, **358**, 903-11
- Liu, W., Howarth, M., Greytak, A.B., Zheng, Y., Nocera, D.G. (2008), "Compact Biocompatible Quantum Dots Functionalized for Cellular Imaging", *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 1274-1284
- Luo, H., Li, N.B., Lio, S.P., (2005), "Resonance Rayleigh scattering study of interaction of hyaluronic acid with ethyl violet dye and its analytical application," *Biosensors and Bioelectronics*, **45**, 81-86
- Maini, R.N., Elliott, M.J., Brennan, F.M., Williams, R.O., Chu, C.Q., Paleolog, E., Charles, P.J., Taylor, P.C., Feldmann, M. (1995), "Monoclonal anti-TNF alpha antibody as a probe of pathogenesis and therapy of rheumatoid disease", *Immunol Rev.*, **144**, 95-223
- Maini, R.N., Elliott, M.J., Brennan, F.M. ve Feldmann, M. (1995) "Beneficial effects of tumour necrosis factor-alpha (TNF-a) blockade in rheumatoid arthritis (RA)", *Clin Exp Immunol*, **101**, 207-212
- Meyer, K., Palmer, J.W. (1934), "The Polysaccharide of The Vitreous Humor", *J. Biol. Chem.*, **107**, 626-34

- Moreland, L.W. (2003), "Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action", *Arthritis Res. Ther.*, **5**, 54–67
- Möhrle, B.P., Köhler, K., Jaehrling, J., Brock, R. ve Gauglitz, G. (2006), "Label-free characterization of cell adhesion using reflectometric interference spectroscopy (RIFS)", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **384**, 407-413
- Naor, D., Nedvetzki, S. (2003), "CD44 in rheumatoid arthritis", *Arthritis Res. Ther.*, **5**, 105–115
- Odian, G.G (1970), "Principles of Polymerization", McGrawHill, New York yayını
- Proll, G., Kumpf, M., Mehlmann, M., Tschmelak, J., Griffith, G., Abuknesha, R., Gauglitz, G. (2004) "Monitoring an antibody affinity chromatography with a label-free optical biosensor technique", *J Immunol Methods*, **292**, 35–42
- Pröll, F., Möhrle, B., Kumpf, M., Gauglitz, G. (2005), "Label-free characterisation of oligonucleotide hybridisation using reflectometric interference spectroscopy", *Anal Bioanal Chem* **382**, 1889–1894
- Randomized, A., (1999), "Etanercept Therapy in Rheumatoid Arthritis", *Ann Intern Med*, **130**, 478-486.
- Reimold, AM. (2003), "New indications for treatment of chronic inflammation by TNF-alpha blockade," *Am J Med Sci*, **325**, 75-92.
- Richter, M.M (2004), "Electrochemiluminescence (ECL)", *Chem. Rev.* **104**, 3003-36
- Rindfleisch, A. ve Muller, D. (2005), "Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis", *American Family Physician*, **72**, 1037-47
- Saari, H ve ark., (1993), "Differential effects of reactive oxygen species on native synovial fluid and purified human umbilical cord hyaluronate," *Inflammation*, **17**, 403-415
- Scallon, B, Cai, A, Solowski, N, ve ark. (2002), "Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists," *J Pharmacol Exp Ther* **301**, 418-26.

- Scallon, B.J., Moore, M.A., Trinh, H., Knight, D.M., ve Ghayeb, J. (1995), "Chimeric anti-TNF-alpha monoclonal antibody cA2 binds recombinant transmembrane TNF-alpha and activates immune effector functions," *Cytokine*, **7**, 251-9.
- Scott, D. L. ve Kingsley, G.H. (2006), "Tumor Necrosis Factor Inhibitors for Rheumatoid Arthritis", *N. Engl. J. Med.*, **355**, 704,
- Shigemori, M., Takei, S., Imanaka, H., Maeno, N., Hokonohara, M., Miyata, K. (2002), "Diagnostic significance of increased serum hyaluronic acid in juvenile rheumatoid arthritis", *Pediatrics International*, **44**, 394-399
- Smolen, J.S. ve Steiner, G. (2003), "Therapeutic Strategies For Rheumatoid Arthritis", *Nature Reviews-Drug Discovery*, **2**, 473-88
- Staros, J.V., Wright, R.W. and Swingle, D.M. (1986) "Enhancement by *N*-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions", *Anal. Biochem.* **156**, 220-222
- Tracey, D., Klareskog, L., Sasso, E.H., Salfeld, J.G., Tak, P.P. (2008), "Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action." *Pharmacology & Therapeutics* **117**, 244-279
- Waterston, A., Bower M. (2004), "TNF and cancer: good or bad?", *Cancer Therapy*, **2**, 131-148
- Wong, M., Ziring, D., Korin, Y., Desai, S., Kim, S., Lin, J., Gjertson, D., Braun, J., Reed, E., Singh, R. R. (2008), "TNF α blockade in human diseases: Mechanisms and future directions," *Clinical Immunology*, **126**, 121-136