

**TÜBÜLİN BLOKLAYICI
İLAÇ TAŞIYICI
NANOPARTİKÜLER SİSTEMLER**

Şennur GÖRGÜLÜ
Yüksek Lisans Tezi
İleri Teknolojiler Anabilim Dalı
Eylül 2010

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Şennur GÖRGÜLÜ'nün "**Tübülin Bloklayıcı İlaç Taşıyıcı Nanopartiküler Sistemler**" başlıklı **İleri Teknolojiler** Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi 28 Temmuz 2010 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) :	Doç. Dr. LÜTFİ GENÇ
Üye :	Prof. Dr. RIDVAN SAY
Üye :	Yard. Doç. Dr. AYÇA ATILIR ÖZCAN

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

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TÜBÜLİN BLOKLAYICI İLAÇ TAŞIYICI NANOPARTİKÜLER SİSTEMLER

Şennur GÖRGÜLÜ

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Lütfi GENÇ

2010, 80 sayfa

Ökaryotik hücrelerde sitoplazmaya doğru yayılan protein filamanları ağından oluşan hücre iskeleti prokaryotlardan farklı olarak ileri düzeyde bir organizasyon sağlamak amacıyla bulunur ve üç temel protein filaman tipinden meydana gelir. Bu önemli temel hücre iskeleti elemanlarından biri mikrotübüllerdir. Mikrotübüllerin yapı taşı olan tübülünler ise hücre içinde devamlı yapılanıp ayrışabilen ve bu sayede organellerin hücre içinde taşınması, mitoz sırasında kromozomların ayrılması gibi pek çok görevde yer alan globüler proteinlerdir. Bu proteinlerin yapılanması ve dinamik kararsızlığı kanser gibi hastalıklarda anti mitotik ajanlar yardımıyla tedavi amaçlı araştırılmaktadır.

Bu çalışmada, tübülün blokasyonuna yönelik anti tübülün antikoru ile konjuge edilmiş kuvantum nokta nanopartikülleri ve Rutenyum ile floresan özelliğe sahip biyobloklayıcı konjugatlar sentezlenmiştir. Aynı zamanda bu polimere anti mitotik bir ajan olan Nokodazol ve Annexin bağlanmış ve bu sayede polimere görüntüleme, taşıma, hedefleme ve tedavi edici özellikler kazandırılması amaçlanmıştır. Sentezlenen biyokonjugatların *in vitro* ortamda anti kanser aktiviteleri MTT ve Akış sitometri yöntemi ile değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Mikrotübül, Kuvantum nokta, Anti Tübülün Antikoru, Nokodazol, Anti Kanser

ABSTRACT

Master of Science Thesis

TUBULIN BLOCKER DRUG CARRIER NANOPARTICULAR SYSTEMS

Şennur GÖRGÜLÜ

Anadolu University

Graduate School of Sciences

Advanced Technologies Program

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Lütfi GENÇ

2010, 80 pages

Cytoskeleton formed by protein filaments network spreading through cytoplasm in eucaryotic cells -unlike that of procaryotic cells- is organised in an advanced form and consists of three essential protein filament types. Microtubules are one of this important cytoskeleton components. Tubulins, constituents of microtubules, are continuously polymerized and depolymerized elements inside the cell, and are important globular proteins charged in many operations such as moving organelles, separation of chromosomes during mytosis, etc... Polymerization and dynamical instability of these proteins are now subjects to researches for treatment of diseases like cancer by charging anti-myototic agents.

In this study, quantum dot nanoparticules which are conjugated by anti tubulin antibodies aimed to block tubulins, and ruthenium-fluorescended bioblocker conjugates are syntesized. Concurrently, it is aimed to bring this polymer abilities of conveying, targeting, and curing features by binding Nocodazole and Annexin which are anti-myototic agents. Activity of bioconjugates are evaluated *in vitro*, using MTT and Flow cytometry assays.

Key Words: Microtubul, Quantum Dot, Anti Tubulin Antibody, Nocodazole, Anti Cancer

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bana her zaman destek çıkıp yol gösteren, her türlü ihtiyacıma çözüm üretmeye çalışan, Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi (BİBAM) bünyesindeki imkanlardan sonuna kadar faydalanmam için elinden geleni yapan, ilgi ve anlayışına sığındığım Danışmanım Sayın Doç. Dr. Lütfi GENÇ'e,

Çalışmalarım için bilgi birikimi ile yeni ufuklara yelken açmamı sağlayan, laboratuvar imkanlarından faydalanmama fırsat sunan, yol göstericiliği ve değerli katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr. Rıdvan SAY'a ve Sayın Prof. Dr. Arzu ERSÖZ'e

Dertlerimi dinlemekten bıkmayan, deneysel ve teorik çalışmalarım boyunca ilgi ve yardımıyla hep yanımda olan çok sevdiğim hocam Yard. Doç. Dr. Ayça ATILIR ÖZCAN'a,

Hücre kültürü alanında tecrübelerinden ve imkanlarından yararlandığım değerli hocalarım Yard. Doç. Dr. Miriş DİKMEN'e ve Öğr. Gör. Zerrin CANTÜRK'e,

Tecrübelerini benimle paylaşan ve yardımlarından faydalandığım Arş. Gör. Gözde AYDOĞAN KILIÇ'a,

Eksik kaldığım alanlarda beni tamamlayan sevgili arkadaşlarım Uzm. Sibel BÜYÜKTİRYAKI, Arş. Gör. Özlem BİÇEN, Suzan YAZAR, Esra MUSLU ve Gamze GÜNEY'e,

Fen ve Eczacılık fakültelerinde üzerimde emeği olan tüm hocalarıma ve BİBAM personeline,

Gerektiğinde çeviri sıkıntılara çözüm üretebilmek için çabalayan arkadaşım Ahmet ÖZEN'e,

Beni yetiştirip bu günlere getiren, maddi manevi tüm sıkıntılarında sevgi, emek ve desteklerini benden bir an olsun eksik etmeyen, moral kaynağım biricik ANNEM ve BABAM'a,

Tecrübelerinden her fırsatta faydalandığım, yardımlarını hiçbir koşulda benden esirgemeyen, stresli zamanlarımda bana üstün sabırla katlanabilen biricik ABİM'e,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Şennur GÖRGÜLÜ

Eylül 2010

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. HÜCRE İSKELETİ VE HÜCRE HAREKETLERİ	3
2.1. Aktin Filamanlar.....	3
2.2. Ara Filamanlar	5
2.3. Mikrotübüller	6
2.3.1. Mikrotübüllerin yapısı, yapılanması ve dinamik kararsızlığı	6
2.3.2. Sentrozom, sentriyoller ve mikrotübül düzenlenmesi	9
2.3.3. Mitoz sırasında mikrotübüllerin yeniden düzenlenmesi.....	11
2.3.4. Mikrotübüllerin kararlılığı ve hücre polaritesi.....	14
2.3.5. Mikrotübül motorları ve hareket.....	15
2.3.6. Mikrotübül motor proteinlerinin tanımlanması	15
2.3.7. Organel taşınması ve hücre içi düzenlenme	18
2.3.8. Mitotik kromozomların ayrılması.....	19
2.3.9. Kirpikler ve kamçılar	20
3. ANTİMİTOTİK, KEMOTERAPÖTİK İLAÇLAR İLE KANSER İLİŞKİSİ	23
3.1. Mitotik İğ (Spindle): Antikanser İlaçlarının Başlıca Hedefi Mikrotübüller	24

3.2. Mitoz	25
3.3. İğ Kontrol Noktası.....	28
3.4. Mikrotübül Bağlayıcı Antikanser İlaçlar.....	29
3.5. Mikrotübül Bağlayıcı Anti Kanser İlaç Olarak Kullanılan Nokodazol.....	30
4. KONTROLLÜ SALIM SİSTEMLERİNİN HEDEFLENDİRİLMESİ	33
4.1. Hedeflendirmenin Amacı	33
4.2. İlaçların Hedeflendirilme Nedenleri	33
4.3. Hedeflendirilen İlaç Taşıyıcı Sistemlerin İdeal Özellikleri	34
4.4. İlaçların Hedeflendirilmesinde Temel Yaklaşımlar.....	35
4.5. Aktif Hedeflendirme Mekanizması.....	36
4.5.1. Ligand-reseptör aracılı hedeflendirme.....	36
4.6. Nanopartikül Taşıyıcı Sistemler.....	38
4.6.1. Kuantum nokta nanopartiküller (Quantum Dot, QD).....	39
5. BİYOKONJUGASYON	44
5.1. Rutenyum Bipiridin Kromoforu.....	44
5.2. Biyokonjugasyon İşlemlerinde Kullanılan Çapraz Bağlayıcı Ajanlar (EDC ve NHS)	46
5.2.1. EDC	46
5.2.2. NHS ve sulfo-NHS	48
5.3. ANADOLUCA Metodu	50
6. KULLANILAN ÖNEMLİ YÖNTEMLERİN PRENSİPLERİ	51
6.1. Mitokondriyal Aktivite Testi (MTT) Uygulanışı.....	51
6.2. Akış Sitometrisi.....	51
6.3. Floresan Spektrofotometresi	54
7. MATERYAL METOT	55
7.1. Kullanılan Kimyasallar.....	55
7.2. Kullanılan Cihazlar	55
7.3. Cds/Kuantum Noktalarına (QD) Anti Tübülün Konjugasyonu	55

7.4 Anti Tübülün Konjuge QD’ların Hücrelerdeki Tübülün İle Etkileşimi	56
7.5. QD Konjuge Polimerik Anti Tübülün İle Nokodazol (NOK) Konjugasyonu	57
7.6. Annexin V ile İşaretlenmiş QD Konjugatının Hazırlanması	57
7.7. Sıçan Embriyo Fibroblast Hücreleri ve İnsan Meme Kanseri Hücreleri ile Hücre Kültürü Uygulamaları	58
7.7.1. Stoktan hücre çıkarma	58
7.7.2. Hücre dizilerinin pasajlanması ve sayımı	58
7.7.3. Hücreleri stoklama	59
7.7.4. Mitokondriyal aktivite testi (MTT) uygulaması	59
7.7.5. Akış sitometrisi ölçümleri için hücrelerin hazırlanması	60
7.7.6. Boyama prosedürünün uygulanması	61
8. BULGULAR	62
8.1. Spektrofotometrik Ölçümler	62
8.1.1. QD-Nanobiyokonjugat ve ilaç etkileşiminin gösterilmesi	62
8.1.2. QD-Nanobiyokonjugatı ve hücre kokteyli etkileşiminin gösterilmesi	62
8.1.3. Annexin V boyası ile bağlanmış biyokonjugatın gösterilmesi	63
8.2. Hücre Kültürü Analizlerinin değerlendirilmesi	64
8.2.1. MTT sonuçlarının değerlendirilmesi	64
8.2.2. MCF-7 hücrelerinde anti kanser aktivitenin değerlendirilmesi	67
8.2.3. Akış sitometrisinde ölçümleri yapılan hücrelerin değerlendirilmesi ...	68
8.2.4. Boyama sonrasında elde edilen floresan mikroskopu görüntüleri	70
9. SONUÇ	76
KAYNAKLAR	78

ŞEKİLLER DİZİNİ

2.1. Bir aktin monomeri ve aktin filamanı	4
2.2. α , β ve γ -tübülün (γ -TuRC).....	7
2.3. Mikrotübül ve mikrotübül alt ünitesinin yapısı.....	8
2.4. Hayvan hücrelerinde mitoz ve sitokinez evreleri.....	13
3.1. Nokodazolün kimyasal yapısı	30
5.1. Rutenyum'un moleküler yapısı	44
5.2. Ru(bpy) ₃ ²⁺ mekanizması	45
5.3. Biyolojik molekülerin ECL işaretlenmesi için Ru(bpy) ₃ ²⁺ - NHS.....	46
5.4. EDC'nin molekül yapısı.....	47
5.5. EDC reaksiyonu	47
5.6. Kimyasal Modifikasyon Reaktifleri NHS ve Sulfo-NHS'nin Yapısı	49
6.1. Annexin V-FITC and PI ile boyanmış 9L gliosarkoma hücrelerinin in vitro görüntüleri	53
8.1. QD biyokojugatına ilaç etkileşimi	62
8.2. QD biyokojugatu ve hücre kokteyli etkileşimi	63
8.3. Annexin V Boyası İle Bağlanmış Polimerlerin etkileşimi.....	63
8.4. 24 saatlik MTT inkübasyonu sonucunda 540 nm dalga boyunda okutulan QD % canlılık değerleri ve standart sapma.....	66
8.5. 24 saatlik MTT inkübasyonu sonucunda 540 nm dalga boyunda okutulan QD-Nokodazol % canlılık değerleri ve standart sapma.....	66
8.6. MCF-7 hücrelerin madde verildikten sonraki ışık mikroskobu görüntüleri ..	67
8.7. Kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin akış sitometrisinde değerlendirilmesi....	68
8.8. QD konjuge anti tübülün ve Nokodazol içeren MCF-7 hücrelerinin akış sitometrisinde değerlendirilmesi	69
8.9. 10 μ g/ml ve 20 μ g/ml Anti tübülün konjuge edilmiş Nokodazol bağlı QD içeren MCF-7 hücrelerinin akış sitometrisinde değerlendirilmesi.....	69

8.10. 30 µg/ml ve 40 µg/ml Anti tubulin konjuge edilmiş Nokodazol bağlı QD içeren MCF-7 hücrelerinin akış sitometrisinde değerlendirilmesi	69
8.11. a ve b MCF-7 QD boyama	71
8.12. MCF-7 QD-anti tübülün boyama	72
8.13. MCF-7 QD-anti tübülün-Nokodazol.....	72
8.14. MCF-7 a) QD-anti tübülün ve b) QD-anti tübülün-Nokodazol.....	73
8.15. 3T3 Annexin-anti-tübülün-QD boyama.....	74
8.16. MCF-7 Annexin-anti-tübülün-QD boyama	74
8.17. 3T3 Nokodazol-Annexin-anti-tübülün-QD boyama ve Anafaz.....	75
8.18. MCF-7 Nokodazol-anti-tübülün-QD boyama, profaz ve prometafaz.....	75

TABLÖLAR DİZİNİ

4.1. İlaçların hedeflendirilme nedenleri	34
4.2. Hedeflendirilen ilaç taşıyıcı sistemlerin ideal özellikleri.....	34
8.1. 24 saatlik MTT inkübasyonu sonuçlarına göre QD % canlılık değerleri ve standart sapma.....	64
8. 2. 24 saatlik MTT inkübasyonu sonuçlarına göre QD-Nokodazol % canlılık değerleri ve standart sapma.....	65

1. GİRİŞ

Kesin nedenleri bilinmeyen ve tedavisi henüz mümkün olmayan günümüzün korkulu hastalıklarından kanser, organizmadaki bazı hücrelerin kontrolsüz çoğalmaları sonucu ortaya çıkmaktadır. Günümüzde kanserleşen hücrelerin çoğalmalarını geciktirmek ya da durdurmak amacı ile uygulanan kemoterapötik tedavilerde ise çeşitli antimitotik kimyasallar kullanılmaktadır. Henüz, sadece kanserleşen hücreler üzerine etkili olan antimitotik maddelerin bulunmaması yanında, bu amaçla kullanılan kimyasalların, hücre iskeleti elemanlarından olan mikrotübüller üzerindeki etkileri de tam olarak bilinmemektedir. Ayrıca bu amaçla kullanılan ilaçların seçici olmaması ve tedavi sırasında normal vücut hücrelerine zarar vermeleri önemli bir dezavantajdır.

Araştırılmasının mutlaka gerekli olduğu düşünülerek, antimitotik kimyasalların hücrede mikrotübüller üzerine etkilerinin incelenmesi ile yapılan diğer ilgili çalışmalara katkıda bulunmak amacıyla araştırmalar hala devam etmektedir.

Günümüzde yapılan kanser araştırmalarının çoğu, kanserleşen hücrelerin çoğalmasını önleyen kemoterapik uygulamalara yöneliktir. Hücre araştırmalarından elde edilen bilgiler, hücre iskeleti elemanlarından özellikle mikrotübüllerin hücre hareketleri, hücre organelleri ve mitoz sırasında kromozomların yer değiştirmesinde görev aldıklarını göstermiştir. Ayrıca kolşisin gibi bazı kimyasalların, mikrotübül polimerizasyonunu önleyerek, hücreler üzerinde antimitotik etki yaptıkları da çalışmalarla ortaya konmuştur. Bu nedenle, kanserleşerek kontrolsüz çoğalan hücrelerdeki mikrotübüllerin polimerizasyonunu önleyen ya da depolimerize eden kimyasallar, kanser tedavisi için kullanılmaktadır.

Kanser tedavisinde kullanılmalarına karşın, antimitotik kimyasalların normal hücreler üzerinde de etkili olması yanı sıra etkilerinin geri dönüşümlü olduğu da bilinmektedir. Bazı antimitotik maddelerin hücreler üzerindeki etkilerinin kalıcı olduğu ve mikrotübüller üzerine etkilerinin de farklılık gösterdiği saptanmıştır (Zeytinoğlu M., 1995). Bu nedenle, farklı farmasötik dozaj şekilleri (nanopartiküller, lipozomlar, mikrokapsüller, akıllı ilaçlar, ilaç hedeflendirme

gibi..) hazırlanarak, sadece kanserli dokularda ilaç salıverilmektedir. Bu sayede hasta tedavi sırasındaki yan etkilere daha az maruz kalmakta ve hedeflenen bölgeye yönelik tedavi amaçlanmaktadır.

2. HÜCRE İSKELETİ VE HÜCRE HAREKETLERİ

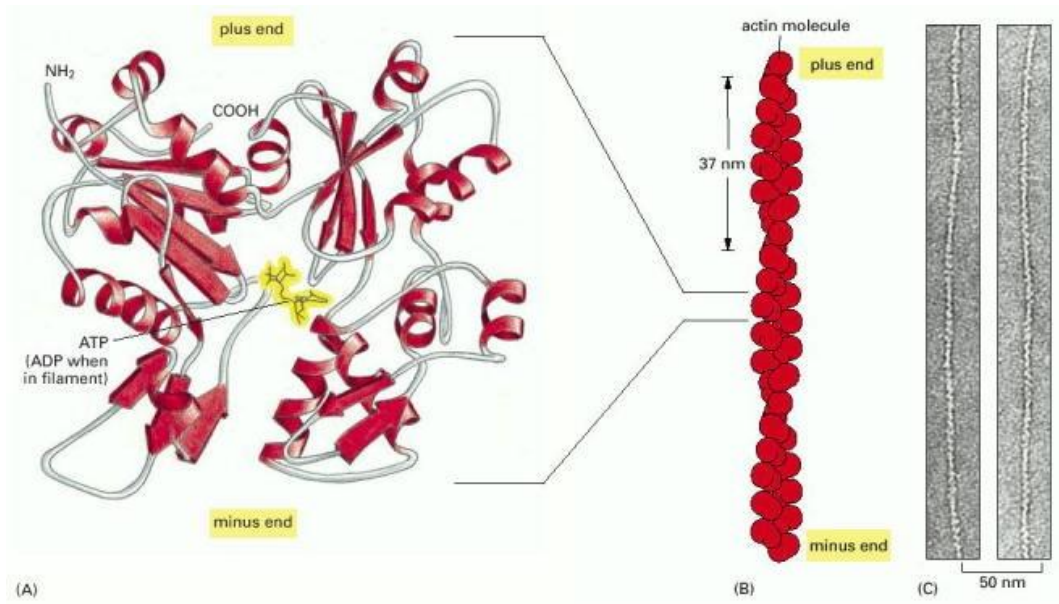
Prokaryotik hücrelerden farklı olarak tüm ökaryotik hücrelerde sitoplazmaya doğru yayılan protein filamanları ağından oluşan hücre iskeleti ile daha ileri düzeyde bir organizasyon sağlanır. Hücre iskeleti hücre için yapısal bir çerçeve saplar, hücre şeklini ve sitoplazmanın organizasyonunu belirleyen bir yapı iskelesi görevi yapar. Bu yapısal görevlerine ek olarak, hücre iskeleti hücre hareketlerinin gerçekleşmesinden sorumludur. Hücre hareketleri, yalnızca hücrelerin bütünsel hareketlerini değil, aynı zamanda organellerin ve mitotik kromozom gibi diğer bazı yapıların sitoplazma boyunca hücre içinde taşınmasını da içerir. Hücre iskeleti, adının çağrıştırdığı kadar sert ve değişmez bir yapı değildir. Bunun yerine, örneğin hücre bölünmesi sırasında hücrelerin hareket etmesi ve şekil değiştirmesi için sürekli yeniden düzenlenen dinamik bir yapıdır.

Hücre iskeleti üç temel protein filaman tipinden oluşmuştur: aktin filamanları, ara filamanlar ve mikrotübüller. Bunlar bir arada bulunurlar ve çok sayıda aksesuar protein aracılığıyla hücre içi organeller ve plazma zarı ile bağlantılıdır (Sakızlı M. ve Atabey N., 2006).

2.1. Aktin Filamanlar

Aktin, ilk olarak 1942 yılında, toplam hücre proteinlerinin % 20' sini oluşturduğu kas hücrelerinden izole edilmiştir. Başlangıçta sadece kas kasılması ile ilişkili olduğu düşünülse de, artık tüm ökaryot hücrelerinde en fazla bulunan protein (toplam proteinin % 5-10' u) olduğu bilinmektedir. Çoğu hücre için ana hücre iskeleti proteini aktindir, aktin proteini “mikrofilamanlar” olarak adlandırılan aktin filamanlarına polimerleşir. Bu ince, esnek lifler yaklaşık 7 nm çapında ve birkaç mikrometre uzunluğunda, yarı katı jel özelliğinde paketler, ya da üç boyutlu ağ yapısı oluşturacak, çok iyi düzenlenmiş bir yapı halinde organize olurlar. Şekil 2.1.' de A ile gösterilen “Aktin monomer”, molekülün merkezindeki derin yarık içinde bir nükleotid bağa sahiptir. B ile gösterilen monomerin filaman içinde düzenlenmesini göstermektedir. Filaman, çoğu zaman monomerin tek heliksi olarak tanımlansa da, lateral temasla bir arada tutulan, her 37 nm'de bir

devamlı tekrarlanmasıyla, iki paralel heliks çizgisi gibi birbirlerini saran iki protofilamandan oluşabilir. Filaman içindeki tüm alt üniteler aynı uyuma sahiptir. C ile gösterilen bir aktin filamanının elektron mikrograf görüntüsüdür (Şekil 2.1.) (Alberts ve ark., 2002). Hem aktin moleküllerinin, hem de aktin filamanlarının üç boyutlu yapısı 1990' da belirlenmiştir. Aktin filamanlarının bir araya gelmesi ve ayrılması, paketler ve birbirleri ile ağ oluşturacak şekilde çapraz bağlantılar yapmaları ve diğer hücresel yapılar (plazma zarı gibi) ile etkileşimleri çok sayıda aktin bağlayan protein ile düzenlenir. Bu proteinler, aktin hücre iskeletinin önemli elemanlarıdır; aktin filamanlarının hem yapılımasını, hem de ayrışmasını düzenlerler. Aktin filamanları özellikle plazma zarının hemen altında; mekanik destek sağlayacak, hücre şeklini belirleyecek ve hücrelerin yüzey hareketlerinin gerçekleştirilmesine böylece hücrelerin göç etmesi, partikül alması ve bölünmesine olanak sağlayacak bir ağ oluşturur (Sakızlı M. ve Atabey N., 2006).



Şekil 2.1. Bir aktin monomeri ve aktin filamanı¹

Aktin molekülleri 375 amino asitlik (43 kd) globüler proteinlerdir. Her aktin monomerinin [globüler (G) aktin] iki monomeri arasındaki baş-kuyruk

¹ Özgün kaynak:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mboc4&part=A2957&rendertype=figure&id=A2969>

etkileşimlerini düzenleyen sıkı bağlantı bölgeleri vardır, böylece aktin monomerleri filamanlar şeklinde polimerize olurlar [filamentöz (F) aktin]. Her monomer filaman içinde 166 ° döner, bu şekilde bir çift iplikli sarmal görünümü oluşur. Bütün aktin monomerleri aynı yönde eklendikleri için, aktin filamanlarının iki ucunun yükleri farklıdır ve uçların (artı ve eksi uçlar) birbirinden farkı ayırt edilebilir. Aktin filamanlarının bu polaritesi; hem yapılanmaları, hem de miyozin hareketine göre tek bir yönde gerçekleşmesi önemlidir. Moleküler motorların ön modeli olan miyozin ATP formundaki kimyasal enerjiyi mekanik enerjiye dönüştüren böylece güç ve hareket meydana getiren bir proteindir. Miyozin ile aktin etkileşimleri, yalnızca kas kasılmasından değil, kas dışındaki hücrelerin hücre bölünmesini de içeren çok çeşitli hücre hareketlerinden de sorumludur.

Aktin filamanları düşük iyonik güçteki solüsyonlarda monomerlerine ayrışır. Eğer iyonik güç fizyolojik olarak artırılırsa, aktin kendiliğinden polimerize olur. Aktin polimerleşmesi monomerlerin aktin filamanlarının uçlarına bağlanıp ayrıştığı, geri dönüşebilir bir olaydır. Alt birim ayrışması hızı monomer yoğunluğundan bağımsızdır. Alt birim bağlanma hızı ise serbest monomerlerin yoğunluğu ile orantılıdır. Monomerlerin kritik konsantrasyonlarında dengeye ulaşılır (Sakızlı M. ve Atabey N., 2006).

2.2. Ara Filamanlar

Ara filamanlar 10 nm çapındadır, bu boyut hücre iskeletinin diğer iki temel elemanı olan aktin filamanları (~7 nm) ve mirotübüller (~25 nm) çaplarının arasındadır. Aktin filamanları ve mikrotübüllerin tersine ara filamanlar hücre hareketlerine doğrudan katılmazlar. Bunun yerine hücre ve dokulara mekanik güç sağlayarak yapısal rol oynarlar. Her ne kadar aktin filamanları ve mikrotübüller tek tip proteinlerin polimerleri ise de ara filamanlar farklı hücre tiplerinde eksprese edilen birçok protein çeşidinden oluşmuşlardır. Elliden fazla farklı ara filaman tipi tanımlanmıştır ve amino asit dizileri arasındaki benzerliklere göre altı grupta sınıflandırılmışlardır. Ara filamanlar, çoğu hücrenin sitoplazmasında, çekirdeği çevreleyen bir halkadan plazma zarına kadar yayılan özenli bir ağ yapısı oluştururlar. Ek olarak sadece plazma zarı ile değil, hücre iskeletinin aktin filamanları ve mikrotübüller gibi diğer elemanları ile de bağlanırlar. Bu yüzden

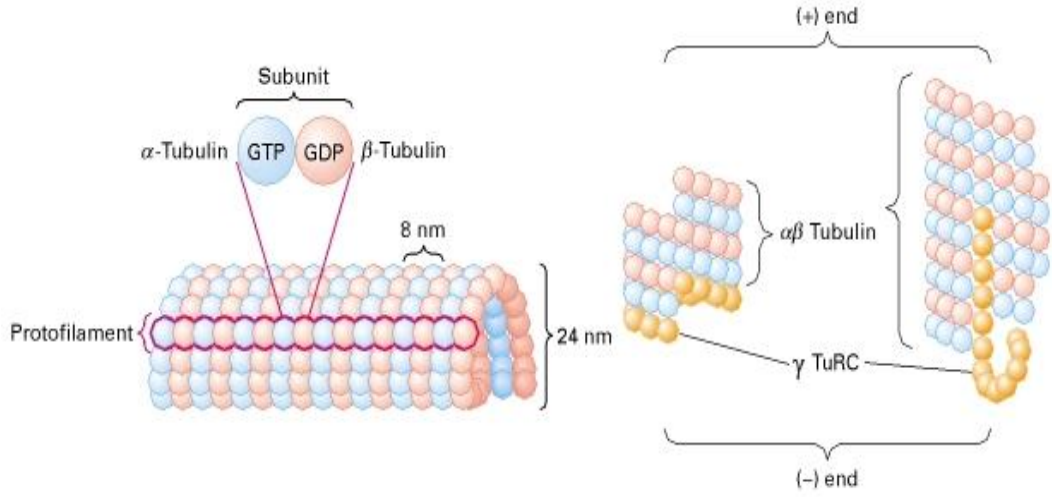
hücre iskeleti elemanlarını bir arada tutan köprüler ve hücrenin içyapısını düzenleyen bir dayanak oluşturur, hücrenin mekanik kararlılığını artırır.

2.3. Mikrotübüller

Üçüncü temel hücre iskeleti elemanı olan mikrotübüller yaklaşık 25 nm çapındaki sert, içi boş çubuklardır. Aktin filamanları gibi, mikrotübüller de hücre içinde devamlı yapılanıp ayrışabilen dinamik yapılardır. Hem hücre şeklinin belirlenmesinde, hem de hücrelerin yer değiştirmesinin bazı tiplerini, organellerin hücre içindeki taşınmasını ve mitoz sırasında kromozomların ayrılmasını da içeren çok çeşitli hücre hareketlerinde görev alırlar (Sakızlı M. ve Atabey N., 2006).

2.3.1. Mikrotübüllerin yapısı, yapılanması ve dinamik kararsızlığı

Birçok farklı fibröz proteinden oluşan ara filamanların aksine, mikrotübüller “tübülin” denilen globüler bir proteinden oluşmuştur. Tübülin, birbiri ile çok benzer 55 kd’ luk iki polipeptitten, α - ve β -tübülin, oluşan bir dimerdir. α - ve β -tübülin birbiri ile ilintili küçük gen aileleri tarafından kodlanırlar. Ek olarak üçüncü bir tübülin tipi olan γ -tübülin (γ -TuRC) spesifik olarak sentrozomda yer alır ve mikrotübül yapılanmasında kritik rol oynar (Şekil 2.2). Uzun süre ökaryotlara özgü olduğu düşünülen bütün bu tübülinlerin evrimsel atasının, prokaryot proteini FtsZ’ye benzeyen bir protein olduğu düşünülmektedir.

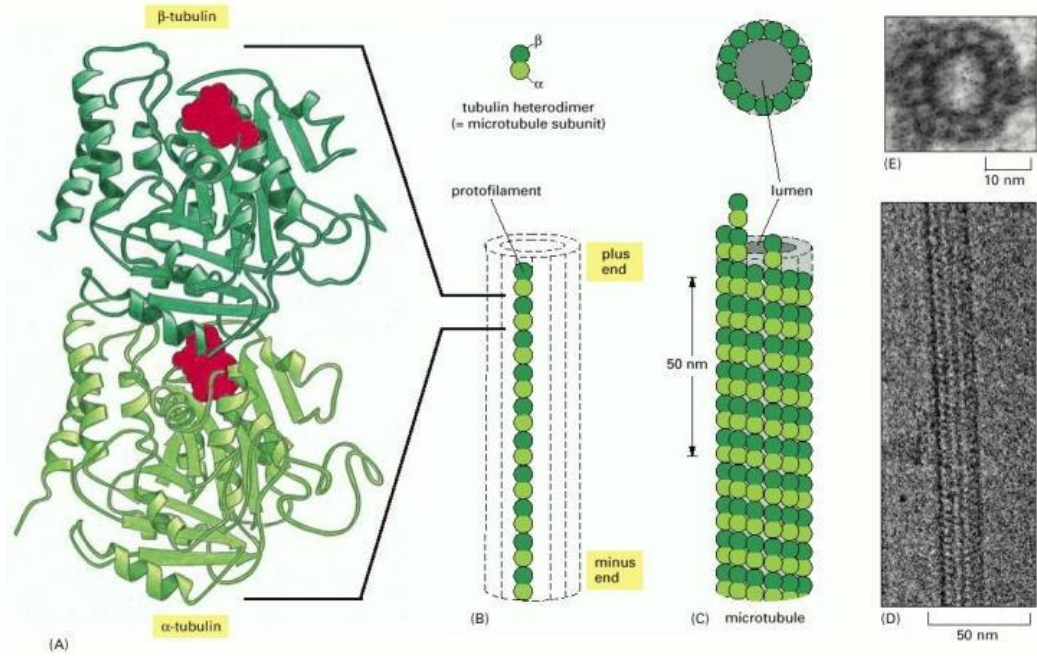


Şekil 2.2. α , β ve γ -tübülin (γ -TuRC)²

Tübülin dimerlerinin polimerleşmesi ile, boru şeklinde kor etrafında yapılanmış, genelde 13 doğrusal ön filaman içeren mikrotübüller oluşur (Şekil 2.2.). Tübülin dimerlerinin baş-kuyruk yönünde dizilmesi ile oluşan ön filamanlar, paralel şekilde bir araya gelmişlerdir. Sonuçta, mikrotübüller aktin filamanları gibi iki farklı ucu olan polar moleküllerdir, hızla büyüyen artı uç ve yavaş büyüyen eksi uç. Bu polarite, aktin filamanlarının polaritesinin miyozin hareketinin yönünü belirlemede olduğu gibi, mikrotübül boyunca hareketin yönünü belirlemede önemlidir.

²ÖzgünKaynak:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mcb&part=A5406&rendertype=figure&id=A5419>



Şekil 2.3. Mikrotübül ve mikrotübül alt ünitesinin yapısı³

Tübülün dimerleri polimerleştikleri gibi ayrışabilirler ve mikrotübüller hızlı bir yapılanma ve ayrışma döngüsüne girebilirler. Hem α - hem de β -tübülün, ATP bağlı aktinin polimerleşmesinin kontrolündeki rolü ile aynı işleve sahip, GTP' ye bağlanır. Genelde, β -tübüline bağlı GTP (α -tübüline bağlı olan değil) polimerleşme sırasında veya polimerleşmeden çok kısa bir süre sonra GDP' ye hidrolize olur. Bu GTP hidrolizi tübülünin komşu moleküllere bağlanma eğilimini zayıflatır, böylece ayrışmaya yardımcı olur ve mikrotübüllerin dinamik değişkenliğini sağlar. Mikrotübüller aktin filamanlarının ki gibi bir yürüme hareketi yapar. Bu hareket GDP' ye bağlı tübülün moleküllerinin eksi uçtan sürekli kaybedilmesi ve aynı mikrotübülün artı ucuna GTP bağlı tübülün monomerlerinin eklenmesi ile gerçekleşen dinamik bir davranıştır. Mikrotübüllerde GTP hidrolizi dinamik kararsızlık olarak bilinen, her bir mikrotübülün uzama ve kısalma döngüleri arasında gidip gelmesi olarak tanımlanan olay ile sonuçlanır. Bir mikrotübülün uzayacağı ya da kısalacağı, kısmen, tübülün eklenme oranına karşılık GTP hidroliz oranı ile belirlenir. Yeni GTP bağlı tübülün molekülleri, GTP' nin hidrolizinden daha hızla eklenmeleri süresince, mikrotübülün artı ucunda GTP başlığı kalır ve mikrotübül uzamaya devam eder. Bununla birlikte,

³ Özgün kaynak: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mboc4&part=A2957>

polimerleşme oranı yavaşsa, mikrotübülün artı ucundaki GTP bağlı tübülün GDP'yi hidroliz edecektir. Bu durumda, GDP bağlı tübülün ayrışacak, hızlı depolimerizasyon ve kısalma ile sonuçlanacaktır. Şekil 2.3.' de A ile gösterilen her bir protofilamanın alt ünitesi, çok sıkı bağlanmış α - ve β -tübülün monomerlerinden oluşan bir tübülün heterodimeridir. Proteinin önemli bir parçası olarak düşünülen α -tübülün monomeri içindeki GTP molekülü çok sıkı bağlıdır. β -tübülün monomeri içindeki GTP daha az sıklıkta bağlıdır ve filaman dinamiğinde önemli bir role sahiptir. Her iki nükleotid de kırmızı ile gösterilmiştir. Şekilde B ile tübülün alt ünitesi (α ve β heterodimeri) ve bir protofilaman alt ünitesi şematik olarak gösterilmiştir. Her bir protofilaman aynı yerleşmeye sahip birçok komşu alt ünitelerden meydana gelir. Şekilde C ile bir mikrotübülün kısa bir segmentinin elektron mikrograf görüntüsü verilmiştir. D' de ise bir mikrotübülün enine kesitinin elektron mikrograf görüntüsü bulunmaktadır (Şekil 2.3.) (Alberts ve ark., 2002).

İlk olarak 1984' te tanımlanan dinamik kararsızlık, çoğu mikrotübülün devamlı ve hızlı dönüşümü ile sonuçlanır. Hücre içindeki yarılanma süresi yalnızca birkaç dakikadır. Mikrotübüllerin hızlı dönüşümü, özellikle mitoz sırasında gerçekleşen hücre iskeleti değişiklikleri için çok önemlidir. Mikrotübüllerin mitozdaki merkezi rolleri nedeniyle, mikrotübül yapısını etkileyen ilaçlar, yalnızca hücre biyolojisi çalışmaları için deneysel bir araç olarak değil, kanser tedavisinde de yararlıdır. Sık kullanılan deneysel ilaçlar, tübülüne bağlanan ve mikrotübül polimerleşmesini engelleyerek mitozu durduran ilaçlardır. Bunlardan bazıları seçici olarak hızla bölünen hücrelerin bloklanması ile kanser tedavisinde kullanılabilir, bazıları da mikrotübüllerin yapısını engellemek yerine onları stabilize eder. Bu kararlılık da hücre bölünmesini engeller ve anti kanser ajan olarak kullanılır (Sakızlı M. ve Atabey N., 2006).

2.3.2. Sentrozom, sentriyoller ve mikrotübül düzenlenmesi

Çoğu hücredeki mikrotübüller, eksi uçlarından tuttukları bir mikrotübül düzenleyici merkezden dışarı doğru yayılır. Hayvan hücrelerinde, asıl mikrotübül düzenleyici merkez interfazdaki bölünmeyen hücrelerde, nükleusa komşu olarak, merkezde yerleşmiş olan sentrozomdur. Mitoz sırasında mikrotübüller,

kromozomların ayrılmasından ve yavru hücrelere dağılımından sorumlu mitotik iği oluşturmak üzere, kopyalanmış sentrozomlardan dışarıya doğru uzanır. Sentrozom bu nedenle mikrotübüllerin hücre içindeki düzenlerinin belirlenmesinde anahtar rol oynar. Ancak bu fonksiyonun bir çok noktası henüz tam olarak anlaşılmamıştır (Sakızlı M. ve Atabey N., 2006).

Sentrozom, sentrozomdan hücre kenarına doğru yayılan mikrotübüllerin yapılanması için bir başlangıç noktası olarak görev yapar. Bu, mikrotübüllerin yapılanması kolşemid, taksanlar, epothilonlar ve dikodermolidler vinka alkaloidleri, kolşisin, çeşitli anti mitotik ilaçlar (nokodazol, doksorubisin) ile engellenen hücrelerde açıkça görülebilir (Schmidth M. ve Bastians H., 2007). İlaç uzaklaştırıldığı zaman genellikle hücreler eski haline döner ve sentrozomdan dışarıya doğru uzayan yeni mikrotübüller görülebilir. Mikrotübül uzamasının sentrozomdan başlaması, hücre içindeki mikrotübüllerin polaritesi için önemlidir. Genelde, mikrotübüller artı uçlarına tübülün eklenmesiyle, sentrozomdan dışarıya, hücre kenarına doğru uzarlar. Sentrozomdaki mikrotübüllerin yapılanmasından sorumlu anahtar protein ilk olarak mantarlarda tanımlanmış, az rastlanan tübülün türü olan γ -tübülüdür. Bazı hücre tipleri sentrozom olmadan mikrotübül yapılanmasını başlatabilirler. Bunun, bu hücrelerin sitozollerinde γ -tübülün bulunması nedeniyle gerçekleşebildiği düşünülmektedir. Ek olarak, interfazdaki hücreler ya da polarize epitelyum hücreleri veya sinir hücreleri gibi artık bölünmeyecek hücreler, mikrotübüllerini hücrenin başka bölgelerinde işlev görmek üzere sentrozomdan ayrılırlar (Sakızlı M. ve Atabey N., 2006).

Çoğu hayvan hücresinin sentrozomu, birbirine dik yerleşmiş, amorf bir sentriyol çevre maddesi ile çevrelenmiş bir çift sentriyol içerir. Sentriyoller, dokuz adet üçerli mikrotübülden oluşan, kirpik (sil) ve kamçı bazal cisimlerine benzeyen silindirik yapılardır. Sentriyoller, bazal cisimler, kirpik ve kamçıların oluşumu için gereklidirler ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde henüz tam olarak anlaşılmamış görevleri vardır. Ancak sentrozomun mikrotübül görevleri için gerekli değildir ve bitki hücrelerinde, tek hücreli ökaryotların ve mayozdaki hayvan hücrelerinin çoğunda (fare yumurta hücreleri gibi) bulunmazlar. Sentriyoller değil, sentriyol çevre maddesi mikrotübül yapılanmasını başlatır.

Bununla birlikte, hayvan hücrelerinde sentriyollerin uzaklaştırılması, sentrozom içeriğinin dağılması ve mikrotübül dönüşümünde gecikme ile sonuçlanır.

Sentriyoller, net polaritesi olan kompleks yapılardır, bir ucunda araba tekerleği gibi protein yapısı ve sentrozom içerisinde bir çok uzantısı bulunur. Bu uzantıların sentrozom matrisinin düzenlenmesine yardımcı olduğu düşünülmektedir. Sentriyoller üçerli mikrotübüllerin karakteristik bir parçası olan γ -tübülün gibi birçok özgün protein içerir. İnterfaz sırasında iki sentriyol, sentrin içeren (kalmodiline benzeyen bir Ca^{2+} bağlayan protein) bir ya da daha fazla lifle bağlantılıdır (Sakızlı M. ve Atabey N., 2006).

2.3.3. Mitoz sırasında mikrotübüllerin yeniden düzenlenmesi

Mikrotübüller mitoz sırasında tam olarak yeniden düzenlenirler ve bu mikrotübüllerin dinamik kararsızlığının önemini gösteren çarpıcı bir örnektir. İnterfazdaki mikrotübül dizisi, ayrıştır ve serbest tübülün alt birimleri, kardeş kromozomların ayırımından sorumlu mitotik iği oluşturmak üzere, yeniden yapılanır. Mikrotübül hücre iskeletinin yeniden yapılanması, sentrozomun mitotik için karşıt kutuplarında, iki ayrı mikrotübül düzenleyici merkez oluşturacak şekilde iki katına çıkması ile yönlendirilir.

Sentriyoller ve sentrozomun diğer elemanları interfaz hücrelerinde iki katına çıkar, fakat mitoz bölünme başlayıncaya kadar hücrenin bir bölgesinde bir arada kalır. O zaman, iki sentrozom ayrılır ve nükleusun iki karşıt bölgesine doğru hareket ederler ve mitotik için iki kutbunu oluştururlar. Hücre mitoz girildiği zaman, mikrotübüllerin yapılanma ve ayrışma dinamikleri de çok değişir. İlk olarak, mikrotübül ayrışması yaklaşık on kat artar, mikrotübüllerin tam olarak dağılması ve kısalması ile sonuçlanır. Aynı zamanda sentrozomdan çıkan mikrotübül sayısı da beş ila on kat artar. Bunların bir araya gelmesi, interfazdaki mikrotübüllerin ayrışması ve sentrozomdan çok sayıda kısa mikrotübülün uzamasıyla sonuçlanır (Sakızlı M. ve Atabey N., 2006).

Mitotik için oluşumu, sentrozomdan yayılan mikrotübüllerden bazılarının geçici olarak stabilizasyonu ile gerçekleşir. Bunu sağlamak için mitotik iğcikte üç tip mikrotübül bulunur: Polar mikrotübüller, kutuplardan ekvatora doğru uzanır. Karşılıklı kutuplardan uzanan ve ekvatoru biraz geçen polar fibriller, ekvator

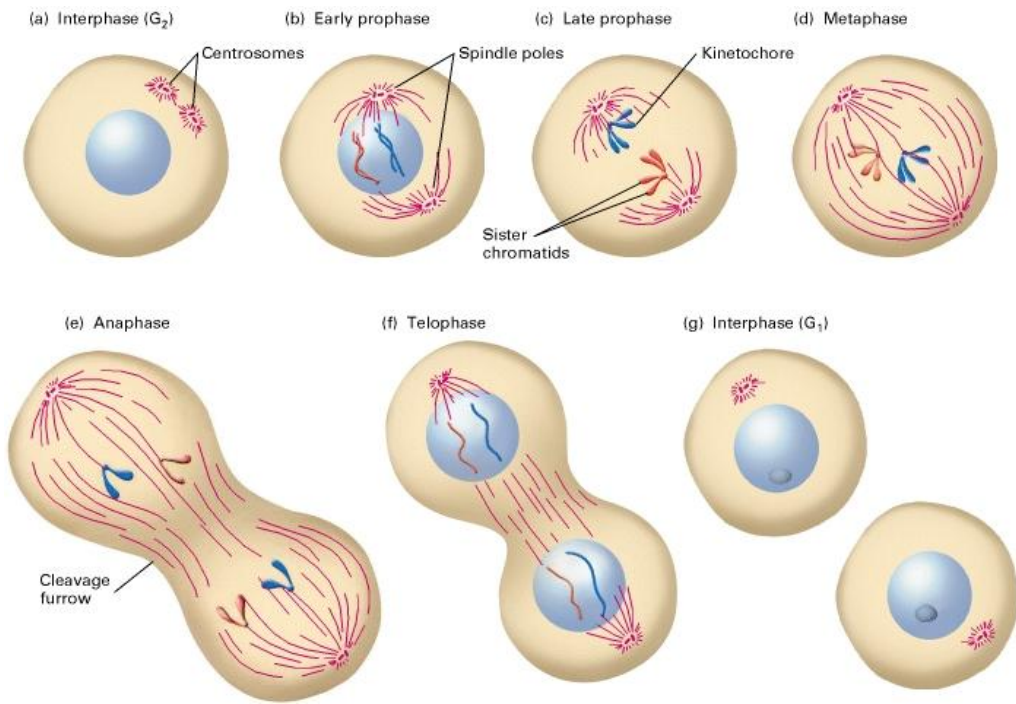
bölgesinde mikrotübül bağlayıcı proteinler ile birbirlerine çapraz olarak tutunurlar, kromozomlara tutunmazlar bunun yerine, iki sentrozomdan yayılarak hücre merkezinde birbirleri ile karşılaştıklarında stabilize olurlar. Kinetokor mikrotübüller, kromozomların sentromerine tutunarak kromozomları kutuplara bağlar. Yıldızsı mikrotübüller, kutuplarda sentromerin etrafında, sentromerden hücrenin periferine doğru ışınal olarak uzanırlar ve serbest artı uçları açıktadır. Hem polar hem de yıldızsı mikrotübüller, iği zıt kutuplara iterek kromozom hareketine katkıda bulunurlar (Goodman B. ve Zheng Y.,2006; Sakızlı M. ve Atabey N., 2006).

Mitoz devam ederken, kalınlaşmış kromozomlar metafaz plağı üzerinde toplanırlar ve daha sonra, her kromozomun iki kromatidi için iki karşıt kutbuna çekilerek ayrılırlar. Kromozom hareketleri, iğ mikrotübülleri ile bağlantılı motor proteinler ile gerçekleştirilir. Mitozun son dönemlerinde, nükleer zarf yeniden oluşur, kromozomlar gevşer ve sitokinez başlar. Böylece, her yavru hücrede, yeni interfaz mikrotübül ağ yapısının oluşumunu başlatacak bir sentrozom yer alır (Sakızlı M. ve Atabey N., 2006).

Bir hayvan hücresinin mitoz bölünme sırasında geçirdiği Şekil 2.4.' de gösterilen evreler şu şekildedir: (a) İnterfaz: DNA sentez fazı sırasında kromozomal DNA replikasyonunu takiben mitozdan hemen önce gelen G2 fazı. Kromozomların her biri kardeş kromatit içerir ve kromatitler yayılmış durumdadır, belirgin görünür halde değildir. İnterfaz sırasında, sentriyoller de replike olur. (b) Erken profaz: Kromozomlar ince uzun iplikler şeklinde belirir, çekirdekçik kaybolmaya başlar ve sentriyoller birbirinden ayrılarak kutuplara doğru hareket etmeye başlar. Kromozomlar ince uzun iplikler şeklinde belirir ve çekirdek zarı küçük parçalara ayrılmaya başlar. (c) Orta ve geç profaz: Kromozom kondensasyonu tamamlanır, Her kromozom kendini eşleyerek ikiz kromatitler meydana getirilir, sentrioller birbirinden uzaklaşarak iğ ipliklerini oluşturmaya başlar.

Geç Profaz: Sentioller hücrenin zıt kutuplarına ulaşır, iğ ipliklerinin oluşması tamamlanır ve kromozomların sentromerleri tarafından meydana getirilen kinetokor iğ ipliklerine tutunur. Çekirdek zarı ve çekirdekçik tümüyle kaybolur. (d) Metafaz: Kromozomlar hücrenin ekvatoruna doğru hareket eder, ekvatoryal yüzeyde hizalanmaya başlarlar. Kardeş kromatitler henüz

ayrılmamıştır. (e) Anafaz: kromatitleri birbirine bağlayan sentromer ikiye ayrılır. Böylece serbest kalan her bir kromatid kromozomu kutuplara doğru hareket eder. Anafazın sonunda hücre birbirinden tümüyle ayrılmış ve kutuplara çekilmiş iki ayrı kromozom takımı içerir. Bu safhanın sonunda sitokinez (sitoplazma bölünmesi) başlar. (f) Telofaz: Yeni çekirdek zarları kardeş çekirdekçiklerin etrafında oluşur iğ iplikleri kaybolur, mikrotübüller depolimerize olurlar, çekirdekçik yeniden görünür hale gelir. Sitokinez tamamlanır. Sitokinezin tamamlanmasından sonra her kardeş hücre hücre döngüsündeki G1 fazına girer ve hücre döngüsü devam eder (Şekil 2.4.) (Lodish H. ve ark, 2000).



Şekil 2.4. Hayvan hücrelerinde mitoz ve sitokinez evreleri⁴

⁴ Özgün kaynak:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mcb&part=A5499&rendertype=figure&id=A5500>

2.3.4. Mikrotübüllerin kararlılığı ve hücre polaritesi

Doğal dinamik kararsızlıkları nedeniyle, çoğu mikrotübül hücre içinde ayrılmış durumda bulunur. Bu dinamik davranış, ancak mikrotübüller başka proteinler ile etkileşime girerlerse değişebilir. Bazı hücre proteinler, ya mikrotübülleri keserek ya da mikrotübüllerin uçlarından tübülün ayrışmasını artırarak mikrotübüllerin yıkımında etkilidirler. Bu proteinlere bir örnek olarak, ilk olarak lösemilerde, proliferatif meme kanserlerinde ve malign over kanserlerinde yüksek düzeyde eksprese olan bir protein, stratimin verilebilir. Diğer proteinler (mikrotübül bağlayıcı proteinler ya da MAP' lar) mikrotübüllere bağlanır ve onların kararlılık durumlarını belirler. Bir MAP grubu tübülün/GTP' ye bağlandıkları ve uzayan mikrotübülleri hücredeki spesifik yerleşimlerine doğru izledikleri için, artı uç izleyici proteinler olarak adlandırılır. Diğer MAP' lar mikrotübüllerin ya artı ya da eksi uçlarını kapatır. Bu gibi etkileşimler, mikrotübüllerin hücrede belli yerleşimlerde kararlı kalmasını sağlar ve hücre şeklinin ve polaritesinin belirlenmesinde önemli bir mekanizma oluşturur.

Çok sayıda MAP tanımlanmıştır ve bunlar hücre tipine bağlı olarak çok farklı olabilirler. En iyi tanımlanmış olanlar nöronal hücrelerden elde edilen MAP-1, MAP-2 ve Tau ile nöronal olmayan tüm omurgalı hücrelerinde bulunan MAP-4' tür. Tau proteini, Alzheimer' lı hastaların beyinlerindeki karakteristik lezyonların ana elemanı olduğu için, geniş ölçüde çalışılmaktadır. MAP' ların aktiviteleri fosforillenme ile düzenlenir, bu da, hücrenin mikrotübül kararlılığını kontrol etmesini sağlar.

Kararlı mikrotübüllerin hücre polaritesini düzenlemedeki rolünü gösteren güzel bir örnek, sinir hücrelerinde hücre gövdesinden dışarı doğru uzayan iki farklı tipteki oluşumdur (akson ve dendritler). Hem aksonlar, hem de dendritler kararlı mikrotübüller ve nörofilamanlar tarafından desteklenir. Ancak, akson ve dendritlerdeki mikrotübüller farklı şekilde düzenlenmiştir ve farklı MAP' lar ile bağlıdır. Aksonlarda, mikrotübüllerin hepsi diğer hücre tiplerindeki genel yönelimlerine benzer olarak, artı uçları ile hücre gövdesinden uzağa yönelmişlerdir. Ancak, Aksonlardaki mikrotübüllerin çoğunda, eksi uçlar sentrozoma tutunmuş değildir, bu mikrotübüllerin artı ve eksi uçları, aksonun sitoplazmasında sonlanır. Dendritlerde mikrotübüller her iki tarafa da

yönlenmiştir, bazı artı uçlar hücre gövdesi, bazıları hücre kenarı doğrultusundadır. Mikrotübül yapılanmasındaki bu fark ile MAP' lardaki farklılıklar paraleldir: Aksonlarda tau proteinleri bulunurken, MAP-2 bulunmaz, dendritlerde ise MAP-2 vardır, tau proteini bulunmaz, MAP-2 ve tau dağılımındaki bu farklılığın akson ve dendritlerdeki kararlı mikrotübüllerin farklı düzenlenmelerinden sorumlu oldukları düşünülmektedir (Sakızlı M. ve Atabey N., 2006).

2.3.5. Mikrotübül motorları ve hareket

Mikrotübüller hücre içi hareket, zar veziküllerinin ve organellerin yer değiştirmesi, mitozda kromozomların ayrılması, sil ve kamçıların hareketini içeren çok çeşitli hücre hareketlerinden sorumludur. Mikrotübüller boyunca hareket aktin filamanlarında olduğu gibi ATP hidrolizinden elde ettiği enerjiyi kullanarak güç ve hareket oluşturan, motor proteinlerin çalışması esasına dayanır. İki büyük motor proteini ailesinin üyeleri olan kinezinler ve dineinler, mikrotübüllerin katıldığı çok çeşitli hareket için güç sağlamakla yükümlüdür (Sakızlı M. ve Atabey N., 2006).

2.3.6. Mikrotübül motor proteinlerinin tanımlanması

Mikrotübül motor proteinlerinin prototipi olan kinezinler ve dineinler, mikrotübül boyunca zıt yönlerde ilerlerler, çoğu kinezin artı uca ve dinein ise eksi uca doğru hareket eder. Mikrotübül motor proteinlerinden ilk tanımlanan, 1965' de izole edilen dineindir. Kirpiklerde bu tip dineinin (aksonemal dinein) çok yüksek miktarda bulunması, aynen kas hücrelerinde miyozin baskın olduğu için elde edilmesinin kolaylaşması gibi saflaştırılmasını kolaylaştırmıştır. Ancak, diğer mikrotübül temelli motorların tanımlanması, kromozom hareketi ve organel taşınması gibi olaylardan sorumlu proteinlerin izolasyonu, sitoplazmada görel olarak daha düşük konsantrasyonlar bulunduğu için problemlidir. Bu nedenle, bu proteinlerin elde edilmesi moleküler motorların hareketlerini hücre sistemlerinde saptayabilen yeni deneysel yöntemlerin gelişmesine bağlıdır (Sakızlı M. ve Atabey N., 2006).

Sitoplazmadaki motor proteinler için *in vitro* ölçüm yöntemleri geliştirilmesi, 1980'lerin başlarından, zar vezikülleri ve organellerin akson kollarındaki mikrotübüller boyunca hareketini araştırmak için geliştirilen video ile güçlendirilmiş mikroskobun kullanılması esasına dayanmaktadır. Bu yöntemde ışık mikroskobu ile elde edilen görüntülerin kontrastını artırmak için bir video kamera kullanılmış, böylece küçük cisimlerin saptanmasında ve canlı hücrelerin izlenmesi ile organel hareketlerinin belirlenmesinde bir gelişme sağlanmıştır. Bu yöntem kullanılarak, plazma zarının uzaklaştırıldığı ve sitoplazma içeriğinin bir cam lam üzerine yayıldığı, hücresiz sistemlerde de, organel hareketlerinin gerçekleştiği gösterilmiştir. Bu gözlem, *in vitro* yeniden kurulan sistemlerin geliştirilmesine öncülük yapmıştır ve organel hareketlerinden sorumlu hücresel proteinleri saptayabilecek bir kapasitede bir ölçüm geliştirilmesi sağlanmıştır. 1985' te bu gelişmelerden yararlanarak hem aksonların kollarında hem de sığır beyinde bulunan yeni bir mikrotübül motor proteini olan kinezinleri tanımlanmışlardır (geleneksel kinezinler veya kinezin-I).

Daha sonraki çalışmalar kinezin I' in, mikrotübül boyunca yalnızca bir yöne (artı uca) doğru yer değiştirdiğini göstermiştir. Aksonlardaki mikrotübüllerin artı uçları, hücre gövdesinden uzağa doğru yönlendikleri için kinezin I' in bu doğrultudaki hareketleri ile veziküller ve organeller hücre gövdesinden uzağa, aksonların uçlarına doğru taşınır. Bununla birlikte sağlam aksonlarda veziküller ve organellerin geriye hücre gövdesine doğru hareket ettikleri gözlenmiştir. Bu da mikrotübüller boyunca karşıt yöne eksi uca doğru hareketten sorumlu, farklı bir motor proteinin olabileceğini düşündürmüştür. Bu öngörüye uygun olarak daha sonraki deneyler, daha önceleri mikrotübül bağlayan protein MAP-1C olarak tanımlanmış bir proteinin aslında mikrotübüllerin eksi ucu yönündeki hareketi sağlayan motor proteini olduğunu göstermiştir. İleri incelemeler, MAP-1C' nin sillerden izole edilen aksonemal dinein ile ilintili olduğunu göstermiştir, bu nedenle günümüzde stoplazmik dinein olarak anılmaktadır (Sakızlı M. ve Atabey N., 2006).

Kinezin I, yaklaşık 380 kd' luk iki ağır zincir (her biri 120 kd) ve iki hafif zincirli (her biri 64 kd) bir proteindir. Ağır zincirlerde uzun α sarmal bölgeleri, birbirlerinin üzerine dolanan sarmal yapıdadır. Ağır zincirlerdeki amino ucu

globüler baş bölümleri, molekülün motor bölgeleridir. Hem mikrotübüllere hem de ATP' ye bağlanır ve hidrolizi ile hareket için gerekli enerjiyi sağlar. Kinezinin ~340 amino asitlik motor bölümü miyozininkinden ~850 amino asit kadar çok daha küçük olsa da, X-ışını kristalografisi kinezin ve miyozinin aynı ortak atadan evrimleştiğini ve yapısal olarak benzer olduğunu göstermektedir. Kinezin molekülünün kuyruk kısmı, ağır zincirin karboksi uç bölgesi ile bağlanmış hafif zincirler içerir. Kinezinin bu bölgesi kinezin motorunun etkisi ile mikrotübül boyunca taşınacak zar vezikülleri ve organeller gibi diğer hücresel elemanlara bağlanmadan sorumludur.

Stoplazmik dinein, her biri değişken sayıdaki, boyutları 14-120 kd arasında değişen, hafif veya orta boyuttaki zincirler ile kompleks oluşturan, iki ya da üç ağır zincir (her biri ~500 kd) içeren, çok büyük bir moleküldür (~2000 kd). Kinezinde olduğu gibi, ağır zincir, mikrotübüller boyunca hareketten sorumlu olan globüler ATP bağlayan motor bölgeleri oluşturur. Molekülün hafif ve orta boy zincirleri içeren ana bölümünün, organeller ve veziküller gibi diğer hücresel yapılara bağlandığı düşünülmektedir (Sakızlı M. ve Atabey N., 2006).

Miyozin gibi kinezin ve dinein de ilintili motor protein aileleri oluştururlar. Kinezinin 1985'deki ilk izolasyonu arasında kinezin ile ilintili birçok protein tanımlanmıştır. *C. elegans* genomu on sekiz farklı kinezin kodlamaktadır. İnsandaki kinezin ailesinin ise, en az 100 farklı üyesi olduğu düşünülmektedir. Kinezin ailesinin Kinezin I gibi bazı üyeleri, mikrotübüllerde artı uç yönünde hareket eder. Buna karşın, kinezin ailesinin diğer bazı üyeleri ise karşıt yönde, eksi uca doğru ilerler. Kinezin ailesinin bu farklı üyelerinin karboksi ucundaki kuyruklarının dizilimleri değişkendir ve veziküller, organeller ve kromozomlar gibi farklı tipteki kargoların mikrotübül boyunca hareketlerinden sorumludurlar. Aksonemal dineinlerin de stoplazmik dineinler gibi birçok tipi vardır. Dinein ailesi üyelerinin tamamı mikrotübüllerin eksi uçlarına doğru hareket ederler, fakat farklı stoplazmik dineinler farklı kargoları taşıyabilir (Sakızlı M. ve Atabey N., 2006).

2.3.7. Organel taşınması ve hücre içi düzenlenme

Mikrotübüllerin esas rollerinden birisi zar veziküllerini ve organelleri ökaryot hücrelerin sitoplazmaları boyunca taşımaktır. Bu gibi stoplazmik organel taşınmaları, özellikle sinir hücrelerinin bir metreden daha çok uzayabilen aksonlarında kanıtlanmıştır. Ribozomlar ise, yalnızca hücre gövdesinde ve dendritlerde bulunurlar, yani proteinler, zar vezikülleri ve organeller (örn. mitokondri) mutlaka hücre gövdesinden aksonlara taşınmalıdır. Video ile güçlendirilmiş mikroskopi yoluyla, zar veziküllerinin ve organellerin akson mikrotübülleri boyunca her iki yönde de taşındığı görüntülenebilir. Burada kinezin ve dinein sırası ile aksonların uçlarına ve uçlarından kendi yüklerini taşırlar. Örneğin nörotransmitterleri içeren salgı vezikülleri, Golgi aygıtında aksonların uç dallarına kinezin ile taşınırlar. Ters yönde stoplazmik dinein, endositik vezikülleri aksondan hücre gövdesine taşır (Sakızlı M. ve Atabey N., 2006).

Diğer hücre tiplerinde de mikrotübüller zar veziküllerini ve organelleri benzer şekilde taşır. Mikrotübüller sentrozomlara eksi uçları ile tutunarak, artı uçları hücre kenarına doğru yönlendiğinden, kinezin ve dinein ailesinin farklı üyelerinin vezikül ve organelleri sitoplazma boyunca zıt yönlere taşıdıkları düşünülmektedir. Geleneksel kinezinler ve diğer artı uca yönlendiren kinezin ailesi üyeleri, kargolarını hücre kenarına doğru taşıırken, stoplazmik dinein ve eksi uca yönlendiren kinezin ailesi üyeleri, maddeleri hücrenin merkezine doğru taşır. Endositik ve salgısal yollardaki zar veziküllerinin taşınmasına ek olarak, mikrotübüller ve ilişkili motor proteinler, zarla kaplı organellerin (endoplazmik retikulum, Golgi aygıtı, lizozomlar, mitokondri gibi) hücre içinde yerleşimini düzenlerler. Örneğin endoplazmik retikulum, mikrotübüllere bağlanarak hücre kenarına doğru uzanır. Mikrotübülleri depolimerize eden ilaçlar, endoplazmik retikulumun hücre merkezine doğru gerilemesine neden olurlar. Bu durum, endoplazmik retikulumun yaygın durumunun korunması için mikrotübülleri ile bağlanmasının gerekli olduğunu göstermektedir. Endoplazmik retikulumun hücredeki yerleşiminde onu mikrotübüller boyunca hücre kenarına doğru artı uç yönünde çeken kinezinin (ya da olasılıkla kinezin ailesinin birçok üyesinin) etkili olduğu düşünülmektedir. Benzer şekilde, kinezinin lizozomların hücre

merkezinden uzaklaştırılmasında önemli bir rol oynayabileceği ve kinezin ailesinin üç değişik üyesinin, mitokondri hareketinde görev aldığı gösterilmiştir.

Bunun aksine stoplazmik dineinin, Golgi aygıtının yerleşiminde rol oynadığı düşünülmektedir. Golgi aygıtı, sentrozom yakınında hücrenin ortasında yerleşiktir. Eğer mikrotübüller, ilaçla ya da hücre mitoza girdiğinde yıkılırsa, Golgi, sitoplazma geneline yayılan küçük veziküllere ayrılır. Mikrotübüller yeniden oluştuğunda Golgi vezikülleri, stoplazmik dinein aracılığıyla hücrenin merkezine (mikrotübüllerin eksi ucuna doğru) taşınır ve Golgi aygıtı yeniden yapılır. Bu nedenle, ökaryot hücrelerin sitoplazmalarında gözlenen mikrotübüller boyunca hareket, sadece vezikül transportundan değil zarla çevrili organellerin yerleşiminden de sorumludur (Sakızlı M. ve Atabey N., 2006).

2.3.8. Mitotik kromozomların ayrılması

Mitozun başında mikrotübüller iki katına çıkan kromozomları yavru nükleuslara dağıtarak, hücre bölünmesinde önemli rol oynayan mitotik iğ oluşturmak üzere yeniden düzenlenirler. Genetik materyalin bu kritik öneme sahip dağılımı, kardeş kromatitlerin ayrıldığı ve iğın zıt kutuplarına hareket ettiği, mitozun anafaz aşamasında gerçekleşir. Kromozom hareketi, farklı iğ mikrotübülleri ve ilişkili motor proteinleri içeren, anafaz A ve anafaz B olarak tanımlanan iki farklı mekanizmada olur.

Anafaz A, kromozomların kinetokor mikrotübülleri boyunca iğ kutuplarına doğru hareketinden sorumludur ve kromozom hareket ettikçe kinetokor mikrotübülleri kısalmaktadır. Bu tip kromozom hareketinin, kromozomları sentrozoma doğru ve iğ mikrotübüllerin eksi ucu yönüne ileten kinetokor bağlantılı motor proteinler tarafından gerçekleştirildiği düşünülmektedir. Stoplazmik dinein, kinetokorlar ile bağlantılıdır ve kinezin ailesinin eksi uca yönelen üyeleri gibi kutuplara yönelik kromozom hareketinde rol oynayabilir. Kinetokor motor proteinlerin bu davranışı, kinetokor mikrotübüllerin ayrışması ve kısılması ile eşleşmiştir. Bu olay mikrotübül kararsızlaştıran enzim gibi davranan, kinezin ailesinin bazı üyeleri tarafından gerçekleştirilmektedir.

Anafaz B, iğ kutuplarının kendiliğinden ayrılmasını kapsar. Bu ayrılma, iğ mikrotübüllerinin uzaması eşliğinde gerçekleşir ve mitozun başlangıcında

ikilenmiş sentrozomların iğ kutuplarını oluşturmak üzere, ilk ayrışmasına benzerdir. Anafaz B sırasında, üst üste çakışan polar mikrotübüller, iğ kutuplarını iterek birbirlerinin üzerinde kayarlar. Bu tip hareketin, polar mikrotübülleri çapraz bağlayarak, onları üst üste çakıştığı mikrotübülün artı ucuna doğru, karşı kutuptan uzağa hareket ettiren, çok sayıda artı uca yönelen kinezin ailesi üyelerinin etkisi ile olduğu bulunmuştur. Buna ek olarak, iğ kutupları, yıldızlı mikrotübüller tarafından birbirinden ayrılabilirler. Bu tip bir hareketten sorumlu olan mekanizma henüz tanımlanmamıştır, ancak hücre korteksine veya sitoplazmadaki başka bir yapıya tutunan stoplazmik dineinin etkisi sonucunda gerçekleşiyor olabilir. Eksi uç yönünde, bu gibi yıldızlı mikrotübüllere tutunmuş dinein motorunun yer değiştirmesi, iğ kutuplarının ileriye, hücre kenarında çekilmesine neden olabilir. Alternatif olarak, iğ kutupları ile ilişkili bir motor protein, artı uç yönüne doğru yıldızlı mikrotübüller boyunca hareket ederek, iğ kutuplarını hücre kenarına doğru çekebilir (Sakızlı M. ve Atabey N., 2006).

2.3.9. Kirpikler ve kamçılar

Kirpikler ve kamçılar, çeşitli ökaryot hücrenin hareketinden sorumlu olan, plazma zarının mikrotübül temelli uzantılarıdır. Birçok bakteride de kamçı bulunmaktadır. Fakat prokaryot kamçıları ökaryotlardakilerden oldukça farklıdır. Bakteri kamçıları mikrotübül destekli plazma zarı uzantıları değil, hücre yüzeyinden dışarı doğru uzanan protein filamanlarıdır. Ökaryotlardaki kirpik ve kamçılar her biri ~0,25 µm çapa sahip, birbirine çok benzer yapılardır. Birçok hücre uzunluğu ~10 µm olan çok sayıda kirpik (sil) ile kaplıdır. Kirpikler düzenli bir şekilde ileri geri hareket ederek, titreşerek, hücreyi sıvı içinde ya da sıvıyı hücre yüzeyinde hareket ettirir. Örneğin *Paramecium* gibi bazı protozoaların kirpikleri, hem hücre hareketinden, hem de hücre yüzeyi ve hücre yüzeyinde yüzen besinin ağız boşluğu içine alınmasından sorumludur. Hayvanlarda kirpiklerin önemli bir fonksiyonu da, sıvıyı ya da mukusu, epitelyum hücre tabakalarının yüzeyinde hareket ettirmektir. Buna iyi bir örnek, solunum yollarını döşeyen ve solunum yollarından mukus ve tozları uzaklaştıran kirpikli hücrelerdir. Kamçılar, 200 µm' ye varabilen uzunlukları ve dalga benzeri titreşim hareketleri

bakımından kirpiklerden farklıdır. Hücreler genellikle çeşitli protozoaların ve spermilerin hareketinden sorumlu olan sadece bir ya da iki kamçı içermektedir.

Hem kirpik hem de kamçının temel yapısı, mikrotübüllerle ilişkili proteinlerden oluşan aksonemdir. Mikrotübüller, dokuz çift dış mikrotübül ile çevrili bir çift merkez mikrotübülünden oluşan “9+2” formatında düzenlenmişlerdir. Dışta bulunan birbirine kaynaşmış her ikili farklıdır: Bunlardan biri (A tübülü) 13 ön filamana sahip olan tam bir mikrotübüldür; diğeri ise (B tübülü) tam bir mikrotübül yapısına sahip değildir ve A tübülüne kaynaşmış halde 10 ya da 11 ön filaman içerir. Dış mikrotübül çiftleri merkezdeki mikrotübül çiftine ışınları çıkıntılar ve birbirlerine de neksin adı verilen bağlantılar aracılığı ile bağlıdır. Buna ek olarak, her bir A tübülüne, 2 dinein kolu tutunmuştur, bu aksonemal dineinlerin motor aktiviteleri, kirpik ve kamçının titreşme hareketini sağlar.

Kirpik ve kamçıların yapısında bulunan mikrotübüllerin eksi uçları, dokuz adet mikrotübül üçlüsü içeren ve yapısı sentriyole benzeyen bazal cisim içinde tutunmuştur. Sentrozom elemanları olarak önceden bahsedilmiş olan sentriyoller, bu yapı içerisinde kompleks bir işleve sahiptirler. Bununla birlikte, bazal cisimler aksonem mikrotübüllerinin düzenlenmesinde açık bir role sahiptir. Aksonemin dışındaki mikrotübül çiftlerinin her biri, bazal cismin içindeki üçlülerde bulunan iki mikrotübülün uzaması ile gelişir. Bu bakımdan bazal cisimler, kirpik ve kamçıyı hücre yüzeyinde tutmanın yanı sıra aksonemal mikrotübüllerin uzamasını başlatmakla da görevlidirler (Sakızlı M. ve Atabey N., 2006).

Kirpik ve kamçıların hareketleri, dıştaki mikrotübül çiftlerinin birbirine göreli olarak kaynamasının sonucudur ve bu aksonemal dineinin motor aktivitesi ile desteklenir. Dineinin alt kısmı A tübülüne bağlanırken, dinein baş grupları komşu mikrotübül çiftlerinin B tübüllerine bağlanır. Böylece, dinein baş gruplarının eksi uç yönündeki hareketi, bir çift içindeki A tübülünün, komşu B tübülünün alt ucuna kaymasına yol açar. Aksonemdeki mikrotübül çiftleri neksin köprüleri ile bağlı olduğundan, bir çiftin diğeri üzerinde kayması bükülmelerine neden olur. Bu da kirpik ve kamçının titreşim hareketinin esasını oluşturmaktadır. Buna karşın, aksonemin farklı bölgelerindeki dinein moleküllerinin aktiviteleri, kirpiklerin titreşimlerinin ve kamçının şu ana kadar çok az anlaşılan dalga benzeri

hareketlerinin, düzenli olarak gerçekleştirilebilmesi için çok dikkatli bir şekilde kontrol edilmelidir (Sakızlı M. ve Atabey N., 2006).

3. ANTİMİTOTİK, KEMOTERAPÖTİK İLAÇLAR İLE KANSER İLİŞKİSİ

Bugün klinikte kullanılan çoğu kemoterapötik anti kanser ilaçlar tümör hücrelerinin hiperproliferasyon durumunu inhibe etmek ve sonra da apoptozu indüklemek için hücre döngüsünü hedefleyen ajanlar içerirler. Bununla kemoterapinin sonuçlanması istenmektedir.

Etki şekline dayanarak bu kemoterapötik ilaçlar farklı gruplara ayrılabilir:

- 1) DNA sentezini engelleyen ilaçlar
- 2) DNA hasarını ortaya çıkaran ilaçlar
- 3) Mitotik iğciklerin (mitotic spindle) işlevini inhibe eden ilaçlar

En son bahsedilen ilaçların klinikte son derece başarılı olduğu kanıtlanmıştır ve bunlar genel olarak sıklıkla iğ zehirleri olarak bahsedilen mikrotübül bağlayıcı ilaçlar ile temsil edilirler. Bu gruptaki ilaçlar (kolşemid, taksanlar, epotilonlar ve dikodermolidler Vinka alkaloidleri, kolşisin, nokodazol ve doksorubisin gibi çeşitli anti mitotik ilaçlar) mitotik iğ aygıtı mikrotübüllerinin işlevini engeller ve inhibe eder. Bu da mitozda hücre döngüsünün durmasına ve sonra da tümör hücre ölümünün başlamasına (indüksiyonuna) yol açar. Ancak mikrotübüller istirahat halindeki ve bir aracı yardımıyla farklılaştırılmış olan hücrelerin, örneğin hücre içi geçiş süreci gibi önemli işlevlerini yerine getirdiği için anti mikrotübül ilaçlar ciddi periferik nöropatileri de içeren istenmeyen yan etkiler göstermektedir. Bu nedenle mikrotübülleri öldürmeyen ancak mitozun devamını inhibe eden yeni ilaç hedefleri istenmektedir ve yeni antimitotik ilaçların geliştirilmesi için harekete geçilmiştir. Böylece mevcut ilaç gelişim programları sadece yeni anti mikrotübül ilaçlar geliştirilmesi üzerine değil aynı zamanda mitotik kinezinler ve mitotik kinazları içeren yeni anti mitotik ilaç hedefleri üzerine de odaklanmış durumdadır. Üstelik mitoz programsız bir girişe yol açarak DNA hasarı oluşturan ajanlara maruz kalmış olan hücre döngüsünün durmasını ortadan kaldıran ilaçların kullanılması, tümör hücrelerinde mitozla ilişkili hücre ölümünü uyarmak için ümit verici bir stratejidir (Schmidt ve Bastians, 2007; Çoğulu ve ark., 2007).

3.1. Mitotik İğ (Spindle): Antikanser İlaçlarının Başlıca Hedefi Mikrotübüller

Mikrotübüller, aktin ve ara (intermediate) filamanlar ile birlikte ökaryotik hücrelerin hücre iskeletinin başlıca bileşenleridirler. İnterfazda ve farklılaşmış hücrelerde, mikrotübüller organellerin ve veziküllerin hücre içi geçişi için geçit olarak iş gören içcikleri oluştururlar.

Hücreler mitoz girdiği zaman bu interfaz ağı dağılır ve kromozomların bir araya gelmesi için gerekli olan bir mitotik iğ halinde yeniden düzenlenir ve bunu kardeş kromatitlerin ayrılması izler. Mikrotübüller, mikrotübül duvarını oluşturan α ve β tübülün heterodimerlerinin 13 protofilament haline polimerizasyonu ile oluşmuş, yaklaşık 25 nm çapında, uzun, koyu (stiff) ve silindirik tüplerdir. Mikrotübüller oldukça dinamik olan sürekli olarak büyüyen ve küçülen yapılardır. Bu süreç dinamik kararsızlık olarak adlandırılır. Bu dinamik polimerizasyon davranışı, tübülün alt ünitelerine bağlanan GTP' nin hidrolizi ile sürdürülür: Mikrotübüllerin iki ucu farklıdır: + uç daha dinamik olup net bir büyüme gösterebilirken, - uç, sentrozom ya da mikrotübül düzenleyici merkezde (MTOC, Microtubul Organising Center) sıkıca bağlanmıştır ve daha az dinamik olup net bir küçülme gösterebilir. Bu yüzden, belli bir zamanda, mikrotübüller polimer miktarlarında değişiklik göstermeyebilirler. Ancak büyük ölçüde dinamizm sergilerler. Mikrotübüllerin ikinci önemli dinamik davranışı “treadmilling” olarak adlandırılır. + uca kesintisiz bir büyüme ve eksi dengeli bir kısalma olmaktadır. Bu nedenle, treadmilling mikrotübüllerin + ucundan – ucuna tübülün alt ünitelerinin akışında meydana gelir. Dinamik kararsızlık ve treadmilling, mikrotübüllerin işlevi için, özellikle mitoz sırasında önemli özelliklerdir. Birçok farklı protein mikrotübüllere bağlanabilir. Bunlardan bazıları mikrotübül bağlayıcı proteinler (MAPs) olarak adlandırılan yapısal proteinlerdir ve mikrotübüllerin dinamik davranışını ve stabilitesini düzenlerler. Mikrotübül bağlayıcı proteinlerin diğer büyük grubu motor proteinlerle temsil edilmektedirler. Bu gruptaki proteinler Kinezinler ve dineinler olarak gruplandırılabilir. Bu proteinlerden bazıları hücre içi protein taşınmasına öncülük ederek mikrotübüller boyunca hareket ederler. Diğerleri ise mitozda sentrozom konumlandırılmasında, kromozom toplanması ve ayrılmasında özel işlevlere sahiptir (Schmidt ve Bastians, 2007; Çoğulu ve ark., 2007).

3.2. Mitoz

Mitozda kromozomlar yoğunlaşırlar (kondense olurlar). Çekirdek zarfı bozulur, hücre iskeleti mitotik iğsi cisimcik oluşturmak üzere organize olur ve kromozomlar zıt kutuplara göç ederler. Kromozomların ayrılmasını hücre bölünmesi yani sitokinez izler.

Mitozda temel olarak kromozomlar kondense olur mitotik iğsi iplikçikler oluşur ve bu iplikçiklerin mikrotübüllerine kromozomlar tutunurlar. Kardeş kromatitler daha sonra birbirlerinden ayrılırlar ve zıt kutuplara göçerler. Bunu da yavru hücrelerde çekirdek oluşumu izler. (Schmidt ve Bastians, 2007; Çoğulu ve ark., 2007).

Mitozun 4 dönemi vardır:

- 1) Profaz
- 2) Metafaz
- 3) Anafaz
- 4) Telofaz

Profaz, nükleer zarın dağılımı ile başlar. Çok küçük veziküller halini almış zar vezikülleri parçalanıp dağılırlar. Bütün mitoz boyunca iğcik çevresinde kalırlar ve nükleer zarın dağılması ile iğciği oluşturan mikrotübüller nükleusun yer aldığı bölgeye uzanırlar. Profazda kondensasyon (yoğunlaşma) meydana gelir. Kromozomların her biri iki kardeş kromatitten ibarettir. Bu dönemdeki DNA molekülleri S döneminde oluşmuştur. Replik olmuş bu DNA molekülleri birbirine sarılı olarak S ve G2 dönemlerini geçtikten sonra kromozom kondensasyonu boyunca birbirinden ayrılırlar. Kondense olmuş kardeş kromatitler sentromerde birleşirler. Sentromer proteinlerin iğsi iplikçik mikrotübülünün temas ettiği yer olan kinetokoru oluşturmak üzere bağlandığı proteinlerin bulunduğu DNA dizisidir. Sentrozomlar mikrotübül büyüme merkezleridir. Mikrotübüller buralardan hücrenin çevresine doğru uzanırlar. Mitotik iğcik 3 tip mikrotübül içerir:

- 1) Polar Mikrotübül: Kutuplardan ekvatora doğru uzanır. Karşılıklı kutuplardan uzanan ve ekvatoru biraz geçen polar fibriller, ekvator

bölgesinde mikrotübül bağlayıcı proteinler ile birbirlerine çapraz olarak tutunurlar.

- 2) Kinetokor mikrotübül: Kromozomların sentromerine tutunarak kromozomları kutuplara bağlar.
- 3) Yıldızsı mikrotübül: Kutuplarda sentromerin etrafında, sentromerden hücrenin periferine doğru ışınsal olarak uzanırlar (Goodman B. ve Zheng Y.,2006)

Kromozomlar iççiğe kinetokor adı verilen yapılarla tutunurlar. Kardeş kromatitler ise sentromerleri ile birbirlerine kaynaşmışlardır. Sentromer, kromozom ayrışması için gereken özel bir DNA bölgesidir. Profazda her bir sentromer üzerinde her bir kromatidin sentromer bölgesine bir tane denk gelecek şekilde birbirine zıt yönde iki kinetokor gelişir. Kinetokorlar metafazda kutuplardan kromozomlara doğru uzanan kinetokor fibrillerinin kromozomlara tutundukları yerdir. Kinetokor, mitozda kromozom hareketini sağlayan esas elemandır. Üç tabakalı bir yapı gösterir. Plaka gibi olup, bir multiprotein kompleksidir. Kinetokora bağlanan mikrotübül sayısı türlere göre değişir. İnsanlarda yaklaşık olarak 20-40 mikrotübül bağlanır. Profazda, çekirdek zarfın yıkılması, kromozomların mitotik iççik ile ilişki kurmalarını sağlar. Bunun sonucu olarak da bir kromozomun iki kromatidi birbirinden ayrılır. Kinetokor mikrotübülleri her kromozomu kinetokor kutuplara bakacak şekilde mitotik iççiği ikiye bölen ekvator düzlemine yerleştirir. Böylece prometafazın karakteristiği olan kromozom hareketlenmesini başlatır. Kinetokorda toplanan proteinler, mikrotübül motorlarını içerir ve bunlar iççi iplikçik mikrotübüllerinin uçlarına doğru sentrozomdan tutunmuş olan kromozom hareketini sağlar. Ayrıca sentrozomda bulunan motor proteinler de bu harekete katkıda bulunur. Bu harekete karşı polar uçlardan karşı yöne doğru polar esinti denilen karşı bir güç de kromozomları ortaya doğru iter. Sonuç olarak; prometafaz kromozomları sentrozom ve iççi iplikçiğin merkezi arasında ileri geri hareket eder durur. Bütün bu işlemler prometafazda tamamlanır. Mikrotübüller kinetokora tutunduğu zaman diğer yandaki kinetokor da farklı kutuptan büyüyen diğer mikrotübülü yakalar. Ortaya çıkan bu prometafaz hareketleri yeni oluşan hücrelere kromatitlerin dağılmasını sağlar. Böylece anne ve babadan gelen genlerin karışması sağlanır.

Kondensasyonu takiben mitotik iğsi iplikçik gelişimine yol açan sitoplazmik değişiklikler profazda meydana gelir. Kopyalanmış olan sentromer ayrılır ve çekirdekte zıt yönlere gider.

İğsi iplikçiğin zıt kutuplarından gelen mikrotübüller kardeş kromatitlerin iki kinetokoruna temas eder ve kromozomlar üzerindeki güçlerin dengesi metafazda iğsi iplik üzerinde dizilmelerini sağlar. İğsi iplikçik kromozomlarla temas eden kinetokor mikrotübülleri ve hücrenin merkezinde üst üste gelen polar mikrotübüllerden oluşur. Ayrıca kısa yıldızlı mikrotübüller sentrozomlardan hücre periferine doğru yayılım gösterir.

Profazı takiben hücre prometafaza girer. Profaz ve metafaz arası bir geçiş dönemidir. Bu dönemde iğsi iplikçiğin mikrotübülleri kinetokorlara temas eder. Kardeş kromatit kinetokorları kromozomun zıt kutuplarına yönlendirilirler, böylece iğsi iplikçiğin zıt kutuplarından çıkacak şekilde mikrotübülle temas ederler.

Metafaz döneminde kromozomlar iki kutba da eşit mesafede olacak şekilde iğsi iplikçikte dizilirler. Bu durum kromozomları iten ve çeken güçlerin varlığı sayesinde gerçekleşir. Bu güçlerin nereden kaynaklandığı henüz bilinmemektedir. Bir kromozomu metafaz plağında tutan kinetokor fibrillerden birisi kesilirse, kromozom tam olarak, yani kromatitler ayrılmadan, kinetokor fibriliyle o yöndeki kutba doğru çekilir. Eğer iki kromatit arasındaki birleşme noktası koparılsa, her iki kromatit birbirinden ayrılır. Aynı anafazda olduğu gibi bağlı buldukları kutuplara doğru hareket ederler. Eğer bir kromozom bir kutba doğru itilirse, karşıt güç aniden artar ve kromozomu metafaz plağına çeker ve orada kalmasını sağlar. Kardeş kromatitler arasındaki bağın kopması ile metafazdan anafaza geçiş olur. Anafazda iki olay meydana gelir. Anafaz A' da kinetokor mikrotübülleri kısalır, kromozomlar kutuplara yaklaşır. Anafaz B' de polar mikrotübüller uzamaya başlar, böylece iğsi iplikçiğin iki kutbu birbirinden gittikçe uzaklaşır. Kromozomların mikrotübüller üzerindeki hareketi hakkında da değişik modeller öne sürülmekle birlikte, en çok kabul gören bir modele göre dinein ya da kinezin adı verilen bir protein ATP hidrolizi ile elde ettiği enerji yardımıyla mikrotübül üzerinde bir çeşit yürüme hareketi ile ilerlerken kromozomu da

kendisiyle birlikte sürükler. Kinetokor tarafından açığa çıkan mikrotübülün kromozom tutan ucu da devamlı yıkıma uğrar.

Kromozomlar zıt kutuplara göç ederler ve mitoz telofazla sonlanır. Telofazda kromatitler kutuplara ulaşır ve kinetokor mikrotübülleri görünmez olur. Polar mikrotübüller uzamaya devam eder, yeni çekirdek zarfı oluşur. Çekirdek tekrar şekil alır ve kromozomlar yeniden yoğunlaşırlar. Yoğunlaşmış kromatinler yaygınlaşır ve mitoz sonlanır.

Sitoplazmanın iki bölüme ayrılması olan sitokinez, geç anafazda başlar ve telofaz sonuna doğru sonlanır, iki yavru hücre oluşur. Bu dönemde sitoplazma yarıma ile ikiye ayrılır, hücre zarı büzülür ve bir oluk oluşur. Bu oluk oluşumu mitotik iğciğin uzun eksenine dik açıdır. Ana hücrenin ekvatoru etrafındadır. Genellikle simetrik olarak bölünen hücrenin bölünme düzlemi ve oluğun pozisyonu mitotik iğciğin pozisyonu tarafından önceden ayarlanır (Schmidt ve Bastians, 2007; Çoğulu ve ark., 2007).

3.3. İğ Kontrol Noktası

Mitotik bir hücrede anafaz başlamadan önce kromozomların yeni oluşan hücrelere eşit dağılımını sağlamak için metafaz boyunca kromozomların ilk olarak uygun bir şekilde sıralanması gereklidir. Bu kuralın bozulması, sıralanmamış kromozomların varlığında kromozom ayrılmasına izin verir ve bu yüzden, anaploidi ile ilişkili kromozomal değişkenlik (instabilite) meydana gelir. Kromozomların yanlış ayrılmasını önlemek için “iğ kontrol noktası” olarak bilinen bir sinyal transdüksiyon yolağı tüm kinetokorlar uygun bir biçimde iğ mikrotübüllerine bağlanana kadar anafazın başlamasını inhibe eder ve metafaz boyunca düzenler. İğ kontrol noktası sinyali çeşitli çok iyi korunmuş olan proteinlerin işlevini yerine getirir. Nükleer zarfın dağılmasından hemen sonra iğ kontrol noktasının aktivasyonu, bu mikrotübül bağlantısı ya da kinetokor gerilimi olmayan kinetokorlara toplanmasıyla ilişkilidir ve 26S proteozom aracılığı ile degradasyonu için anafaz-düzenleyici-kompleks/siklozomun (APC/C), ana mitotik proteinleri işaretleyen bir E3 ubiquitin-ligaz, inhibisyonu ile sonlanır. APC/C’ nin temel substratları sekurin ve siklin B’ dir. Bunların degradasyonları sırası ile anafazın başlangıcı ve mitozdan çıkış için gereklidir. Sekurinin

degredasyonu metafazdan anafaza geçişte kardeş kromatitleri bir arada tutan kohezyon kompleksinin bir alt ünitesine bağlı bir proteaz olan separazin, aktif şeklini serbest bırakmak için gereklidir. Böylece aktive olmuş bir iğ kontrol noktası, protein proteolizinin inhibisyonu ve kromatit kohezyonunun sürdürülmesi boyunca anafazın başlamasını önler.

İğ kontrol noktası aktivasyonunun moleküler mekanizması hakkında bilinenler çok azdır. APC/C'ye doğrudan bağlanan ve ubikuitin ligaz aktivitesini inhibe eden terminal efektör proteini Mad2' yi aktive etmek için Bub1, BubR1, Mps1 kinazların aktivitesi kadar kontrol noktası proteinlerinin kinetokorlara toplanması da gereklidir. Yine de, mikrotübül bağlanması olmadan ya da kinetokor gerilimi olmadan aktif bir kontrol noktası sinyaline nasıl dönüştürüldüğü hala bilinmemektedir. Kinetokor bulunan kinezin proteini CENP-E, mikrotübüllerin kinetokorlara bağlanma eğiliminde bir işleve sahip olmalı ve kontrol noktası sinyalinin BubR1 kinazı aktive ederek başlamasına yol açmalıdır. Buna ek olarak, aurora-B kinaz, INCENP, borealin ve survivinden oluşmuş sözde kromozomal yolcu kompleksi seçici kinetokor gerilimi yokluğunda iğ noktasının aktive edilmesinde bir role sahip olmalıdır.

İğ kontrol noktasının bozulması, yanlış sıralanmış olan kromozomların varlığında bile kardeş kromatitlerin erken ayrılmasıyla sonuçlanır. Kromozomların ya da büyük bölümünün sürekli artışı ya da azalışı doğrudan kromozomal instabiliteye (CIN) yol açar. Bu durum kanserin başlıca ayırt edici özelliği olan anaploidi ile ilgilidir. Gerçekten, birçok tümör hücresinde iğ kontrol noktası işlevi zayıflamıştır ve kontrol noktası sinyali devam ettirilmemektedir. Bu nedenle bozulan bir iğ kontrol noktası kromozomal bir instabiliteye ve kanserde tümör oluşumuna doğrudan katkıda bulunur (Schmidt ve Bastians, 2007; Çoğulu ve ark., 2007).

3.4. Mikrotübül Bağlayıcı Antikanser İlaçlar

Mikrotübüllerin işlevini inhibe eden anti-kanser ilaçların kullanılmasının gerekçesi mitotik iğın normal işlevini yapmasına engel olarak normal mitotik süreci inhibe etmektir. Aslında, mikrotübülleri hedefleyen birçok kimyasal bileşik, çoğunlukla doğal kaynaklardan elde edilir ve bu ilaçlar tümör hücrelerinin

hızla çoğalması üzerinde mitozun blokajıyla ilk etki şeklini gösterir, bu da hücre ölümünün indüklenmesine yol açar. Geleneksel olarak, mikrotübül bağlayıcı ilaçlar iki grupta sınıflandırılırlar:

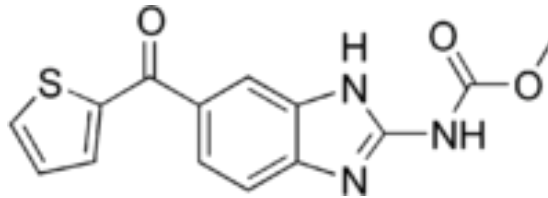
Mikrotübülleri dengeleyen (stabilize eden) çeşitli taksanlar ve epothilonları kapsayan ajanlar ile mikrotübüllerin dengesini bozan (destabilize eden) çeşitli Vinca alkaloidleri ve kolşisini kapsayan ajanlar.

Yine de, tüm bu ilaçlar düşük dozlarda, klinik olarak uygun konsantrasyonlarda nanomolar aralıkta, mikrotübüllerin net polimer miktarını değiştirmekten çok mikrotübüllerin dinamiğini baskırlar. Bu nedenle, bu ajanları mikrotübüllerin instabilitesini baskılayan ilaçlar olarak adlandırmak daha uygundur. Ancak bu ilaçlar etki şeklinden çok mikrotübüller üzerindeki bağlanma bölgelerine dayanarak gruplandırılırlar. İyi bilinen bağlanma bölgeleri, mikrotübüllerin lümenindeki β -tubulin üstündeki taksan bölgesi, Vinca etki alanı (domain), β -tubulin üzerindeki GTP bağlanma bölgesine yakın ve α - ve β -tubulin dimerleri arasındaki arayüzde kolşisin bağlanma bölgesinden oluşmaktadır (Schmidt ve Bastians, 2007; Çoğulu ve ark., 2007).

3.5. Mikrotübül Bağlayıcı Anti Kanser İlaç Olarak Kullanılan Nokodazol

Mikrotübül depolimerleşmesine bağlı olarak antikanser terapisinde tümör hücrelerinin gelişimini baskılamak için mitoz bloklayıcı ajanlar uzun zamandır kullanılmaktadır

Nokodazol, mikrotübüllerin polimerizasyonuna engel olarak hücrelerde etkisini gösteren antimitotik bir ilaçtır (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Nokodazolün kimyasal yapısı

Nokodazol hücre iskeletini etkilerken, kontrol olarak çoğunlukla hücre bölünme döngüsünü senkronize etmek için hücre biyolojisi laboratuvarlarında kullanılır. Flow sitometre ile analiz edildiğinde, Nokodazol ile tedavi edilen

hücreler G2 de veya M fazında aksamaya uğrar. Nokodazol ile tedavi edilen hücrelerin mikroskopisinde, onların mitozu girdiği fakat mikrotübüllerin polimerleşememesi sebebiyle metafaza geçemediği görülür. Kinetokora mikrotübüllerin bağlanamaması nedeniyle, prometafaz safhasında hücrenin sabitlenmesine sebep olan iğsi cisimleri birleştiren kontrol noktasını harekete geçirir. Hücre senkronizasyon deneyleri için sık kullanılan Nokodazolün hücre eş zamanlamasına başarılı olduğu gözlenmiştir. Eğer uzun süre ilaca tabi tutulursa hücrelerin geri dönüşümsüz olarak apoptozu uğraması nedeniyle hücre ölümü gerçekleşir (Çınar ve ark., 2008).

Nokodazolün bir diğer standart hücre biyoloji uygulaması, ökaryotik hücreler içindeki Golgi ministacklarının oluşumuna sebep olmasıdır. Ökaryotların içindeki Golgi aygıtının çekirdeği çevreleyen yapısal organizasyonu, mikrotübül trafiğine bağlıdır, fakat Nokodazol ile tedavi edilen E.R. den Golgi elementinin trafiğinin aksatması, E.R. çıkış kısımlarına yakın birkaç Golgi elementinin oluşumuna sebep olur. Bu, işlevsel Golgi ministacklar, hücrelerin yakınına dağıtılmış bulunur, Nokodazole mikrotübülleri depolimerize ettiğinden beri, çekirdek çevresindeki Golgiyi oluşturmak için ileri harekette bulunamaz.

Dinamik bir bakış açısıyla, ökaryot hücrelerin mikrotübülleri net bir şekilde iki alt popülasyonda kategorize edilebilir. Hareketli mikrotübüller, ekleme uçlarında büyüme ve depolimerizasyon evreleri arasında değişen dinamik bir kararsızlığa bağlıdır. Evreler arasındaki alışılmış değişimler sebebiyle, mikrotübüller hızlıca Nokodazol gibi anti-polimerleşen ilaçlar tarafından istikrarsızlaştırılır. Daha az sıklıkla değişime maruz kalan durağan mikrotübüller uzun süre boyunca uzunluğuna değişime maruz kalmazlar. Mikrotübüller, tubulin alt birimlerinde mRNA' lardan değişime uğramış proteinlerin değişikliklerinin birikimini sağlar ve anti-polimerize olan ilaçlara daha fazla dirençlidir. Ekleme uçlarının kaplanması durağan mikrotübüllerin ekleme uçlarını tıkamaya neden olan önemli bir yöntemdir. Onları, birleşen veya kopan tubulin alt birimlerinden korur, her ikisinin de dinamik önlemesini ve anti polimerize ilaçlara karşı direnişini açıklar. Buna karşın, dinamik mikrotübüllerin, başlıksız ekleme uçlarını, onların büyümesine veya küçülmesine izin vererek sergilemeleri umulur. Bu ilaçlar, kötü huylu hale dönüşmüş olan hücrelerin mitotik aparatları üzerine etki

eder veya daha açık ifadeyle hücrelerin mitotik işlevlerini etkileyip interfaz mikrotübüllerinden daha dayanıksız olan bozuk mikrotübüllere dönüşmesine sebep olurlar. Tümör hücrelerinin, mitostatik ilaçlara, sağlam hücrelere nazaran daha hassas oldukları ve sağlam hücreler için gereken dozdan daha düşük dozlarda bloke olabildikleri düşünülmektedir. Açıkça ortadadır ki Nokodazol gibi ilaçların sağlam hücrelere etkileri yabana atılmamalıdır çünkü maruz kalan sağlam hücreler de kötü huyluya dönüşme eğilimine girebilirler. Bu nedenle Nocodazolün etkilerinin doza bağlı olduğunu unutmamak gerekir (Vasquez ve ark., 1997).

Mikrotübül (MT) depolimerize edici bir ajan olan Nokodazol kullanılarak yapılan tedavilerde tüm yeni gelişen mikrotübüller şaşırtıcı bir şekilde hareketli ve durağan mikrotübülleri sırasıyla karıştıran homojen bir populasyon oluşmasına neden olur: bu durumda mikrotübüller normal olarak büyürler ve aynı zamanda anti polimerize olmuş ilaçlarla mücadele karşısında veya hücre geçirgenliğinin ardından seyreltmeye direnirler. Ayrılmaya karşı bu koruma, kesin olarak, durağan mikrotübüllerde bulunan ve MT ekleme uçlarının tıkanmasıyla MT uzamasının bozulmasına benzeyen ekleme ucu kaplamasının varlığı ile açıklanamaz. Yeni yöntemler ile gelişmekte olan mikrotübüllerin bu şartlar içerisinde korunumunun sağlanması açıklanmaya çalışılmaktadır (Eilers ve ark, 1989).

4. KONTROLLÜ SALIM SİSTEMLERİNİN HEDEFLENDİRİLMESİ

Kontrollü salım sistemlerinden nanopartiküller, ilaçların endojen bileşikler ile kimyasal modifikasyonlar sonucunda elde edilen konjugatlar; hedefle yüksek oranda etkileşme özelliğine sahip doğal/sentetik hedeflendirici moleküllerin doğrudan ilaca ya da nanopartiküler taşıyıcıya kovalan bağlanması ile hazırlanan sistemler ile ilaçların hedeflendirilmesine olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır. Bunun önemli bir nedeni konvansiyonel, biyoteknoloji ve gen kökenli ilaçların, ya da tanı maddelerinin vücudun spesifik bölgesine -doku, organ, hücre- seçici olarak taşınmasıdır. Bu seçici hedeflendirme istenmeyen yan etkilerin azalmasına, optimum terapötik yanıt elde edilmesine, yüksek dozlarda toksik etkileri gözlenen biyolojik olarak aktif kimyasal maddelerin güvenli kullanımına olanak vermektedir (Gürsoy A. Z.,2002).

4.1. Hedeflendirmenin Amacı

Konvansiyonel tedavide gözlenen olumsuzlukları elimine etmek ya da en aza indirmek, hücresel düzeylere taşınmayı artırmak, ilaçların dolaşımında ya da diğer biyolojik sıvılardaki konsantrasyonunu ve salım kinetiklerini optimize etmek, ilaçların farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerini değiştirmek, düşük ya da yüksek dozlarda etkin ve güvenli tedavi sağlamak, toksik ve immünojenik özellikleri gidermek ya da en aza indirmek, ilaçların stabilitesini artırmak ve vücudun diğer bölgelerinde herhangi bir istenmeyen etkileşmeye neden olmadan hedef bölgede istenilen düzeyde farmakolojik yanıt elde etmektir (Gürsoy A. Z.,2002).

4.2. İlaçların Hedeflendirilme Nedenleri

İlaçların klinik, farmasötik, farmakokinetik/farmakodinamik, biyofarmasötik ve ticari yönlerden hedeflendirilme nedenleri Tablo 4.1.' de özetlenmiştir (Gürsoy A. Z.,2002).

Tablo 4.1. İlaçların hedeflendirilme nedenleri

Farmasötik	Dayanıksız olması Çözünürlük sorunu olması
Biyofarmasötik	Absorbsiyonun düşük olması Membrana fazla bağlanması
Farmakokinetik/Farmakodinamik	Yarılanma ömrünün kısa olması Dağılma hacminin geniş olması
Klinik	Terapötik indeksin düşük olması Anatomik/hücresele engellerin bulunması
Ticari	İlacın hasta ve hekime yeni şekilde sunulması

4.3. Hedeflendirilen İlaç Taşıyıcı Sistemlerin İdeal Özellikleri

Biyolojik, ilaca ve taşıyıcıya ilişkin özellikler olmak üzere üç grupta toplanabilir (Tablo 4.2.) (Gürsoy A. Z.,2002).

Tablo 4.2. Hedeflendirilen ilaç taşıyıcı sistemlerin ideal özellikleri

Biyolojik Faktörler	İlaca İlişkin Faktörler	Taşıyıcıya İlişkin Faktörler
Hedefe vasküler taşıma	Kontrollü salım frekansı	Biyolojik olarak geçimli olması
Hedefe yerleşme	Hedefe ulaşmadan salımın olmaması	Biyoparçalanır olması
Endotele geçiş	İlacın istenen düzeyde olması	Maliyet etkin olması
Hedefe ilaç dağılımı		Dozaj şeklinde fiziksel ve kimyasal olarak dayanıklı olması
Salımın kontrolü		

4.4. İlaçların Hedeflendirilmesinde Temel Yaklaşımlar

İlaçların hedeflendirilmesi iki temel yaklaşımdan biri ile yapılmaktadır. Bunlardan birincisi, ana bileşiğin hedef bölgeye taşınmasını, hedefte ya da taşınma sırasında istenen bölgede aktif şekle dönüşmesini sağlayan kimyasal modifikasyon, ikinci yaklaşım ise, mikropartiküler sistemler ile ilacın formülasyonunun sistemik/diğer yollarla uygulanarak etki bölgesine gönderilmesidir.

Kimyasal modifikasyonda ilaç, taşıyıcı bileşiğe kovalan olarak bağlanmaktadır. Kimyasal modifikasyon sonucunda elde edilen konjugat moleküler yapısına, yoluna bağlı olarak hedefte veya absorpsiyonun sağlandığı bölgede kimyasal/enzimatik degradasyon ile taşıyıcı kısmından ayrılmakta ve ilaç aktif şekline dönüşmektedir. Bu yaklaşım ön ilaç tasarımı olarak bilinmekte ve ilacın yapısını kimyasal olarak değiştirmede kullanılan molekül, ilacın taşınmasını ve/veya spesifik olarak tanınmasını sağlayan kısmı oluşturarak, ilacın fizikokimyasal, biyofiziksel ve farmakokinetik özelliklerini değiştirmektedir. Taşıyıcı olarak endojen yapıda, biyolojik olarak uyumlu ve parçalanabilir bileşiklerin kullanılması, ilacın organizmada bulunan doğal biyokimyasal/metabolik yolları izlemesine neden olmaktadır. Bu amaçla endojen yapıdaki lipitler (yağ asitleri, monogliserit, digliserit, fosfolipitler ve fosfolipit türevleri), karbonhidratlar, polimerler, biyopolimerler taşıyıcı olarak seçilmekte ve elde edilen yapılar ilaçların biyotransinir türevleri veya biyokonjugatları olarak bilinmektedirler.

Kimyasal modifikasyonda bir başka yaklaşım ise ilacın kendisinin veya hedeflendirmeyi sağlayan ligand ile birlikte taşıyıcı olarak seçilen polimere kovalan bağlanması ve elde edilen polimer-ilacın konjugat ile kontrollü ve/veya hedeflendirilmiş sistemlerin oluşturulmasıdır. Bu amaçla polietilenglikol (PEG) sıklıkla kullanılmaktadır. PEG ile modifikasyona pegilasyon denilmekte ve PEG ilaçlara ve/veya lipitlere kovalan bağlandığında elde edilen konjugat miseller yapı oluşturulabilmektedir. Pegilasyon ile ilacın immunojenik özellikleri azalmakta, dolaşımda kalış süresi artmakta, dağılım hacmi küçülerek, ilacın yarı ömrü uzamaktadır (Gürsoy A. Z.,2002).

4.5. Aktif Hedeflendirme Mekanizması

Aktif hedeflendirme, mikropartiküler sistemleri Retikulo Endotelyal Sistemde (RES) toplanmaması ancak doğal dağılım modelinin değiştirilmesi sonucu spesifik hücrelere, dokulara ya da organlara yönlendirilmesi esasına dayanır. Sistemde, ya doğrudan doğruya etken maddeye ya da etken maddeyi taşıyan taşıyıcıya bağlı hedefleyici bir madde bulunmaktadır. Aktif hedeflendirme manyetik, ultrasonik ve ligant-reseptör aracılı hedeflendirme olmak üzere üç ana başlık altında incelenmektedir (Gürsoy A. Z.,2002).

4.5.1. Ligand-reseptör aracılı hedeflendirme

Bu tip hedeflendirmede farklı yapıda ligantlar kullanılmaktadır. Taşıyıcı sistemler hücre yüzeyindeki spesifik reseptörlere yönlendirilerek, hücre içine alınma ligantın ve reseptörün yapısına bağlı olarak reseptör aracılı endositoz veya transitoz ile gerçekleşmektedir. Ligant hedeflenen hücrede bulunan reseptörün özelliklerine bağlı olarak seçilmektedir. Bu seçimde ligantın özellikleri (tipi, özgünlüğü, reseptöre olan ilgisi ve bağlanması, hücre içine internalizasyon kapasitesi ve hızı, taşıyıcı sistemin ligantın fizikokimyasal özelliklerine etkisi) ve reseptörün özellikleri (antijen/reseptör yoğunluğu, epitopun [özgün tanıma ve bağlanma sağlayan bölgenin] lokalizasyonu, reseptöre bağlanmanın uygunluğa erişmesi, hücre yüzeyinde ekspresyonun artması/azalması, hücre içine internalizasyon hızı ve internalizasyon yolu) göz önünde bulundurulmakta ve doğru seçim hedeflendirmenin başarısında en önemli etkeni oluşturmaktadır. Bu bağlamda bazı hastalıklarda sadece hedef hücreye özgü yüzey reseptörlerinin bulunması veya bazı reseptörlerin ekspresyon düzeylerinin normalin üzerinde artması koşulu ligant seçiminde belirleyici bir özellik olarak kullanılmaktadır (Gürsoy A. Z., 2002).

Ligant-reseptör aracılı hedeflendirmede kullanılan ligantlar arasında lektinler, monoklonal antikolar, monoklonal antikor fragmanları, monoklonal antikor-enzim konjugatları, vitaminler, peptit yapıdaki büyüme faktörleri, sitokinler, glikoproteinler, viral proteinler, hücre adezyon molekülleri, toksinler, apolipoproteinler ve glikoaminoglikanlar bulunmaktadır. Ligantlar doğrudan

ilaca, polimer-ilaç konjugata kovalan bağlanabildiği gibi, lipozomal taşıyıcılarda lipozom membranına veya yüzeyde kaplı bulunan polimerin dış ucuna da bağlanmaktadır(Gürsoy A. Z., 2002).

Son yıllarda yapılan çalışmalar mikropartiküllü ilaç taşıyıcı sistemlerin (konvansiyonel lipozom, mikroküre, immünolipozom, nanopartikül ve lipit kökenli diğer taşıyıcılar veya biyokonjugatların hedef hücreye ulaşması ve hücre içine endositik yollarla alınabilmesinde en önemli parametrenin, taşıyıcı sistemin hedefle etkileşmesine olanak tanıyacak sürede dolaşımda kalması olduğunu göstermektedir. Bu nedenle biyolojik sıvılarda veya dolaşımda kalış süresini arttıran, opsonize edici bileşenlerle etkileşmeyi önleyen sterik stabilizasyon ve hedeflendirici ligantların ilaç taşıyıcı sistem tasarımında birlikte kullanılarak ligant-reseptör aracılı hedeflendirme yapılması ön plana çıkmaktadır. Bu tür tasarım çalışmalarında diğer bir neden ise fagositoz ile hücre içine alınan ve lizozomal enzimlere karşı dayanıklı olmayan etken maddelerin lizozomda degradasyon sonucunda etkinliklerini kaybetmeleridir. Bu degradasyon konvansiyonel ilaç taşıyıcı sistemler ile hazırlanmış olan biyoteknoloji ve gen kökenli ilaçlar içinde benzer şekilde gerçekleşmektedir. Bu nedenle ligant-reseptör aracılı hedeflendirmede, taşıyıcıların hücre içine alınması, hücre içinde istenilen organelle taşınmasının sağlanması, gerektiği durumda sitoplazmaya geçişinin artırılması için tasarımda bağlanma ve internalizasyon kapasitesi yüksek, özgün yönlendirici ligantların kullanılması gerekli görülmektedir. Bu durum ise hücre içine alınışın reseptör aracılı endositoz ile gerçekleştirilmesi veya taşıyıcı sistemin endozom membranı ile birleşmesinin sağlanması ve sitoplazmadaki enzimlerle parçalanmasını engelleyecek şekilde tasarlanmasını gündeme getirmektedir (Gürsoy A. Z., 2002).

İlaçların istenilen organ, doku ve hücreye hedeflendirilmesi ve bu amaçla kontrollü salım sistemlerinin geliştirilmesi ile yapılan çalışmalar ve bunların sonuçları dikkatle irdelendiğinde gerek konvansiyonel, gerekse biyoteknoloji ve gen kökenli ilaçların hedeflendirilmesinde yol gösterici ve karşılaşılan sorunları giderme yönünde önemli bilgilerin bulunduğu gözlenmektedir. Kontrollü salım sistemleri ile hedeflendirme kanser, gen düzeyindeki hastalıklar, diyabet, enzim eksikliği ve dejeneratif hastalıkların tedavisinde bugün alternatif olan, ancak

gelecekte tercih edilecek sistemlerin geliştirilmesini sağlayacaktır. Bu konudaki başarılı yaklaşımlar ve bunları klinik tedavi uygulanabilmeleri multidisipliner bilgi ve araştırma sonucunda gerçekleşecektir (Gürsoy A. Z., 2002).

4.6. Nanopartikül Taşıyıcı Sistemler

Nanopartiküller; 100 nm' den küçük ve boyutlarına özgül özelliklere (elektron tutucu etki, geçici mıknatıslık özelliği, yüzey plazmon rezonansı gibi) sahip bileşiklerdir. Boyutları ve bu özellikleri nedeniyle biyolojik sistemlere kolayca entegre olabilirler. Biyolojik ölçümler için ilk nanopartikül uygulamaları 1970' lerde 5-50 nm çaplı kolloidal altın kullanımı ve elektron mikroskop için immunositokimyasal prob kullanımı ile başlamıştır. Araştırmalar peptid, protein ve nükleik asit gibi biyolojik moleküllere bağlanabilen ve optik, elektronik ve manyetik özelliklere sahip nanopartiküllerin geliştirilmesi üzerinde yoğunlaşmıştır. Şu anda üzerinde çalışılan konu süspansiyon içinde yer alan nanopartiküllerdir (Portakal, 2008). Nanopartiküller biyolojik ölçümlerde farklı amaçlarla kullanılabilir:

- 1) Miktar tayininde organik florofor veya radyoaktif işaretlemeyi elimine etmek için nanopartiküller tercih edilebilir. Bu amaçla en çok kuvantum noktalar (quantum dots) ve metal nanopartiküller kullanılır.
- 2) Nanopartiküller solüsyondaki biyolojik ölçümlerde substrat olarak kullanılabilir. Mikrodizilim (microarray) bazlı ölçümler ile karşılaştırıldığında bu süspansiyon-bazlı ölçümler daha hızlı, daha esnek, daha yüksek tekrarlanabilirliğe sahiptir ve daha az örnek ve reaktif kullanırlar.
- 3) Sinyal iletici olarak etki gösteren nanopartiküller biyolojik örneğin işaretlenmesini elimine ettikleri için çoğunlukla tanısal ölçümlerde kullanılır.
- 4) Fonksiyonel nanopartiküller (nanomateryaller) biyolojik reaksiyonların katalizi gibi işlevleri yürütebilmek için partiküllerin spesifik fiziksel ve kimyasal özelliklerini kullanırlar (Portakal, 2008).

4.6.1. Kuantum nokta nanopartiküller (Quantum Dot, QD)

Kuantum nokta nanopartiküller nanoyapıda malzemelerdir. Aynı zamanda nokta yapılı malzemeler, yarı iletken nanokristaller ya da nanokristaller olarak da bilinirler. Küresel yapıdadırlar ve yarıçapları 1-12 nm aralığındadır. Böylesine küçük yapılar kuantum kapama etkisi nedeniyle yığın katılardan farklı davranış gösterirler. QD'lar yüksek emisyon kuantum verimleri, boyutları ile ayarlanabilir emisyon profilleri ve dar spektral bantları ile önemli optoelektronik özelliklere sahiptirler. Bu özellikleri nedeniyle bilim ve teknolojiye yeni uygulamalara yön vermektedirler. Yarı iletken nanopartiküller birkaç nm büyüklüğündeki atomların birkaç yüz ve binlik kristalin kümelenmesi ile oluşur. Bu kolloidal nanokristal yarı iletkenler periyodik tablonun II-VI, III-V ya da IV-VI gruplarından oluşabilir. CdS'nin kolaylıkla sentezlenebilmesi, yarı iletken nanopartiküllerin spesifik optik, elektronik, fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle yaygın kullanımını arttırmıştır. Genellikle floresan olmayan bu bileşikler, nm ölçeğinde sentezlendikleri zaman yoğun, uzun süren luminesan yayılıma sahip olurlar. Elektronik band aralıkları nanopartiküllerin büyüklüğüne ve şekline bağlı olduğundan CdS nanopartikülleri farklı uygulamalarda kullanılabilir. Yarıiletken nanopartiküllerin yüzey aktifliğinin fazla olması ve biyolojik moleküllerle etkileşimi sayesinde kuantum nokta nanopartikül biyokonjugatları hazırlanabilir. CdS nanopartikülleri streptavidin, biyotin, antikor, oligonükleotit gibi moleküllerle konjuge etmek olasıdır ve bu moleküllerin spesifik moleküler tanıma özellikleri sayesinde biyolojik analizlerde biyoorganik dedektör olarak kullanılabilmektedir. Nanopartiküllerin bu uygulamaları sayesinde organik floroforların kullanımı azalmıştır. Kuantum nokta nanopartiküller organik florofor grupları ile kıyaslandığında dar, ayarlanabilir ve simetrik emisyon spektrumu, geniş bantlı uyarılma, yüksek fotoağarma eşiği ve kimyasal kararlılığının iyi olmasından dolayı avantajlıdır (Diltemiz, S. E. 2006).

QD'lardan önceki araştırmalarda kullanılan floroforların yalnızca çok dar bir dalgaboyundaki ışıkla uyarılması ve floresan yayımları da yine belli bir dalgaboyuyla sınırlı kalması ve bu nedenle spektraların üst üste binmesi gibi sorunları nedeniyle biyolojik molekülleri eşzamanlı görüntüleme ve etiketlemede ancak üç farklı renge sahip boya kullanılabilirdi. Ayrıca boyaların

floresans özellikleri zamanla solmaya eğilimlidir (fotoağarma). Çünkü yakın çevrelerine çok duyarlıdırlar ve floresan özelliklerini kaybetmelerine neden olan geri dönüşümsüz oksidasyon işlemleriyle fotoağarmaya gidebiliyorlar. Bu, bütün çalışmalarda florofor etiketli yapıların gözlenme sürelerini kısıtlayan ana sınırlama olarak ortaya çıkmaktadır (Diltemiz, S. E. 2006).

Artan ihtiyaçlar doğrultusunda kullanımı yaygınlaşan kuantum noktalar ise şu alanlarda özellikle avantaj sağlamıştır:

- a) Biyomoleküler yüzey kaplamaların geliştirilmesinde kullanılabilir.
- b) Floresan prob olarak kullanılabilir: meme kanseri belirleyicisi Her-2'nin hücre yüzeyinde belirlenmesinde IgG ve streptavidin bağlı kuantum noktaların kullanımı ve invazif olmayan kanser hücrelerinin ayırımında kuantum noktalar ile hücre motilitesinin belirlenmesi gibi.
- c) Elektronik özelliklerinden yararlanılarak DNA hibridizasyon tayini yapılabilir
- d) Kuantum noktalar ayrıca floresan rezonans enerji transferi (FRET) için organik floroforlardan daha iyi bir vericidir (Portakal, 2008).

Çok küçük (1-10 nm) yarı-iletken nanokristaller olan QD'lar, yaygın olan organik floresan ışımaya boyalarıyla kıyaslandığında gittikçe artan bir şekilde dikkat çekmektedirler. QD'ların olağandışı parlaklıkları, verimli ışık emilimlerine, ölçülmüş yüksek sönüm katsayısına ve yüksek kuvantum kazancına (%85 - yayılan foton sayısının emilen foton sayısına oran) sahip olmalarından kaynaklanmaktadır. Bütün bunlarla birlikte, geleneksel floroforlarla karşılaştırıldıklarında ışıkla-ağartma hususunda yüksek kararlılık göstermeleriyle de QD'lar, floresan ışımaya mikroskopisinde uzun zaman boyunca gözlem yapabilmeye ve yüksek hassasiyette tespiti imkan tanırırlar. QD'lar aynı zamanda, geleneksel floresan ışımaya boyalarıyla kıyaslandığında dar bir yayılım tayfına da sahiptirler. Böylece QD'ların floresan ışımaya sinyali, uyarıcı kaynağın ışığından kolayca ayırt edilebilir. Ek olarak, QD'ların yukarıda sayılan eşsiz optik özellikleri floresan ışımaya mikroskoplarında farklı tespit kanallarına geçiş yapmadan çok renkli görüntülemeye de izin vermektedir. Ayrıca farklı yayılımlara sahip QD'lar tek bir dalga boyuyla uyarılabilmektedir. Bu da aygıt kurulumundaki sayısız uyarıcı kaynak gereksinimini ortadan kaldırır. Nispeten uzun olan floresan ışımaya süresi QD floresan ışımaya tespitini zaman çözümlü olarak

sağlar, bu da hücre oto floresan ışımasıyla kıyaslandığında sinyal/arkaplan oranını (15 faktör kadar) artıran bir özelliktir. QD'ların en yüksek floresan ışımaya aralığı bileşenlerine bağlıdır ve tüm görülebilir ışık tayfindan (örn: CdS ve CdSe) kızılötesine kadar (örn: CdTe) uzanır. Dahası, bileşenlere bağlı yayılım aralığı içinde, yayılımın en yüksek olduğu bölge kesin olarak QD'ların ebatları ayarlanarak belirlenebilir. Daha küçük QD'lar büyük partiküllere göre daha kısa dalga boyunda yayılım yaparlar. Örneğin, CdSe nanokristallerinde 3 ve 7 nm çapındaki partiküller tam olarak sırasıyla 550 ve 650 nm dalga boyunda en yüksek yayılım yaparlar. Belirtilen QD çekirdekleri tipik olarak başka bir yarı-iletkenle kaplanırlar (çoğunlukla ZnS). Kaplanmış olan QD'lar kaplanmamış olanlara kıyasla daha ileri kuvantum kazancı sağlarlar. İlginç bir olgu da "kırpışma/blinking" olarak ifade edilen QD ışımaya sinyalinin gidip-gelme davranışdır. Bu olguya neden olan şey, uyarım sırasında yüzey kusurlarının varlığıdır ve bu da hiç foton yayılımı olmadığı zamanlarda değişken parlak ve karanlık durumlara sebep olur. Kırpışma, tespiti sınırlayan bir faktör olabileceği gibi yararlı bir ayırıcı işaret de olabilir. Örneğin QD etiketli reseptörlerin gidiş gelişlerinin takibinde bu kırpışma yararlıdır (Hild ve ark., 2007).

QD teknolojisindeki son gelişmeler, özellikle minik hayvanlar için *in vivo* görüntülemeye imkan sağlamıştır. Bu alandaki önemli gelişmeler NIR yayan QD'ların kullanımıyla sağlanmıştır. Çünkü dokularca engellenen ve emilen kısa boylu ışıklara göre NIR ışığı bariz şekilde dokunun içinden geçebilmektedir. Tespit edilebilirlik, QD'ların eşsiz optik özelliklerinin MRI izlenebilirlikle birleştirilmesiyle de artırılabilir. Bu da doku görüntülemesinde ileri gelişmelere yol açacaktır. *In vivo* deneylerine güzel bir alternatif, dokularda çok daha iyi tespitlere imkan veren ve kendinden-ışımali olarak ifade edilen QD'lardır. Burada, QD'ye bağlanmış bir biyoışımaya molekülünün nanopartikülü uyarma görevini üstlenmesiyle ortaya çıkan biyoışımaya rezonans enerji aktarımı (BRET, floresan) olgusu kullanıldığından bir uyarım kaynağına ihtiyaç yoktur. Bu sayede *in vivo*"da tespit hassasiyeti ve sinyal/arkaplan oranı geliştirilmiş olur (Hild ve ark., 2008).

BRET, FRET analizinin arkaplanında ortaya çıkan gürültüleri engeleyebilmek için geliştirilmiş bir yöntemdir. FRET analizinde belli bir dalga

boyunda ışıkla uyarılan bir floroforun kendisinden maksimum 10 nm uzaklıktaki başka bir floroforu daha yüksek dalga boyundaki ışınmasıyla uyarması (eksitasyonu) sonucu bu ikinci floroforun ışınmasıdır. Bu tür floroforlar proteinlere takıldıklarında birbirleriyle etkileşip etkileşmedikleri anlaşılabilir. Biyokimyasal reaksiyon kinetiklerinde bu yöntem sıklıkla kullanılmaktadır (Jamieson ve ark., 2007).

Yoo ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptığı bir çalışmada tekil moleküllerin görüntülenmesinde yaşanan son gelişmeler, proteinlerin moleküler mekanizmaları hakkında detaylı bilgiler sağlamıştır. Fakat bu moleküllerin hücre içindeki fonksiyonlarının altında yatan mekanizma hala bilinmemektedir. Birçok hücre biyolojisi çalışmasında, Cy3 ve GFP (Cyber 3 floresan boyası ve Green floresan protein) gibi organik floroflorlar ve floresan ışınma proteinleri kullanılarak tekil protein moleküllerinin görüntülenmesine uğraşılmış ve çok başarılı olunmuştur. Fakat bu floroflorların tekil molekül olarak gözlenebilmeleri, ani ışıkla-ağarma özelliklerinden dolayı birkaç saniye gibi çok kısa sürelerde mümkün olmaktadır. Bu yüzden, canlı hücre içindeki proteinlerin işleyişlerinin detaylı olarak incelenebilmesi için hedef proteinlerin daha uzun sürelerde görüntülenmesini sağlayacak yeni bir tekniğin geliştirilmesi önemlidir. Canlı hücrelerdeki biyomoleküllerin davranışlarının bir saat veya daha uzun süreler boyunca tespitinde, parlak ve ışık-kararlı kuvantum noktalar çok kullanışlıdır. QD' lar çok parlak ışıkla uyarıldıklarında, parlak floresan ışık noktalarının konumları, uzun sürelerde bir nanometreden daha yüksek bir kesiklikte tespit edilebilmektedir. Bu yüzden biyoloji ve tıp araştırmalarında gelecekteki ilerlemeler açısından canlı bir hücredeki biyomoleküllerin QD' larla doğrudan etiketlenmesi önemlidir.

Hücre içi görüntüleme için QD konjugatların canlı hücrelerde duvarı geçip sitoplazmaya sokulmaları oldukça zordur. Bu iş için; elektroporasyon, libozom füzyonu, mikroenjeksiyon ve hücreye girebilen polimerler ve peptitler gibi bazı metotlar test edilmiştir. Fakat bu metotlarda QD' lar kümeler halinde içeri sokulabilmiştir. Canlı hücrelerde QD etiketli tekil moleküllerin görüntülenebilmesi için, biyokonjuge QD' ların mono dağılımda salınmış olmaları ve artırılmış hedef verimine sahip olmaları gerekir. Yakın zamanda, QD' ların içeri

alınmaları için pinozomların ozmotik lizisi kullanılmıştır. Bu yöntem basitti fakat bazı hücrel fonksiyonların zarar görmesiyle sonuçlanmaktaydı.

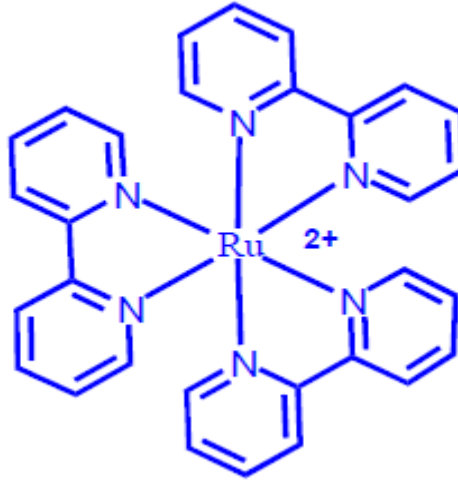
Yapılan çalışmalarda hücrel fonksiyonların zarar görmemesi için, hücre biyolojisinde DNA transfeksiyonu için yaygın olarak kullanılan lipid transfeksiyonu kullanılarak QD'lar hücre içine sokulmaya çalışılmıştır. Biyokonjuge QD'lar başarıyla salınmış ve fevkalade küçük molekül örnekleri olarak sırasıyla antikor ve enzim olan; phalloidin, anti-tübülin antikor ve kinezin moleküllerine bağlanmış QD'lar başarıyla görüntülenmiştir. Mikrotübülün ilginç dinamikleri ve kinezinin hücre içine özel davranışları ilk defa gözlenerek keşfedilmiştir. Böylece fotokararlı QD'ların kullanımı, motor proteinler gibi diğer birçok hücrel bileşenin görüntülenmesinde güçlü bir araç olacaktır (Yoo ve ark., 2008).

5. BİYOKONJUGASYON

İki biyomolekülün birbirine kovalent bağlar ile bağlanması işlemine biyokonjugasyon denmektedir. Biotin veya floresan boya ların bir proteine bağlanması ya da bir antikoru n bir enzime bağlanması gibi protein-protein biyokonjugasyonları sık rastlanan örneklerdendir. 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 (Hermanson 1996).

5.1. 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 5.1). Oda sıcaklığında yoğunluğu 12.2 g/cm³ olup gümüşü bir rengi vardır. 1844 yılında Kazan'da bulunmuştur.

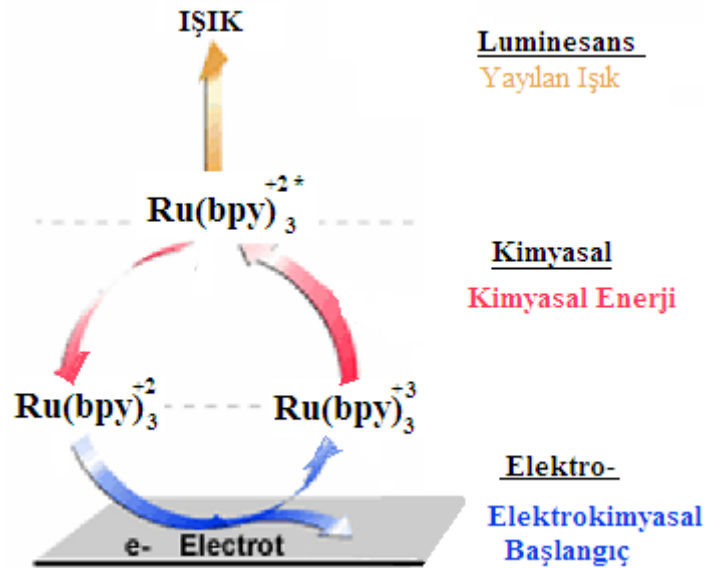


Şekil 5.1. Rutenyum'un moleküler yapısı

Genellikle rutenyum kompleksleri örneğin $[Ru(Bpy)_3]^{2+}$ elektrot yüzeyine immobilize olmuş bir monolayer olarak ya da bir korelaktant ya da Ru konjuge

antikor olarak elektrokimyasal luminesan (ECL) özellik gösterir. ECL, elektrokimyasal tepkimeler sırasında çözelti içinde üretilen bir çeşit luminesandır. 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. ECL uyarımına elektrotüremeli-*electrogenerated*- türlerin elektron transfer (redoks) reaksiyonuna sebep olur. Bütün reaktantların elektrotların üzerinde elektrokimyasal olarak üretildiği kimyasal luminesanın –*chemiluminescence*- bir formu olan luminesan uyarımı ECL uyarımına örnek olarak verilebilir.

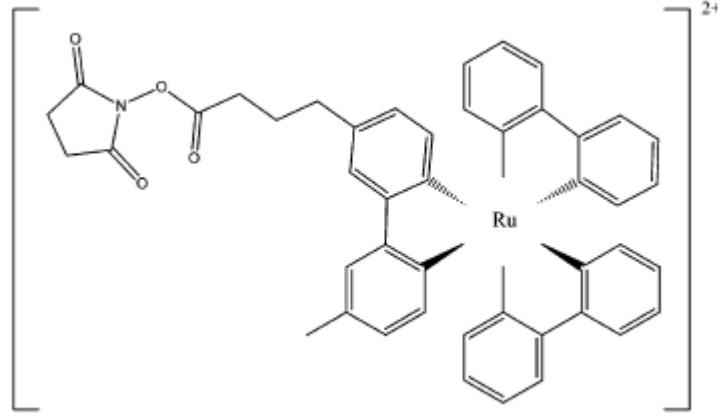
ECL, yüksek hassas ve duyarlı bir yöntem olarak analitik uygulamalar için oldukça kullanışlıdır. Örneğin $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ gibi bir ECL luminoforun varlığında bir elektroda bir voltajın uygulanması ışık emisyonuyla sonuçlanmakta ve çok düşük konsantrasyonlardaki yayılmanın tanımlanmasına olanak sağlamaktadır. $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ asetonitrilin içinde tetrabutilamonyum tetrafloroborat elektrolit olarak kullanılmasıyla ilk defa 1972 yılında rapor edilmiştir (Şekil 5.2).



Şekil 5.2. $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$ 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 bipiridin kromoforuna bağlandığında daha aktif metotlar sentezlenebilmektedir (Şekil 5.3) (Yazar, S., 2009).

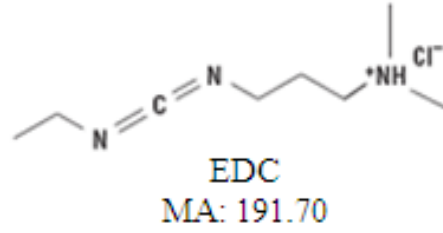


Şekil 5.3. Biyolojik molekülerin ECL işaretlenmesi için Ru(bpy)₃²⁺ – NHS

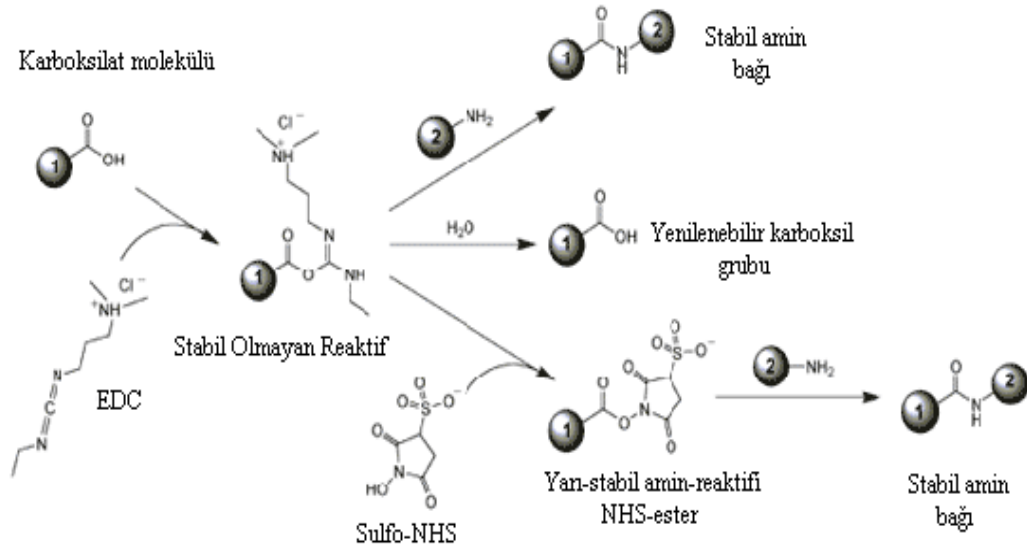
5.2. Biyokonjugasyon İşlemlerinde Kullanılan Çapraz Bağlayıcı Ajanlar (EDC ve NHS)

5.2.1. EDC

Etil-3-[3-dimetilaminopropil]karbodiimid hidroklorid (EDC veya EDAC), karboksil grupları birincil amidlere bağlamak üzere kullanılan bir çapraz bağlayıcıdır (Şekil 5.4). Bu çapraz bağlayıcı, peptit sentezinde amid bağları kurmak, haptenlerin (immünjenlerin 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 karboksil grubuna rejenere olur. EDC, bir karboksil grubunu amin-reaktif *N*-hidroksisulfosüksinimid (Sulfo-NHS) esterlerine dönüştürmek için kullanılır.



Şekil 5.4. EDC'nin molekül yapısı



Şekil 5.5. EDC reaksiyonu

Şekil 5.5.'de görüldüğü gibi EDC karboksil grubu içeren molekül 1 ile *O*-açilizoürea 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. Amin-reaktif Sulfo-NHS ester, bir protein üzerindeki karboksil grubunun değişmeden kalmasına olanak sağlayacak iki basamaklı çapraz bağlama işlemi için yeterli stabilliğe sahiptir.

EDC molekülü:

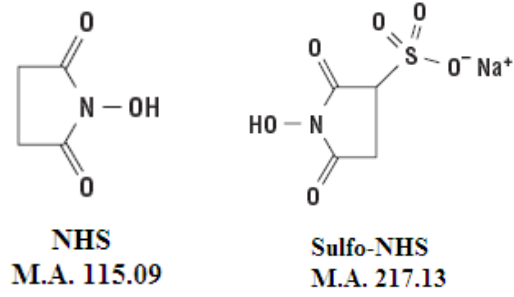
- Suda çözülebilir böylece herhangi bir organik çözücüye gerek kalmadan fizyolojik çözeltilerde çapraz bağlama işlemi yapılabilir.
- Yüksek saflıkta kristalize EDC' nin kullanılması yüksek saflıkta aktive olmuş türevlerin oluşturulmasında kullanılabilir.
- Fazla kullanılan çapraz bağlayıcı kolaylıkla su veya seyreltilmiş asit ile ortamdaki uzaklaştırılır.
- Bu çapraz bağlayıcı ile amin bağlı oluşumların 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.

5.2.2. NHS ve sulfo-NHS

Sulfo-NHS ve onun yüksüz analogu NHS, biyokonjugasyon ve çapraz bağlamanın çeşitli uygulamaları için karboksil gruplarını amin-reaktif Sulfo-NHS esterlerine dönüştürmek için kullanılan kimyasal modifikasyon reaktifleridir (Şekil 5.6). 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, biyotiline afinite gösteren kuyruklar gibi çok çeşitli protein işaretli reaktifler üretmektir (Yazar, S., 2009).



Şekil 5.6. 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 kovalan bağlanarak kendiliğinden tepkimeye girebilirler.

NHS ve Sulfo-NHS karboksil grupları aminreaktif 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 (Yazar, S., 2009).

NHS ile Sulfo-NHS arasındaki farklar ise şu şekildedir; sulfo-NHS, NHS' in sülfonat sodyum tuzudur, suda çözülebilir fakat membran geçirgenliği yoktur. NHS ise membran geçirgendir ve suda çözülebilir. NHS organik çözücülerde 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 (Yazar, S., 2009).

5.3. ANADOLUCA Metodu

ANADOLUCA [AmiNoAcid (monomer) Decorated and Light Underpinning Conjugation Approach] metodu, fotosentetik amino asit monomerlerin ve oligomerlerin hazırlanması için biyoteknoloji ve yaşam bilimlerinde kullanılan konjuge edici bir metoddur. Yeni sentetik maddeler ve bunların uygulamalarına yeni bir bakış açısı getirmektedir.

Bu metotta monomer bağlayıcı yapıdaki birçok protein temelindeki rutenyum şelat tarafından çapraz immobilizasyon ve ışığa duyarlı çapraz bağlar yapılır, metod şu aşamalardan oluşur:

- Rutenyum temelli aminoasit monomerler ve oligomerlerin ışığa duyarlı metal şelat olarak sentezi,
- Yüzeyle sahip monomer bağlayıcıların hazırlanması,
- Yüzeyle sahip monomer bağlayıcıların ışığa duyarlı rutenyum şelatla etkileşimi,
- APS gibi başlatıcılar kullanılarak mikro ve nano yüzeyli proteinlerin, antikor ve diğer biyomoleküllerin tirozin, sistein ve triptofan ile kovalent bağlanması için aminoasit monomerleri yoluyla çapraz bağlanması ve konjugasyonu.

Bu yöntem multifonksiyonel, biyo uyumlu, tek başına durabilecek veya eş zamanlı stabil ve spesifik mikro ve nano biyokonjugatlara imkan verir. Aynı anda hedefleme, görüntüleme ve teranostik özelliklere sahiptir. Kataliz ve determinasyonda kullanılır. Birçok materyale uygundur. Proteinlerin fonksiyonu ve konformasyonundan etkilenmez, pH ve sıcaklıktan bağımsızdır (Say, 2009).

6. KULLANILAN ÖNEMLİ YÖNTEMLERİN PRENSİPLERİ

6.1. Mitokondriyal Aktivite Testi (MTT) Uygulanışı

Tetrazolyum tuzu (3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT) testi indirek olarak hücre büyümesi ve/veya hücre ölümünü değerlendirmeyi amaçlayan, hücre kültürü esasına dayanan bir ilaç duyarlılığı testidir (Mossman ve ark., 1983).

MTT yöntemiyle bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem sağlam hücrelerde mitokondrinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Bu reaksiyon frajil bir mitokondrial enzim olan süksinat dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağlıdır. Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmamaktadır. Bu yöntem hücrelerin MTT boyasıyla inkübasyonu, presipite reaksiyon ürününün çözünür hale getirilmesi ve reaksiyon ürününün kolorimetrik olarak ölçümü basamaklarından oluşmaktadır (Yaka ve ark., 2006).

6.2. Akış Sitometrisi

Akış sitometrisi, hücre veya partiküllerin akmakta olan bir akışkanın içindeyken karakteristiklerinin ölçülmesidir. Akış sitometrisi ile bir süspansiyon halindeki hücre ya da partiküller, lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilir; hücrelerin ışığın önünden geçerken verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilir. Oluşan sinyallerin kaynağı, hücrenin büyüklük, granülarite gibi fiziksel özellikleri olabildiği gibi; hücreye bağlanan çeşitli florokromlar da olabilir. Böylece hücre ya da partikülün immünofenotipi, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli, canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi toplanabilir.

Ölçüm yapılırken hücreler canlı, sabit ve teker teker askıda olacak şekilde bir süspansiyon içinde, akış boyunca bir lazer ışınından geçirilir. Her bir hücre lazerle uyarıldığında floresan ışık yayar.

Akış sitometriler; akışkanlar, lazer optikler, elektronik dedektörler, analog dijital çevirimciler ve bilgisayarlar içerirler ve optik kısımları lazer yayarak ışını hücre çaplarının oluşturdukları demet üzerine odaklarlar. Floresan yoğunluğu her bir hücre için eş zamanlı olarak farklı pek çok dalga boyunda ölçülebilir.

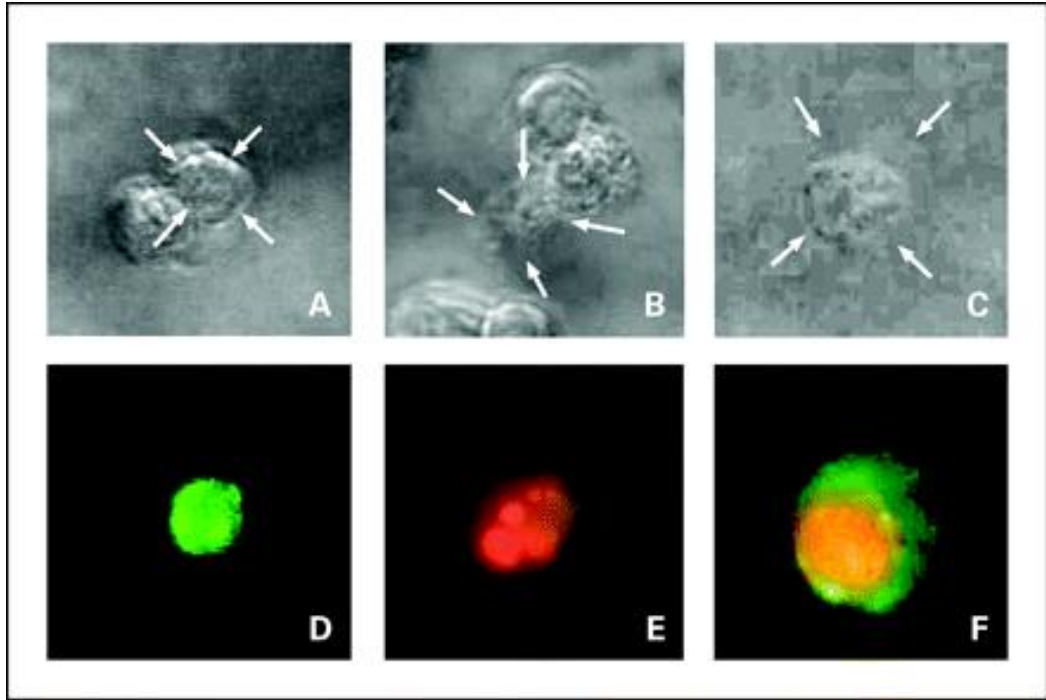
Hücrelerin spesifik bileşenlerini rapor eder, hücreler arası kalsiyum, zar potansiyeli, pH veya serbest yağ asitlerindeki hızlı değişimleri izleyebilir. (Karaboz ve ark. 2008).

Akış sitometrisi ışık mikroskobu ile karşılaştırılınca çok daha fazla hücreyi daha kısa sürede inceleme fırsatı vermesiyle avantaj sağlamaktadır. Bu teknikle 1 saniyede 500 hücre sayılır ve ortalama 10^4 hücreyi 20 saniyede analiz edebiliriz (Taneli, 2007).

Normal hücrelerde, fosfotidil serin (FS) bölgeleri sitoplazmik membranın iç kısmında bulunurlar. Apoptoz sürecinde, FS bölgeleri yer değiştirir ve dış membrana yönelir. Annexin-V, FS 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 6.1.' de differensiyal interferens kontrast mikroskobuyla çekilmiş 9L gliosarkoma hücrelerinin *in vitro* olarak çekilmiş görüntüleri bulunmaktadır. Annexin V-FITC ve PI ile boyanan hücreler sırasıyla A' dan C' ye kadar DIC ile, D' den F' ye floresan görüntülenmiş ve buna göre hücre tipleri analiz edilmiştir. A ve D, erken apoptotik hücrelerdir. Hücreler şişme olmaksızın FITC pozitif ve PI negatiftir. B and E, geç apoptotik hücrelerdir. Hücreler parçalanmış nükleuslu ve PI pozitifdir. C and F, nekrotik hücrelerdir. Hücreler kabarık FITC and PI pozitifdir (Yamamoto ve ark., 2006).

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. Böylece nekrotik ve apoptotik hücreler belirlenmektedir. FITC

(floresanizosiyanat), Annexin V proteine bağlı olan ve apoptoza uğrayan hücresleri akış sitometrisindeki lazer yardımıyla sayılmasını sağlayan floresan özellikte bir boyadır. PI ise dış koşullar nedeniyle parçalanmış hücresleri boyayan bir boyadır. Apoptoza uğrayan hücresler Annexin V-FITC boyası ile boyanır ve akış sitometrisinde hücre popülasyonundaki erken apoptoza uğrayan hücreslerin sayısı belirlenir (Q4), nekroza uğramış hücresler PI boyası ile boyanır ve akış sitometrisinde nekrotik hücreslerin sayısı belirlenir (Q1), Annexin V-FITC ve PI boyaları birlikte hücresleri boyarsa akış sitometrisinde hücreslerin apoptoza ve sonra nekroza uğradığı gösteren geç apoptoz değeri belirlenir (Q2) ve her iki boyanın da bağlanmadığı hücresler ile sağlıklı hücre sayısı belirlenmektedir (Q3). (http://www.bdbiosciences.com/external_files/pm/doc/tds/cell_bio/live/web_enabled/6710KK_556570.pdf).



Şekil 6.1. Annexin V-FITC and PI ile boyanmış 9L gliosarkoma hücreslerinin in vitro görüntüleri

6.3. Floresan Spektrofotometresi

Floresan spektroskopisi, uyarılmış yapıların yaydıkları radyasyonun ölçümüne dayanarak yapılan bir analiz yöntemidir. Bu cihaz spektrum tarama, kinetik, yarı ömür ve kantitatif analiz ölçümlerini floresan, fosforesan veya kemi/biyoluminesan modlarında yapabilmektedir. Cihazın spektral band genişliği hem uyarılma hem de emisyon bölgelerinde iki kademedede seçilebilmektedir.

Floresan spektrofotometre basitçe geniş bir bant aralığında ışık kaynağı, bir monokromatör, bir örnek hücresi ve bir diyot dizi sensöründen oluşmaktadır. Prensipli kısaca şu şekildedir: 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 floresan spektrumu sabit bir uyarılma dalga boyunda elde edilebilir veya emisyon spektrumu sabit bir floresan dalga boyunda kaydedilebilir.

7. MATERYAL METOT

7.1. Kullanılan Kimyasallar

Nokodazol, Anti tübülün, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Fetal Bovin Serumu (FBS), Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10000 U/mL penisilin, 10mg/mL streptomisin), Tripsin-Etilendiamintetraasetik asit (Tripsin/EDTA), Dulbecco's sodyum-fosfat Tamponu (PBS), Dimetil sülfoksit (DMSO), MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid), PIPES, GTP, Sigma; Gluteraldehit, Electron Microscopy Science; Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, BD Pharmingen™; diğer bütün kimyasallar analitik saflıkta olup, Merck AG (Darmstadt, Almanya) firmasından sağlanmıştır. Deneyleerde 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.

7.2. Kullanılan Cihazlar

Cary Eclipse floresan spektrofotometre cihazı; BD FACSAria™ Akış sitometri cihazı, Leica DM6000B mikroskop (floresans görüntüleme), Leica Inverted Mikroskop, Heraeus CO2 inkübatörü, ELIZA cihazı (Bio.Tek. ELx808IU), Nüve BM 302 Su Banyosu, Heraeus Megafuge 1.0/1.0R santrifüj, Heraeus Sepatech Biofuge 17RS Soğutmalı Santrifüj, Heraeus SUT 6200 Kuru Hava Sterilizatörü, Hirayama HVE50 Otoklav, Heal Force® laminar steril kabin, Shimadzu 8000 model FT-IR, Holten steril kabin, Heraeus Etüv.

7.3. Cds/Kuantum Noktalarına (QD) Anti Tübülün Konjugasyonu

Öncelikle CdS/kuantum noktaları (QD) sentezlenmiştir. Bunun için etanol ile 24 mL 0.01 M Cd(OAc)₂.H₂O solüsyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan solüsyon azot ortamında 30 dakika oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Daha sonra sodyum sülfid (0.01 M, 24 mL) yavaşça ortama eklenmiş ve karışım 30 dakika azot

ortamında tekrar karıştırılmış ve sonra santrifüjlenmiştir. Çökelek iki kere distile su ile yıkanmış ve hava ile oda sıcaklığında kurutulmuştur.

CdS nanokristalleri Hür ve ark. (2007) tarafından sentezlenen metakriloilamido sistein (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-MACys çözeltisine Hür ve ark. (2007) tarafından sentezlenen metakriloilamido tirozin (MATyr) bağlanması için 5,08 mg MATyr 1 mL suda disperse edilmiş ve 1 mL CdS-MAC solüsyonu üzerine ilave edilmiş ve 24 saat karıştırılmıştır.

Konjugasyonlar ANADOLUCA metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Say, 2009). Anti tübülün antikorumun kuantum noktalarına konjugasyonu için, 10 ppm 1 mL anti tübülün solüsyonu hazırlanmış ve 2 mL CdS-MAC-MATyr çözeltisine ilave edilmiştir. Üzerine 100 µL Say ve ark. (2009) tarafından sentezlenen polimer çözeltisi p(MATrp-Ru(bipyridine)₂-MATrp) ilave edilmiş ve 2 saat karıştırılmıştır. Daha sonra fosfat tamponunda (pH:7.4) hazırlanmış 100 µL 100 mM APS (Amonyum persülfat) ilave edilerek polimerizasyon başlatılmış ve gün ışığında oda sıcaklığında 4 saat polimerizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. 4 saat sonunda bağlanmayan anti tübülünün uzaklaştırılması için fosfat tamponu (pH:7.4) ile iki kere yıkama işlemi yapılmıştır. QD nanobiyokonjugatları sayesinde floresan özellik kazanan polimerik anti tübülünün floresan spektrumu ölçülmüştür.

7.4. Anti Tübülün Konjuge QD'ların Hücrelerdeki Tübülün İle Etkileşimi

Fen Fakültesi Biyoloji laboratuvarlarında 2,5 mL fosfat tamponu (pH:7.4) içinde 5×10^5 A549 (İnsan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri) hücre dizisi, lizat ve kaspaz içeren hücre kokteyli temin edilmiş ve 500 µL polimerik QD konjuge anti tübülün ile karıştırılmıştır. Karışım sonucunda anti tübülün ve tübülün bağlanma etkinliği floresan spektrofotometresinde ölçülerek değerlendirilmiştir.

7.5. QD Konjuge Polimerik Anti Tübülin İle Nokodazol (NOK) Konjugasyonu

3 mL fosfat tamponu (pH:7.4) içinde disperse edilmiş QD konjuge polimerik anti tübülün (QD-anti tübülün) üzerine 250 µL 0.1 M N-hidroksisüksinimid (NHS) ile 250 µL 0.4 M 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid (EDC) ilave edilmiş ve 2 saat karıştırılmıştır. 2 saatin sonunda karışıma DMSO içinde çözülmüş 0.1 M/3 mL olacak şekilde Nokodazol stok çözeltisinden ilave edilmiş ve 24 saat manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılmıştır. 24 saat sonunda 12000 rpm hızda 10 dakika süre ile QD konjuge polimerik anti tübülün biyokonjugatı ve Nokodazol karışımı santrifüjlenerek polimerik anti tubuline konjuge olmayan Nokodazol molekülleri uzaklaştırılmıştır. Santrifüj sonunda pellet 3 kere fosfat tamponu (pH:7.4) ile santrifüjlenerek yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Nokodazol konjuge polimerik QD-anti tübülün floresan spektrofotometresinde incelenmiş ve Nokodazol konjugasyonu sonucu floresan spektrumundaki değişim belirlenmiştir.

7.6. Annexin V ile İşaretlenmiş QD Konjugatının Hazırlanması

3 mL QD-anti tübülün üzerine 250 µL 0.1 M NHS ile 250 µL 0.4 M EDC ilavesi eşliğinde 100 µL Say ve ark. (2009) tarafından patent beklemesinde olan MATrp-Ru(bipyridine)₂-MATyr ilave edilmiş ve 4 saat karıştırılarak fotosensitif kovalent konjugasyon daha sonra fosfat tamponu ile yıkanarak bağlanmayan materyalin uzaklaştırılmasının ardından 10 µL annexin V proteini katılarak kovalent çapraz bağlı yapı elde edilmiştir. QD-anti tübülün prosedüründe olduğu gibi NHS ve EDC ile karıştırılmıştır, APS eşliğinde QD-anti tübülün annexin V biyokonjugatı 0,1 mM Nokodazol ile karıştırılarak bağlanma sağlanmıştır. Karışımdan sonra polimerik madde yıkanarak floresan spektrometresinde ölçüm yapılmıştır.

7.7. Sıçan Embriyo Fibroblast Hücreleri ve İnsan Meme Kanseri Hücreleri ile Hücre Kültürü Uygulamaları

Çalışmada yapılan deneylerde laboratuvarlarımızın NIH/3T3 fare embriyo fibroblast hücreleri ve MCF-7 insan meme kanser hücreleri kullanılmıştır.

NIH/3T3 (fare embriyo fibroblast) hücre serisi Jainchill ve arkadaşları tarafından 1969 yılında türetilmiştir. MCF-7 hücreleri 1970 yılında Kafkasyalı 69 yaşındaki bir bayandan elde edilen meme kanseri hücre hattıdır (Soule ve ark.,1973).

7.7.1. Stoktan hücre çıkarma

Pasajlanacak NIH/3T3 hücreleri -196 °C' de sıvı azot tankında bulunan hücre stoklarından çıkarılmış ve vakit kaybetmeden su banyosunda sıvı hale gelince, uygun besiyeri içine alınarak, 1200 rpm' de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı döküldükten sonra, hücreler yeni besiyeri içinde dağıtılarak kültür flasklarına alınmış ve 37 °C' de, % 5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre kaldırılmıştır. Hücrelerin çoğaltılmasında % 10 FBS (Fetal Bovine Serum) içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) besiyeri ve % 2 penisilin streptomisin antibiyotik karışımı kullanılmıştır.

Aynı şekilde MCF-7 hücreleri ise aynı prosedürle farklı olarak RPMI (Roswell Park Memorial İnstitute) besiyerinde muamele görmüştür.

7.7.2. Hücre dizilerinin pasajlanması ve sayımı

Hücre kültür kaplarındaki kirlenmiş vaziyetteki hücre besiyerleri pipet yardımıyla atılmış ve kültür kabına yapışmış olan hücreler öncelikle PBS (Phosphate Buffered Saline) yardımıyla yıkanmıştır. Kültür kabının büyüklüğüne ve hücrenin yoğunluğuna bağlı olarak 1X tripsin/EDTA solüsyonu konmuş, bir iki dakika etüvde bekletilerek hücrelerin yapıştıkları flasktan kalkmaları sağlanmıştır. Tripsinin etkisini nötralize etmek için, kalkan hücrelerin üzerine hemen besiyeri ilave edilerek, besiyeri-hücre karışımı santrifüj tüpüne aktarılmıştır. 1200 rpm' de 5 dakika santrifüj sonrasında, pellet üzerine kullanılan hücre kültür kabının büyüklüğüne göre besiyeri eklenmiş ve pipetleme yapılmıştır.

Santrifüj tüpünde homojen olarak dağılan hücreler, pipet yardımıyla hücre kültür kaplarına paylaştırılmıştır.

Hücreler deneye alınmadan önce, hücre sayısı Neubauer lamında tespit edilip, deney koşullarına uygun ortamlara ekildikten sonra, deney maddelerinin 24 saat süreyle hücrelerle 37 °C' de, % 5 CO₂ içeren inkübatörde etkileşimi sağlanmıştır.

Çoğaltılan hücrelerin bir kısmı stoklanarak tez çalışmasının sonraki deneyleri için depolanmıştır.

7.7.3. Hücreleri stoklama

Hücreler, PBS ile yıkandıktan sonra, 1X tripsin EDTA yardımıyla kaldırılarak, santrifüj tüpü içerisine aktarılmış, 1200 rpm' de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında pelet üzerine her bir kriyotüp (vial) için 1800 µl hücre besiyeri konularak, elde edilen bu hücre-besiyeri karışımı 30 dakika kuru buz üzerinde bekletilmiştir. 30 dakika sonrasında, hazırlanacak vial miktarına göre, her bir vial için 200 µl DMSO çözeltisi ilave edilmiş ve homojen bir karışım elde edene dek pipetleme yapılmıştır. Hücre, besiyeri ve DMSO çözeltisi karışımından her bir vial için 2 ml aktarılmış ve vialler -20 °C'ye kaldırılmıştır. 3-4 saat sonrasında vialler sıvı azot tankına (-196° C) yerleştirilerek, stoklama işlemi tamamlanmıştır.

7.7.4. Mitokondriyal aktivite testi (MTT) uygulaması

Ayrıntılı deney basamakları aşağıdaki gibidir:

Neubauer lamında sayımları yapılan ve 3×10^4 hücre/ml yoğunluğunda olacak şekilde hazırlanan MCF-7 hücre süspansiyonu, 96 kuyucuklu hücre kültür plakalarına, her kuyucukta 100 µl olacak şekilde aktarılmış ve madde konsantrasyonları hücrelere verilmeden önce, kültür plakalarındaki hücreler % 5 CO₂'li etüvde 37° C' de 24 saat inkübe edilmiştir. Her bir konsantrasyon için, 3 plaka kuyucuğu kullanılacak şekilde konsantrasyonlar verilmiştir. Yine her madde için, hücre içeren 3 kuyucuğa besiyeri ve 3 kuyucuğa da % 0,1 oranında DMSO içeren besiyeri verilmiştir. Kontrol ve 1 µg/mL, 2 µg/mL, 3 µg/mL, 4 µg/mL, 5 µg/mL 10 µg/mL, 20 µg/mL, 30 µg/mL, 40 µg/mL, 60 µg/mL madde

konsantrasyonlarını içeren hücre kültür plakaları % 5 CO₂'li etüvde, 37° C'de, 24 saatlik inkübasyonlara bırakılmıştır. Her bir inkübasyon süresi sonunda, plakalardaki besiyeri uzaklaştırılarak, kültür besiyeri ile taze olarak hazırlanmış MTT çalışma solüsyonundan, plakaların her bir kuyucuğuna 100 µl ilave edilmiş ve plakalar 3-4 saat 37 °C' lik etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda MCF-7 hücrelerini içeren kuyucuklardaki MTT solüsyonu dökülmüş ve her bir kuyucuğa 100 µl DMSO konularak, plakalardaki hücrelerin optik yoğunlukları (dansiteleri) mikropilaka okuyucu cihazında 540 nm dalga boyunda okutulmuştur. Bu testte her maddenin 3 tekrarı alınmıştır. Işıktaki bozulduğu için MTT boya ilavesi ve sonraki aşamalarının karanlıkta yapılmasına özen gösterilmiştir.

7.7.5. Akış sitometrisi ölçümleri için hücrelerin hazırlanması

25 cm²' lik flaslara 10⁶/ml olarak ayarlanan hücrelere, anti tubulin ile konjuge edilmiş Nokodazol bağlı QD biyokonjugatları 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml ve 40 µg/ml konsantrasyonlarında olacak şekilde uygulanmıştır. 24 saat süreyle karbondioksitli inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler santrifüjlenip, 2 kere soğuk PBS ile yıkanmıştır. Bu hücre süspansiyonundan 10⁵ /ml hücre analiz tüpüne alınarak, bu çalışmada kullanılan Annexin-V-PI kitinin prosedürü uygulanmış, 100 µl Annexin V Binding Buffer içinde süspanse edilmiştir. Üzerine 5 µl Annexin V-FITC (Fluorescein isothiocyanate) ve 5 µl PI (Propidyum iyodür) ilave edildikten sonra, oda sıcaklığında ve karanlıkta 15 dk süreyle bekletilmiştir. FITC, floresan bir madde olup, hücrelerin işaretlenerek tespit edilebilir hale gelmesini sağlar. Bu süre sonunda, 400 µl Annexin V binding buffer eklenmiş ve hücreler 1 saat içinde analize alınmıştır. FACS Aria flow cytometer cihazında Diva 6.0 software kullanılarak, hücrelerin apoptoz yüzdeleri saptanmıştır. Annexin V-FITC ve PI negatif olan bölge canlı hücreleri (Q3), Annexin V-FITC ve PI pozitif olan bölge geç apoptotik veya nekrotik hücreleri (Q2), ifade etmektedir.

7.7.6. Boyama prosedürünün uygulanması

NIH/3T3 ve MCF-7 hücrelerine uygulanan bu boyama ve tutuklama prosedürü Harvard Mitchison Tıp Okulunun prosedürü yeniden düzenlenerek gerçekleştirilmiştir (<http://mitchison.med.harvard.edu/protocols/poly.html>).

Prosedürün uygulanabilmesi için 3T3 ve MCF-7 hücre dizileri lamel üzerinde tek sıra dağılacak şekilde 24 saatlik RPMI ve DMEM besiyerlerinde kültüre alınmıştır.

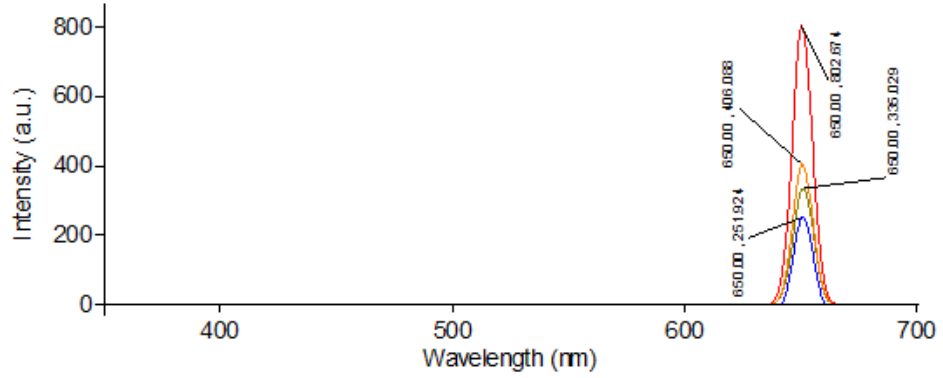
24 saat sonunda yapışan hücrelerin besiyerleri alınıp önce 1X PBS ile yıkama gerçekleştirilmiştir. Yıkamanın ardından MTSB (Mikrotübül Stabilize Edici Tampon) ve % 0,5 TX-100' de (TritonX-100) 30 saniye muameleye tabi tutulmuş ve tekrar PBS ile yıkanmıştır. % 0,5 lik gluteraldehit ile 15 dakika oda ısısında fiske edildikten sonra 1X PBS içinde hazırlanmış % 0,1 lik NaBH_4 ' de 7 dakika bekletilmiştir. % 0,5 TX-100 içeren MTSB solüsyonundan ilave edip 10 dakika oda sıcaklığında bekletilen numuneler daha sonra 1X PBS içinde % 1'lik BSA içinde 30 dakika bekletilerek tekrar PBS ile 5 dakika yıkanmıştır. Antikorlu boya maddeleri ilave edilip 3 saat oda sıcaklığında bekletilmiş ve hücrelere antikorların konuşlanması sağlanmıştır. Son olarak PBS ile 5 dakika yıkanıp lameller alınmış ve ters çevrilerek lam üzerine yerleştirilmiş, mikroskopta görüntülenmek üzere sabitlenmiştir.

8. BULGULAR

8.1. Spektrofotometrik Ölçümler

8.1.1. QD-Nanobiyokonjugat ve ilaç etkileşiminin gösterilmesi

QD, anti tubulin, QD-anti tübülün, QD-anti tübülün-Nokodazol etkileşimleri aynı seyreltme oranları kullanılarak, 350 nm uyarımla floresan spektrometresinde ölçülmüş ve şekil 8.1’ de gösterilmiştir. 350 nm’ de uyarılmış ve 650 nm emisyon değeri elde edilmiş mavi pik ile görünen QD biyokonjugatının floresanı 251, 924 a.u.; kırmızı pik ile görünen anti tubulinin floresanı 802,674 a.u.; turuncu ile görünen QD-anti tübülün biyokonjugatının floresanı 408,088 a.u.; yeşil pik ile görünen QD-anti tübülün-Nokodazol biyokonjugasyonlarının floresanı 335,028 a.u. olarak bulunmuştur.

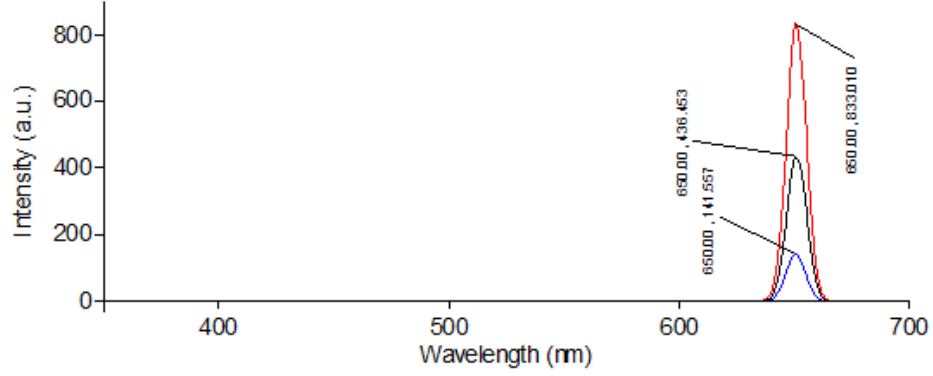


Şekil 8.1. QD biyokonjugatına ilaç etkileşimi

8.1.2. QD-Nanobiyokonjugatı ve hücre kokteyli etkileşiminin gösterilmesi

Aynı seyreltme oranları kullanılarak ölçülen QD-anti tübülün, hücre kokteyli (HK) ve QD-anti tübülün-HK etkileşimleri ile 350 nm uyarımda 650 nm emisyon değerinde ortaya çıkan pikler Şekilde 8.2’ de gösterilmiştir. Siyah pikle görünen QD-anti tübülün-HK floresanı 436,453 a.u.; mavi pik ile gösterilmiş HK

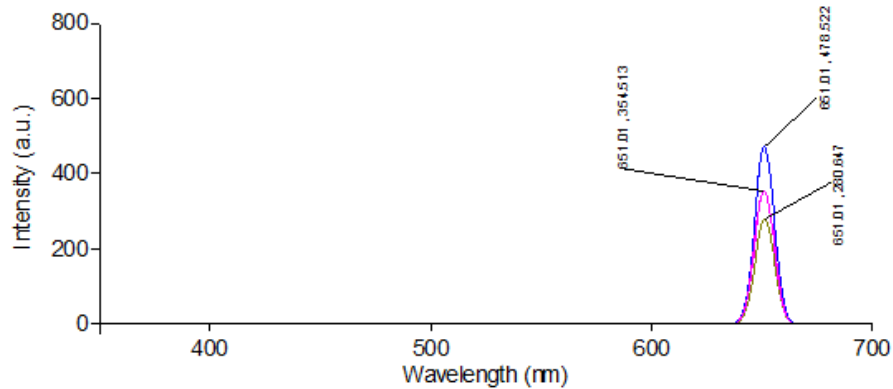
floresanı 141,557 a.u.; kırmızı pik ile görünen QD-anti tübülün floresansı 833,010 a.u. olarak bulunmuştur.



Şekil 8.2. QD biyokojugatu ve hücre kokteyli etkileşimi

8.1.3. Annexin V boyası ile bağlanmış biyokonjugatın gösterilmesi

Aynı seyreltme oranları kullanılarak ölçülen QD-anti tübülün, QD-anti tübülün-annexin, QD-anti tübülün-annexin-Nokodazol etkileşimleri ile 350 nm uyarımda 651,01 nm emisyon değerinde ortaya çıkan pikler Şekil 8.3’ de gösterilmiştir. Mavi pik ile gösterilen QD-anti tübülün-annexin floresansı 478,522 a.u.; pembe pik ile gösterilen QD-anti tübülün floresansı 354,513 a.u.; yeşil pik ile görünen QD-anti tübülün-annexin-Nokodazol floresansı 280,647 a.u. olarak bulunmuştur.



Şekil 8.3. Annexin V Boyası İle Bağlanmış Polimerlerin etkileşimi

8.2. Hücre Kültürü Analizlerinin değerlendirilmesi

8.2.1. MTT sonuçlarının değerlendirilmesi

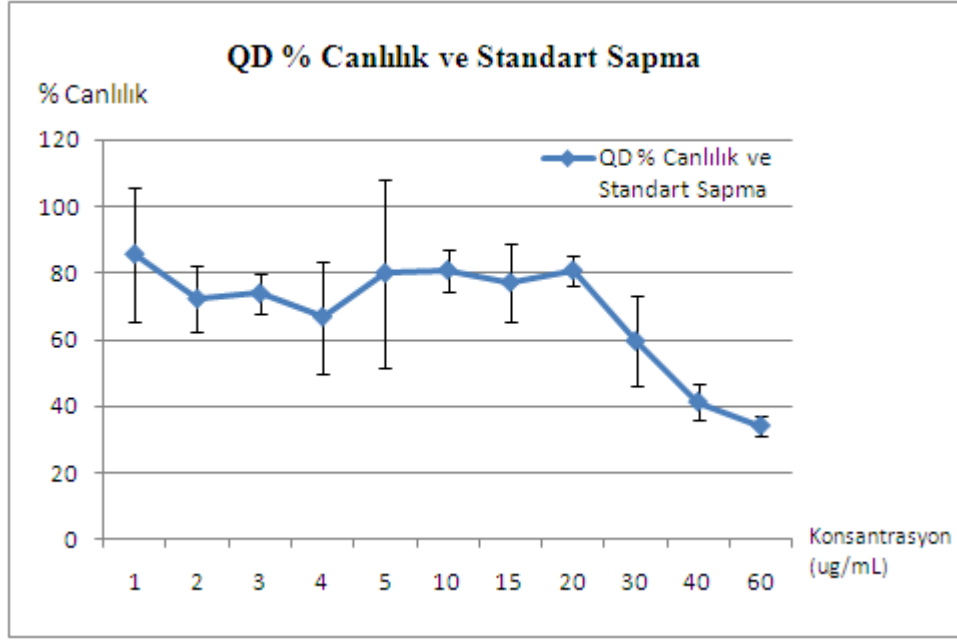
MCF-7 hücre dizisinde QD ve QD-Nokodazol grubu için Kontrol, 1,2,3,4,5,10,20,30,40,60 µg/mL'lik konsantrasyonlar her bir grup için ayrı ayrı olmak üzere toplamda 11 grup ile yapılan 24 saatlik inkübasyon sonrasında sonuçlar kontrol grubu baz alınarak ELIZA cihazında 540 nm de okutularak hesaplanmış ve MTT sonuçlarına göre yapılan analizlerde hücrelerin IC 50 değerleri (hücrelerin % 50' sini öldüren doz) 35-40 µg/mL olarak bulunmuştur. MTT sonuçlarına bağlı % canlılık ve standart sapma değerleri Tablo 8.1., Tablo 8.2.' de ve Şekil 8.4., Şekil 8.5.' de gösterilmiştir. Apoptotik etkilerin belirlenebilmesi için akış sitometride dozlar 10 µg/mL, 20 µg/mL, 30 µg/mL, 40 µg/mL şeklinde uygulanarak akış sitometrisi analizleri gerçekleştirilmiştir.

Tablo 8.1. 24 saatlik MTT inkübasyonu sonuçlarına göre QD % canlılık değerleri ve standart sapma

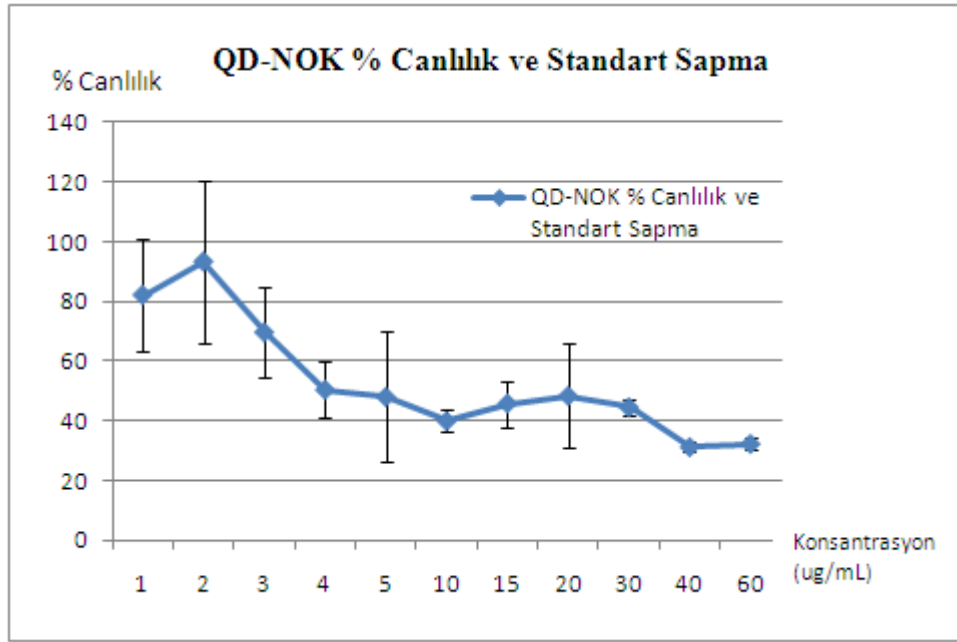
QD	% Canlılık	Standart Sapma
Kontrol	100	0
1	85,69	20,09
2	72,26	9,99
3	73,91	5,9
4	66,82	16,77
5	80,02	28,2
10	80,89	6,28
15	77,21	11,86
20	80,8	4,77
30	59,58	13,43
40	41,29	5,22
60	34,11	2,85

Tablo 8. 2. 24 saatlik MTT inkübasyonu sonuçlarına göre QD-Nokodazol % canlılık değerleri ve standart sapma

QD-NOK	% Canlılık	Standart Sapma
Kontrol	100	0
1	82,07	18,98
2	93,2	27,02
3	69,59	15,09
4	50,43	9,23
5	48,02	21,83
10	39,96	3,6
15	45,86	7,72
20	48,38	17,56
30	44,55	2,46
40	31,26	1,7
60	32,37	2,04



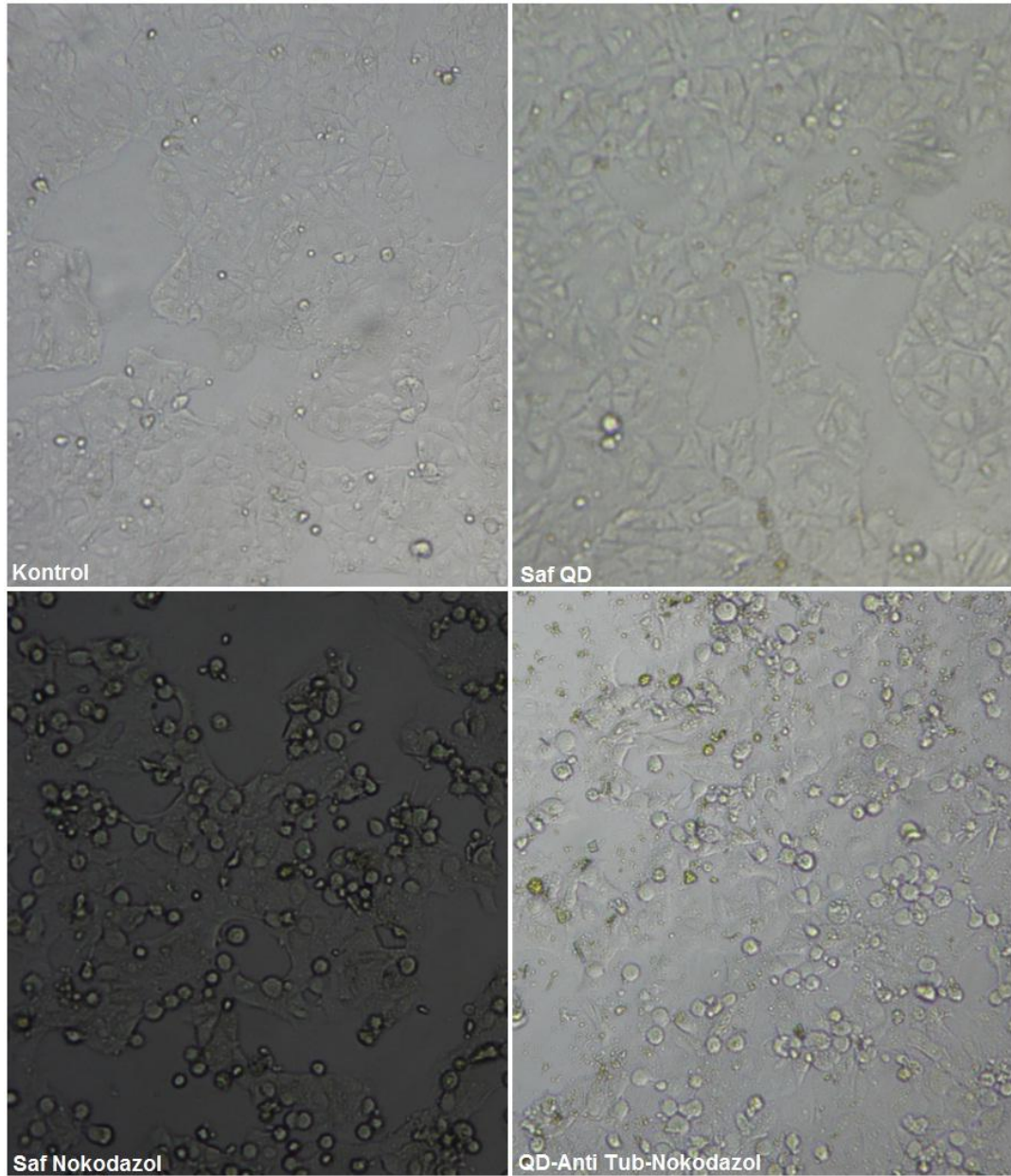
Şekil 8.4. 24 saatlik MTT inkübasyonu sonucunda 540 nm dalga boyunda okutulan QD % canlılık değerleri ve standart sapma



Şekil 8.5. 24 saatlik MTT inkübasyonu sonucunda 540 nm dalga boyunda okutulan QD-Nokodazol % canlılık değerleri ve standart sapma

8.2.2. MCF-7 hücrelerinde anti kanser aktivitenin değerlendirilmesi

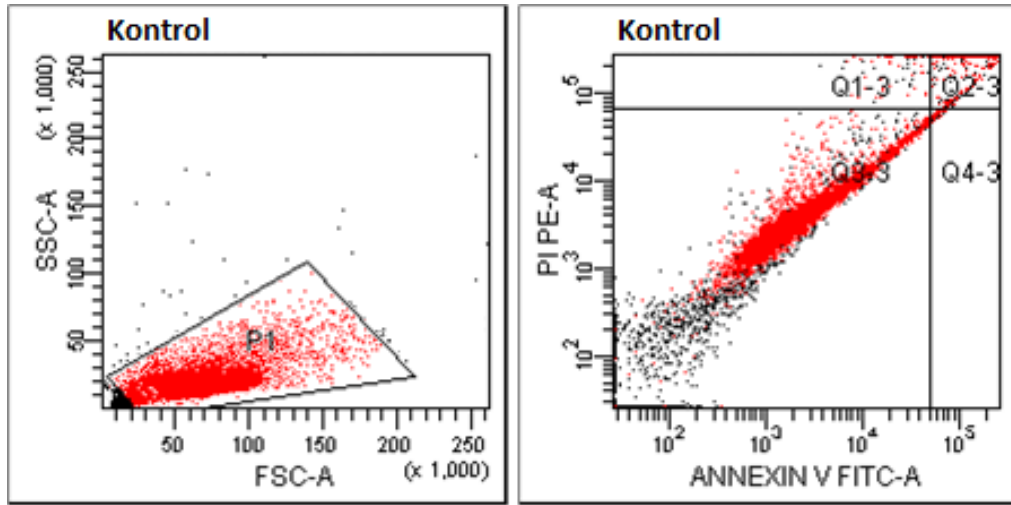
Şekil 8.4' de kontrol, DMSO-kontrol, Nokodazol, kuvantum nokta ve anti tübülünle konjuge Nokodazol bağlı kuvantum noktalarının muamelesinden sonra MCF-7 hücrelerinin 24 saatlik inkübasyon sonundaki morfolojik görüntüleri verilmiştir. Özellikle ilaç bağlı polimerlerde konsantrasyon ve inkübasyon zamanı arttıkça hücre canlılığının ve proliferasyonunun azaldığı görülmektedir.



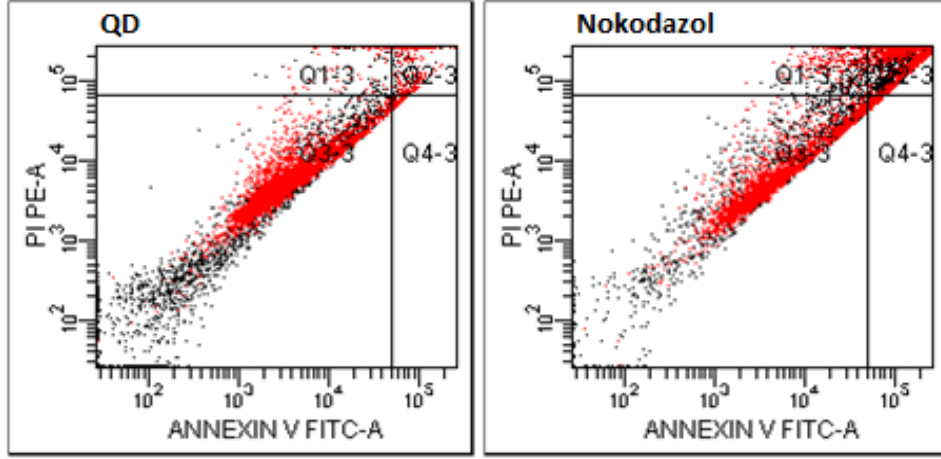
Şekil 8.6. MCF-7 hücrelerin madde verildikten sonraki ışık mikroskobu görüntüleri

8.2.3. Akış sitometrisinde ölçümleri yapılan hücrelerin değerlendirilmesi

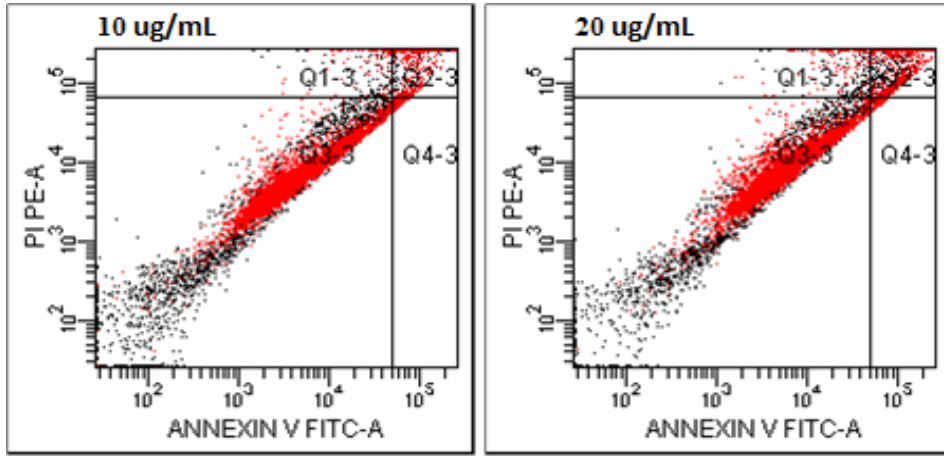
MCF-7 kanser hücreleri üzerinde denenen polimer maddenin hücre üzerindeki apoptotik etkileri Annexin V-FITC kullanılarak akış sitometrisinde değerlendirildiğinde; kontrolde canlı hücre yüzdesi % 95,8; yüzde apoptotik oran % 1,3 (Şekil 8.5), QD konjuge anti tübülün kontrolde canlı hücre yüzdesi % 93,4; yüzde apoptotik oran % 4,3; Nokodazol kontrolünde canlı hücre yüzdesi % 49,7; yüzde apoptotik oran % 41,8 (Şekil 8.6); Anti tübülün konjuge edilmiş Nokodazol bağlı QD konsantrasyonları uygulandıktan 24 saat sonra; 10 µg/ml olan konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi % 90,9; yüzde apoptotik oran % 6,0; 20 µg/ml olan konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi % 84,5; apoptotik hücre oran % 11,2 (Şekil 8.7); 30 µg/ml olan konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi % 80,8; yüzde apoptotik oran % 15,1; 40 µg/ml olan konsantrasyonda canlı hücre yüzdesi % 75,5; yüzde apoptotik oran % 20,4 (Şekil 8.8) olarak bulunmuştur. 40 µg/ml konsantrasyonda apoptotik oran kanser hücrelerinde en yüksek seviyededir.



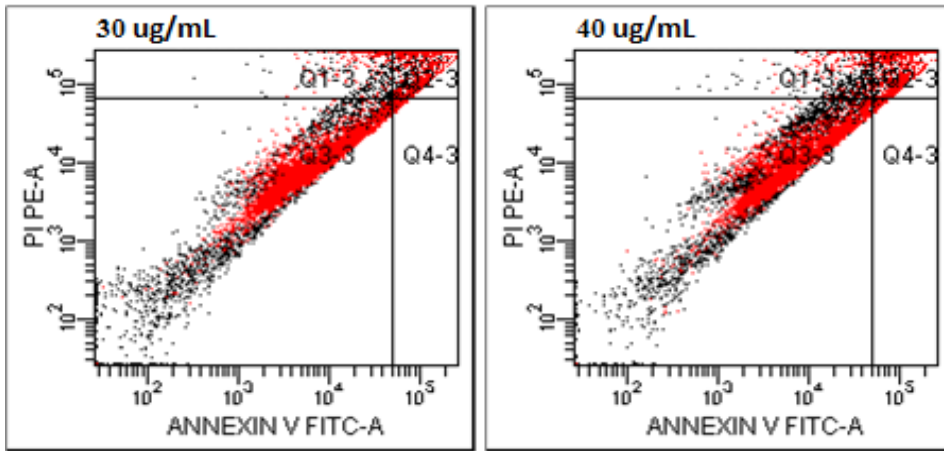
Şekil 8.7. Kontrol grubu MCF-7 hücrelerinin akış sitometrisinde değerlendirilmesi



Şekil 8.8. QD konjuge anti tübülün ve Nokodazol içeren MCF-7 hücrelerinin akış sitometrisinde değerlendirilmesi



Şekil 8.9. 10 µg/ml ve 20 µg/ml Anti tübülün konjuge edilmiş Nokodazol bağlı QD içeren MCF-7 hücrelerinin akış sitometrisinde değerlendirilmesi



Şekil 8.10. 30 µg/ml ve 40 µg/ml Anti tubulin konjuge edilmiş Nokodazol bağlı QD içeren MCF-7 hücrelerinin akış sitometrisinde değerlendirilmesi

8.2.4. Boyama sonrasında elde edilen floresan mikroskobu görüntüleri

Şekil 8.9' da MCF-7 insan meme kanser hücrelerinin sadece QD ile boyanması sonucunda floresan resimleri görülmekte ve herhangi bir kaplama olmadığı için floresan etkide çabuk düşme gözlenmektedir.

Şekil 8.10' da MCF-7 insan meme kanser hücrelerinin QD-anti tübülün ile boyanması sonucunda sitoplazmalarındaki mikrotübül yapıları çizgiler halinde belirginleşmiştir. Bu sayede anti tübülün konjuge QD'ların hücrelerle etkileşimleri net bir şekilde gözlemlenmektedir. Yeşil renkte gözlemlenen mikroskobun I3 filtresinin uyarım aralığı 450-490 nm, kırmızı renkte gözlemlenen Y3 filtresinin uyarım aralığı ise 535-650 nm' dir.

Şekil 8.11' de MCF-7 insan meme kanser hücrelerinin QD-anti tübülün-Nokodazol ile boyanması sonucunda sitoplazmadaki kıvrımlar ve hücrelerde meydana gelen profaz, prometafaz ve anafaz evreleri gözlemlenmiştir.

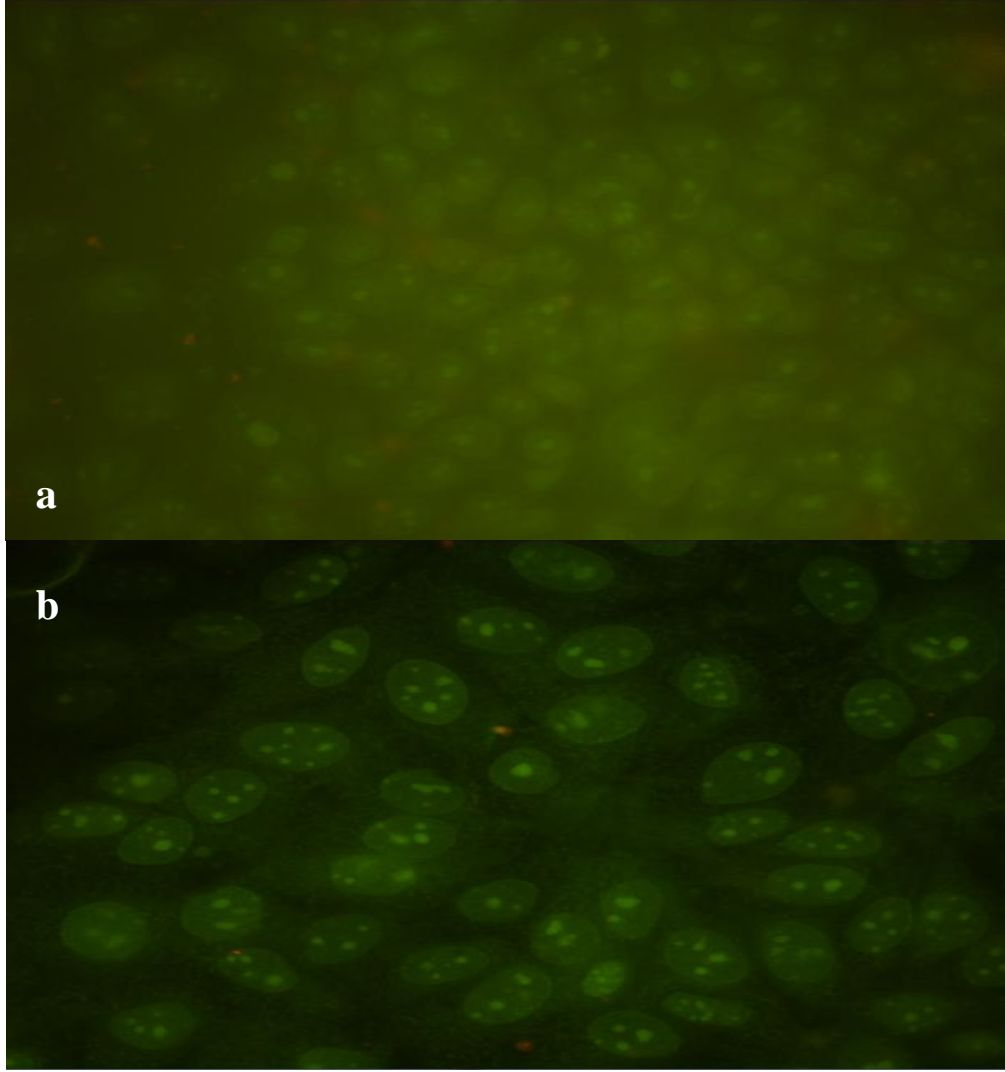
Şekil 8.12' de MCF-7 insan meme kanser hücrelerinin QD-anti tübülün ve QD-anti tübülün-Nokodazol ile boyanması sonucundaki farklılaşmalar kıyaslanmış ve hücre çekirdeklerinde ilaca olan tepki gözlenmiştir.

Şekil 8.13' de Annexin bağlı anti-tübülünli QD biyokonjugatları ile 3T3 normal tip fare fibroblast hücrelerinin çekirdekleri ve mikrotübüllerinin ipliksi yapıları kolayca görülebilecek şekilde boyanmıştır.

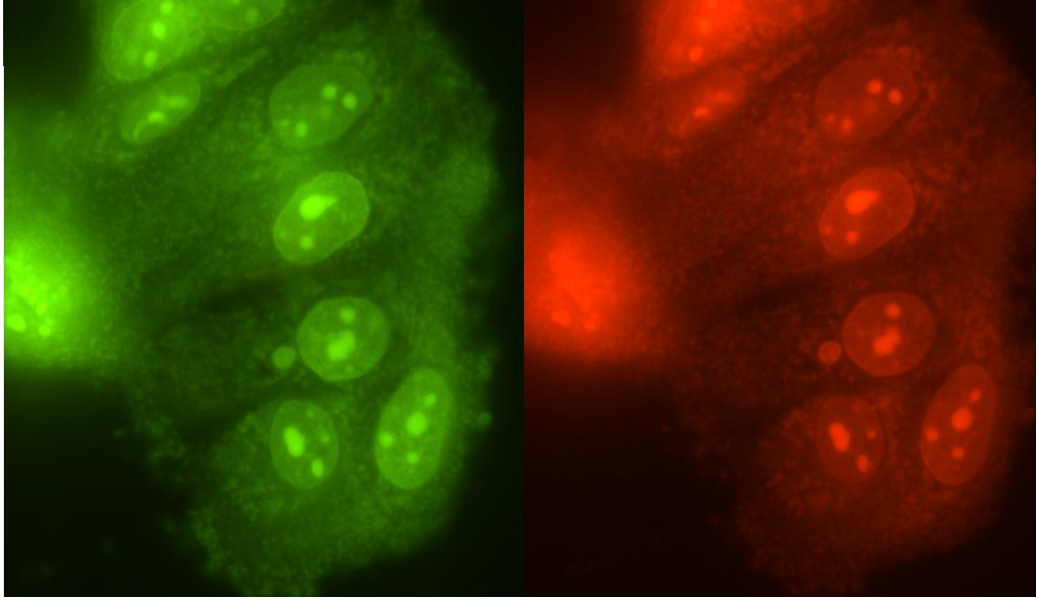
Şekil 8.14' de MCF-7 insan meme kanser hücrelerinin annexin bağlı anti-tübülünli QD biyokonjugatları ile boyanması sonucu ipliksi mikrotübül yapılarını görmekteyiz.

Şekil 8.15' de Nokodazol ile konjuge, Annexin bağlı anti-tübülün QD biyokonjugatlarının mikrotübül yapısında meydana getirdiği değişiklikler sonucu kıvrımlı yapılanmaları ve küçük resimde mitozun anafaz evresi gözlemlenmektedir.

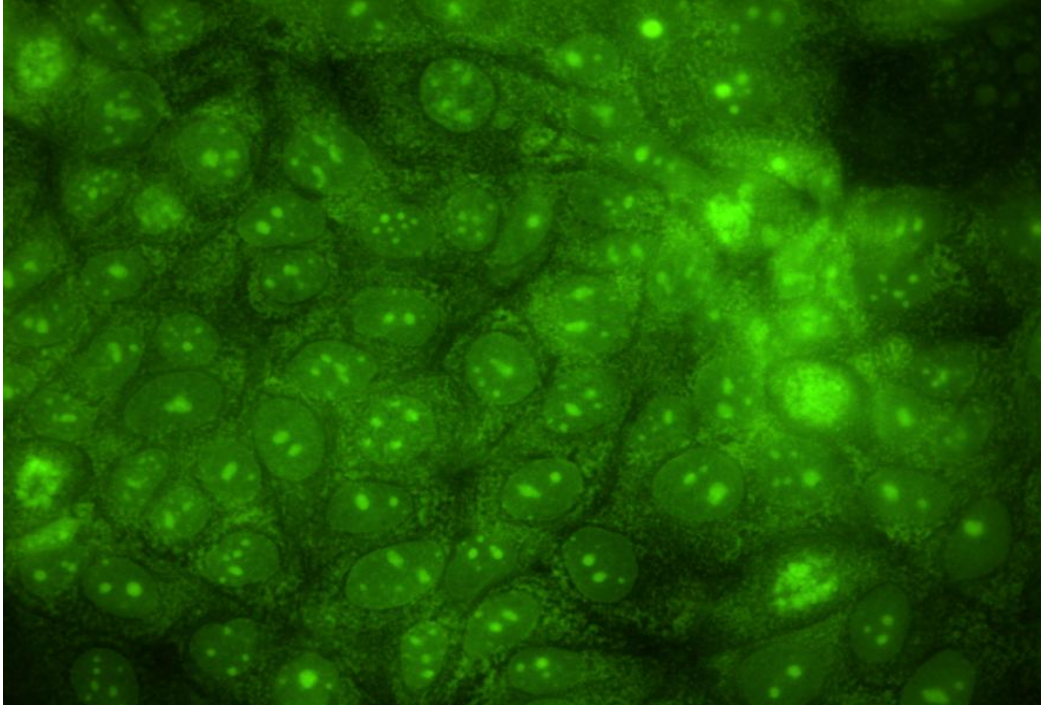
Şekil 8.16' da mitozun interfaz safhasına geçmeden önce durmuş Nokodazol ile konjuge anti-tübülün QD biyokonjugatları ile boyanmış MCF-7 insan meme kanser hücreleri profaz ve prometafaz evrelerinde görülmektedir, stoplazmadaki mikrotübüller ise kıvrımlaşmıştır.



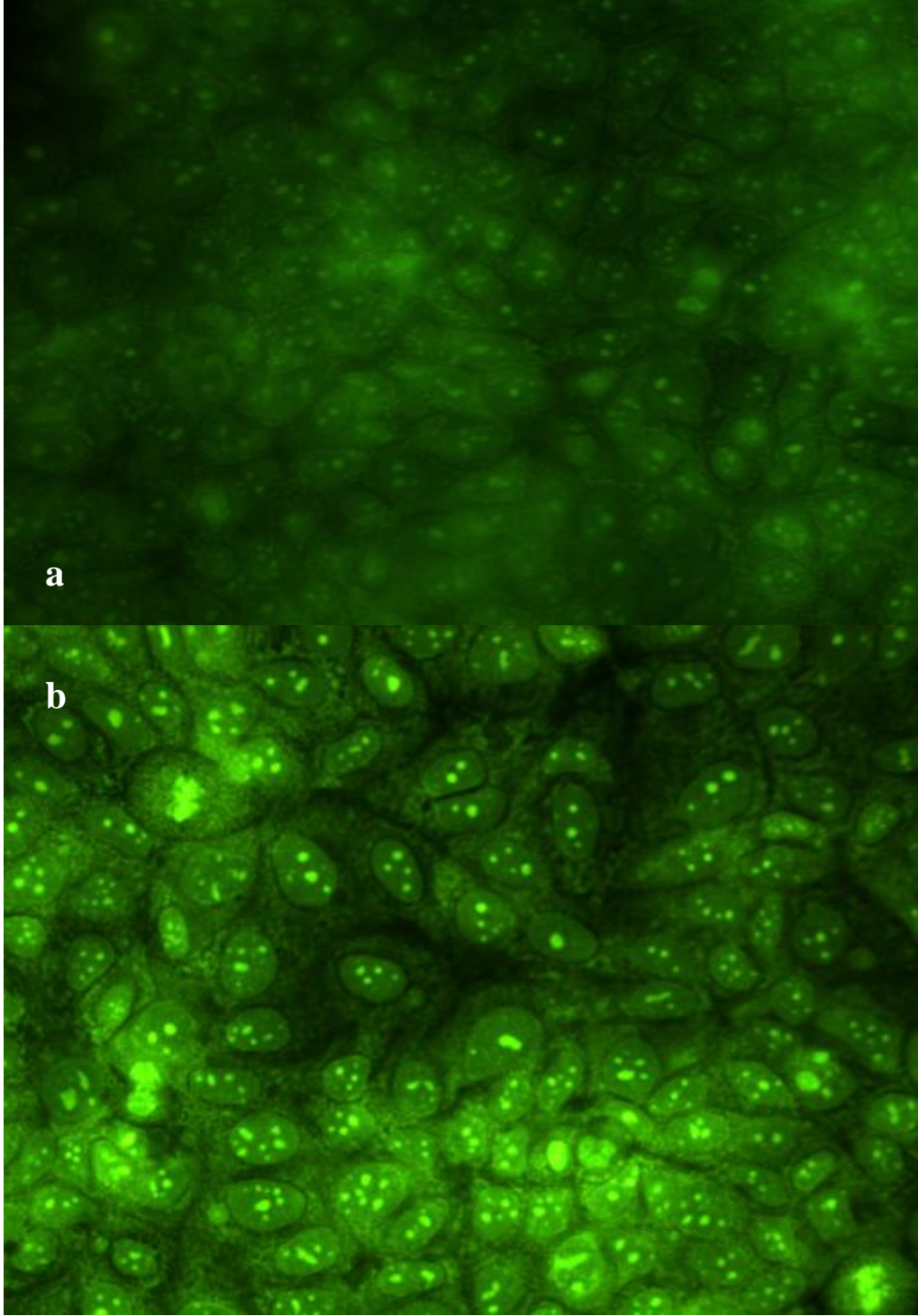
Şekil 8.11. a ve b MCF-7 QD boyama



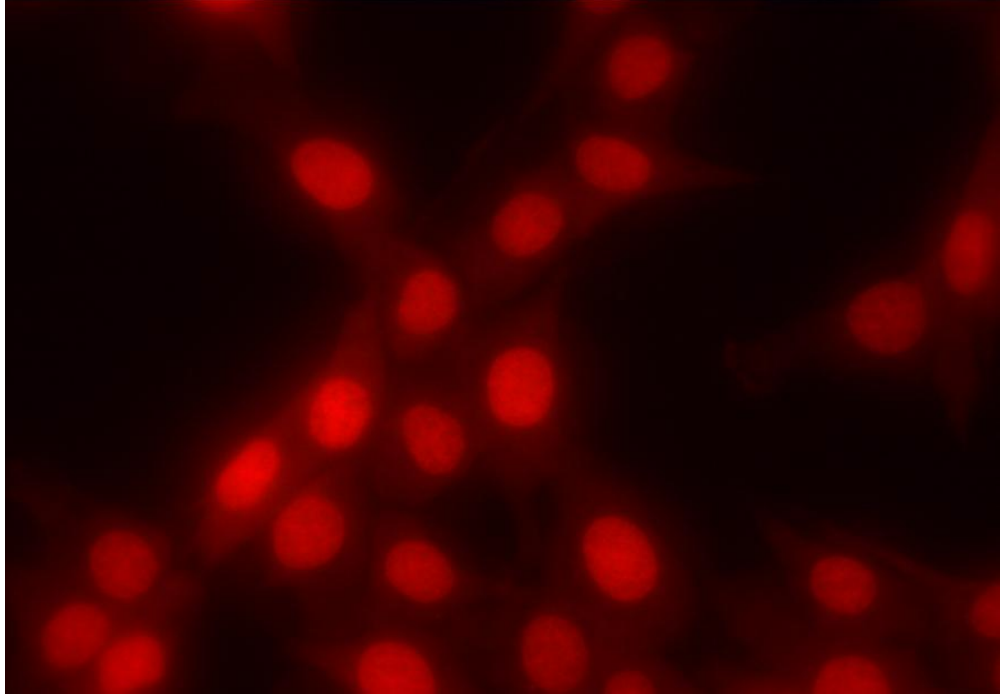
Şekil 8.12. MCF-7 QD-anti tübülin boyama



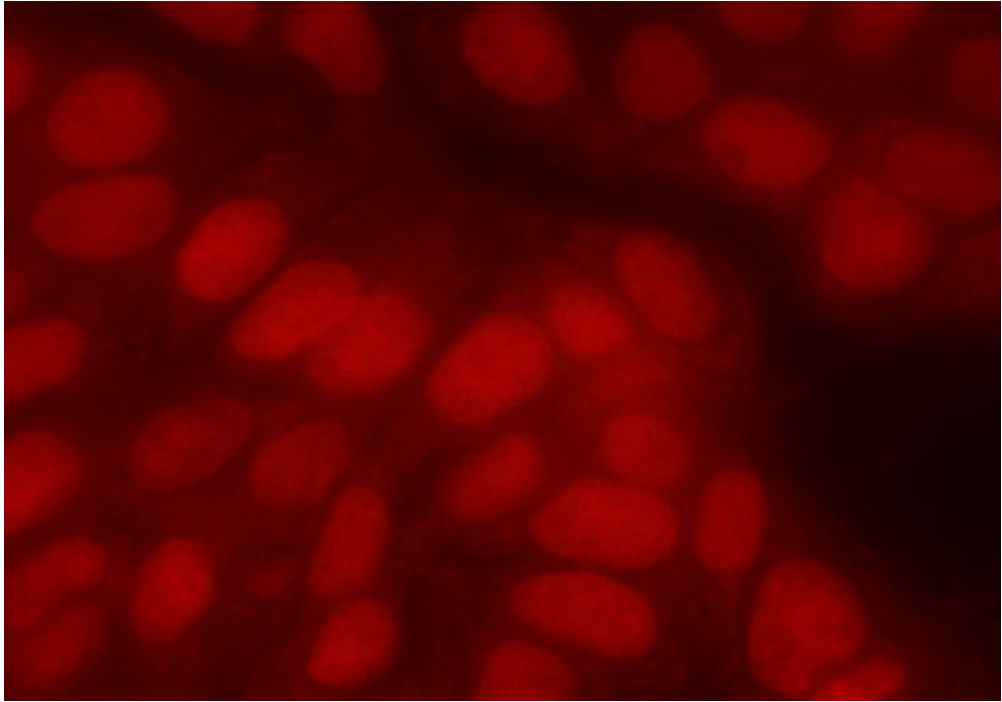
Şekil 8.13. MCF-7 QD-anti tübülin-Nokodazol



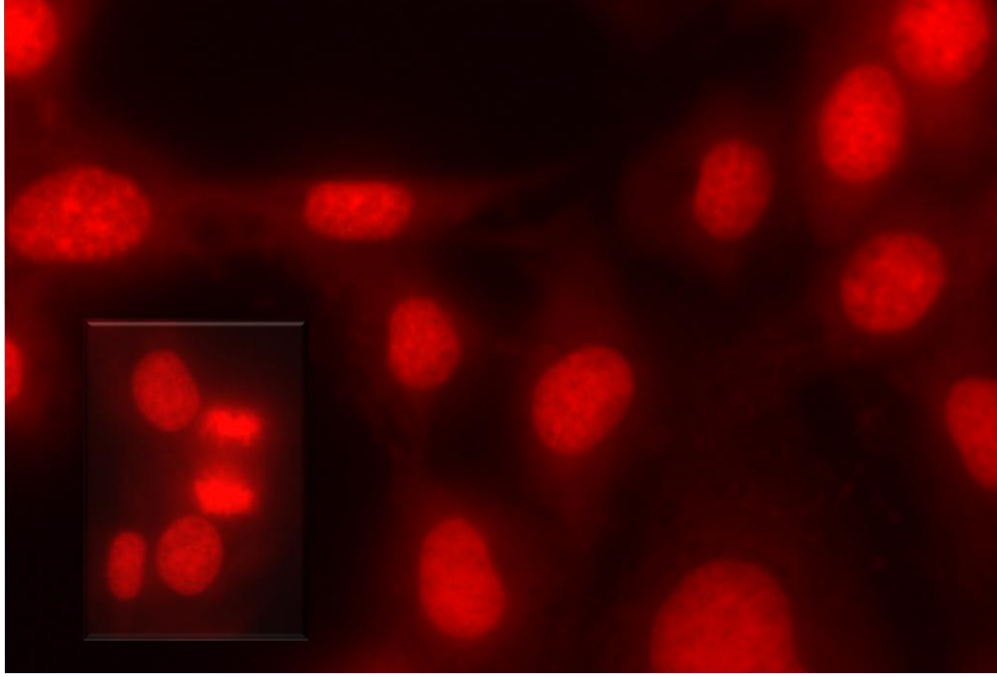
Şekil 8.14. MCF-7 a) QD-anti tübülün ve b) QD-anti tübülün-Nokodazol



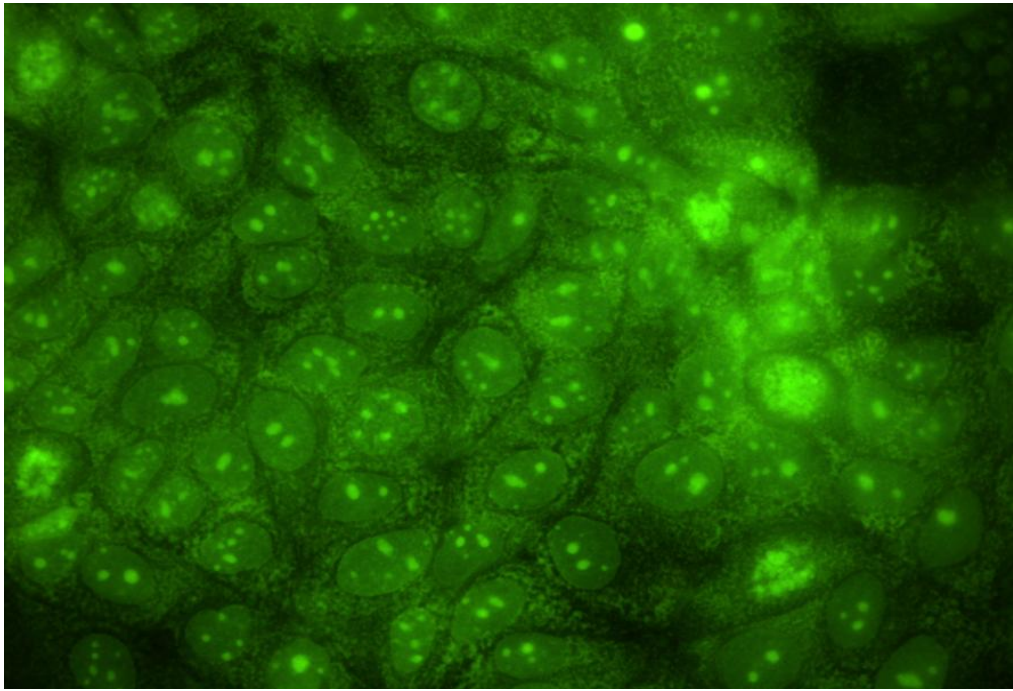
Şekil 8.15. 3T3 Annexin-anti-tübülin-QD boyama



Şekil 8.16. MCF-7 Annexin-anti-tübülin-QD boyama



Şekil 8.17. 3T3 Nokodazol-Annexin-anti-tübülin-QD boyama ve Anafaz



Şekil 8.18. MCF-7 Nokodazol-anti-tübülin-QD boyama, profaz ve prometafaz

9. SONUÇ

Bu çalışmada tübüline bağlanarak bloke eden anti tübülün antikoruona kuvantum noktaları ve p(MATrp-Ru(bipy₂)-MATrp) konjuge edilerek floresan özellik kazandırılmış, aynı zamanda bir anti mitotik olan Nokodazol bağlanarak kanser hastalarına yönelik bir polimer sentezlenmeye çalışılmıştır. Tüm polimerizasyon işlemlerinde pH, sıcaklık gibi kritik noktalar için standart şartlar kullanılmıştır. Elde edilen nanobiyokonjugatlar aynı anda hedefleme, taşıma, tedavi ve görüntüleme yapabilmesi ve ekonomik açıdan da birçok basamağı tek bir basamakta toplaması açısından oldukça avantajlıdır. Sentezlenen yapılar CdS ve p(MATrp-Ru(bipy₂)-MATrp) sayesinde intensite kaybı olmaksızın floresan özellik taşımaktadır bu da yeni nesil biyobloklayıcıların hücrelerle etkileştirildiğinde floresan ve konfokal mikroskoplarında uzun süren ışımaya etkileriyle kanserli hücrelerin tayininin daha kolay yapılabilmesine olanak sağlayacaktır. Bir anti mitotik olan Nokodazol ile kanserli bölgeye direk hedefleme yapılmış, ilacın hücre çekirdeğine kadar taşındığı kanıtlanmış ve hastalığın tedavisinde görüntülemeyle birlikte önemli bir avantaj sağlanmıştır. Tüm bu sonuçlar doğrultusunda yeni nesil anti kanserojen tübülün bloklayıcı ilaç taşıyıcı nanoteranostik sistemler geliştirilmiştir.

Karakterizasyon çalışmalarında yapılan floresan spektrofotometresi sonuçlarında görülen düşme ve yükselmeler moleküllerin birbirleri ile etkileştiğini, biyokonjugasyonların istenen doğru yönlendirme ile gerçekleştiğini göstermektedir. QD biyokonjugat polimerlerin, Nokodazolün ve anti tübülün antikorusunun ayrı ayrı floresanlarının olduğu ve birbirleriyle etkileşimleri sonucunda spektrofotometrik açıdan ışımaya yaptığı gözlemlenmiştir. Bu da FRET yöntemiyle proteinlerin birbirlerine karşı enerji transferi yaptığını kanıtlamıştır. Floresan spektrofotometre sonuçları istenilen şekilde çıkmış ve sentez moleküllerindeki biyoaktif ajanların etkinliğini koruduğunu göstermiştir.

Daha önce de çeşitli literatürlerde QD ile ilgili akış sitometrisi analizleri yapılmış olup sıklıkla kullanılan Streptavidin ve Biotin ile konjugasyon yapılmış ve QD' ların antikora uygunluğu kanıtlanmıştır (Bruchez ve Hotz, 2007). Fakat bu çalışmada biyokonjugasyon aşamasında kullanılan p(MATrp-Ru(bipy₂)-

MATrp) sayesinde QD ışımalarının daha uzun süre tekrar tekrar görüntülemeye olanak sağlamıştır. Laboratuvar ortamlarında hücre kontaminasyonu ile yaşadığımız sorunlar nedeniyle QD içeren biyokonjugatların ışımaya testleri gerçekleştirilememiş olup en kısa zamanda deneyler tekrarlanarak bu konuda edinilen veriler de bilgiye sunulacaktır.

Hücre kültürü analizleri sonucunda anti tübülün ve Nokodazol bağlı anti tübülün QD biyokonjugatlarının hücreler ile etkinleştirilmesi sonucunda antijen bağlama bölgelerinin işlevli, toksik olmayan fakat hücrelerde apoptotik etkinliğin gözlemlendiği, hücre bölünmesinin farklı aşamalarında hücrelerin tutulabildiği floresan spektrofotometresi, akış sitometri analizleri ve floresan mikroskop görüntüleri yardımıyla kanıtlanmıştır. Anti tübülüne konjuge Annexin V ile boyanan hücrelerin görüntülenmesi sırasında apoptoza giden hücreler mikroskop altında kolayca sayılabilecek konuma gelmiştir.

Akış sitometri analizlerinde saf halde ölçülen QD ve Nokodazolün toksik olduğu fakat konjugasyonlar sonucunda elde edilen veriler neticesinde toksik özellikler yerine apoptoza yönlendirme etkisinin öne çıktığı belirlenmiştir.

Mikroskop görüntüleri neticesinde anti tübülün ve annexin V biyokonjugatı ile hücrelerin çekirdeklerinin kolayca boyandığı, ilacın çekirdeğe kadar taşınabildiği ve burada hücreyi metafazdan önce durdurduğu bu şekilde apoptoza olan etkisi, aynı zamanda da hücrelerin sayımı için uygun ortam sağlandığı gözlemlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda kanserin tedavisine yönelik birçok basamağı içeren antijen antikör bağlama, boyama prosedürlerinin ayrı ayrı uygulanması ve ilaç hedeflendirmesi gibi işlemlerin tek bir polimer vasıtasıyla sağlanabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Alberts B., Johnson A., Lewis J, Raff M., Roberts K., Walter P., *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, New York, 16, 2002.
- Bruchez M. P., Hotz C. Z., “Methods in Molecular Biology, vol. 374: Quantum Dots: Applications in Biology”, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2007.
- Çınar Ö., Can A., Semiz O. O., “Nokodazol hücre döngüsü eş zamanlaması için kullanılabilir mi?”, *Türkiye Klinikleri J. Med Sci*, 28, 437-444, 2008.
- Çoğulu Ö., Alpman A., Durmaz B., Özkinay F., “Mitoz Ve Mayozun Moleküler Temelleri”, *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 27:725-737, 2007.
- Diltemiz, S. E., “DNA’ yı tanıma bölgelerine sahip moleküler baskılanmış polimer tekniğine dayalı biyosensör geliştirilmesi”, Doktora tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Anadolu Üniversitesi, 2006.
- Eilers U., Klumperman J., Hauri H.P., “Nocodazole, a mikrotubule-active drug, interferes with apical protein delivery in cultured intestinal epithelial cells (Caco-2), *Journal of Cell Biology*, vol 108, 13-22, 1989.
- Goodman B., Zheng Y., "Mitotic spindle morphogenesis: Ran on the microtubule cytoskeleton and beyond", *Biochemical Society Transactions*, Vol:34, part 5, 2006.
- Gürsoy A. Z., *Kontrollü Salım Sistemleri*, Kontrollü Salım Sistemleri Derneği, İstanbul, 2002.
- Hermanson, G.T., “Bioconjugate Techniques”, *Academic Press*, (1996).
- Hild W. A., Breunig M., Goepferich A., “Quantum dots–Nano-sized probes for the exploration of cellular and intracellular targeting”, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 68, 153-168, 2008.
- <http://mitchison.med.harvard.edu/protocols/poly.html>
- http://www.bdbiosciences.com/external_files/pm/doc/tds/cell_bio/live/web_enabled/6710KK_556570.pdf
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mboc4&part=A2957&rendertype=figure&id=A2969>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mboc4&part=A2957>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mcb&part=A5406&rendertype=figure&id=A5419>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mcb&part=A5499&rendertype=figure&id=A5500>

Hür, D., Ekti, S.F., Say, R., “N-Acylbenzotriazole Mediated Synthesis of Some Methacrylamido Amino Acids,” *Letters in Organic Chemistry*, 4, 585-587, 2007.

Jainchill J. L., Aaronson S. A., G. J. Todaro, "Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells", *J. Virol.* 4, 549-553, 1969.

Jamieson T., Bakhshi R., Petrova D., Pocock R., Imani M. and Seifalian A. M. “Biological applications of quantum dots” *Biomaterials* Volume 28, Issue 31, 4717-4732, 2007.

Karaboz, İ., Kayar, E., Akar, S., “Flow Sitometri ve Kullanım Alanları” *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 6, 2, 01-18, 2008.

Lodish H., Berk A., Zipursky S. L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J., *Molecular Cell Biology*, W. H. Freeman, New York, 19; 2000.

M. Cooper, Robert E. Hausman (Sakızlı M., Atabey N.), 3(11), sayfa no, *Hücre: Moleküler Yaklaşım*, İzmir Tıp Kitabevi, İZMİR sayfa no, 2006.

Malmsten M., “Proteinadsorption in intravenous drug delivery” *Biopolymers at Interfaces*, Ed.: M. Malsmten, Marcel Dekker, Inc., New York, 561-596, 1998.

Mossman T. , “Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay”, *J. Immunol Method*, 65: 55-63, 1983.

Portakal O., “Biyolojik Ölçümler ve Nanopartiküller”, *Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem]*; 33 (1) ; 35–38., 2008.

Say, R. Photosensitive aminoacid-monomer linkage and bioconjugation applications in life sciences and biotechnology. PCT/IB2009/055707, *Applied* 11 Dec., 2009.

- Schmidt M., Bastians H., “Mitotik drug targets and the development of novel anti mitotic anticancer drugs” Drug Resistance Updates 10, 162-181, 2007.
- Soule H. D., Vazquez J., Long A., Albert S., Brennan M., “A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma”, J. Natl. Cancer Inst., Nov;51(5):1409-16, 1973.
- Taneli, F., “Flow Sitometri Tekniđi Ve Klinik Laboratuvarlarda Kullanımı”, Türk Klinik Biyokimya Derg., 5 (2), 75-82, 2007.
- Vasquez RJ, Howell B, Yvon AM, Wadsworth P, Cassimeris L., “Nanomolar concentrations of nocodazole alter microtubule dynamic instability in vivo and in vitro.” Mol Biol Cell., 8(6):973-85, 1997.
- Yaka E., Eğrilmez M., Keskinođlu P., Çavdar Z., Genç Ş., Genç K., İyilikçi L., Yener G. G., “Alzheimer Hastalığında Beyin Omurilik Sıvısında (BOS) Biyolojik Belirteçler ve BOS’ un PC12 Hücre Hattı canlılığı Üzerine in vitro etkisinin değerlendirilmesi” Turkish Journal of Geriatrics, 9 (1): 1-7, 2006.
- Yamamoto J., Yamamoto S., Hirano T., Li S., Koide M, Kohno E, Okada M., Inenaga C., Tokuyama T., Yokota N., Terakawa S., and Namb H, “Monitoring of Singlet Oxygen Is Useful for Predicting the Photodynamic Effects in the Treatment for Experimental Glioma” Clinical Cancer Research December 1, vol. 12 no. 23 7132-7139, 2006.
- Yazar, S., “Romatoid Artrit Hastalığının Proinflamatuvar Sitokini Olan TNF α ’ya yönelik Nanoteranostik Geliştirilmesi”, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi; Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2009.
- Yoo J., Kambara T., Gonda K., Higuchi H., “Intracellular imaging of targeted proteins labeled with quantum dots”, Experimental Cell Research, 314, 3563 – 3569, 2008.