



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İRİNOTEKAN'IN MAGNETİK
NANOPARTİKÜL ÜZERİNE İMMOBİLİZE
EDİLMİŞ SERUM PROTEİNLERİNE
BAĞLANMASININ İNCELENMESİ**

Ecem TAMYÜREK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalını

Mayıs-2015
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Ecem TAMYÜREK tarafından hazırlanan "İrinoteka'nın Magnetik Nanopartikül Üzerine İmmobilize Edilmiş Serum Proteinlerine Bağlanmasının İncelenmesi " adlı tez çalışması 26/05/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fizikokimya Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan

Prof. Dr. Salih YILDIZ

Danışman

Prof. Dr. Salih YILDIZ

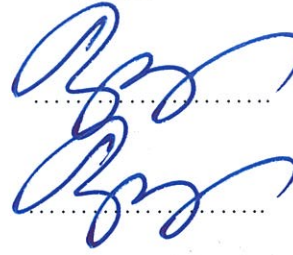
Üye

Prof. Dr. Tevfik ATALAY

Üye

Doç. Dr. Aydan YILMAZ

İmza



Yukarıdaki sonucu onaylarım.



Prof. Dr. Aşır GENÇ
FBE Müdürü

Bu tez çalışması Selçuk Üniversitesi BAP tarafından 13201081 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.



Ecem TAMYÜREK

Tarih: 26/05/2015

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İRİNOTEKAN'IN MAGNETİK NANOPARTİKÜL ÜZERİNE İMMOBİLİZE EDİLMİŞ SERUM PROTEİNLERİNE BAĞLANMASININ İNCELENMESİ

Ecem TAMYÜREK

**Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı**

Danışman: Prof. Dr. Salih YILDIZ

2015, 70 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. Salih YILDIZ

Prof. Dr. Tefik ATALAY

Doç. Dr. Aydan YILMAZ

Bu tezde irinotekanın hemoglobin, globulin ve insan serum albumini gibi serum proteinlerine bağlanması çalışılmıştır. Bu amaçla epoksi modifiye süperparamagnetik demir oksit nanopartikülleri (GPTS-SPION) yüzeyi kullanılmıştır. Bu nanopartikül NH_4OH ile Fe^{+2} ve Fe^{+3} tuzlarının birlikte çöktürülmesi ile sentezlenmiş ve sonra SPION yüzeyinde fonksiyonel epoksi grupları elde etmek için [3-2,3-epoksipropoksi propil] trimetoksi silan (GPTS) ile modifiye edilmiştir. Sonuçlar sırasıyla 20mg GPTS modifiye SPION yüzeyine insan serum albumini (HSA) için 44,1, globulin (Glb) için 21,2 ve hemoglobin (Hem) 32,6 μg bağlandığı bulunmuştur.

İrinotekanın serum proteinlerine bağlanma miktarlarının belirlenmesi amacıyla irinotekanın spektrofotometrik yöntemle uyarma ve yayılma dalga boyları belirlenmiştir. Buna göre uyarma dalga boyu 299 nm iken yayılma dalga boyu 448 nm bulunmuştur. 25 mg GPTS modifiye SPION yüzeyin serum protein-SPION yüzeylerine irinotekan bağlanma miktarları sırasıyla insan serum albumini (HSA) için 37,3, globulin (Glb) için 43,2 ve hemoglobin (Hem) için 40,8 μg bağlandığı bulunmuştur.

Nanopartikül yüzeyine HSA, Glb ve Hem ile irinotekanın bağlanması infrared spektroskopisi ile doğrulanmıştır. Ayrıca yüzey karakterizasyonu için Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) analizi yapılmıştır. GPTS-SPION yüzeyinde serum proteini-irinotekan etkileşiminin termal davranışı termogravimetrik analiz (TGA) kullanılarak incelenmiştir. Termal parçalanmanın kinetik parametreleri Horowitz- Metzger metodu kullanılarak tayin edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: İrinotekan, Magnetik nanopartikül, Floresans spektroskopisi, Protein, Horowitz-Metzger metodu

ABSTRACT

MS THESIS

A STUDY ON BINDING OF IRRINOTECAN TO IMMOBILIZED SERUM PROTEINS ON MAGNETIC NANOPARTICLES

Ecem TAMYÜREK

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE OF CHEMISTRY**

Advisor: Prof. Dr. Salih YILDIZ

2015, 70 Pages

Jury

Prof. Dr. Salih YILDIZ

Prof. Dr. Tevfik ATALAY

Doç. Dr. Aydan YILMAZ

The binding of irinotecan to serum proteins (hemoglobin, globulin, and human serum albumin) was studied on the surface of epoxide modified superparamagnetic iron oxide nanoparticles (GPTS-SPIONs), which were synthesized by the coprecipitation of ferrous and ferric salts with NH_4OH and then modified with [3-(2,3-epoxypropoxy)propyl] trimethoxy silane (GPTS) to obtain functional epoxide groups on the SPIONs surface. Data showed that binding amount of human serum albumin (HSA), globulin(Glb) and hemoglobin (Hem) found to be as 44, 21.2 and 32.6 μg per 20 mg of GPTS modified SPIONs, respectively.

The binding of irinotecan to serum protein was determined by using spectrofluorometer via excitation and emission wavelength of the drug. The excitation and emission wavelengths of irinotecan was measured as 299 nm and 448 nm, respectively. Data showed that binding amount of irinotecan to human serum albumin (HSA), globulin(Glb) and hemoglobin (Hem) found to be as 37.7, 43.2 and 40.8 μg per 20 mg of GPTS modified SPIONs, respectively.

The binding of irinotecan to HSA-SPIONs, Hem-SPIONs and Glb-SPIONs was confirmed by using infrared spectroscopy scanning electron microscopy analysis was performed for surface characterization. The thermal behaviour of the serum protein-Ir interaction on GPTS-SPIONs was also studied by using thermo gravimetric analysis (TGA) technique and then the kinetic parameters for the thermal decomposition were determined using Horowitz-Metzger method.

Keywords: Irinotecan, Magnetic nanoparticles, Fluorescence spectroscopy, Protein, Horowitz-Metzger method.

ÖNSÖZ

Tez çalışmam boyunca bana her zaman destek olan değerli hocam Prof. Dr. Salih Yıldız' a ve bana her konuda destek olan, tez çalışmalarım konusunda yol gösteren sevgili hocam Arş. Gör. Esra Maltaş' a sonsuz teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarımda bana destek olan Arş. Gör. Salih Zekibaş ve Arş. Gör. Mustafa Özmen' e teşekkür ederim.

Ecem TAMYÜREK
KONYA-2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER ve ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Nanopartiküller	1
1.1.1. Nanopartiküllerin sentez yöntemi	3
1.1.2. Nanopartiküllerin uygulama alanları	5
1.1.3. Magnetik nanopartiküller.....	6
1.1.3.1. Magnetik nanopartiküllerle ilaç taşıma	6
1.1.4. Peptit - protein nanoyapılar.....	7
1.2. Peptitler ve Proteinler	7
1.2.1. Proteinlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri	10
1.2.2. Denatürasyon	11
1.2.3. Protein yapısı ve fonksiyonları	11
1.2.4. Proteinlerin floresans özellikleri.....	17
1.3. Farmakoloji	18
1.3.1. İlaç	19
1.3.1.1. İlaçların elde edildiği kaynaklar	19
1.3.1.2. İlaçların sınıflandırılması.....	20
1.3.2. Kemoterapötikler	20
1.3.2.1. Antineoplastik (Antikanser) ilaçlar.....	21
1.3.2.2. Bitkisel kaynaklı ilaçlar	23
1.3.3. İlaçların etki mekanizmaları	24
1.3.4. Farmakolojide reseptör kavramı ve ilaç-reseptör ilişkisi.....	27
1.3.5. İlaçlar arasındaki etkileşme şekilleri.....	27
1.4. Lüminesans Olay, Floresans ve Fosforesans	28
1.4.1. Lüminesans oluşumu	28
1.4.2. Fotolüminesans	29
1.4.3. Fosforesans	29
1.4.4. Geciktirilmiş floresans	30
1.4.5. Floresansa etki eden faktörler	31
1.4.6. Floresans spektrumları.....	34

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	35
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	43
3.1. Kullanılan Malzemeler	43
3.1.1. Kullanılan cihazlar	43
3.2. Nanopartiküllerin Sentezi	44
3.2.1. Süperparamagnetik nanopartikül sentezi	44
3.2.2. Magnetik nanopartikül sentezi.....	44
3.3. Epoksi Modifiye Nanopartiküle Protein Bağlanması	44
3.3.1. Epoksi modifiye nanopartiküllere bağlanmış proteinlerin (HSA, Hem, Glb) ilaç ile etkileşimi	45
3.4. TGA Çalışması	45
3.5. Karakterizasyon	47
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	48
4.1. Nanopartikül Sentezi.....	48
4.2. HSA, Hem, Glb'in Bağlanma Sonuçları ve Karakterizasyonu	49
4.3. Epoksi Modifiye Nanopartiküllere Bağlanan ve Bağlanmayan Protein Miktarının Hesaplanması	52
4.4. Epoksi Modifiye Nanopartiküle Bağlanmış Proteinlere (HSA, Hem, Glb) İrinotekan'ın Bağlanması	55
4.5. TGA	61
4.6. Karakterizasyon	64
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	66
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	70

ŞEKİLLER VE ÇİZELGELER DİZİNİ

Şekiller

Şekil 1.1. Nanoboyutlu malzemeler.....	2
Şekil 1.2. Nanopartiküllerin kullanım şekilleri.....	5
Şekil 1.3. Peptit bağı oluşumu	8
Şekil 1.4. Albuminin altı bağlanma bölgesinin gösterimi	9
Şekil 1.5. Hemoglobinin şematik gösterimi.....	10
Şekil 1.6. Kortikosteroid bağı globulin.....	10
Şekil 1.7. Sığır insülin yapısı	13
Şekil 1.8. Protein birincil yapısı.....	13
Şekil 1.9. α heliks yapısı	14
Şekil 1.10. Proteinin paralel ve antiparalel β konformasyonu	15
Şekil 1.11. Ramachandran grafiği.....	16
Şekil 1.12. Myoglobinin üç boyutlu yapısı.....	16
Şekil 1.13. Kuaterner yapısı.....	17
Şekil 1.14. Protein yapıları	17
Şekil 1.15. Floresans özelliğe sahip amino asitlerin yapıları.....	18
Şekil 1.16. Benign.....	22
Şekil 1.17. Malign.....	22
Şekil 1.18. İrinotekan metabolizması	24
Şekil 1.19. İrinotekan HCl 'in kimyasal yapısı	24
Şekil 1.20. Uyarılmış singlet, triplet hal	28
Şekil 1.21. Uyarılma ve emisyonların toplu gösterimi	30
Şekil 1.22. Geciktirilmiş floresansın şematik diyagramı	31
Şekil 1.23. Floresansa konjügasyon etkisi	32
Şekil 1.24. Anilin ve anilinyuma pH etkisinin gösterimi	33
Şekil 2.1. MMC yapısı	35
Şekil 2.2. FU yapısı.....	35
Şekil 2.3. DXR yapısı	35
Şekil 2.4. MP yapısı	35
Şekil 2.5. Ketokonazolün yapısı	37
Şekil 2.6. Protein ve ilacın sırasıyla epoksi modifiye magnetik nanopartiküle bağlanma mekanizması.....	38
Şekil 2.7. Donepezilin yapısı	39
Şekil 2.8.SPIONs' a amin-silan modifikasyonu ve bu mekanizmaya HSA, modifiye SPION ise donepezil bağlanması	39
Şekil 4.1. Demir nanopartiküllerinin yüzey modifikasyonu ile protein ve ilaçların yüzeye bağlanma mekanizmaları.....	48
Şekil 4.2. Demir nanopartiküllerinin yüzeyinin fonksiyonlanlaştırma mekanizması.....	49
Şekil 4.3. HSA proteinin 280 nm eksitasyon ve 342 nm emisyon dalga boylarındaki floresans spektrumları	49
Şekil 4.4. Globulin proteinin 280 nm eksitasyon ve 342 nm emisyon dalga boylarındaki floresans spektrumları	50
Şekil 4.5. Hemogloblin proteinin 280 nm eksitasyon ve 342 nm emisyon dalga boylarındaki floresans spektrumları	50
Şekil 4.6. HSA proteinine ait kalibrasyon grafiği.....	51
Şekil 4.7. Glb proteinine ait kalibrasyon grafiği.....	51
Şekil 4.8. Hem proteinine ait kalibrasyon grafiği.....	52

Şekil 4.9. Farklı miktardaki epoksi modifiye magnetik nanopartiküllere bağlanan Glb miktarı	54
Şekil 4.10. Farklı miktardaki epoksi modifiye magnetik nanopartiküllere bağlanan HSA miktarı	54
Şekil 4.11. Farklı miktardaki epoksi modifiye magnetik nanopartiküllere bağlanan Hem miktarı	55
Şekil 4.12. İrinotekan' ın 299 nm eksitasyon ve 448 nm emisyon dalga boylarındaki fluoresans spektrumları	55
Şekil 4.13. İrinotekan'a ait kalibrasyon grafiği	56
Şekil 4.14. Farklı miktardaki SPION' a bağlanan HSA yüzeyindeki irinotekan miktarı ..	57
Şekil 4.15. Farklı miktardaki SPION' a bağlanan Glb yüzeyindeki irinotekan miktarı	58
Şekil 4.16. Farklı miktardaki SPION' a bağlanan Hem yüzeyindeki irinotekan miktarı....	58
Şekil 4.17. HSA' e bağlanan irinotekan miktarı	59
Şekil 4.18. Glb' e bağlanan irinotekan miktarı	59
Şekil 4.19. Hem' e bağlanan irinotekan miktarı.....	60
Şekil 4.20. Farklı miktarda epoksi modifiye magnetik nanopartiküllere bağlanan proteinler	60
Şekil 4.21. Farklı miktarlarda SPION-proteinlere bağlanan irinotekan miktarı.....	61
Şekil 4.22. Ir-Hb-GPTS-SPION ve Hb-GPTS-SPION TG eğrileri (a), Glb-GPTS-SPION ve Ir-Glb-GPTS-SPION TG eğrileri (b), HSA-GPTS-SPION ve Ir-HSA-GPTS-SPION TG eğrileri (c).....	62
Şekil 4.23. GPTS-SPION (a), Hb-GPTS-SPION (b), HSA-GPTS-SPION (c) and Glb-GPTS-SPION (d) SEM görüntüleri.....	64
Şekil 4.24. GPTS-SPION (a), Hb-GPTS-SPION (b), HSA-GPTS-SPION (c) ve Glb-GPTS-SPION (d) FT-IR spektrumları	65

Çizelgeler

Çizelge 4.1. Farklı miktarlardaki epoksi modifiye SPION' a (mg) bağlanan HSA miktarı (mg/ml)	53
Çizelge 4.2. Farklı miktarlardaki epoksi modifiye SPION' a (mg) bağlanan Hem miktarı (mg/ml)	53
Çizelge 4.3. Farklı miktarlardaki epoksi modifiye SPION' a (mg) bağlanan Glb miktarı (mg/ml)	53
Çizelge 4.4. Farklı miktarlardaki epoksi modifiye SPION-HSA' e (mg) bağlanan irinotekan miktarı (mg/ml).....	56
Çizelge 4.5. Farklı miktarlardaki epoksi modifiye SPION-Glb' e (mg) bağlanan irinotekan miktarı (mg/ml).....	56
Çizelge 4.6. Farklı miktarlardaki epoksi modifiye SPION-Hem' e (mg) bağlanan irinotekan miktarı (mg/ml).....	57
Çizelge 4.7. Hb-GPTS-SPION, Ir-Hb-GPTS-SPION, Glb-GPTS-SPION, Ir-Glb-GPTS-SPION, HSA-GPTS-SPION ve Ir-HSA-GPTS-SPION' nın kinetik parametreler için termal dekompozisyonu Horowitz-Metzger metodu tarafından değerlendirilmesi	63

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

A	: Preekspansiyel faktör
α	: t zamanda ayrılmış fraksiyon
D	: İlaç konsantrasyonu
E^*	: Aktivasyon enerjisi
$f(\alpha)$: Ayırıştırma mekanizmasına bağlı dönüşüm fraksiyonu
F_0	: Albuminin başlangıçtaki fluoresans şiddeti
F	: İlaç bağlandıktan sonra albuminin fluoresans şiddeti
G	: Gibbs serbest enerjisi
$g(\alpha)$: Reaksiyon mekanizmasına bağlı α 'nın fraksiyonu
h	: Planck sabiti
k	: Hız sabiti
$k(T)$: Sıcaklığa bağlı fraksiyon
K_A-K_b	: Bağlanma sabiti
K_B	: Boltzman sabiti
K_{SV}	: Stern-Volmer sabiti
K_q	: Quenching sabiti
n	: Albumin üzerindeki bağlanma bölge sayısı
P	: Protein konsantrasyonu
R	: Gaz sabiti
T	: Sıcaklık
T_S	: DTG tepe sıcaklığı
Q	: Quencher sabiti
w_a	: Bozunmanın tamamlanmasıyla oluşan kütle kaybı
w	: t zamanına kadar kütle kaybı
ΔG	: Serbest enerji değişimi
ΔH	: Entalpi değişimi
ΔS	: Entropi değişimi
ΔS^*	: Entropi aktivasyonunu
ΔG^*	: Gibbs serbest enerjisini
ΔH^*	: Aktifleşme entalpisini
φ	: Isınma oranı

Kısaltmalar

AFM	: Atomik Kuvvet Mikroskobu
APTES	: (3-Aminopropil) trietoksisilan
BAL	: Dimerkaprol
BSA	: İnek Serum Albumin
CD	: Dairesel Dikroizm Spektrumu
$C_6H_5-NH_2$: Anilin
$C_6H_5-NO_2$: Nitrobenzen
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DSC	: Diferansiyel Taramalı Kalorimetri
DSÖ (WHO)	: Dünya Sağlık Örgütü
DTG	: Diferansiyel Termal Analizör
DXR	: Doksorubisin hidroklorür

EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
Fe	: Demir
FeCl ₃	: Demir (III) Klorür
FU	: Fluorourasil
Glb	: Globulin
GPTS	: Trimetoksisilan
H	: Hidrojen
Hem	: Hemoglobin
HSA	: İnsan Serum Albumin
Ir	: İrinotekan
IR	: Infrared Spektroskopisi
LD	: Lazer Kırınımı Yöntemi
MMC	: Mitosin C
MP	: Merkaptopürin
mRNA	: Mesajcı-Ribonükleik asit
NADH	: Nikotinamid-adenin-dinükleotit
NH ₂	: Amin
NO	: Azot Oksit
NO ₂	: Azotdioksit
Nd-Fe-B	: Neodyum Mıknatıs
NP	: Nanopartikül
OCH ₃	: Metoksi
OH	: Hidroksi
PCS	: Foton Korrelasyon Spektroskopisi
PDI	: Poly Dispersity Index
SA	: Serum Albumin
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
SPION	: Süperparamagnetik Demiroksit Nanopartikülü
UV	: Ultra Viyole
TG	: Termal Gravimetri
TGA	: Termal Gravimetrik Analiz

1. GİRİŞ

Teorik ve teknolojik bakımdan nano yapıların büyüklük ve şekillerinin kontrol edilebilmesi önemlidir. Partikül boyutu, nanopartiküllerin kimyasal özellikleri (reaktivite ve kataliz) kadar fiziksel özelliklerini belirlemede temel bir değişkendir. Bu nedenle özellikle nano boyutlu magnetik sistemlere uygulama alanı kazandırmak için farklı yapı ve fonksiyonda pek çok nanopartikül geliştirilmiştir. Magnetik nanopartiküller; proteinlerin ve enzimlerin immobilizasyonu, biyoayırma, immünoanalizler, ilaç dağılımı, biyosensörler gibi geniş bir uygulama alanına sahiptir (Mandal ve ark, 2005).

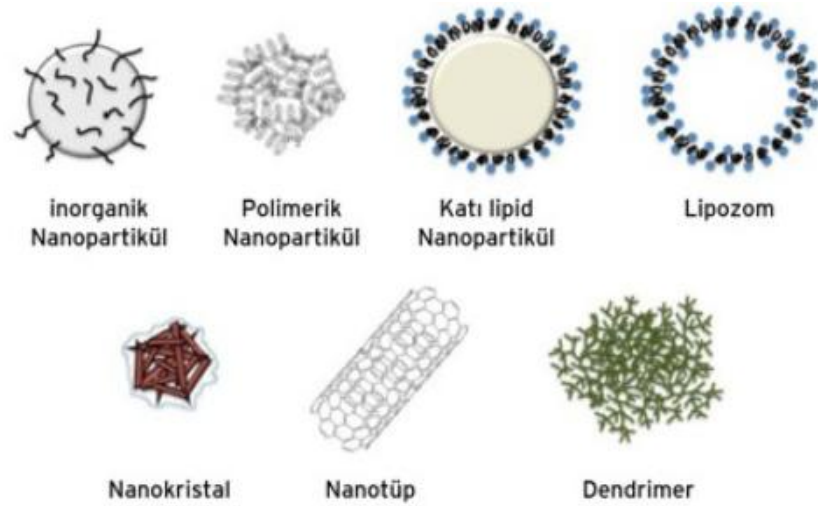
İlaçların kimyasal olarak proteinlere bağlanma mekanizmasını açıklamak oldukça güçtür. Çünkü protein ilaç etkileşimleri genelde in-vivo (canlı ortam) ortamda çalışılmaktadır. İlaç protein etkileşimlerini tanımlamak için senkron fluoresans metodu kullanılmaktadır. Ancak bu metotla çözelti ortamında çalışıldığı için fluorescent özellik gösteren ilaçların kullanılması çok güvenilir sonuç vermez. Katı destek maddesi ile çalışmak ise ilacın katı destek maddesine bağlanması sırasında bağlanmanın aynı anda takip edilmesine olanak verir. Katı destek maddesi olarak polimerden nanopartiküle birçok madde kullanılabilir.

Nanopartiküller üzerinde protein ilaç etkileşimlerinin tanımlanması ile magnetik nanopartiküller yeni uygulama alanları kazanmıştır.

1.1. Nanopartiküller

Nanoteknoloji ile mevcut teknoloji küçültülerek daha duyarlı sistemlerin oluşması sağlanır. Günümüzde nanoteknolojinin kullanım alanları gittikçe artmaktadır. Özellikle tıp ve biyoteknolojik alanlarda kullanılmak üzere çeşitli özelliklerde, nanoboyutlarda nanomalzemeler sentezlenmeye başlanmıştır. Nanoboyutlu malzemeler;

- Nanokristaller
- Nanopartiküller
- Nanotüpler
- Nanoteller
- Nanoçubuklar gibi farklı sınıflara ayrılırlar.



Şekil 1.1. Nanoboyutlu malzemeler (Kavaz, 2011).

Nanopartiküller; sentetik veya doğal kaynaklı makromoleküllerden meydana gelen 1-100 nm boyutlarında olan kolloidal yapılardır. Nanopartiküller ve nanokristaller sahip oldukları değişik özelliklerden dolayı yaygın kullanım alanına sahiptirler. Üretimlerinde genellikle polimerik yapılar kullanılır. Çünkü her polimerin kendine has özelliği ile nanopartiküller çeşitli özellikler kazanır. Polimer bazlı nanopartiküllerin düşük sistemik toksisite ve düşük sitotoksisiteye sahip olmaları, organik çözücü kalıntısı içermemeleri, büyük ölçekte üretimlerinin mümkün olması, dokulara etkin madde hedeflenebilmesi ve kontrollü etkin madde salımından dolayı tercih edilirler.

Nanopartiküllerin en çarpıcı özelliği maddelerin belli boyut aralığında hacimsel yapılardan farklı olarak olağandışı özellikler ve farklı görevler üstlenebilmeleridir. Nanopartiküllerin yüzey alanı/hacim oranının mikropartiküllere göre çok yüksek olması hem in-vitro hem de in-vivo çalışmalarda daha çok tercih edilmesini sağlar.

Dinamik ışık saçılması, lazer kırınımı, proton korrelasyon spektroskopisi gibi yöntemlerle partikül dağılımları elde edilir. Böylece nanopartiküllerin fiziksel olarak stabil olduğu anlaşılır. Yöntemlerin hepsi için en önemli parametre PDI (Poly Dispersity Index) değeridir. PDI 0,1-0,25 arasında ise istenilen dar dağılım elde edilir. Eğer 0,5' in üzerinde ise geniş dağılım elde edilir.

Nanopartiküllerin zeta potansiyellerine bakılarak kararlılıkları ve topaklaşma eğilimleri ile ilgili bilgi alınabilir. Zeta potansiyeli 60 mV üzerinde ise partiküller iyi derecede kararlıdır, 20-30 mV arasında ise kararlıdırlar. Nanopartiküller belirtilen bu değerler arasında değilse kararsızdır ve topaklaşarak çökelme eğilimindedirler (Kavaz, 2011).

1.1.1. Nanopartiküllerin sentez yöntemi

Hazırlama yönteminin parametreleri, üretimde kullanılan emülsifiyerin tipi, miktarı ve üretimde kullanılan çözücüler; partikül büyüklüğünü ve dağılımını etkiler. Emülgatör miktarı belirli bir orana kadar arttırılırsa ortalama partikül büyüklüğü azalır. Foton korrelasyon spektroskopisi (PCS) ve lazer kırınımı yöntemi (LD) partikül büyüklüğünün rutin ölçümleri için en güçlü yöntemlerdir. Coulter Counter yöntemi nadiren kullanılan bir yöntemdir. Çünkü, bu yöntem koloidal dispersiyonları destabilize edebilecek elektrolitlere ihtiyaç duyar ve küçük nanopartiküllerin değerlendirilmesi zordur.

Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ve elektron mikroskobu nanopartiküllerin şekillerinin belirlenmesinde kullanılır.

Nanopartiküllerin yüzey özellikleri ile ilgili bilgiler, DSC ve X ışını kırınımı yöntemleri ile alınır. Yapısal özelliklerin araştırılmasında da IR ve Raman spektroskopisi kullanılır. DSC ve X ışını kırınımı cihazı ile etkin maddenin nanopartikül içerisinde fiziksel durumu ve yerleşimi analiz edilebilir (Kavaz, 2011).

Üretimde kullanılan yöntemler; aşağıdan yukarı “Bottom Up” ve yukardan aşağıya “Top Down” olarak adlandırılır.

“Bottom Up” yaklaşımına göre hacimsel malzemeye dışarıdan mekaniksel ve kimyasal işlemler ile enerji verilmesi sonucunda malzemenin nano boyuta kadar inebilecek küçük parçalara ayrılması esas alınır. Bu yaklaşıma örnek olarak; mekanik öğütme ve aşındırma verilebilir. “Top Down” yaklaşımı ise atomik veya moleküler boyuttaki yapıları kimyasal reaksiyonlar ile büyütürük oluşumunun gerçekleştirilmesi olarak tanımlanmaktadır.

Nanopartikül sentezinde kullanılan önemli yöntemler;

- **Sol jel yöntemi:** Bu teknoloji, çözelti formundan yola çıkarak farklı uygulama alanlarına yönelik olarak seramik, cam ve kompozit malzemeler üretim tekniğine verilen genel bir isimdir. Sol jel yöntemi; alkoksit hidrolizi, peptitleşme veya polimerizasyon, jel eldesi ve kalsinasyon/sinterleme basamaklarından oluşur. Metal alkoksit çözeltileri veya metal tozları, nitratlar, hidroksitler ve oksitler gibi inorganik bileşikler belirli oranda su ve asitler birleştirilerek bir solüsyon elde edilir. Elde edilen bu solüsyon belirli sıcaklıklarda karıştırılarak solüsyon içerisinde birbirini izleyen bir dizi kimyasal reaksiyon ve taneciklerin sahip olduğu yüzey yüklerinin elektrokimyasal

etkileşimleri ile bir ağ (jelleşme) meydana gelir. Bu ağ giderek büyür ve sistemdeki bütün noktalara ulaşarak komple bir yapı (jel) oluşur.

Sıvı içerisindeki kolloidal katı taneciklerinin kararlı süspansiyonuna “sol” denir. Kolloidal taneciklerin çöktürülmesi ile elde edilen ve bol miktarda su içeren çökeleklere “jel” denir.

Bu teknik; aşınmaya dayanıklı kaplamaların yapılmasında, optik amaçlı kaplamalarda, fiber optiklerde, elektronik ve magnetik malzemelerin üretiminde kullanılır (Kavaz, 2011).

- **İn situ polimerizasyon yöntemi:** Bu teknik iki tür yaklaşım içermektedir. Birincisinde çözücü olmayan fazda polimerize olacak monomer emülsifiye edilmektedir. İkincisinde ise monomer, elde edilecek polimerin çözünmediği çözücüde çözündürülmektedir. Birinci yaklaşımda devamlı faz sulu (yağ/su emülsiyonu), ikincisinde devamlı faz organiktir (su/yağ emülsiyonu). Her iki yaklaşımda da monomer yüzey etken madde molekülleriyle çözünmediği fazda emülsifiye olur ve monomerlerin şişmesiyle misel oluşur. Polimerizasyon reaksiyonu bir başlangıç maddesinin fiziksel veya kimyasal tetikleyici ile tetiklenmesi ile başlar. Bu maddenin yarattığı enerji devamlı fazdaki serbest reaktif monomerlerin oluşmasını ve daha sonra bu monomerlerin reaktif olmamış çevredeki monomerlerle birleşmesini ve polimerizasyon zincir reaksiyonunu başlatmasını sağlar. Monomerin tam olarak tüketilmesi ile reaksiyon son bulur (Kavaz, 2011).

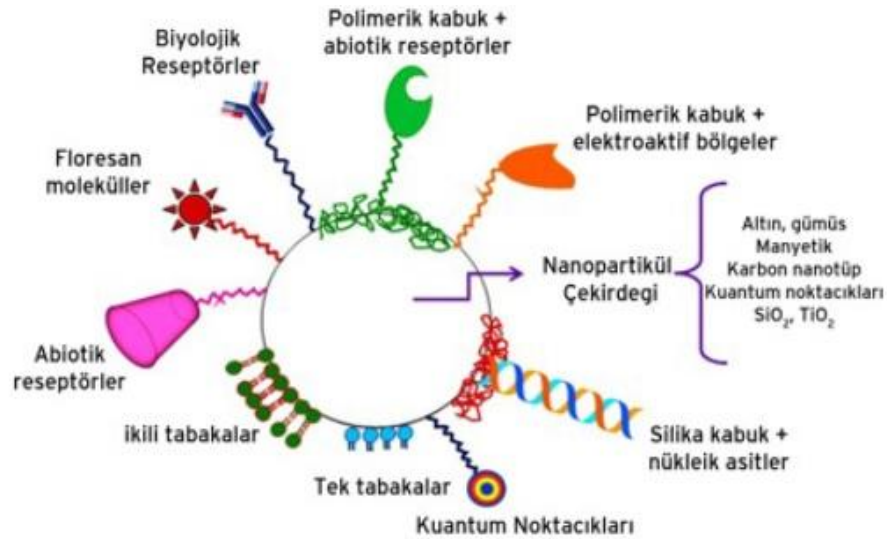
- **Mikroemülsiyon yöntemi:** Bu yöntem, lipidin eritilmesiyle başlar. Su ve emülsifiyer lipidin bulunduğu sıcaklığa ısıtılır. Daha sonra lipide eklenir ve karıştırılır. Bu maddeler, mikroemülsiyon oluşumu için gerekli oranlarda karıştırıldığında şeffaf ve termodinamik olarak stabil bir sistem elde edilir. Oluşan sıcak veya ılık mikroemülsiyon termostatlı bir şırınga kullanılarak, aşırı miktardaki soğuk su içinde mekanik bir karıştırma ile disperse edilir. Fazla su ultrafiltrasyon veya liyofilizasyon ile uzaklaştırılır (Kavaz, 2011).

- **Konservasyon yöntemi:** Bu yöntem, büyük miktarda organik çözücü kullanımını önler. Ayrıca ısı veya çapraz bağlama ile sertleştirme işleminden önce emülsiyonun intrinsik stabilite problemlerine bağlı olarak küçük ve dar partikül büyüklüğü dağılımı gösteren nanopartikül hazırlanmasının zorluğunu ortadan kaldırır.

Bu durumda, partiküller faz ayrımı işlemiyle sulu fazda oluşmakta ve akabinde glutaraldehit gibi bir çapraz bağlama ajanı ile stabilize edilmektedir (Kavaz, 2011).

- **Yüksek hızda karıştırma (Ultrasonikasyon) yöntemi:** Bu yöntemler genelde bir arada kullanılmaktadır ve belirli bir süre yüksek sıcaklıklarda uygulanmaktadır. Geniş partikül büyüklüğü dağılımına sahip ürün vermesi yüksek hızda karıştırma yönteminin dezavantajıdır. Çünkü bu durum saklama sırasında partikül büyümesi gibi fiziksel stabilite sorunlarına yol açar. Ayrıca ultrasonikasyon yöntemi kullanılıyorsa metal kontaminasyona dikkat edilmelidir (Kavaz, 2011).

1.1.2. Nanopartiküllerin uygulama alanları



Şekil 1.2. Nanopartiküllerin kullanım şekilleri (Kavaz, 2011).

- Gen tedavisinde
- Kanser tedavisinde
- Peptit ve proteinlerin oral yolla vücuda verilmesinde
- Tanı için görüntülemelerde
- Mikro-akışkan biliminde
- Biyomikroelektromekanik-Biyonanoelektromekanik ve Biyoçiplerde
- Akıllı barkotlarda
- Biyoanalitik nanosensörlerde
- Nanomalzemelerde

Biyoselektif yüzeylerde kullanılırlar (Kavaz, 2011).

1.1.3. Magnetik nanopartiküller

Yüksek yüzey alanlarına sahiptirler ve herhangi bir yardımcı adsorblayıcı olmadan kimyasallarla kolaylıkla etkileşebilirler.

Magnetik nanopartiküllerin yüzeyleri kaplanabilir ya da fonksiyonlaştırılabilir. Adsorbsiyon işleminden sonra mıknatısla ya da magnetik alanın uygulanması ile kolaylıkla sudan ayrılıp, tekrar tekrar kullanılabilirler. Magnetik nanopartiküller suda dağılmış biçimde bulunabilir. Bu durumda kil, polimer ve diğer destek malzemelerine gömülü olarak da bulunabilirler. Suda dağılmış halde bulunan nanopartikül, hedef kirlenmeye bağlandıktan sonra magnetik ayırmayla kolaylıkla geri kazanılır (Şener, 2011).

1.1.3.1. Magnetik nanopartiküllerle ilaç taşıma

Farklı organik maddeler (polimerik NP, lipozomlar, miseller), pasif hedefleme, bir tanıma parçası ile aktif hedefleme veya fiziksel uyarıcı tarafından aktif hedefleme kullanılarak ilaç taşıma için nanovektörler olarak incelenmişlerdir.

Bu organik sistemler; sınırlı kimyasal ve mekanik denge, şişme, mikrobiyolojik atağın hassasiyeti, yetersiz ilaç salınımı kontrolü ve yüksek maliyet sunarlar. Polimer NP' ler yüksek polidispersite sorunu, düzensiz dallanma ve geniş bir dağılım ile birlikte sentez ürünlerin parçacıkları heterojen farmakolojik özelliklere yol açmaktadır. Dendrimerlerin kullanımı; büyümenin her noktasında saflaştırılabilir olması, aşamalı sentez edilebilmeleriyle küresel yapılı ve monodisperse karaktere sahip olmalarından dolayı bir alternatiftir. Dendrimerleri görüntüleme spesifik kısım ile hedefleme gerektirir. Bununla birlikte dendrimerlerin ve dendritik polimerlerin en büyük eksikliği yüksek maliyetidir. Aynı zamanda dendritik polimerlerin preparatı hedef bölgede birikmesi ve kan içinde yeterli uzunluğa geldikten sonra vücuttan atılımı sorun yaratır.

Tedaviler aktif hedeflemeye dayanır. Magnetik nanopartiküller kanser tedavilerine ek olarak kas ve iskelet sistemi bozukluklarında, anemik kronik böbrek hastalıklarında da kullanılabilir. Bu hastalıklar için süperparamagnetik Fe oksit NP (SPION), harici magnetik alan ile birlikte genel olarak doz ve yan etkileri azaltırken uygun konsantrasyonu korumasıyla iltihaplı bölgelere ilaç taşıma için uygun bir alternatiftir.

Magnetik hedefleme için bir ilaç veya tedaviye ait radyoaktif çekirdek vücuttan getirilen bir magnetik bileşiğe bağlanır ve daha sonra magnetik alan aracılığıyla hedef

alana yönelir. Uygulamalara bağlı olarak söz konusu partiküller sonra ilaç salınımı ya da lokal bir etkiye neden olurlar. İlaç salınımı, fizyolojik şartlardaki değişikliklerle (pH, ozmolarite, sıcaklık) veya enzimatik aktivite gerektiren mekanizmalarla gerçekleşebilir. Aynı zamanda basit difüzyon ile devam edebilir. İlaç salınımı ayrıca ilaç konjuge magnetik nanopartiküllerden magnetik olarak tetiklenebilir.

SPION ile Nd-Fe-B mıknatıs kombinasyonu mükemmel magnetik özelliklere sahiptir; vücudun 10-15 cm derinliğinde etkili magnetik alana ulaşabilir (Arruebo ve ark, 2007).

1.1.4. Peptit-protein nanoyapılar

Proteinler; moleküler tanıma işlevine sahip olduklarından “akıllı işlevsel maddeler” olarak adlandırılırlar. Reseptör-ligand, antijen-antikor ve enzim-substrat eşleşmesi gibi birçok seçici bağlanmanın gerçekleştiği olayda moleküler tanıma görülmektedir. Bu özellik proteine kendiliğinden düzenlenme yapabilme yeteneği verir. Böylece molekül birimlerin kovalent olmayan etkileşimlerle (hidrojen bağları, elektrostatik etkileşimler, van-der waals ve dipol-dipol etkileşimleri gibi) kendiliğinden ve tersinir bir şekilde düzenli yapılara organize olmaktadır.

Proteinlerin yapıtaşı olan amino asitler taşıdıkları radikal yan zincirler sayesinde farklı etkileşimlere girerek kendiliğinden düzenlenme sürecini yönlendirirler. Bundan dolayı peptit ve proteinlerden çok geniş bir nanomalzeme yelpazesi elde edilmektedir. Bu nanomalzemeler suda kolay çözünebildikleri için canlı sistemlerde kolayca kullanılabilirler. Sıcaklık, pH gibi dış etkenlere oldukça dayanıklıdır. Bu özelliklerden dolayı oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptirler (Pala, 2011).

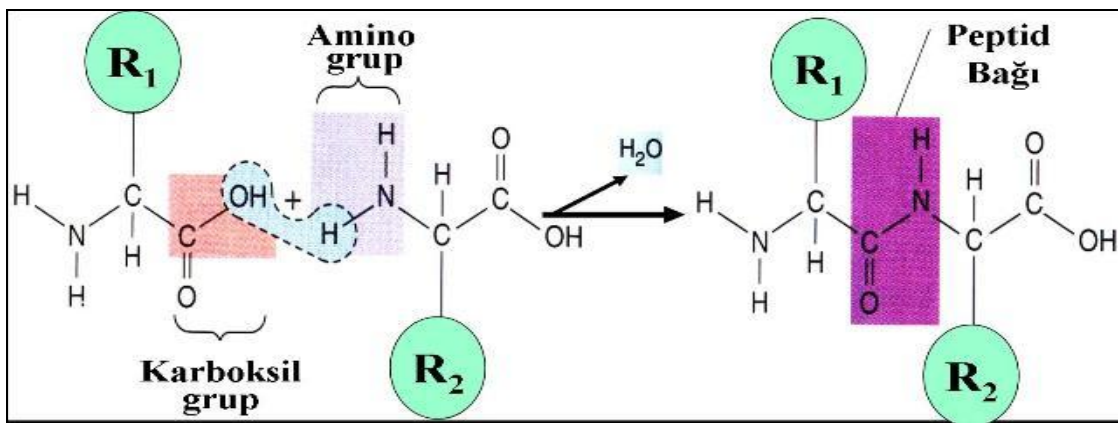
1.2. Peptitler ve Proteinler

Amino asitler birbirleriyle amit bağı sayesinde kovalent bağlanabilirler. Kovalent bağlanmayı sağlayan amit bağına peptit bağı adı verilir (Cox ve Nelson, 2005). Bu bağ bir amino asidin α karboksil grubunda bulunan OH ile diğer amino asidin α amino grubundan H ayrılmasıyla meydana gelir (Tüzün, 2002). Bu oluşum suyun uzaklaşmasıyla oluştuğu için bir dehidratasyon olayıdır (Cox ve Nelson, 2005). İki amino asidin bağlanmasıyla oluşan peptide dipeptit denir. Benzer şekilde üç amino asitin peptidine tripeptit denir. Az sayıda amino asitlerle oluşan peptitlere oligopeptit, çok sayıda amino asitlerin bağlanmasıyla da polipeptitler oluşmaktadır. (Tüzün, 2002).

Proteinler ise binlerce amino asit kalıntısından oluşmaktadır. Diğer bir ifadeyle proteinler 20 amino asidin karakteristik doğrusal diziler halinde kovalent olarak bağlanmasıyla oluşmaktadır. Bu 20 amino asit farklı kombinasyon ve birleşmelerle çok sayıda farklı özellik ve aktivite gösteren proteinler yapabilmektedir (Cox ve Nelson, 2005).

Proteinlerde bulunan 20 amino asitte α amino asittir. Bu amino asitler standart amino asit olarak adlandırılır. Bunun nedeni; protein sentezinden sonra modifiye olan bazı amino asitleri ve canlı organizmada bulunup proteinde bulunmayan amino asitleri, proteinde bulunan amino asitlerden ayırt etmektir (Cox ve Nelson, 2005).

Proteinler amino asit dışında kimyasal grup içerip içermediklerine göre ikiye ayrılırlar. Amino asit dışında kimyasal grup içermiyorsa bu tür proteinlere basit proteinler denir (Cox ve Nelson, 2005). Örneğin; albümin, gluteinler, provitaminler, sklero proteinler (Cingi ve Erol, 1996). Amino aside ek olarak kimyasal grup içerenlere ise konjuge (birleşik) proteinler denir. Konjuge proteinin amino asit olmayan kısmına prostetik grup denir. Bu prostetik grup kimyasal yapısına göre adlandırılır (Cox ve Nelson, 2005). Örneğin; fosfoproteinler fosforik asit, lipoproteinler lipit, glikoproteinler şeker grupları içerirler (Cingi ve Erol, 1996). Prostetik grubun proteinin biyolojik işlevine büyük katkısı vardır.



Şekil 1.3. Peptid bağı oluşumu

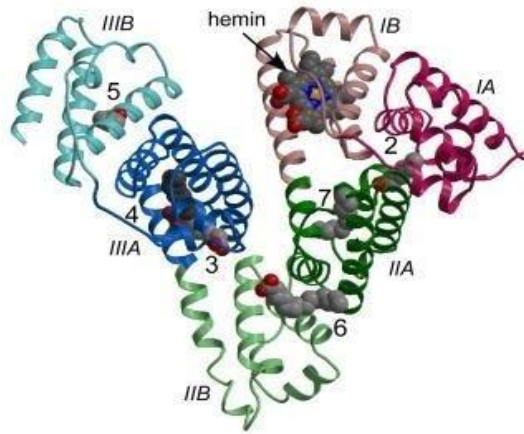
(http://80.251.40.59/veterinary.ankara.edu.tr/fidanci/Ders_Notlari/Ders_Notlari/Proteinler.html).

Basit ve konjuge proteinlere örnekler;

- **Albumin:** Albüminler, hayvansal ve bitkisel organizmalarda yaygın halde bulunurlar. Saf suda ve seyreltik tuz solüsyonlarında erirler. İnsan serumunda bulunan albümine serum albümin denir (Cingi ve Erol, 1996). Kan plazmasında en yaygın olarak protein türüdür. Kandaki proteinlerin yaklaşık % 60' ını albümin oluşturur (Buzoğlu,

2012). Elektroferezde göç hızlarına göre pre-albümin ve albümin olmak üzere ikiye ayrılırlar (Cingi ve Erol, 1996). Albumin, olgunlaşmamış proteinlerden endoplazmik retikuluma salınan N-terminal peptite sahip olan preproalbumin olarak karaciğerde sentezlenir. Molekül ağırlığı 67 kilodaltondur (Buzoğlu, 2012).

Albumin kanda çok az çözünen maddelerle (yağ asitleri, ilaçlar, ağır metal iyonları, vitaminler gibi) birleşerek bu maddeleri serumda çözünmüş halde tutar. Ayrıca osmotik basıncın düzenlenmesinde rol oynar (Cingi ve Erol, 1996). Albumin yapısında altı farklı bölge bulundurur. Moleküller bu bölgelere bağlanabilir (Buzoğlu, 2012).



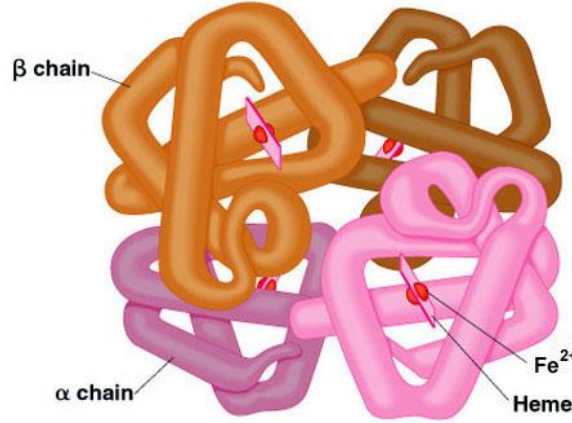
Şekil 1.4. Albuminin altı bağlanma bölgesinin gösterimi (Buzoğlu, 2012).

- **Hemoglobin:** Birleşik protein olan hemoglobinin prostetik grubu hem, proteini ise globindir. Hemoglobinin yapısına bakıldığında en büyük kısmının protein olduğu görülür. Bunun yanında hemoglobin molekülü dört tane demir iyonu (% 0,33 kadar demir) içerir. Yetişkin bir insanda hemoglobin α , β , γ , δ olmak üzere dört polipeptit zinciri içerir. Globinin bu dört polipeptit zinciri birer hem grubu ile birleşir. Yani bir hemoglobin molekülünde dört tane hem bulunur.

Hemoglobin sentezi kemik iliğindeki olgunlaşmamış eritrositlerde olur. Hemoglobin biosentezi için protoporfirin IX, globin, Fe^{+} iyonu gereklidir. Ayrıca bu sentezin gerçekleşebilmesi için pantotenik asit, piridoksal fosfat, B_{12} vitamini, intrinsik faktör ve bakır iyonu gibi kofaktörlere de ihtiyaç vardır.

Hemoglobin biosentezi için gerekli olan protoporfirin IX endojen olarak meydana gelir. Organizmaya şırınga edilen protoporfirin hemoglobin sentezinde kullanılmaz. Karmaşık bir dizi reaksiyondan sonra protoporfirin IX meydana gelir. Fe^{+2} iyonunun katılmasıyla da “Hem” oluşur. Hem' in globin proteinine bağlanmasıyla da hemoglobin oluşur.

Hemoglobinin organizmadaki en önemli görevi oksijeni akciğerlerden dokulara taşımaktır. Bunun yanında hemoglobin kanın en önemli tamponlarından (Cingi ve Erol, 1996).



Şekil 1.5. Hemoglobinin şematik gösterimi (Buzoğlu, 2012).

- **Globulin:** İnsan vücudunda bulunan üç tip serum proteinden birisidir. Molekül ağırlığı yüksek olan bir proteindir. Sodyum klorür, sodyum sülfat, magnezyum sülfat gibi elektrolit içeren zayıf tuzlu solüsyonlarda çözünür. Globulinler α , β , γ olmak üzere üç fraksiyona sahiptir. Bu fraksiyonların birbiri ile oranı, organizmanın durumuna göre değişir. Hastalıkların çeşidine göre bu oran büyür ya da küçülür (Buzoğlu, 2012).



Şekil 1.6. Kortikosteroid bağlı globulin (Wikimedia commons, 2009).

1.2.1. Proteinlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri

- Proteinler; triklorasetik asit, pikrik asit, sülfosalisilik asit gibi asitlerle; civa, çinko, demir, kurşun, kadmiyum gibi ağır metal tuzlarıyla ve özgül antikorlarla çökebilirler.

- Proteinler spesifik olduklarından antijen etki gösterirler.
- Proteinlerin biyolojik yapıları ısı ve bazı kimyasal veya fiziksel etkenlerle bozulabilir. Bu olaya denatürasyon denir (Cingi ve Erol, 1996).

1.2.2. Denatürasyon

Küresel proteinlerin kendilerine özgü üç boyutlu yapılarını pH, sıcaklık, kimyasal ve çevresel faktörlerle kaybetmesine denatürasyon denir. Denatürasyon ile ikincil ve üçüncül yapıyı oluşturan etkileşimler tamamen veya kısmen ortadan kalkar ve protein molekülü açılır. Açılan protein molekülünün tekli bağlarında rastgele dönmeler olur. Bu etkiler sonucunda çözünürlük azalır, viskozite ve UV ışık absorpsiyonu artar. Denatürasyon sonucunda protein eski biyolojik özelliğini kaybeder. Denatürasyona neden olan etken ortadan kalkınca protein eski haline geri döner. Protein yine aynı noktalardan katlanır ve döner. Çünkü protein için primer yapıya bağlı tek bir kararlı konformasyon vardır. Belirli konformasyonun seçilmesi ΔG ' nin en negatif değeri alması ile mümkündür. Bu duruma entalpi ve entropinin etkisi vardır.

$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ ΔG ; serbest enerji değişimidir. ΔH ; entalpi değişimidir. ΔS ; entropi değişimidir. T; sıcaklıktır.

Proteinin belirli konformasyonu seçmesi entropiyi azaltırken, serbest enerjiyi artırır. Ancak hidrofobik etkiden dolayı entropi büyük bir artış gösterir. Hidrofobik yan zincire sahip amino asitler su moleküllerini iter ve onların belirli düzende sıralanmasına neden olurlar. Protein katlanınca hidrofobik gruplar iç kısımda kalır. Böylece su molekülleri serbestçe hareket eder ve entropi artar. Entropinin artması serbest enerjiye zıt bir etki yapar.

İkincil ve üçüncül yapıyı kararlı hale getiren tuz köprüleri, hidrojen bağları, van der Waals etkileşimleri, disülfür bağlarının oluşması ekzotermik entalpi değişimlerine sebep olarak ikinci negatif katkıyı sağlar. İki terimin negatif olmasıyla katlanmalar kendiliğinden gerçekleşir (Pamuk, 2000).

1.2.3. Protein yapı ve fonksiyonları

Proteinler tüm hücrelerde miktar olarak en çok bulunan biyolojik makromoleküllerdir. Biyolojik proseslerin hemen hemen hepsinde bulunurlar ve biyolojik işlevlerde çeşitlilik gösterirler. Proteinler transport, depolama, mekanik destek immün-koruma, büyüme ve farklılaşmanın kontrolü, sinirsel uyarı ve koordine edilmiş

hareketler gibi fonksiyonları yerine getirirler. Ayrıca genetik bilgi protein biyosentezi ile ilgili olduğu için canlılık için çok önemlidir. Proteinin yapısı ile fonksiyonu birbirine bağlıdır.

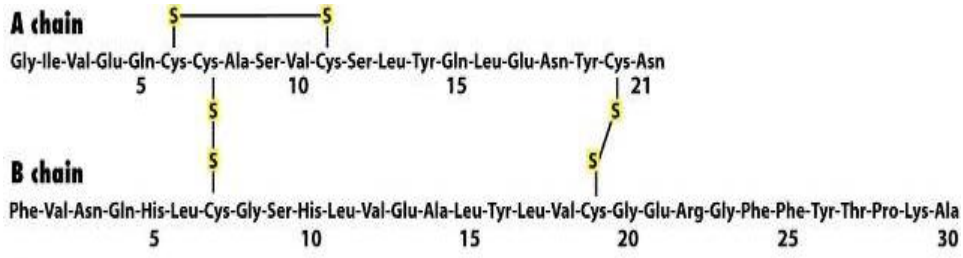
Proteinlerin organizmadaki görevleri;

- Yapısal Proteinler (Hücre dışı proteinler)
- Hareket Sistemi Proteinleri (Kaslar vb.)
- Enzimler
- Reseptörler
- Hormonlar
- Taşıyıcı Proteinler
- İmmün Sistem Proteinleri (İmmüoglobulinler)
- Pıhtılaşma Faktörü (Telefoncu, 1988; Pamuk, 2000).

Protein Yapıları;

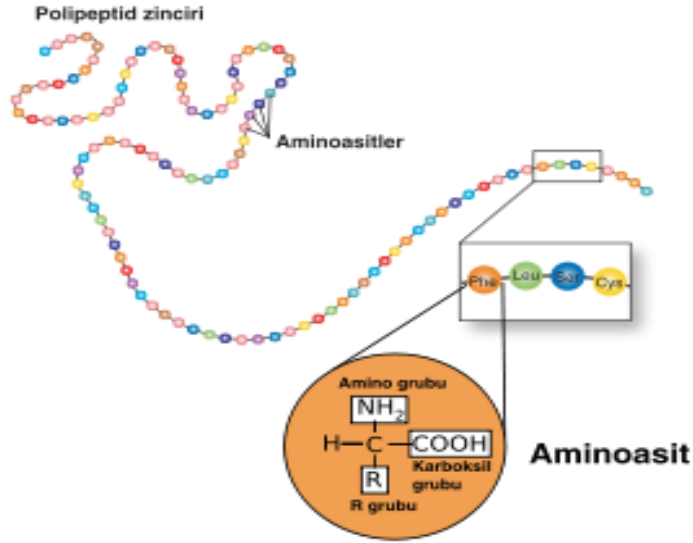
Proteinde bulunan atomların uzaysal düzenlenimine konformasyon denir. Olası konformasyon kovalent bağları kırmadan elde edilen yapısal durumdur. Çok sayıda oluşan konformasyondan sadece bir veya iki tanesi karardır. Bu kararlılık termodinamik açıdan değerlendirilir. Genellikle termodinamik açıdan en kararl olan en düşük Gibbs serbet enerjisine (G) sahip konformasyondur (Cox ve Nelson, 2005).

- **Birincil (Primer) yapı:** Birincil yapı kovalent bağlarla bağlanmış amino asit kalıntılarının oluşturduğu polipeptit zincirdir. Bu yapı genetik olarak kodlanır. Tek polieptit zinciri bir N- ucuna ve bir C- ucuna sahiptir. Eğer insülinde olduğu gibi iki N- ucuna sahipse bu yapı, iki polipeptit zincirinden kurulmuş demektir. Hemoglobin ise dört polipeptit zincirinden oluşan bir yapıdır. Peptit zinciri içindeki amino asitlerin cinsi, sayısı, sırası proteinlerin farklı özellikler göstermesini sağlar. Örneğin sığır serum insülini yukarıda bahsedildiği gibi iki polipeptit zincirinden oluşmaktadır. Sığır insülini A zincirinde 21 ve B zincirinden 30 amino asit olmak üzere toplam 51 amino asit içerir. A ve B zinciri birbirine disülfid köprüleriyle bağlanır. Domuz, koyun ve at insülinleri A zincirinde 8, 9 ve 10' uncu sıradaki amino asitler yönünden farklılık gösterirler (Cox ve Nelson, 2005; Fidan, 2009).



Şekil 1.7. Sığır insülinin yapısı

(http://80.251.40.59/veterinary.ankara.edu.tr/fidanci/Ders_Notlari/Ders_Notlari/Proteinler.html)



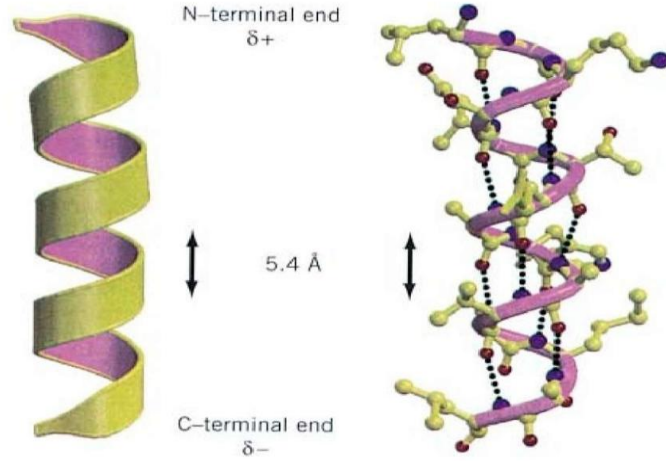
Şekil 1.8. Protein birincil yapısı

(http://tr.wikipedia.org/wiki/Protein_birincil_yap%C4%B1s%C4%B1)

- **İkincil (Sekonder) yapı:** Amino asit kalıntılarının kısmen kararlı düzenlemelerle tekrarlayan bir yapısıdır. Polipeptidin belirli kısımlarının yerel konformasyonudur. Birkaç tipi kararlıdır. En yaygın olanlar; α heliks (sarmal) ve β komformasyonlarıdır (Cox ve Nelson, 2005).

- **α Heliks:** α heliks olarak adlandırılan helezonik yapılarıdaki polipeptit iskeleti heliksin ortasından uzunlamasına aşağı doğru inen hayali eksen etrafına sarmalanmıştır. Amino asitlerin R grupları iskeletin dışına doğru yönelmiştir. Tekrarlayan birim eksen boyunca yaklaşık 5,4 Å uzunluğunda olan heliksin tek bir dönüşüdür ve her bir heliks dönüşü 3,6 amino asit kalıntısı içermektedir. α heliksin tüm proteinlerde dönme şekli sağ el dönüşlü heliks şeklindedir. α heliks yapısı iç hidrojen bağları en uygun kullanım şeklini sağladığı için en çok bu konformasyonu gözleriz. Bu yapı peptit bağının elektronegatif azot atomuna bağlı hidrojen atomu ile yine aynı peptit bağının amino terminal ucu kısmında bulunan dördüncü amino asidin elektronegatif karbonil oksijen

atomu arasında oluşan hidrojen bağı ile sabitlenir. α heliks yapıları L- ya da D- amino asit içeren polipeptitlerden oluşabilmektedir. Ancak amino asitler tek bir stereoizomerik yapıda olmalıdır. Çünkü bir D-amino asit bir L-amino asit içerirse düzenli yapıyı bozabileceği gibi tam tersi etkide yapabilir (Cox ve Nelson, 2005).

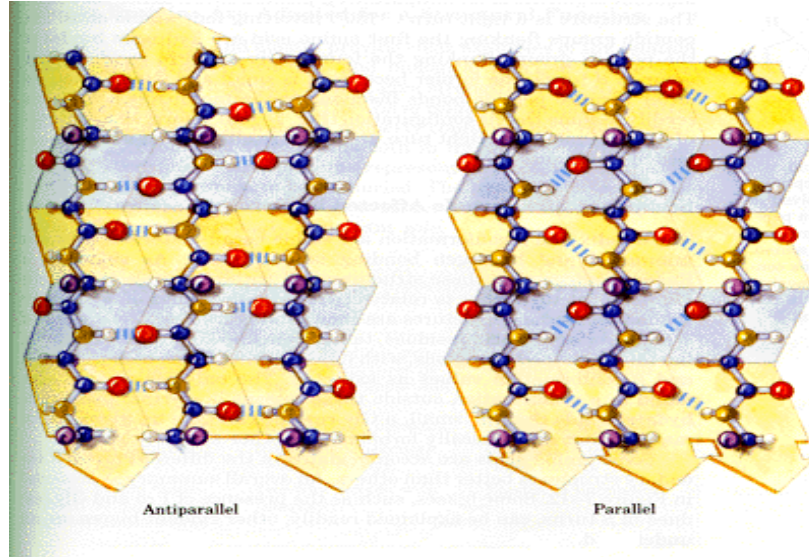


Şekil 1.9. α heliks yapısı

(<http://what-when-how.com/molecular-biology/alpha-helix-310-helix-and-pi-helix-molecular-biology/>)

- **β Konformasyonu:** Yapısı X-ışını analiziyle kesinleştirilmiş polipeptit zincirinin daha uzatılmış konformasyonudur. Zincirin iskeleti daha çok zigzag yapısında uzamaktadır. Bu şekilde bir seri pliseye benzer bir yapı oluşturacak şekilde, yan yana gelerek düzenlenebilirler. Bu düzen β tabaka olarak adlandırılır ve hidrojen bağları polipeptit zincirinin bitişik kısımları arasında oluşturulur. β tabakayı oluşturan her bir bölüm polipeptit zincirinin yakınında, polipeptidin çizgisel diziliminde birbirlerinden biraz uzakta hatta farklı polipeptit zincirlerine ait kısımlarda bulunabilirler.

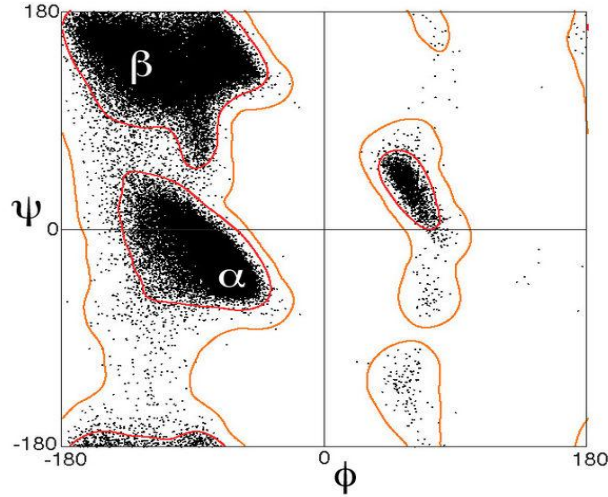
β tabakada bulunan bitişik polipeptit zincirleri paralel ya da antiparalel konumda bulunabilir. Paralel yapıda tekrarlayan birim daha kısa ve hidrojen bağlarının oluşum düzeninin farklı olmasına rağmen birbirlerine benzer özellik gösterirler (Cox ve Nelson, 2005).



Şekil 1.10. Proteinin paralel ve antiparalel β konformasyon
(<http://landfood.ubc.ca/courses/fnh/301/protein/protprin.htm>)

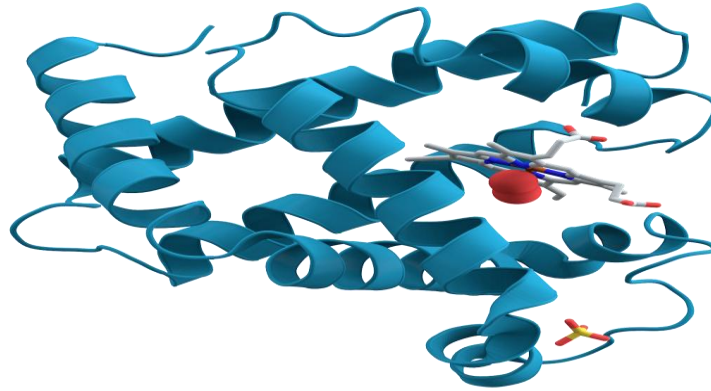
- **β Kıvrılma yapıları:** Polipeptit zincirlerinin ters döndüğü yerlerde, dönüş ve ilmik şeklindeki yapı içinde yoğun yapıya sahip küresel proteinlerde bulunan amino asit kalıntılarının bir kısmı bulunur. Bu yapılar α heliks ve β konformasyonlarının birleşmesini sağlar. β kıvrılmalar çoğunlukla proteinin yüzeyine yakın yerlerde oluşur. Aynı zamanda iki amino aside ait peptit gruplarının suyla hidrojen bağı yapabildiği bölgelerde bulunur. β kıvrılmalar en çok β tabakanın iki bitişik ucunun bağlanması olayında gözlemleriz. Bu yapı dört amino asit içeren 180° lik bir dönüştür. Dört amino asit içeren bu yapının ilk amino asidinin karbonil oksijeni ile dördüncül amino asidinin amino grubunun hidrojeni arasında hidrojen bağı oluşur. Merkezde bulunan amino asitler ise hidrojen bağı yapımına katılmazlar (Cox ve Nelson, 2005). Proteinler her zaman α heliks ya da β tabaka yapılarını göstermezler. Farklı katlanmalar ve kıvrılmalar yapabilirler. Bu katlanma ve kıvrılmalarla oluşan yapılara rastgele sarmal yapı denilse de bu oluşumlar rastgele değildir. Aynı cins proteinler hep aynı yerden ve aynı şekilde katlanıp kıvrılırlar.

Ramachandran grafikleriyle olası ve olası olmayan ikincil yapıları topluca görebiliriz. İkincil yapıların her tipi, amino asitlerdeki ψ ve ϕ bağ açılarıyla tanımlanabilir (Pamuk, 2000; Cox ve Nelson, 2005).



Şekil 1.11. Ramachandran grafiği
(http://tr.wikipedia.org/wiki/Alfa_sarmal)

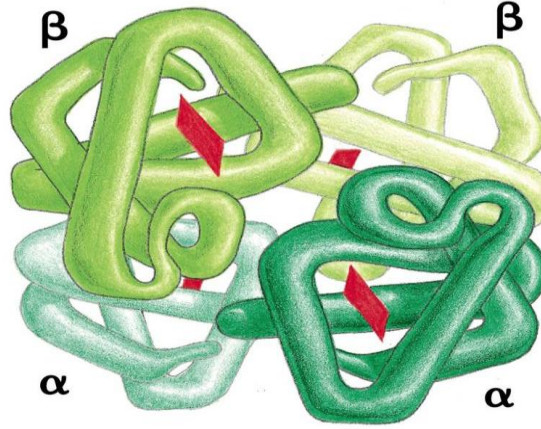
- **Üçüncül (Tersiyer) yapı:** Heliks ve halkalı yapıyı kazanmış olan protein küçük bir hacme sığacak şekilde polipeptit zincirlerinden farklı şekillerde katlanıp kıvrılarak üç boyutlu yapıyı kazanır (Pamuk, 2000). Bu yapı amino asit dizisinin daha geniş bir aralığını ifade eder ve özellikle küresel proteinler (globulinler) için geçerlidir. Tersiyer yapı kararlı bir yapıdır. Bu yapıya etki eden etmenler; hidrojen bağları, yan zincirdeki iyonlaşabilen gruplar arası iyonik etkileşimler, yan zinciri alifatik veya aromatik olan amino asitler arası hidrofobik etkileşimler, disülfür bağları ve polar gruplar arası etkileşimlerdir (Pamuk, 2000; Cox ve Nelson, 2005).



Şekil 1.12. Myglobinin üç boyutlu yapısı
(<https://en.wikipedia.org/wiki/File:Myoglobin.png>)

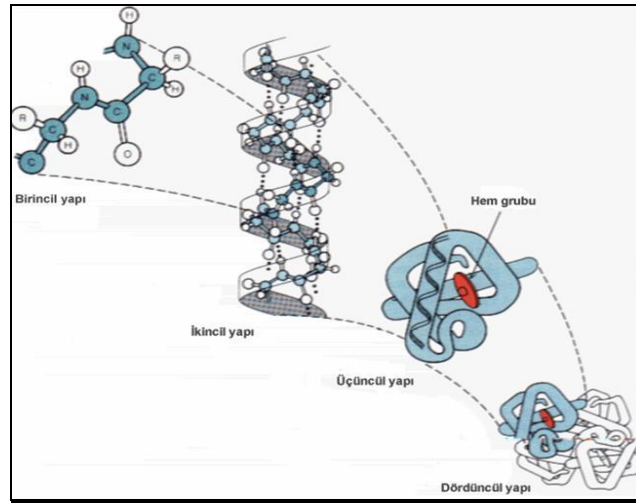
- **Dördüncül (Kuaterner) yapı:** Birden fazla peptit zinciri içeren oligomerik proteinlerde görülür. Bu yapı, birden fazla ayrı polipeptit zinciri veya alt birim bulundurur. Bu alt birimlerin yapısı aynı ya da farklı olabilir. Alt birimlerin üç boyutlu

kompleksler şeklinde düzenlenmesiyle dördüncül yapı oluşur. Kuarterner yapıyı oluşturan bu alt birimler, asimetrik moleküller şeklindedir. Bir araya gelmeleri çeşitli simetri düzenlerinde olur. Dördüncül yapı da üçüncül yapıyı kararlı yapan etkileşimlerden dolayı karardır (Pamuk, 2000; Cox ve Nelson, 2005).



Şekil 1.13. Kuarterner yapı

(<http://tipnotlarim.wordpress.com/2011/03/14/proteinlerin-baglama-ozellikleri-fizyoloji/>)



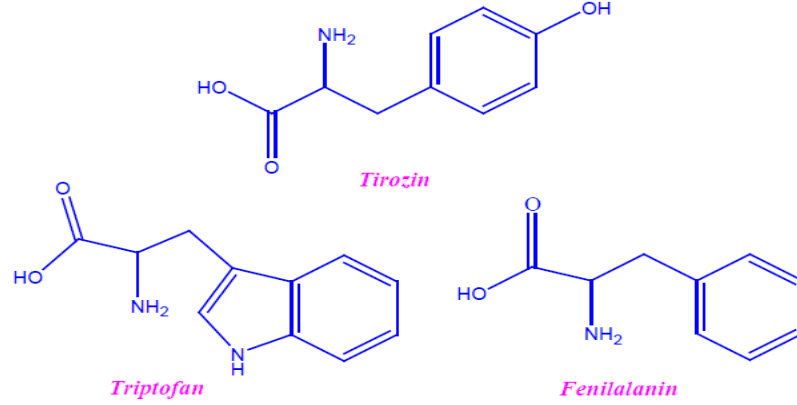
Şekil 1.14. Protein yapıları

(http://80.251.40.59/veterinary.ankara.edu.tr/fidanci/Ders_Notlari/Ders_Notlari/Proteinler.html)

1.2.4. Proteinlerin fluoresans özellikleri

Özellikle son yıllarda proteinlerin fluoresans özelliklerden faydalanarak birçok çalışma yapılmıştır. Spektroskopi tabanlı yaklaşımlar, biyolojik bir doku örneği üzerinde kimyasal bileşimi ve bileşenlerin dağılımının ele alınmasında temel oluşturmaktadır. Bu tür çalışmalar biyolojik doku hastalıklarının saptanmasında meydana gelen kimyasal değişiklerin izlenmesine katkı sağlanmıştır. Birçok metabolik belirteçlerin (NADH, kollajen, tirozin, triptofan, lipo-pigmentler, elastin, pridoksinler),

ışık altında uyarılmasıyla karakteristik fluoresans emisyon spektrumları elde edilir (Buzoğlu, 2012).



Şekil 1.15. Floresans özelliğe sahip amino asitlerin yapıları (Buzoğlu, 2012).

1.3. Farmakoloji

Farmakoloji; ilaçlara ait her türlü bilgiyi içeren ve ilaçların biyolojik sistemlerle etkileşimini inceleyen ilaç bilimidir (Cingi ve Erol, 1996). Bu inceleme, in vitro ya da in vivo olarak yapılabilir (Kayaalp, 1991).

Farmakolojinin dalları;

- Farmakodinami: in vitro incelemelerde ilaçların fizyolojik, biyokimyasal ve patolojik olaylar üzerindeki etkileri ile ilgilenir. Yani ilaçların etki yerlerinin ve etki mekanizmalarının saptanması, kimyasal değişiklik sonucu meydana gelen değişmelerin belirlenmesidir (Kayaalp, 1991).
- Farmakokinetik: İlaç ile vücut arasındaki etkileşimi inceler. İlaçların vücutta emilimi, dağılımı, dönüşümü, atılması gibi olayları matematiksel modellerle inceler (Kayaalp, 1991).
- Kemoterapi: Bakteri ve diğer mikroorganizmalarla çeşitli parazitlerin yaptığı hastalıkların tedavisi ile ilgilenir. Özellikle kanser hücrelerini etkileyen kanser ilaçları kullanılarak yapılan tedavi şeklidir (Kayaalp, 1991; Cingi ve Erol, 1996).
- Toksikoloji: Zehir bilimi anlamına gelmektedir. Kimyasal maddelerin biyolojik sistemlere etkisini zararlı sonuçları yönünden inceler (Kayaalp, 1991).
- Farmakemoterapi: Hastalıkların tedavisinde ilaçların uygulanmasını konu alır (Kayaalp, 1991).

- Klinik farmakoloji: Yeni ilaçların bulunması ve gelişimi ile ilgilenir (Kayaalp, 1991).
- Farmakogenomik: Vücudun ilaca verdiği tepkilerin farklılıklarını bireylerin genetik değişikliğine bağlı olarak inceler. Ayrıca genler üzerinde yeni ilaçlar için hedef noktaların bulunması ile uğraşır (Kayaalp, 1991; Cingi ve Erol, 1996).

1.3.1. İlaç

İlaç; biyoaktif saf bir kimyasal maddeyi ya da standart aktif madde içeren bir ekstreyi ifade eder. DSÖ (WHO: Dünya Sağlık Örgütü) ilacı şu şekilde tanımlar; “Fizyolojik sistemleri veya patolojik durumları alanın yararı için değiştirmek veya incelemek amacıyla kullanılabilen bir maddedir.” (Kayaalp, 1991). İlaçlar hastalıkların önlenmesi, tedavisi, teşhisi ve diğer tıbbi amaçlar için kullanılırlar (Cingi ve Erol, 1996).

İlaçların yaptığı tedavi şekilleri radikal ve palyatif olarak iki şekilde incelenir. Radikal tedavi; hastalığın nedenini tamamen ortadan kaldıran tedavi şeklidir. Palyatif tedavi; hastalığı oluşturan patolojik etkeni ya da olayı tamamen yok etmeyip engeller. Bu şekilde de hastalığın hızla ilerlemesinin önüne geçilmiş olur. İkinci bir tedavi alternatifi de hastalığa neden olan semptom ve işaretleri düzeltmekle olur. Bu iki durumdaki tedavi şeklide palyatif tedavi ya da semptomatik tedavi adını alır (Kayaalp, 1991).

1.3.1.1. İlaçların elde edildiği kaynaklar

İlaçlar doğal kaynaklardan ya da sentez yolu ile elde edilirler.

- **Sentez yolu ile elde edilen ilaçlar:** Doğal kaynaklardan elde edilen ilaçların büyük bir kısmı sentez yoluyla da elde edilir. Sentez yöntemi ilaç elde etmenin en önemli nedenleri; genellikle ham madde bulma zorluğu ve zamandır. Tıpta kullanılan ilk sentetik ilaçlar; genel anesteziklerden eter ve azotprotoksid olmuştur (Kayaalp, 1991; Cingi ve Erol, 1996).

Doğal kaynaklardan elde edilen ilaçlar

- **Bitkisel kaynaklı ilaçlar:** Etkin madde genellikle bitkinin özsuyu, yaprak, rizom, kök, tohum, kabuk gibi kısımlarından elde edilir. Ekstraksiyon ile bitkinin bu

kısımlarından saf olarak alınır. Bitkiden alınan bu etkin madde; amin grubu içeren bazik maddeler, sabit yağlar, uçucu yağlar, gomlar, karbonhidratlar, glikozidler gibi yapıları içerirler (Kayaalp, 1991).

- **Hayvansal kaynaklı ilaçlar:** Mikroorganizmalardan antibiyotiklerin elde edilmesinde kullanılır. Hayvansal kaynaklı ilaçlar; hormonlar, serumlar ve enzimler gibi preparatlardır (Cingi ve Erol, 1996).

- **Madensel (Mineral) kaynaklı ilaçlar:** Kükürt, iyot, demir, alüminyum, magnezyum, amonyum bileşikleri tedavilerde kullanılabilir (Cingi ve Erol, 1996).

- **DNA rekombinasyonu ile ilaç eldesi:** Bu teknik ile insan veya deney hayvanlarında belirli bir etkin maddeyi sentez eden hücrelerden alınan DNA molekülü, çeşitli işlemlerden geçtikten sonra kolay üretilen bir mikroorganizmanın sitoplazması içine sokulur. Bu tekniğin sayesinde insan interferonları, insülin, büyüme hormonu ve bazı aşılar hazırlanmıştır (Cingi ve Erol, 1996).

1.3.1.2. İlaçların sınıflandırılması

- **İlaçların kimyasal yapısı:** Belirli bir kimyasal yapıdan türeyen ilaçların etkileri aynıdır. Bu bakımdan kimyasal yapı ile farmakolojik etki arasında yakın bir ilişki olduğu söylenebilir (Kayaalp, 1991).

- **İlaçların tesir yerleri:** Kemik iliği eritrositlerin yapıldığı yerdir. Burada gerçekleşen hematopiez olayını etkileyen ilaçlara hematopietik ilaçlar denir (Kayaalp, 1991).

- **İlaçların kullanıldığı durumlar ve kullanılma amaçları:** Örneğin; ağrı kesmek için kullanılan ilaçlar analjezikler, cerrahi girişimde bulunmak için kullanılan ilaçlar genel anestezi olarak sınıflandırılır (Kayaalp, 1991).

1.3.2. Kemoterapötikler

Vücudu saran mikroorganizmaları veya parazitleri konakçıya zarar vermeden öldürebilen ilaçlarla yapılan tedavi şeklindedir.

Hastalığa neden olan organizmalar çok çeşitli olduğundan kemoterapide kullanılan ilaçlar da çok çeşitlidir. Kemoterapide ana ilke konakçıda hiç veya çok az

toksik etki yapan kimyasal madde sayesinde hastalığa neden olan organizma üzerinde yeteri kadar toksik veya letal etki oluşturmaktır. Vücuttaki kimyasal maddelerin selektif etkisi için kemoterapötik ilaçlar en iyi örnektir. Bahsi geçen selektif etki mikroorganizma hücresi ile memeli hücresi arasında yapı ve biyokimyasal mekanizmalar bakımından var olan farklar sayesinde mümkün olmaktadır. Selektif derecesi kemoterapötik ilaçlarda farklılık gösterir.

Kemoterapide kullanılan ilaçlar kullanıldığı patojen etkenin cinsine göre sınıflandırılırlar (Kayaalp, 1991).

- Antibakteriyel İlaçlar
- Antifungal İlaçlar
- Antihelmintik İlaçlar
- Antimaralyal İlaçlar
- Antiamibik İlaçlar
- Antiriketziyal İlaçlar
- Antiviral İlaçlar
- Antineoplastik (Antikanser) İlaçlar (Cingi ve Erol, 1996).

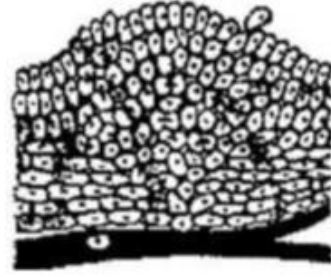
1.3.2.1. Antineoplastik (Antikanser) ilaçlar

Kanser ya da tümör kelimesi tıbbi olarak “neoplazm” şeklinde tanımlanır. “Neoplazm” kelimesinin anlamı; dokunun rölatif olarak aşırı büyüme göstermesidir. Neoplazmlar iyi huylu ve kötü huylu olmak üzere iki türdür. İyi huylu olarak bilinen neoplazmlar metastaz yapmazken, kötü huylu olanlar metastaz yaparlar. Metastaz ise orjin olarak primer tümörden türeyen ve vücudun diğer bölgelerine sekonder olarak gelişen anormal doku çoğalmalarıdır.

İyi huylu tümörlerde (Benign) kanser hücreleri bir kapsül içerisindeydir. Bununla birlikte büyümeleri yavaş olur ve kendisini çeviren dokuyu işgal etmezler. Kötü huylu tümörlerde (Malign) ise büyüme hızlı olur. Kanser hücreleri bir kapsül içinde olmadığından kendisini çeviren dokuyu işgal ederek metastaz yaparlar (Büyükbingöl, 2011).



Şekil 1.16. Benign (Büyükbingöl, 2011).



Şekil 1.17. Malign (Büyükbingöl, 2011).

Bakteri ve protozoer enfeksiyonlarında kemoterapinin başarılı olmasıyla antineoplastik ilaçlar konusunda geniş araştırmalar yapılmış ve birçok yeni sentetik ilaçlar tedavide kullanılmıştır. Antineoplastik ve antimikrobik kemoterapinin ana ilkesi, hastanın veya konakçının normal hücrelerine zarar vermeden bakteri veya tümör hücresinin büyümesini durdurmak veya yok etmektir (Kayaalp, 1991).

Antikanser ilaçların büyük bir kısmı sitotoksik etkileri sayesinde malign hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını önlerler. Aynı zamanda malign hücrelerinin ölümüne yol açarlar. Radikalik bir tedavi istisnalar dışında var olan ilaçlarla sağlanamamaktadır. Antineoplastik ilacın terapötik etkisini kısıtlayan önemli faktör, tümör hücrelerinin ilaca karşı direnç göstermesidir. Aynı malign hücreden gelişen kanser hücreleri morfolojik, biyokimyasal ve ilaca yanıt verme karakteristikleri bakımından farklılık gösterirler. Bu durum başlangıçtaki tümör hücresi kolonunun tekrarlayan bölünmeler sırasında mutasyona uğraması ile ilgilidir.

Malign hücre ile normal hücre arasında kalitatif bakımdan fazla farklı olmadığından antineoplastik ilaçların kanser hücresine karşı olan seçicilikleri azdır (Aytaç ve Tozkoparan, 2007). Bundan dolayı antineoplastik ilaçlar, kanser hücrelerini yok etmek yerine hızlı bir biçimde çoğalmakta olan normal hücreleri de yok edebilir. En fazla etkilenen hücreler; kemik iliği, gonadlar, gastro-intestinal kanal ve cilt'dir. Bunun yanı sıra karaciğer ve böbrek gibi nispeten yavaş çoğalan hücreleri de etkilerler (Cingi ve Erol, 1996).

Antineoplastik ilaçların sınıflandırılması;

- Alkilleyici İlaçlar
- Antimetabolitler İlaçlar
- Bitkisel Kaynaklı İlaçlar
- Antitümör Antimetabolitler
- Hormonlar ve Hormon Antagonistler

- Diğer İlaçlar; Sisplatin, L-Asparaginaz, Hidroksiüre, Amsakrin (Cingi ve Erol, 1996).

1.3.2.2. Bitkisel kaynaklı ilaçlar

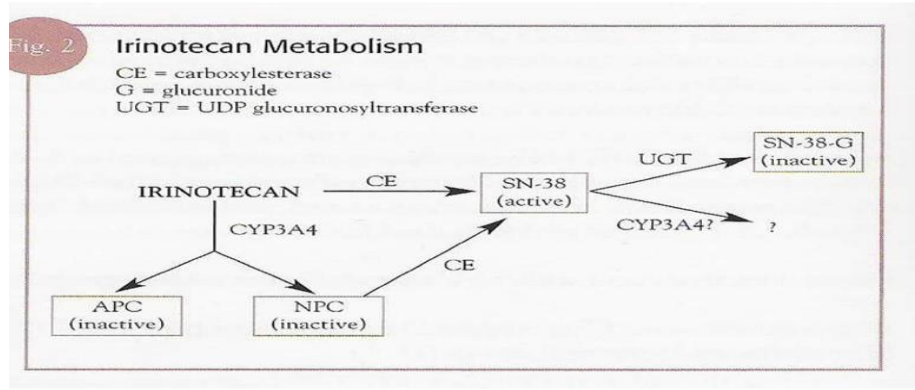
Vinca Rosea bitkisinin dimerik alkaloidleri olan vinkristin vinblastin bitkilerden elde edilen podafilotoksin ve yarı sentetik türevleri etopozid ve tenipozid ile Taxus türü bitkilerden elde edilen taksonlar paklitaksool ve dosetaksel'dir. Etopozid ve tenipozid hariç primer etkileri mitozun metafaz döneminde, mikrotübüllerden ibaret olan mitoz iğciklerinin oluşmasını önlemektir. Sonuç olarak hücre bölünmesi metafazda durur ve hücre ölür. Mitoz dönemine özgü ilaçlardır. DNA sentezini ve DNA yapısını bozmazlar (Dizdar ve Türker, 2005).

Kamptotesin türevi ilaçlar da yarı sentetik ilaçlardır. Kamptotesin Çin' de yetişen ağacın (Camptotheca Acuminata) kabuğu ve odunundan 1966'da elde edilmiştir İrinotekan ve Topotekan bu gruptaki ilaçlardır (Dizdar ve Türker, 2005).

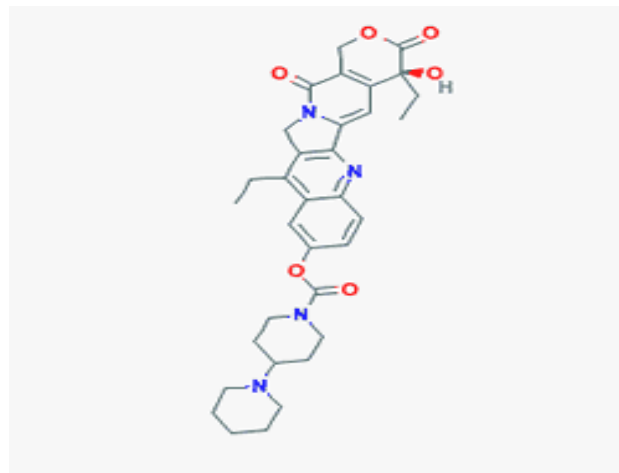
İrinotekan

Kamptotesin türevi antineoplastik ve immunosupresif bir ilaçtır. Kamptotesinler spesifik olarak topoizomerez 1 enzimi ile etkileşir. Bu etkileşme DNA' da geri dönüşümlü tek zincir kırıklarını indükleyerek torsiyonel gerilimi azaltır.

Kolorektal kanserdeki etkinliğini tek başına ya da fluorourasil/folinik asit ile birlikte gösterebilir. Sisplatin, oksaliplatin, etoposid gibi ajanlarla da kombine edilir. Ayrıca küçük hücreli ve küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinde, over, gastrik, meme kanseri ve hodgkin dışı lenfoma ile akut lösemilerde de etkilidir. Doz kısıtlayıcı yan etkiler arasında nötropenin ön planda olduğu mielosüpresyon, gecikmiş ishal sayılabilir. Asteni, anoreksi, alopesi, bulantı, kusma da görülebilir (Dizdar ve Türker, 2005).



Şekil 1.18. İrinotekan metabolizması (Aykan, 2004).



Şekil 1.19. İrinotekan HCl' in kimyasal yapısı (<http://www.ilactr.com/ilac/irinotekan.html>).

1.3.3. İlaçların etki mekanizmaları

İlacın etkisinin bir biyolojik yapıda nasıl gerçekleştiğinin bilinmesi, insanda aynı etkiyi elde etmek için rasyonel ve bilinçli ilaç kullanımını sağlar. Etki mekanizması; sistem, organ, doku, hücre, sübselüler yapı düzeylerinde ve enzimler gibi hücrelerdeki fonksiyonel moleküller düzeyinde olmak üzere değişik şekillerde incelenebilir (Kayaalp, 1991).

İlaçların başlıca etki oluşturdıkları mekanizmalar;

- **Farmakolojik etki ilacın fiziksel veya kimyasal nonspesifik bir özelliğine bağlı olabilir.**

Magnezyum ve sülfat iyonlarının bağırsakta hemen hemen hiç absorbe edilmemesinden dolayı magnezyum sülfat pürgatif tesir gösterir. Böylece, bağırsak

içinde kalan tuz izo-osmotik ekivalanı kadar su tutacak ve feçesin sulu kalmasıyla birlikte ishale sebep olacaktır (Kayaalp, 1991).

- **Farmakolojik etki ilacın bir enzimi inhibe etmesine veya aktive etmesine bağlı olabilir.**

Vücutta sinaps ve kavaşaklarda bulunan enzimler normal durumda nöromedyatörleri inaktive ederler. Fakat ilaçların etkisi ile enzim bu özelliğini kaybeder ve nöromedyatör birikir. Nöromedyatörün konsantrasyonunun artması farmakolojik etkinin ortaya çıkmasına neden olur. Örnek olarak antikolinesteraz ilaçları verilebilir (Kayaalp, 1991).

- **İlaç antimetabolit olması nedeniyle etki oluşturabilir.**

Koenzimler; inorganik katyonlardan ya da oldukça basit bir yapıya sahip organik maddelerden oluşan, enzimlerin aktif kısımlarıdır. Koenzimin yapısında bulunan organik maddeler organizmalar tarafından sentezlenir veya başka organizmalar tarafından sentez edilmiş halde besin içinde dışarıdan alınır. Koenzimler ve enzim substratları metabolit denilen maddelerden sayılırlar. Metabolitlerin vücuttaki miktarı, hücrenin canlılığı ile ilgili çeşitli metabolik olayların düzenli bir şekilde devam etmesi için önemlidir. İnsan vücudunda elde edilemeyip dışarıdan alınan metabolitlere esansiyel (temel) metabolitler denir.

Kimyasal yapı bakımından metabolitlere benzeyen bazı sentetik maddeler (metabolit analogu) hücrede gerçekleşen biyokimyasal olaylarda metabolitlerin yerini alabilirler. Metabolit analogunun, metabolit molekülünün enzim molekülüne bağlanan kısmına konformasyon ve elektron dağılımı bakımından benzeyen bölgesi vardır. Böylece esas metabolit yerine antimetabolit geçer ve biyokimyasal olaylar bloke olur. Fakat normal metabolit ile arasındaki yapı farkından dolayı reaksiyona giremezler ve enzimatik olayı durdururlar. Bu duruma biyolojik antagonizma denir.

Hücre içindeki birçok biyolojik olayın antimetabolitler tarafından inhibe edilmesiyle organizmada bazı etkiler gözlenir. Örneğin; bakteri, protozoer ve malign tümör hücresi ve diğer hücrelerde gelişme ve bölünmenin durması (Kayaalp, 1991).

- **Etki, hücrelerde nöromedyatörlerin ve diğer endojen maddelerin tesir ettiği reseptörlerin ilaç tarafından etkilenmesi sonucu oluşabilir.**

Santral ve periferik sinir sisteminde mevcut sinapslarda ve periferik sinirlerin efektör hücrelerle (çizgili kas, düz kas, myokard, salgı bezi hücreleri) yaptığı

kavşaklarda salıverilen nöromediyatörler, salıverildikleri sinir ucunun karşısındaki hücrede kendilerine uyan reseptör noktalarını uyararak veya inhibe ederek fizyolojik etkiler meydana getirirler. Periferik eferent sinir sisteminde en yaygın olan nöromediyatörler asetilkolin ve noradrenalinidir. Santral sinir sisteminde ise dopamin, histamin, serotonin gibi amin bileşikleri, bazı amino asitler ve peptitler nöromediyatör görevi yapabilirler (Kayaalp, 1991).

- **İkame (yerine koyma) esasına dayanan ilaç etki mekanizması**

Santral ve periferik sinir sistemlerindeki sinaps veya kavşaklarda impuls aşırımından sorumlu mediyatör maddelerin azalmasından dolayı hastalıklar meydana gelebilir. Bu durumda hastalığa sebep olan maddenin yerini tutacak veya miktarını artıracak ilaçlar tedavi yapılır (Kayaalp, 1991).

- **Farmakolojik etki, ilacın vücutta normalde inaktif durumda bulunan bir maddeyi açığa çıkarmasına ve aktif hale getirmesine bağlı olabilir.**

Sinir ucundan salıverilen ve sinaps veya kavşakta impuls aşırımını sağlayan mediyatör moleküllerinin “re-uptake” olayı ile geri alınmaları onların etkinliğini azaltır. Bazı ilaçlar “re-uptake” olayını bloke ederek mediyatörün inaktivasyonunu engelleyerek etkinliğini artırır. Kokain ve imipraminler bu şekilde etki yaparak ruhi eksitasyon durumu oluşturabilirler (Kayaalp, 1991).

- **Farmakolojik etki ilacın selasyon yapmasına bağlı olabilir.**

Metal iyonlarının organik moleküller ile halka oluşturarak bağlanmasına selasyon denir. Selasyonu yapan organik maddeler; kalsiyum disodyum EDTA, penisilamin, dimerkapkrol (BAL) ve desferrioksamin gibi maddelerdir. Kurşun tuzları ile zehirlenmelerin tedavisinde kalsiyum disodyum EDTA kullanılır (Kayaalp, 1991).

- **İlaç etkisi, indüksiyon olayı sonucu oluşabilir.**

Hücrelerde protein sentezi m-RNA tarafından yapılır. m-RNA, DNA tarafından hazırlanıp ribozomlara yönlendirilir. DNA molekülünde aktif olan bölge özel bir protein ile kapatılarak inaktive edilip, kendine özel m-RNA' i yapamayacak durumda olabilir. Hormonal etkili ilaçlar ve bazı hormonlar represyon yapan proteini inaktive ederek DNA' nın bu bölgesinin karakteristik mesajını taşıyan m-RNA' nın transkripsiyonuna olanak verirler (derepresyon olayı). m-RNA' nın taşıdığı mesajla ribozomlarda yeni enzimler ve diğer proteinler yapılır (indüksiyon olayı). İndüksiyon sonucunda oluşan

enzim ve diğ er proteinler hormonal maddelerin hücre içindeki fizyolojik ve farmakolojik etkilerinin temelini teşkil edebilirler (Kayaalp, 1991).

1.3.4. Farmakolojide reseptör kavramı ve ilaç-reseptör ilişkisi

Hücrelerde fonksiyonel önemi olan makromoleküllerin üzerinde bulunan bir kimyasal gruptan oluştuğ u kabul edilen, ilaç veya endojen madde moleküllerine seçici bir şekilde uyan ve etkiyi başlatan bu hipotetik noktalara reseptör denir. Reseptörleri taşıyan makromoleküller ekstraksiyon ile saf halde elde edilebilir. Böylelikle ilaç-reseptör etkileşimi molekül düzeyinde incelenebilir.

Reseptörlerin hücrelerdeki yeri çoğ unlukla kesin olarak bilinmez. Fakat eksitabl hücrelerde (nöronlar, çizgili kas hücresi, düz kas hücresi ve kalp kası hücresi), hücrenin aktivitesinin ilaçlar tarafından tenbih veya inhibe edilmesinden sodyum, potasyum ve kalsiyum gibi iyonlara karşı hücre membranının permeabilitesinin değ iştirilmesinden sorumludur. Bundan dolayı reseptörlerin genellikle hücre membranında bulunduğu kabul edilir.

İlaç-reseptör kombinasyonu, enzim ile substrat kombinasyonuna benzer şekilde genellikle reveresibl şekindedir.

Reseptör olmayan makromoleküller ile ilaçlar reveresibl şekilde kombine olabilirler. Bu kombinasyon bir etkiye sebep olmaz. Bu tür makromoleküllere akseptör denir. Dokularda ilaç etkileş en fakat etki oluşturmayan yedek reseptör ya da sessiz reseptör denilen bağ lanma noktaları vardır (Kayaalp, 1991).

1.3.5. İlaçlar arasındaki etkileş me şekilleri

Bir ilaç, diğ er ilacın etkisini kalitatif veya kantitatif olarak değ iştirebiliyorsa bu iki ilaç arasında etkileş im olduğ u söylenir. İki ilaç vücutta özellikle etkileş me yerinde aynı zamanda bulunuyorsa ilaçlar arasında etkileş im olmadığı söylenir.

Etkileş meler bazen bir ilacın terapötik etkisini baş ka bir ilaçla arttırmak veya yan etkilerini azaltmak için kasten oluşturulur. Bu tür etkileş meler yararlı etkileş meler olarak adlandırılır. Bazı etkileş meler ise bilinçsizce ilaç kullanımından dolayı istenmeyen şekilde olabilir.

Etkileş meler oluş ma mekanizmasına ikiye ayrılır (Kayaalp, 1991).

- **Farmakodinamik etkileşmeler**

Bir ilacın diğerinin etkisini; onunla etki yeri veya çevresinde etkileşmesi, onunla zıt yönde veya aynı yönde etki oluşturması, onunla kimyasal olarak birleşmesi sonucu değiştirmesiyle oluşur. İlacın vücut sıvılarındaki, plazmadaki, konsantrasyonu ikinci ilaç tarafından değiştirilemez (Kayaalp, 1991).

- **Farmakokinetik etkileşmeler**

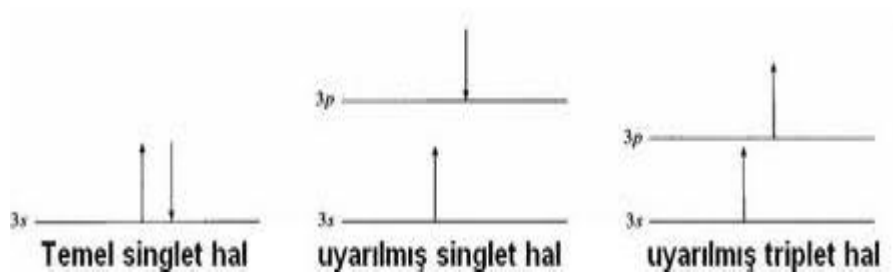
Bu etkileşmelerde bir ilaç diğer ilacın farmakokinetiğini (absorpsiyon, dağılım, biyotransformasyon, ekskresyon) değiştirmesiyle oluşur. Etkileşmeler ilacın etki yerinden uzakta meydana gelir. Vücut sıvılarındaki, etki yerindeki, ilaç konsantrasyonunun değişmesiyle etkinin azalmasına veya artmasına yol açarlar (Kayaalp, 1991).

1.4. Lüminesans Olayı, Floresans ve Fosforesans

1.4.1. Lüminesans oluşumu

Lüminesans olayı, moleküllerin değerlik orbitallerinde bulunan elektronların bir etki uyarılması sonucu başlar. Bu nedenle değerlik elektronlar lüminesans olayının açıklanmasında önemli bir yer tutar.

Singlet halde bulunan molekül enerji absorpsiyonu ile spinini değiştirmeden üst enerji seviyesine uyarılmasına uyarılmış singlet hal denir. Eğer uyarılmış singlet haldeki elektronun spininde değişim varsa buna da uyarılmış triplet hal denir. Uyarılmış singlet ve triplet halde elektronlarının spinlerinin farklı olması yanında enerjileri ve ömürleride farklıdır. Uyarılmış triplet hal, uyarılmış singlet halin dönüşümünden oluştuğu için uyarılmış triplet halin enerjisi uyarılmış singlet halin enerjisinden düşüktür. Uyarılmış singlet halin ömrü yaklaşık 10^{-5} - 10^{-8} sn, uyarılmış triplet halin yaklaşık ömrü ise 10^{-4} - 10^{-2} sn aralığındadır (Yıldız, 2012).



Şekil 1.20. Uyarılmış singlet, triplet hal (Yıldız, 2012).

1.4.2. Fotolüminesans

Fotolüminesans; uyarılma olayının atom veya moleküllerin fotonları soğurması ile gerçekleşen ışık emisyonudur.

Maddenin kimyasal yapısına, fiziksel durumuna ve sıcaklığına bağlı olarak farklı lüminesans olaylar gözlenebilir.

- Fluoresans
- Fosforesans
- Geciktirilmiş Fluoresans

Yukarda bahsettiğimiz lüminesans olaylar birbirinden emisyon dalga boyları veya emisyon ve absorpsiyon arasında geçen zaman ile ayrılır. Normal fluoresans olay maddenin her hangi bir fiziksel durumunda, hem adi hem de düşük sıcaklıklarda gerçekleşebilir. Ancak maddeler genellikle katı veya çözelti halindeyken çok düşük sıcaklıkta fosforesans özellik gösterirler. Fosforesans spektrumları fluoresans spektrumlarına göre daha uzun dalga boyuna kaydığından dolayı spektrum durumlarına bakarak bu iki olayı ayırt edebiliriz. Geciktirilmiş fluoresansı gerçekleştiren maddeler genellikle fosforesans yayan maddelerle aynı fiziksel haldedir. Emisyon spektrumları yönünden ise fluoresansa benzer. Uyarılma ve yayılma arasında geçen zaman fosforesans ömrü mertebesindedir.

Fluoresans ve fosforesans spektrumları, absorpsiyon spektrumları gibi deneysel şartları verilen madde için karakteristiktir. Lüminesans metotları diğer absorpsiyometrik tekniklerden daha duyarlıdır.

Lüminesans tekniklerinin organik ve mineral katıların molekül yapılarının incelenmesinden fotokimya ve moleküler biyoloji alanlarına kadar geniş bir uygulama alanı vardır (Yıldız, 2012).

1.4.3. Fosforesans

Işık ışınlarının absorpsiyonu, molekülü temel halin en düşük titreşim seviyesinden, uyarılmış bir singlet durumun titreşim düzeylerinden birine uyarır. Bu geçiş 10^{-15} sn mertebesinde meydana gelir. Uyarma enerjisinin fazlasının atılması için;

- Fluoresans ile birinci uyarılmış singlet halin en düşük enerji seviyesine dönebilir.
- İlk baş uyarılmış triplet hal titreşim düzeylerinden birine geçer sonra da uyarılmış triplet halin en düşük enerji düzeyine geçebilir.

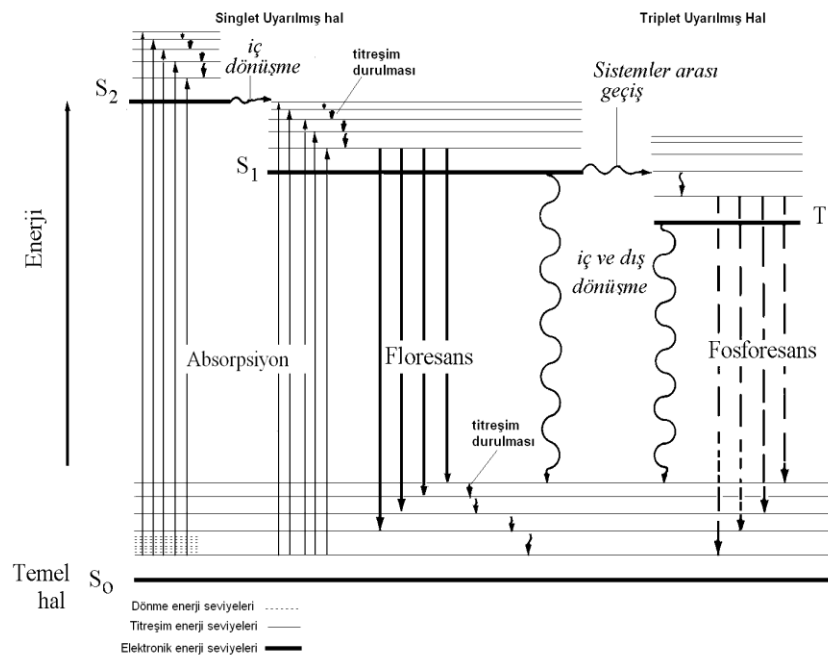
Molekül birinci uyarılmış halden temel hale ışımaya oluşturmada ya da floresans yayarak dönebilir.

Molekülün birinci uyarılmış triplet halden ışımaya emisyonu ile temel hale dönüşü zordur. Yani oldukça yavaş bir emisyonla temel hale dönülür. Uyarılmadan 10^{-4} ve birkaç saniyelik bir süreye kadar oluşan bu ışımaya dönüşte fosforesans meydana gelir.

Molekül birincil uyarılmış triplet halin en düşük titreşim seviyesinden yalnız fosforesans ışımaya ile temel hale dönemez. Bu arada başka moleküllere enerji transferi olabilir veya ışımaya deaktivasyonla temel hale dönebilir.

Fosforesans gösteren madde daima aynı derecede floresans gösterir. Enerji düzeyleri diyagramına bakıldığında, fosforesans emisyonunun floresanstan daha düşük frekansta veya daha uzun dalga boyunda oluştuğu gözlenir.

Fosforesans, en iyi şekilde katı veya viskoz bir ortamda, ışımaya deaktivasyonun azalmasına sebep olan düşük sıcaklıkta gözlenir (Yıldız, 2012).

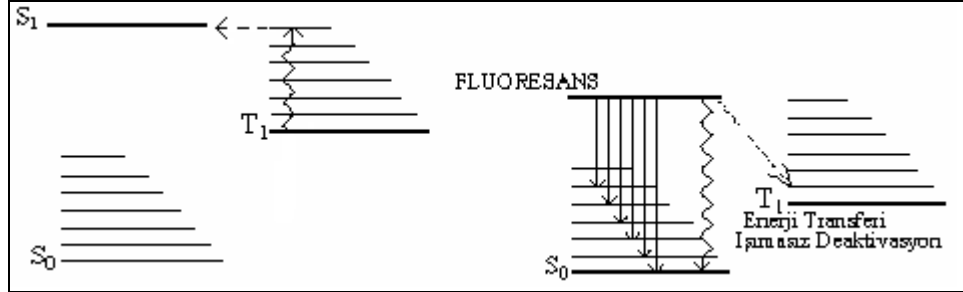


Şekil 1.21. Uyarılma ve emisyonların toplu gösterimi (Yıldız, 2012).

1.4.4. Geciktirilmiş floresans

Singlet veya triplet durumların enerji düzeyi diyagramlarıyla geciktirilmiş floresans izah edilebilir. Olaylar fosforesansda anlatıldığı gibi gerçekleşir. Yani absorpsiyon ve dahili enerji dönüşümünden sonra moleküller ya birinci uyarılmış halinden en düşük enerji titreşim seviyesinde ya da birinci triplet halin en düşük titreşim seviyesinde bulunurlar.

Özel deneysel şartlarda belirli moleküller triplet halin en düşük enerji seviyesinden singlet halin en düşük titreşim düzeyine geçebilirler. Bunun için gerekli olan enerji, içinde bulunan şartlar tarafından sağlanır. Bu şartlar altında birinci uyarılmış singlet hale dönüşten sonra fluoresans emisyonu meydana gelebilir (Yıldız, 2012).



Şekil 1.22. Geciktirilmiş fluoresansın şematik diyagramı (Yıldız, 2012).

1.4.5. Fluoresansa etki eden faktörler

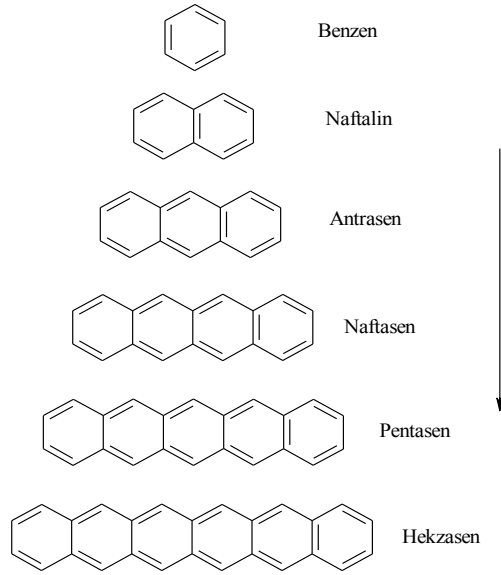
- **Molekül yapısının fluoresansa etkisi**

Fluoresans şiddeti molekül yapısına bağlı olarak üçe ayrılır.

- **Konjügasyon etkisi**

Aromatik ve alifatik bileşiklerde konjügasyona rastlanır. Aromatik konjügasyonda π elektronları delokalize durumda iken alifatik konjügasyonda lokalize durumdadır. Yani π elektronları aromatik bileşiklerde düşük bir enerji ile uyarılabilirken alifatik bileşiklerde bu durum yeterince gevşek bağlı olmadıklarından kolay değildir. Ancak alifatik karbonil bileşikleri fluoresans kuantum verimi çok düşük olacak şekilde fluoresans yapabilirler. Çünkü karbonil oksijeni üzerindeki bağ yapmamış elektron çifti π^* orbitaline düşük bir enerji ile uyarılabilir.

Halka sayısı arttıkça delokalizasyon artar. Buna bağlı olarak da fluoresans şiddeti artar (Yıldız, 2012).



Şekil 1.23. Fluoresansa konjügasyon etkisi (Yıldız, 2012).

- **Molekölün rijitliğinin ve düzlemselliğinin etkisi**

Rijitlik, molekülün esnek olmama özelliğidir. Rijit özelliğe sahip molekül üzerine düşen foton enerjisini titreşim enerjisine dönüştüremeyerek geri yansıtır.

Rijit olmayan molekülde iç dönüşme daha kolay olduğundan ışın yaymaksızın enerji kaybının gerçekleşmesi ihtimali çok daha fazladır. Bu durum da fluoresans şiddetini azaltır. Rijit olmayan bir molekülün bir tarafı diğer tarafına göre daha zayıf bir enerjiyle uyarılmış olabilir. Bu da fluoresans verimini azaltabilir. Bu duruma örnek olarak fluoresein ve fenolftalein moleküllerini verebiliriz. Alkol su karışımında bulunan fluoresein çözeltisi çok kuvvetli fluoresans olduğu halde, fenolftaleinin çözeltisi fluoresans özellik göstermez.

Fluoresein molekülü rijit olduğu halde fenolftalein molekülü rijit değildir. Bundan dolayı fenolftalein uyarıldığı zaman temel hale dönmek için iç dönüşümü tercih eder (Yıldız, 2012).

- **Moleküldeki süstitüentlerin etkisi**

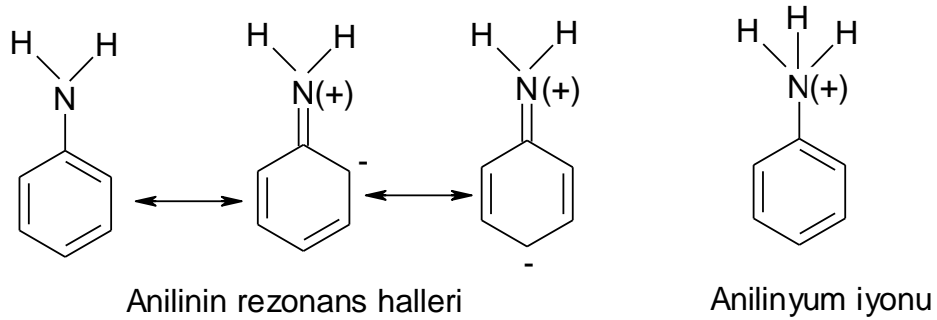
Düşük enerjili $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişlerine sahip aromatik fonksiyonel grupları içeren bileşiklerde en şiddetli ve en faydalı fluoresans görülür. $n \rightarrow \pi^*$ geçişleri ise fluoresansı önler. π elektronunu delokalize eden (gevşeten) süstitüentler ($-\text{NO}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{OCH}_3$) fluoresansı azaltır ya da tamamen yok ederler. Örneğin; benzen UV bölgede fluoresans yapar. Bu moleküle ($-\text{NH}_2$) grubu süstitüe edilirse flüoresansı artar ve yüksek dalga boyuna kayar. Bu moleküle ($-\text{NO}_2$) grubu süstitüe edilirse fluoresans özelliğini

tamamen kaybeder. Çünkü anilinde ($C_6H_5-NH_2$) bağ yapmamış elektron çifti bulunması, nitrobenzende ($C_6H_5-NO_2$) bu halin görülmesidir.

Aromatik halkaya karboksilik asit veya karboksil grubunun süstitüsüyonu genellikle fluoresansı durdurur. Bu bileşiklerde, $n \rightarrow \pi^*$ geçişinin enerjisi, $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişinkinden daha azdır (Yıldız, 2012).

- **Fluoresansa pH' ın etkisi**

Ortam pH' ının değişmesi hem temel hem de uyarılmış molekülleri etkiler. Bundan dolayı pH fluoresans verimini etkileyen bir faktör olabilir. Asit veya baz grubu içeren maddelerin iyonlaşmış veya iyonlaşmamış hallerinin fluoresans ışımalarının dalga boyları ve şiddetleri birbirinden farklıdır. Bu bileşiklerin emisyonundaki değişmeler, moleküllerin asidik ve bazik formları ile ilgili rezonans türlerinin sayısının farklılığından kaynaklanır. Örneğin, anilin bazik ve nötral ortamda ultraviyole ve görünür alan flüoresansı yayar (Yıldız, 2012).



Şekil 1.24. Anilin ve anilinyuma pH etkisinin gösterimi (Yıldız, 2012).

- **Fluoresansa sıcaklık ve çözücünün etkisi**

Yüksek sıcaklıklarda çarpışma frekansının artması dış dönüşüm ile sönm olasılığını arttırdığı için moleküllerin büyük kısmında fluoresansın kuantum verimi, sıcaklık arttıkça azalır. Sıcaklığın artması ile fluoresans moleküllerle çözücü molekülleri arasındaki çarpışma hem artar, hem de daha etkili bir hale gelir. Bunun sonucunda fluoresans ışınları yaymaya hazır bir molekül dış geçiş yaparak temel hale gelir. Çözücünün viskozitesinin azalması da çarpışmayı arttırdığından fluoresansı düşürür.

Molekülün fluoresansı, ağır atomları ya da yapılarında bu atomların olduğu diğer çözünenleri içeren çözücüler varlığında azalır. Bu duruma örnek olarak; karbon tetrabromür ve etil iyodür verilebilir. Orbital spin etkileşimleri triplet oluşum hızında bir artışa ve dolayısıyla fluoresansta bir azalışa sebep olur (Yıldız, 2012).

- **Fluoresansa çözünmüş oksijenin etkisi**

Çözünmüş oksijen genellikle fluoresans şiddetini azaltır. Bu durumu fluoresans yapan türlerin fotokimyasal olarak yükseltgenmesi ile olabilir. Ayrıca moleküler oksijenin paramanyetik özelliği sonucu sönümün meydana gelmesi ile de açıklanabilir. Diğer paramanyetik türler de fluoresansı azaltma eğilimindedir (Yıldız, 2012).

1.4.6. Fluoresans spektrumları

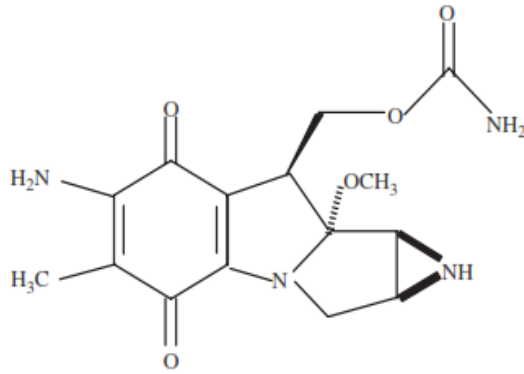
- **Fluoresans emisyon spektrumları:** Fluoresans spektrumları belirli bir spektral bölgede yayılır. Fluoresans spektrumu emisyon dalga boyunun bir fonksiyonu olarak emisyon şiddetinin değişimini veren spektrumu tayin etmek için analizlenen monokromotörün yayılan ışığın dalga boyu değiştirilirken uyarıcı radyasyonunun dalga boyu sabit tutulur (Yıldız, 2012).

- **Fluoresans eksitasyon spektrumları:** Fluoresans ışık şiddeti uyarma ışınımlarından absorbe edilen kuantum sayısına bağlıdır. Molar absorplama katsayısı, dalga boyunun bir fonksiyonu olduğundan bir maddenin absorpsiyon dalga boyuna bağlıdır. Uyarma ışınımlarının dalga boyları ile fluoresans şiddetindeki değişme uyarma spektrumlarını meydana getirir. Uyarma ışınımlarının dalga boyları değiştirilirken gözlenen dalga boyu sabit tutularak bu spektrumlar elde edilir. İzole bir madde için uyarma spektrumları genel olarak absorpsiyon spektrumuna benzerdir. Ancak madde karışımlarında bu benzerlik söz konusu değildir (Yıldız, 2012).

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

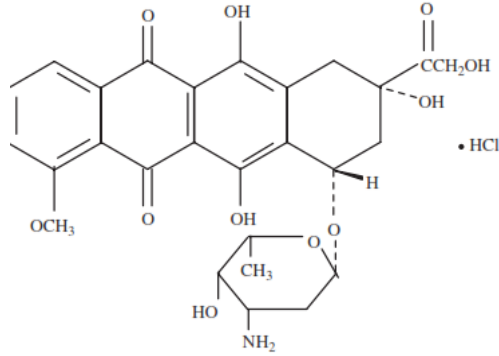
Son yıllarda bilim insanları protein ilaç etkileşimleri üzerine kayda değer çalışmalarda bulunmuşlardır. Dolayısıyla bu çalışma konusunun önemi de gün geçtikçe artmaktadır. Bu bölümde protein ilaç etkileşimleri üzerine yapılan çalışmalara değinilecektir.

- Bi ve arkadaşları spektroskopik yöntemle ilaçlarla (Mitosin C, Fluorourasil, Merkaptopürin, Doksorubisin hidroklorür) BSA (İnek Serum Albumin) arasındaki etkileşmeler üzerine çalışmışlardır.



Şekil 2.1. MMC yapısı.

Şekil 2.2. FU yapısı.



Şekil 2.3. DXR yapısı.

Şekil 2.4. MP yapısı.

İlaç ilavesi ile albuminin 280 nm eksitasyon ve 342 nm emisyon dalgaboyunda olan floresans şiddetinin düştüğünü gözlemlemişlerdir. Yani albumine farklı konsantrasyonlarda ilaç eklemesi albuminin floresans şiddetinin düşmesine neden olduğunu gözlemlemişlerdir.

İlaçların serum albumine bağlanma mekanizması Stern-Volmer denklemi ile incelenmiştir.

$$F_0/F = 1 + K_q\tau_0[D] = 1 + K_{sv}[D] \quad (2.1)$$

F_0 ; albuminin başlangıçtaki floresans şiddetidir. F ; ilaç bağlandıktan sonra albuminin floresans şiddetidir. K_q ; quenching sabitidir. τ_0 ; ilacın floresans ömrüdür. D ; ilaç konsantrasyonudur. K_{sv} ; Stern-Volmer sabitidir.

Bi ve arkadaşları F_0/F 'e karşı $[D]$ grafiğini çizerek bu grafikteki eğimin Stern-Volmer sabitini ve quenching sabitini verdiğini ifade etmişlerdir. Bağlanma sabitini hesaplamak içinde logaritmik bir denklem kullanmışlardır. Bu denklem aşağıdaki şekildedir:

$$\log F_0 - F/F = n \log K_A + n \log ([D_t] + n[P_t] F_0 - F/F_0) \quad (2.2)$$

F_0 ; albuminin başlangıçtaki floresans şiddetidir. F ; ilaç bağlandıktan sonra albuminin floresans şiddetidir. n ; albumin üzerindeki bağlanma bölge sayısıdır. K_A ; bağlanma sabitidir. Ayrıca bu sabit K_b şeklinde de gösterilebilir. D ; ilaç konsantrasyonudur. P ; protein konsantrasyonudur.

Bi ve arkadaşları $\log F_0 - F/F$ e karşı $\log ([D_t] + n[P_t] F_0 - F/F_0)$ grafiğini çizerek, bu grafikteki eğimin, albumin üzerindeki bağlanma bölge sayısını, y eksenini kesen noktanında bağlanma sabitini verdiğini bulmuşlardır.

Bi ve arkadaşları farklı sıcaklıkta bağlanma sabitleri incelemiş ve ilaçların protein ile farklı etkileşimler yaptığını bulmuşlardır.

Ross ve Subramanian'ın görüşlerine göre mekanizmalar arası ilişki ve termodinamik parametreler Van't Hoff denklemi ile açıklanabilir. Bu çalışmada da bu denklem kullanılarak termodinamik parametreler yorumlanmış ve etkileşimler hakkında yorumlar yapılmıştır. Bu denklem aşağıda gösterilmiştir.

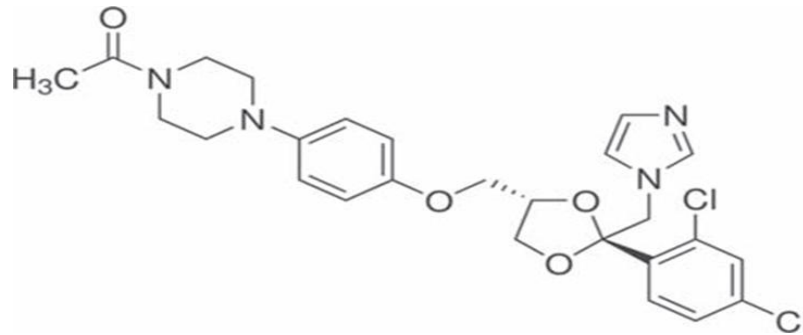
$$\ln K_b = \Delta H/RT + \Delta S/R \quad (2.3)$$

K_b ; bağlanma sabitidir. ΔH ; entalpi değişimidir. ΔS ; entropi değişimidir. T ; sıcaklıktır. R ; gaz sabitidir.

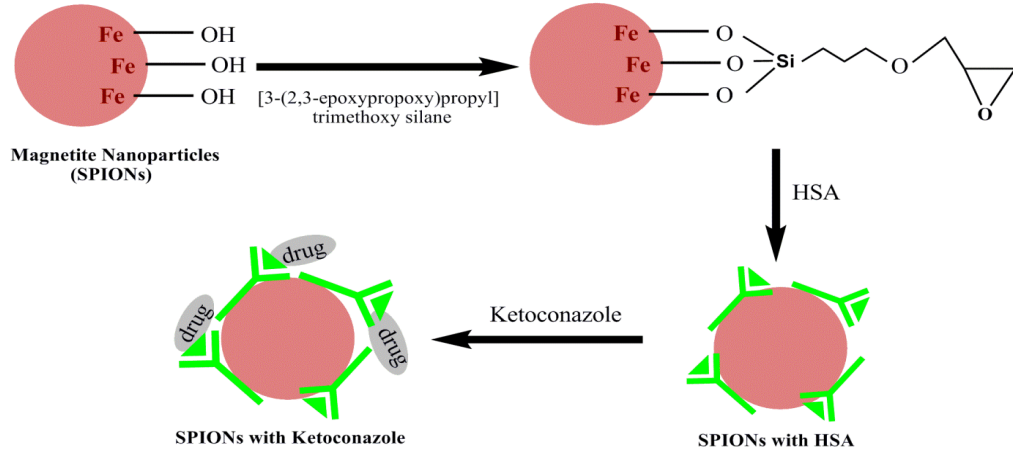
Bi ve arkadaşları elde ettikleri termodinamik parametrelerden etkileşimleri şu şekilde tanımlamışlardır; MMC-BSA ve FU-BSA'da $\Delta H < 0$; $\Delta S > 0$ olduğundan bu ilaçlarla protein arasında elektrostatik etkileşim gözlemlenmiştir. MP-BSA ve DXR-BSA'da $\Delta H > 0$; $\Delta S > 0$ olduğundan bu ilaçlarla protein arasında hidrofobik etkileşim gözlenmiştir.

Bu çalışma, çözelti ortamında yapıldığı için kullanılan ilaçlar fluorescent özellik göstermez. Eğer fluorescent özellik gösterseydi ilaç ve protein emisyonları girişim yapardı (Bi ve ark, 2009).

- Maltaş ve arkadaşları ketokonazol ile HSA arasındaki etkileşimi fluoresans spektroskopisi ile incelemişlerdir. Bu çalışmada, süperparamagnetik Fe oksit nanopartikülleri trimetoksi silan ile modifiye edilerek yüzeyde epoksi grupları oluşturulmuş ve bu epoksi gruplarına HSA amin ucundan bağlanmıştır. İmmobilize olmuş HSA ketokonazol ile etkileşime girmiştir. HSA ile ketokonazol arasındaki etkileşim ve protein bağlanma miktarı fluoresans spektroskopisi ile incelenmiştir. SPION' a protein immobilizasyonu öncesi ve sonrasında Tris tamponu içindeki HSA'nın fluoresans şiddeti spesifik eksitasyon ve emisyon dalga boylarında sırasıyla 280 nm ve 342 nm olarak kaydedilmiştir. Maltaş ve arkadaşları farklı miktarlarda epoksi modifiye nanopartikül yüzeyine HSA bağlanma miktarının kalibrasyon grafiğinin regresyon denkleminde HSA bağlanma miktarı bulmuşlardır.



Şekil 2.5. Ketokonazolün yapısı (Maltaş ve ark, 2013).



Şekil 2.6. Protein ve ilacın sırasıyla epoksi modifiye magnetik nanopartiküle bağlanma mekanizması (Maltaş ve ark, 2013).

Proteininde olduğu gibi ketokonazolün spesifik floresans şiddeti bulunmuştur. Belirli konsantrasyon aralığında ketokonazol sırasıyla 300 nm ve 390 nm eksitasyon ve emisyon dalga boylarında maksimum floresans göstermiştir. Sabit bir konsantrasyon aralığında üç farklı sıcaklıkta (298, 302 ve 306 K) farklı konsantrasyonlardaki ilaç HSA ile etkileşime sokulmuştur ve ilaç maksimum bağlanmayı 306 K' de göstermiştir. HSA' ne ketokonazol bağlanması ile HSA immobilize SPION tarafından ilacın floresans şiddetinin söndürüldüğü (statik quenching) görülmüştür. Maltaş ve arkadaşları tarafından Stern-Volmer denklemi quenching türünü belirlemek için kullanılmıştır.

Statik quenching, ilaç ile protein arasında kompleks oluşumundan dolayı olur. Dinamik quenching ise ilaç proteine difüze olduğunda meydana gelir. Proteine bağlanma bölge sayısı ve bağlanma sabiti aşağıdaki denklemden bulunmuştur.

$$\log F_0 - F / F = \log K_b + n \log [Q] \quad (2.4)$$

F_0 ; albuminin başlangıçtaki floresans şiddetidir. F ; ilaç bağlandıktan sonra albuminin floresans şiddetidir. n ; albumin üzerindeki bağlanma bölge sayısıdır. K_b ; bağlanma sabitidir. Q ; quencher konsantrasyonudur.

Maltaş ve arkadaşları termodinamik parametreleri Van't Hoff denkleminde bulmuşlardır.

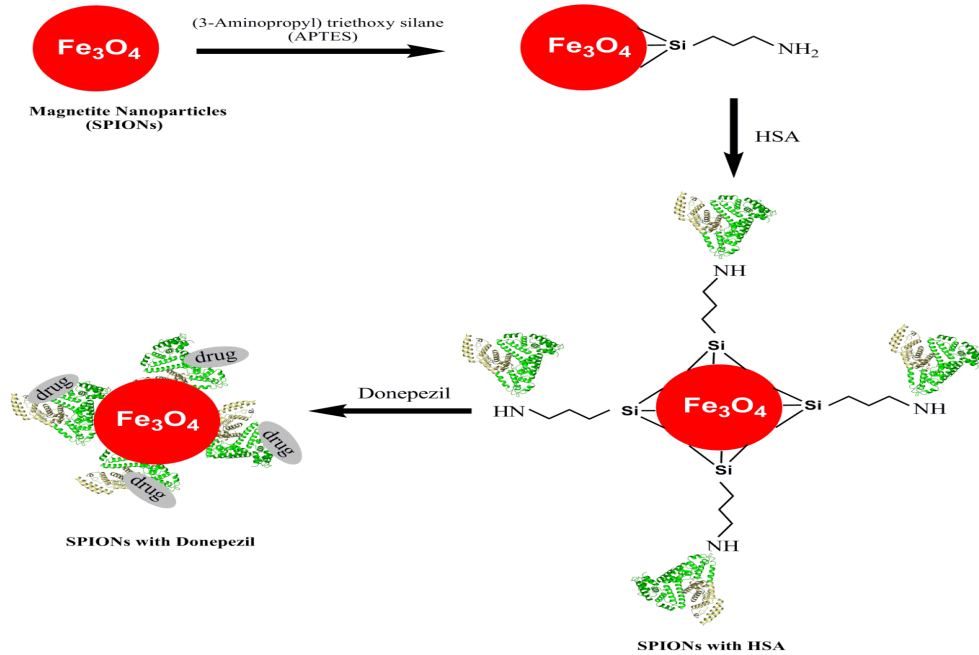
$$\ln K_b = \Delta H / RT + \Delta S / R \quad (2.5)$$

Bu denkleme göre etkileşimlerin mekanizmaları şu şekildedir; $\Delta H > 0$ ve $\Delta S > 0$ ise hidrofobik etkileşimler; $\Delta H < 0$ ve $\Delta S < 0$ ise van der Waals etkileşimi ve hidrojen bağı

$\Delta H < 0$ ve $\Delta S > 0$ ise elektrostatik etkileşimler ile meydana gelmektedir. Buna göre bu çalışmada Maltaş ve arkadaşları $\Delta H > 0$ ve $\Delta S > 0$ bulunduğundan ketokonazol ile HSA arasında hidrofobik etkileşim olduğunu tanımlanmıştır (Maltaş ve ark, 2013).

- Buzoğlu ve arkadaşları amin modifiye magnetik nanopartikül üzerindeki HSA ile Donepezilin etkileşimini incelemişlerdir.

Şekil 2.7. Donepezilin yapısı (Buzoğlu ve ark, 2013).



Şekil 2.8. SPION' a amin-silan modifikasyonu ve bu mekanizmaya HSA, modifiye SPION' a ise donepezil bağlanması (Buzoğlu ve ark, 2013).

Süperparamanyetik Fe oksit nanopartikülleri APTES ile modifiye edilerek yüzeyde amin grupları oluşturulmuş ve bu amin gruplarına HSA bağlanmıştır. İmmobilize olmuş HSA donepezil ile etkileşime sokulmuştur. Bu çalışma ışığında Maltaş ve arkadaşları APTES ile modifiye edilmiş SPION' a karşı HSA grafiğinden nanopartikül konsantrasyonunun artması ile protein bağlanmasının da artacağını tanımlamışlardır. Farklı konsantrasyonlarda donepezilin emisyon spektrumlarından

donepezilin eksitasyon ve emisyon fluoresans şiddetleri 325 nm ve 387 nm olarak tanımlanmıştır. Maltaş ve arkadaşları farklı sıcaklıklarda SPIONs modifiye APTES üzerine donepezilin bağlanmasını ifade eden grafikten albuminin fluoresans şiddetinin donepezilin artan konsantrasyonu ile giderek azaldığını tanımlamışlardır. Bu nedenle ilaç bağlanma miktarı kalibrasyon grafiğinin regrasyon denkleminde bulunmuştur. Bu çalışmadaki etkileşimler $\Delta H < 0$ ve $\Delta S > 0$ olduğundan elektrostatik etkileşimler olarak tanımlanmıştır (Buzoğlu ve ark, 2013).

- Hu ve arkadaşları; BSA ve 1-hekzilkarbamoil-5-fluorourasil arasındaki etkileşim üzerine çalışmışlardır. Anti tümör ilaç, 1-hekzilkarbamoil-5-fluorourasil (Carmofur) ve BSA arasındaki etkileşim fluoresans spektroskopisi, dairesel dikroizm ve UV-Visible absorpsiyon spektrumu içeren spektroskopik metot kullanılarak çalışılmıştır. BSA fluoresansının quenching (söndürme) mekanizması Carmofur ile incelenmiştir. Fluoresans quenching mekanizması tarafından bağlanma bölge sayısı n ve bağlanma sabiti K_b ölçülmüştür.

ΔH , ΔG , ΔS gibi termodinamik parametreler farklı sıcaklıklarda hesaplanmıştır. Sonuçlar bağlanma reaksiyonunda asıl rolü oynayanın hidrofobik kuvvetler ve entropi olduğunu göstermiştir. Foster'ın radyasyon olmayan enerji transferine göre donör (BSA) ile akseptör (Carmofur) arasındaki uzaklık olarak tanımlanan r elde edilmiştir. CD spektrumu carmofur ilavesiyle BSA moleküllerinin yapısal değişimini araştırmak için kullanılmıştır. Sonuçlar BSA moleküllerinin sekonder yapılarının carmofur varlığında değişebildiğini göstermiştir (Hu ve ark, 2005).

- Maltaş ve arkadaşları; epoksi modifiye magnetik nanopartiküllere serum proteinlerinin bağlanma eğilimi üzerine çalışmışlardır. Süperparamagnetik demir oksit nanopartiküllere (SPION), amonyak çözeltisinde bulunan Fe^{+2} ve Fe^{+3} 'ün birlikte çöktürülmesi ile sentezlenmiştir. SPION [3-(2,3-epoksi propoksi) propil] trimetoksi silan ile modifiye edilmiştir. Bu durumda partikül yüzeyinde epoksi gruplarının yüksek yoğunlukta bulunması ile sonuçlanmıştır. Yüzeyi fonksiyonel SPION' a aktif biyo madde bağlanabilir ve biyoloji ve tıp alanında geniş bir uygulama olasılığına sahiptir. Proteinlerin bağlanma oranı epoksi modifiye SPION ile çalışılmıştır. İmmobilizasyon için çeşitli serum proteinleri içeren albümin, α -globulin, hemoglobin, sitokrom c ve miyogloblin ile çalışılmıştır. Epoksi uçlu SPION, 20 mg/ml proteinlerin arasından partikül konsantrasyonu sırasıyla 1,0 ve 0,86 mg olan sitokrom c ve hemoglobin immobilizasyonu için en yüksek bağlanma kabiliyetini göstermiştir. Bağlanma

kabiliyeti, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforez teknikleri kullanılarak gösterilmiştir. Taramalı Elektron Mikroskobu ile protein bağlanmaları incelenmiştir (Maltaş ve ark, 2012).

- Elzoghby ve arkadaşları; albumin bulunduran nanopartiküllerde potansiyel kontrollü olarak ilaç taşıma sistemi salınımı üzerine çalışmışlardır. Albumin ilaç taşıma için çok yönlü bir protein taşıyıcıdır. Aynı zamanda toksik ve immunojen olmadığını, biyouyumlu ve biyolojik olarak bozulabildiğini göstermiştir. Bu yüzden ilaç taşıma için nanopartiküle uyan ideal maddedir. Albumin nanopartiküllerin çeşitli ilaçlarla yüksek bağlanma kapasitelerinden dolayı çok önem kazanmıştır. Ayrıca ciddi yan etkiler olmadan tolere edilebilir. Mevcut inceleme, albumin nanopartiküllerin türler bakımından, formülasyon yönünden, in-vitro ve in-vivo araştırmaların başlıca konularının yanı sıra albumin nanopartiküllerin yüzeyine modifiye edilmiş çeşitli ligandlar kullanılarak özel bölgelere ilaç hedeflendirme onkoloji alanında özel anlayışlar ile etraflıca irdilenerek düzenlenmiştir. Desolvasyon, emülsiyon, termal jelleşme ve son zamanlarda nano sprey kurutma, nab-teknoloji ve albumin nanopartiküllerin üretimleri için araştırılmış kendiliğinden kurutma gibi özel nanoteknolojik yöntemler tartışılmıştır. İlaç taşıma alanında diğer bileşenlerle albuminin nanokompleksleride bu incelemeye dahildir (Elzoghby ve ark, 2012).

- Banerjee ve arkadaşları; Merocyanine 540 ile serum albumin etkileşimi fotofiziksel ve bağlama çalışmalarıyla incelenmiştir. Fotofiziksel çalışmalar, negatif yüklü anti-tümör fotosensitizier, merocyanine 540 (MC 540) ile serum proteinleri, BSA ve HSA'nın bağlanma etkileşimleri absorpsiyon ve kararlı halin yanı sıra zaman-çözümlü floresans teknikleri kullanılarak uygulanmıştır. Temel durum kompleks oluşumu, SA'ların izobestik nokta üretme yapısı MC 540' in absorpsiyon spektrumunun ayrıntılı çalışmalarında doğrulanmıştır. Proteinler ve MC 540 arasındaki bağlanma; fluorescent monomer ve onun fluorescent olmayan dimeri arasındaki var olan dengeyi bozar, maksimumun kırmızıya kayması ile birlikte MC 540' in yoğunluğunun ve floresans anizotropisinin kayda değer şekilde artmasına neden olur. MC 540' in ve SA' in bağlayıcı sitokiyometresi 1.0' dan fazladır. Bu da iki tür kompleks varlığını gösterir. Farklı konsantrasyonlardaki proteinlerin eklenmesi ile 1:1 ve 2:1 oranı oluşmuştur. Kararlı hal ve zaman ölçümlü floresans sonuçlarının ikisi de proteinin esnek yapısından dolayı HSA' e kıyasla BSA ile daha büyük miktarda bağlandığı zaman 2:1 kompleksi içindeki MC 540 moleküllerinin sulu ortama maruz kaldığını gösterdi. Van't Hoff grafiği kullanılarak termodinamik analizleri, MC 540 ayrı ayrı SA arasındaki bağı

entropi odaklı olay gösterir. Olası hidrofobik bağlanma bölgeleri; proteinlerin denatürasyonu, mikropolarite ölçümleri ve Forster rezonans enerji transferi ve moleküler yerleştirme çalışmaları tarafından tayin edilir. MC 540' ın varlığında BSA' nin dairesel dikroizm spektrumunun değişimi proteinin sekonder yapı değişikliğini gösterir. Uyarılmış CD, BSA' nin rijit yapısından dolayı HSA' e kıyasla daha etkin MC 540 kiralitesi oluşturduğunu gösterir (Banerjee ve ark, 2012).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışmada epoksi modifiye magnetik nanopartikül sentezlenmiştir. Farklı miktarlardaki epoksi modifiye magnetik nanopartiküller Albumin, Hemoglobin ve Globulin proteinleriyle daha sonra da İrinotekan ilaç etken maddesi ile etkileştirilmiştir.

3.1. Kullanılan Malzemeler

Demirklorürhekzahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O} > 99\%$), demirklorürtetrahidrat ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} > 99\%$), [3-(2,3-epoksi propoksi) propil] trimetoksi silan, sodyum hidroksit (25 % w/w) ve etanol (>99,2 %) Merck firmasından alınmıştır. HSA, Hem, Glb Sigma firmasından alınmıştır. İrinotekan hidroklorür trihidrat (Pfizer) Konya Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesinden alınmıştır. Millipore Milli-Q Plus su arıtma sistemleri kullanılarak tüm çözeltiler deiyonize su ile hazırlanmıştır. Tris tampon çözeltisi (Trizma baze, 99,9 % Sigma Aldrich) su ile pH: 7.4 olacak şekilde hazırlanmıştır.

3.1.1. Kullanılan cihazlar

Fourier Transform Infrared Spektrometresi (FT-IR), Perkin Elmer marka Spectrum 100 Universal ATR Sampling Accessory kullanılmıştır.

SEM görüntüleri Inca Energy 350n X-Max Spektrometresine sahip ZEISS LS-10 alan emisyon Taramalı Elektron Mikroskobu kullanılarak elde edilmiştir. Numuneler Q150R (Quorum Technologies) kullanılarak Au (% 60) ve Pd (% 40) alaşımları ile kaplanmıştır.

Spektrofluometre olarak Perkin Elmer LS55 Luminescence Spectrometer kullanılmıştır.

Termogravimetri Analiz 20 ml min^{-1} gaz akış oranı ile 10°C min^{-1} ısınma oranında argon atmosferi altında 25-900 °C sıcaklık aralığında Seteram SETSYS Termal Analiz Cihazı ile yapılmıştır.

Rotator-Mixer olarak Biosa Multi RS-60 programmable rotator-mixer kullanılmıştır.

3.2. Nanopartiküllerin Sentezi

3.2.1. Süperparamagnetik nanopartikül sentezi

Bu çalışmada magnetik nanopartiküllerin sentezi için daha önce tanımlanmış bir metot uygulanmıştır. Kısaca, 2 ml 1 M FeCl₃ ve 0,5 ml 2 M FeCl₂ sulu çözeltileri (molar olarak 2:1 oranında) birlikte kuvvetli bir şekilde karıştırılır. Daha sonra 25 ml 1 M sulu amonyak çözeltisi karışıma hızlı bir şekilde eklenir ve hemen koyu magnetik çökeltinin oluştuğu gözlenir. 30 dakikalık bir karıştırmanın ardından oluşan nanopartiküller kuvvetli bir mıknatıs ile toplanır ve ultra saf su ile birkaç defa yıkanır. Yıkama suyunun pH'ı yaklaşık 7 civarı olduğunda nanopartiküller 70 °C' de etüvde kurumaya bırakılır.

3.2.2. Magnetik nanopartikül sentezi

Hazırlanmış magnetik nanopartiküllerin yüzeyinin epoksi grupları ile fonksiyonlandırılması için epoksi uç gruplu bir silan bileşiği kullanılmıştır. Bunun için kurutulmuş nanopartiküller ilk olarak kuru toluen çözücüsü içerisinde ultrasonik olarak 15 dakika muamele edilmiştir. Ardından bir balon içerisine alınan çözelti karıştırmaya bırakılmıştır. Bu deney için belirlenen mol oranı magnetik nanopartikül: silan (1:4) şeklindedir. [3-(2,3-epoksi propoksi) propil] trimetoksi silan maddesinden belirlenen miktar damla damla çözeltilere ilave edilir ve 80 °C' de 6 saat azot ortamında karıştırılır. Kuvvetli bir mıknatıs yardımıyla toplanan partiküller kuru toluen ve etanol ile yıkandıktan sonra 70 °C' de etüvde kurumaya bırakılır.

3.3. Epoksi Modifiye Nanopartiküle Protein Bağlanması

Epoksi modifiye magnetik nanopartiküller 5, 10, 15, 20 ve 25' er mg üç seri olacak şekilde tartılmıştır. Tartılan epoksi modifiye magnetik nanopartiküller pH: 7.4 olan 20 mM' lık Tris tamponu ile üç kez yıkanmıştır. İnsan serum albümin (HSA), hemoglobin (Hem) ve globulin (Glb)'den ayrı ayrı 10 mg alınıp 1 ml tris tamponu içerisinde çözülerek, proteinlerin 10 mg/ml çözeltileri hazırlanmıştır. Üç ayrı tüp alınarak bu tüplerin her birine sırasıyla 10 mg/ml Hem çözeltisinden 0,6 ml, 10 mg/ml HSA çözeltisinden 0,6 ml ve 10 mg/ml Glb çözeltisinden 0,6 ml tüplere konulmuştur ve bu tüplere 5,4 ml tris ilave edilmiştir. Bu şekilde protein çözeltilerinin konsantrasyonu 1 mg/ml seyreltilmiştir. Hazırlanan bu karışımlardan birinci seriye 1 ml Hem, ikinci

seriye 1 ml HSA, üçüncü seriye 1 ml Glb ilave edilmiştir. Protein ilave edilen epoksi modifiye nanopartiküller 2 saat rotator-mixer ile karıştırılmış ve +7 °C' de santrifüjlenmiştir. Yüzeiden alınan çözeltilinin (süpernatant) fluoresans şiddeti sırasıyla 280 nm ve 342 nm eksitasyon ve emisyon dalga boylarında ölçülerek, yüzeye bağlanan protein miktarı HSA, Hem, Glb konsantrasyonuna karşı fluoresans şiddetine ilişkin kalibrasyon grafiğinin denkleminde hesaplanmıştır.

3.3.1. Epoksi modifiye nanopartiküllere bağlanmış proteinlerin (HSA, Hem, Glb) ilaç (irinotekan) ile etkileşimi

Üzerlerine HSA, Hem, Glb bağlanan epoksi modifiye magnetik nanopartiküller, yüzeyde bağlanmadan kalan proteinleri uzaklaştırmak için tris tamponu ile yıkanmıştır. Yıkanan epoksi modifiye magnetik nanopartiküllere immobilize olmuş proteinler, tris tampon karışımındaki ilaç etken maddesi olan “İrinotekan” ile etkileştirilmiştir. Bu işlem için İrinotekan' ın 2 mg/100 µl çözeltisinden ilave edilmiştir. İrinotekan ilavesinden sonra 2 saat boyunca rotator-mixer ile karıştırılmıştır. İrinotekan' ın sırasıyla 299 nm ve 448 nm' de eksitasyon ve emisyon dalga boylarında fluoresans şiddeti ölçülerek kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Çizilen kalibrasyon eğrisinin denkleminde protein ile kaplanmış epoksi modifiye magnetik nanopartikül yüzeyine bağlanan irinotekan miktarı hesaplanmıştır.

3.4. TGA Çalışması

Termogravimetrik analiz yöntemi ile epoksi modifiye SPION-Protein (HSA, Hem, Glb) ve epoksi modifiye SPION-Protein (HSA, Hem, Glb)-İlaç (İrinotekan)' ın termal kararlılığı değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sıcaklığa karşı % TG grafiği çizilerek yapılmıştır. Hem-GPTS-SPION, Ir-Hem-GPTS-SPION, Glb-GPTS-SPION, Ir-Glb-GPTS-SPION, HSA-GPTS-SPION ve Ir-HSA-GPTS-SPION' un termal ayrışması termodinamik ve kinetik parametreler Horowitz-Metzger denklemi kullanılarak TG eğrilerinin analizi ile tayin edilmiştir.

Ayrışma prosesinin oranı sıcaklık ve dönüşümün iki ayrı fonksiyon ürünü olarak açıklanabilir.

$$\frac{d\alpha}{dt} = k(T)f(\alpha) \quad (3.1)$$

α ; t zamanda ayrıştırılmış fraksiyon, $k(T)$; sıcaklığa bağlı fraksiyon, $f(\alpha)$; ayrıştırma mekanizmasına bağlı dönüşüm fonksiyonudur. Hız sabiti k Arrhenius denklemi ile ifade edilir.

$$k = A \exp\left(-\frac{E^*}{RT}\right) \quad (3.2)$$

E^* ; aktivasyon enerjisi (kJ mol^{-1}), A ; preeksponansiyel faktör, R ; gaz sabiti ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$) ifade etmektedir. Denklem 3.1, denklem 3.2' de yerine yazılırsa;

$$\frac{d\alpha}{dT} = \frac{A}{\varphi} \exp\left(-\frac{E^*}{RT}\right) f(\alpha) \quad (3.3)$$

Yukarıdaki denklem elde edilir.

φ ; ısınma oranı dT/dt' dir. Yaklaşım ve entegrasyon üzerine bu denklem düzenlenirse aşağıdaki denklem elde edilir.

$$\ln g(\alpha) = -\frac{E^*}{RT} + \ln\left(\frac{AR}{\varphi E^*}\right) \quad (3.4)$$

$g(\alpha)$; reaksiyon mekanizmasına bağlı α 'nın fonksiyonudur.

Bozunma kinetiklerinin değerlendirilmesi için Horowitz - Metzger denklemi yaklaşım metotlarının bir tanımlayıcısıdır. Horowitz - Metzger denkleminde göre $n=1$ için kinetik proses,

$$\lg\left[\lg\left(\frac{w_\alpha}{w_\gamma}\right)\right] = \frac{E^* \theta}{2.303RT_s^2} - \lg 2.303 \quad (3.5)$$

$\theta = T - T_s$, $w_\gamma = w_\alpha - w$, w_α : bozunmanın tamamlanmasıyla oluşan kütle kaybı, w : t zamanına kadar kütle kaybı, T : herhangi bir anda Kelvin cinsinden sıcaklık, T_s : DTG tepe sıcaklığıdır. $\lg[\lg(w_\alpha/w_\gamma)]$ karşı θ grafiğinin eğimi $E^*/2.303RT_s^2$ ' dir. Preeksponansiyel faktör (A) denklem 3.6' dan hesaplanır.

$$\frac{E^*}{RT_s^2} = \frac{A}{\left[\varphi \exp\left(-\frac{E^*}{RT_s}\right) \right]} \quad (3.6)$$

Diğer termodinamik parametreler aşağıdaki denklemlerden hesaplanır.

$$\Delta S^* = R \ln\left(\frac{Ah}{k_B T_s}\right) \quad (3.7)$$

$$\Delta H^* = E^* - RT_s \quad (3.8)$$

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T_s \Delta S^* \quad (3.9)$$

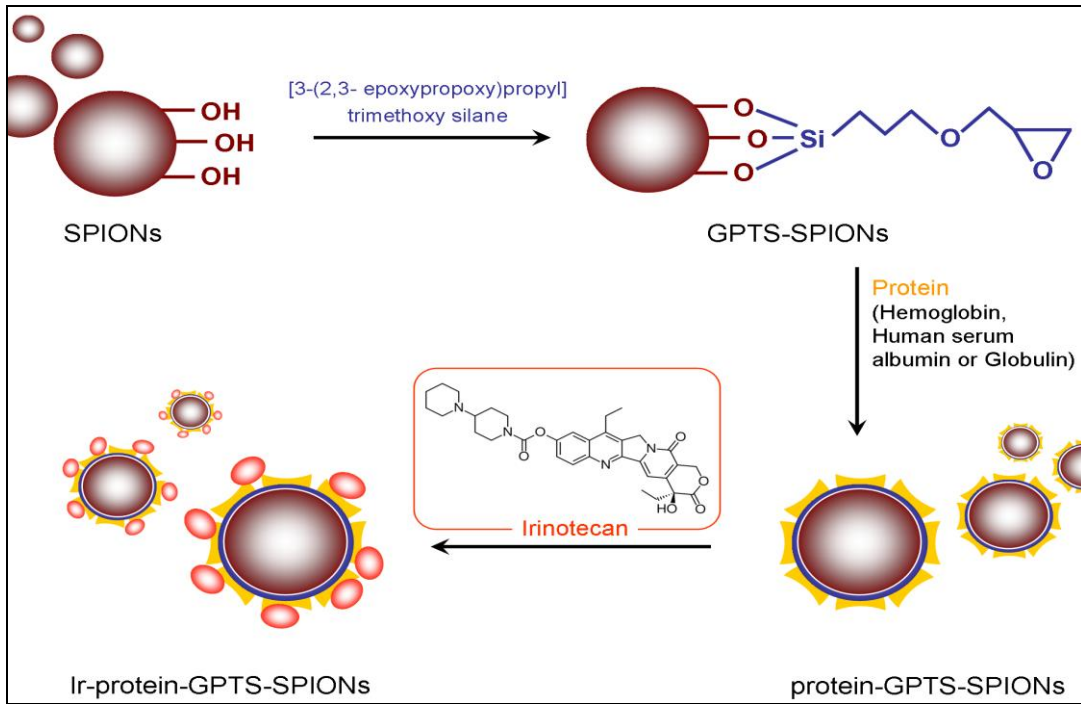
ΔS^* ; entropi aktivasyonunu ($\text{J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$), k_B ; Boltzman sabitini, h ; Planck sabitini, ΔH^* ; aktifleşme entalpisini (kJ mol^{-1}), ΔG^* ; Gibbs serbest enerjisini (kJ mol^{-1}) göstermektedir.

3.5. Karakterizasyonlar

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Infrared Spektroskopisi (IR) ile karakterizasyonlar yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve TARTIŞMA

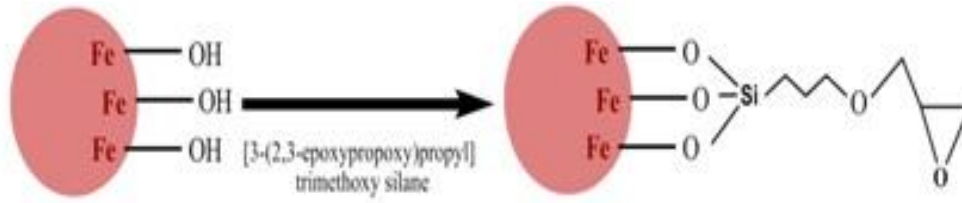
Bu çalışmada magnetik özellik gösteren demir nanopartiküllerin (Fe_3O_4) yüzeyi trimetoksi silan ile fonksiyonlaştırılarak yüzeyde epoksi grupları oluşturulmuştur. Böylece nanopartikülün protein bağlama kapasitesi arttırılmıştır. Nanopartiküller tris tamponu ile yıkanıp dengeye getirildikten sonra mıknatıs ile ayrılan katı yüzeye HSA, Hem ve Glb proteinleri ilave edilerek yüzeye bağlanmıştır. Yüzeye bağlanan proteinlerin miktarı floresans spektroskopisiyle sırasıyla 280 nm ve 342 nm eksitasyon ve emisyon dalga boylarında ölçülmüştür. HSA, Hem ve Glb bağlanmış nanopartiküllere, proteinlerin bağlanmasına benzer şekilde farklı konsantrasyonlarda ki irinotekan çözeltileri ilave edilmiştir ve 2 saat karıştırma işleminden sonra ilk ve son çözelti konsantrasyonları arasındaki farktan spektrofotometrik olarak bağlanma kapasiteleri bulunmuştur.



Şekil 4.1. Demir nanopartiküllerin yüzey modifikasyonu ile protein ve ilaçların yüzeye bağlanma mekanizmaları.

4.1. Nanopartikül Sentezi

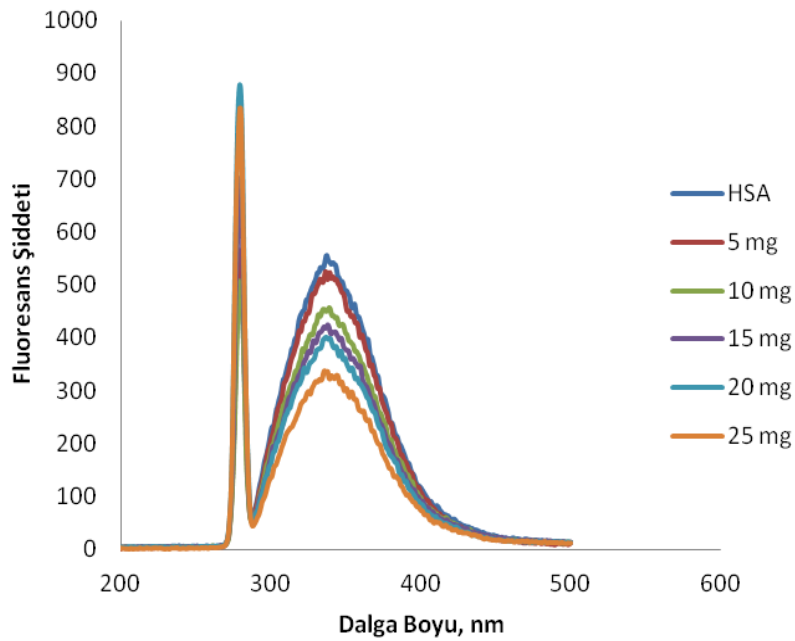
Bölüm 3.2' de anlatılan metottaki gibi epoksi ile modifiye edilen magnetik nanopartiküller sentezlenmiştir.



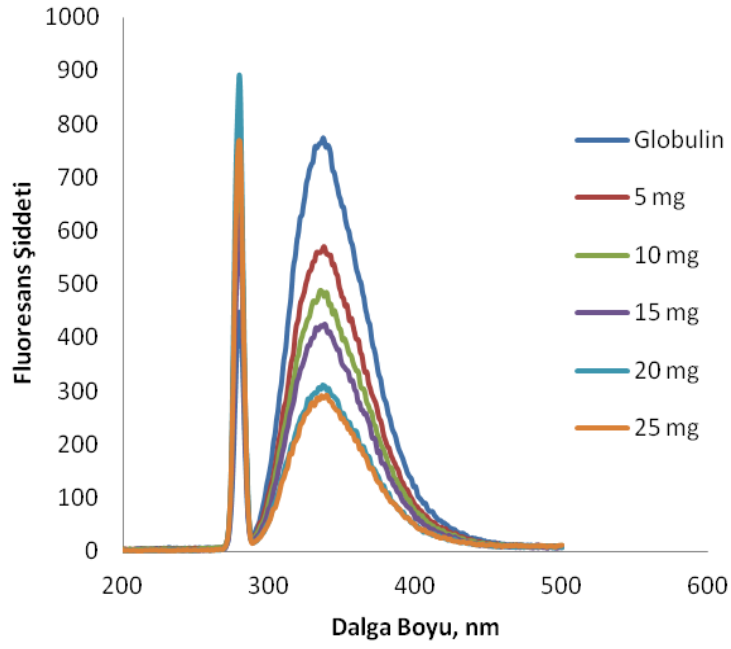
Şekil 4.2. Demir nanopartikül yüzeyinin fonksiyonlaştırılma mekanizması (Maltaş ve ark, 3013).

4.2. HSA, Hem, G1b' nin Bağlanma Sonuçları ve Karakterizasyon

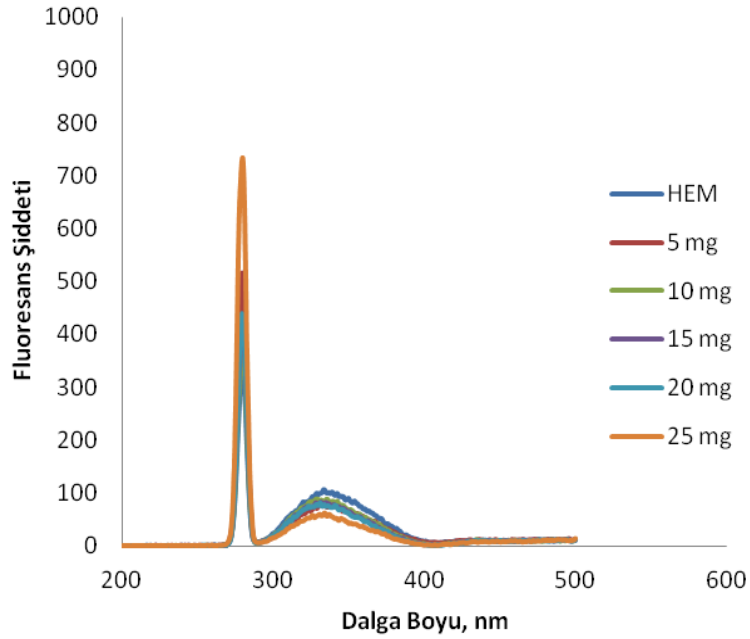
Bölüm 3.3' de verilen deneysel işlemler yapıldıktan sonra analizler spektrofotometre cihazı kullanılarak yapılmıştır. Albumin, globulin ve hemoglobinin 280 nm eksitasyon ve 342 nm emisyon dalga boylarındaki fluoresans spektrumları sırasıyla Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5' de verilmiştir.



Şekil 4.3. HSA proteinin 280 nm eksitasyon ve 342 nm emisyon dalga boylarındaki fluoresans spektrumları.

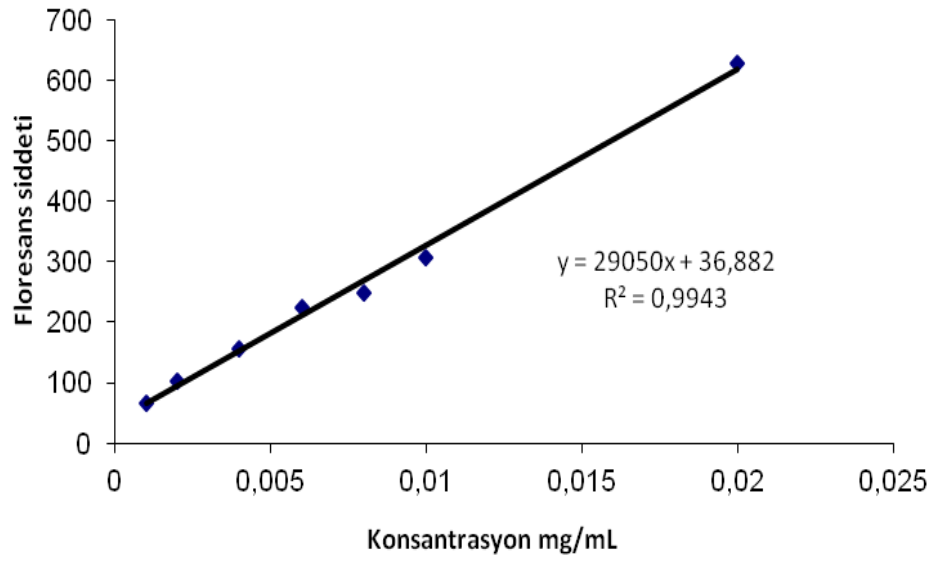


Şekil 4.4. Globulin proteinin 280 nm eksitasyon ve 342 nm emisyon dalga boylarındaki fluoresans spektrumları.

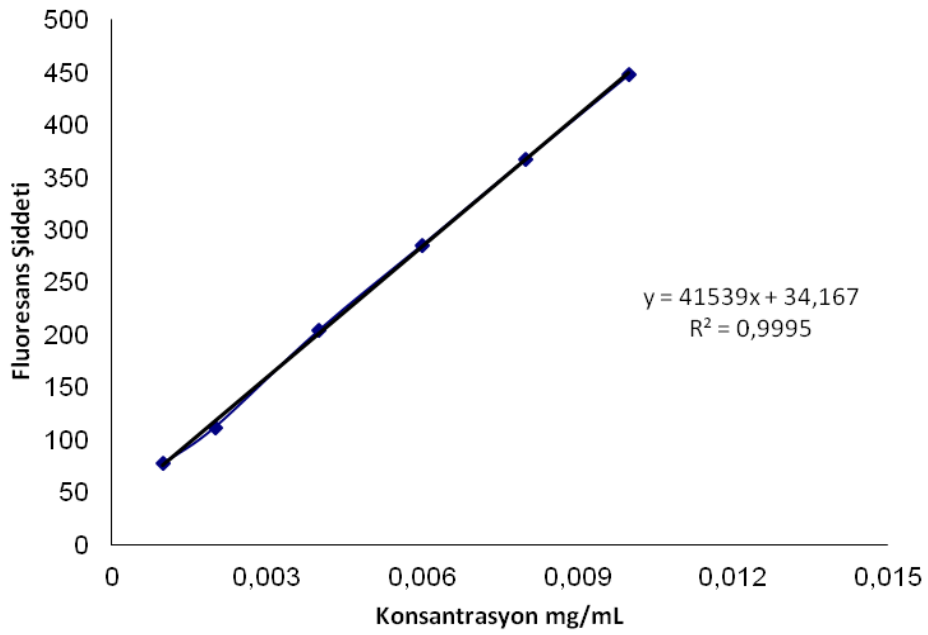


Şekil 4.5. Hemoglobin proteinin 280 nm eksitasyon ve 342 nm emisyon dalga boylarındaki fluoresans spektrumları.

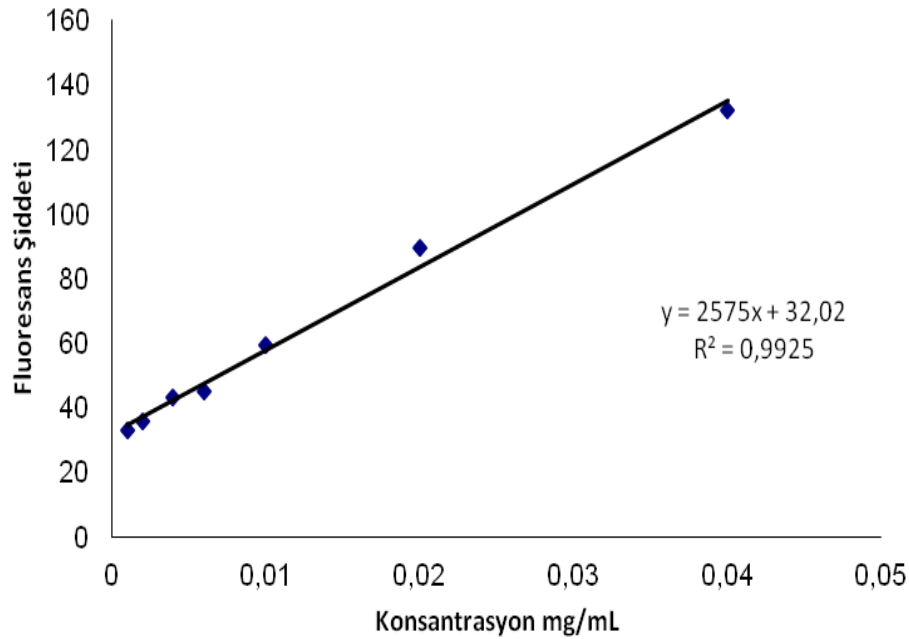
Her protein için ayrı ayrı kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8' de sırasıyla albumin, globulin ve hemoglobine ait kalibrasyon grafikleri görülmektedir. Çizilen bu kalibrasyon grafiklerinin denkleminde epoksi modifiye nanopartiküle ne kadar protein bağlanacağı hesaplanmaktadır.



Şekil 4.6. HSA proteinine ait kalibrasyon grafiği.



Şekil 4.7. Globulin proteinine ait kalibrasyon grafiği.



Şekil 4.8. Hemoglobin proteinine ait kalibrasyon grafiği.

4.3. Epoksi Modifiye Nanopartiküle Bağlanan ve Bağlanmayan Protein Miktarının Hesaplanması

Farklı miktarlardaki epoksi modifiye nanopartikül yüzeyine bağlanan ve bağlanmayan albumin, hemoglobin ve globulin miktarları; bağlanmadan önce ve bağlanmadan sonra protein çözeltilerinin 280 nm eksitasyon ve 342 nm emisyon dalga boyunda vermiş oldukları floresans şiddeti ölçülerek ve kalibrasyon eğrisinin denklemi kullanılarak hesaplanmıştır.

Bağlanma miktarı = Başlangıç miktarı – Bağlanmadan kalan miktar

Spektrofluorometrede alınan sonuçlara göre bağlanan ve bağlanmayan albumin, hemoglobin ve globulin miktarları sırasıyla Çizelge 4.1, Çizelge, 4.2 ve Çizelge 4,3' de gösterilmiştir. Buna göre 25 mg epoksi modifiye nanopartikül yüzeyine bağlanan albumin, hemoglobin ve globulin miktarı sırasıyla 0,0498 mg, 0,0262 mg ve 0,0494 mg' dır.

Çizelge 4.1. Farklı miktarlardaki epoksi modifiye SPION' a (mg) bağlanan HSA miktarı (mg/ml).

SPION-Epoksi miktarı, (mg)	5	10	15	20	25
Bağlanan HSA miktarı, (mg)	7,9	34,1	42,4	44,0	49,8

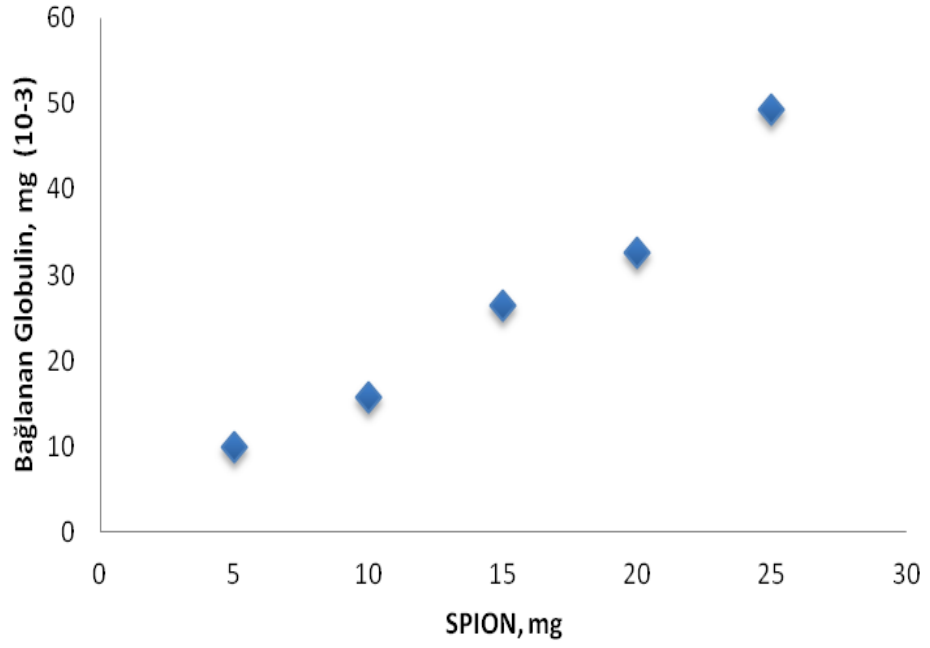
Çizelge 4.2. Farklı miktarlardaki epoksi modifiye SPION' a (mg) bağlanan Hem miktarı (mg/ml).

SPION-Epoksi miktarı, (mg)	5	10	15	20	25
Bağlanan Hem miktarı, (mg)	15,6	17,1	20,3	21,2	26,2

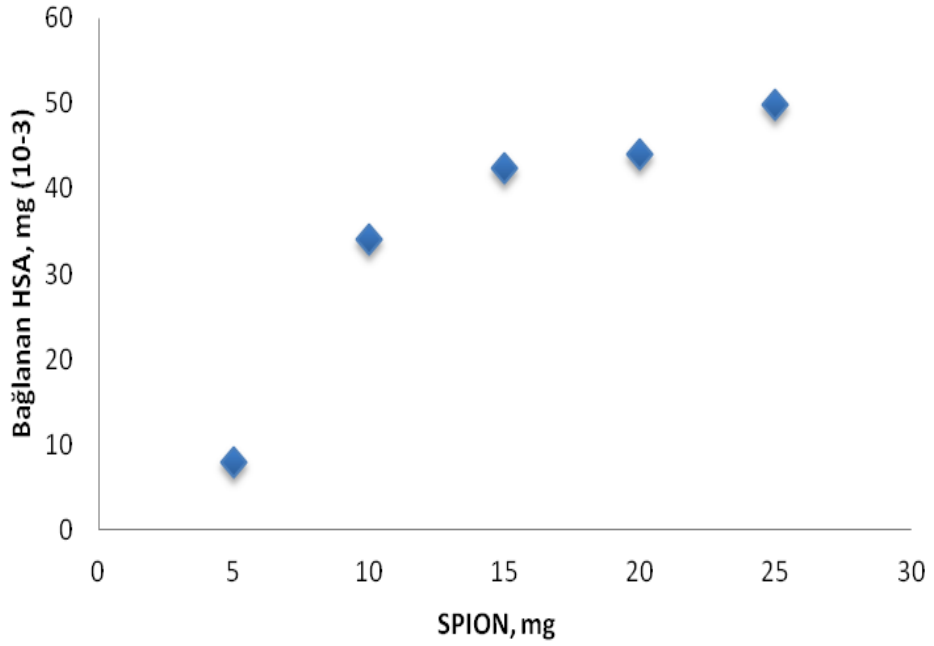
Çizelge 4.3. Farklı miktarlardaki epoksi modifiye SPION' a (mg) bağlanan Glb miktarı (mg/ml).

SPION-Epoksi miktarı, (mg)	5	10	15	20	25
Bağlanan Glb miktarı, (mg)	9,9	15,8	26,4	32,6	49,4

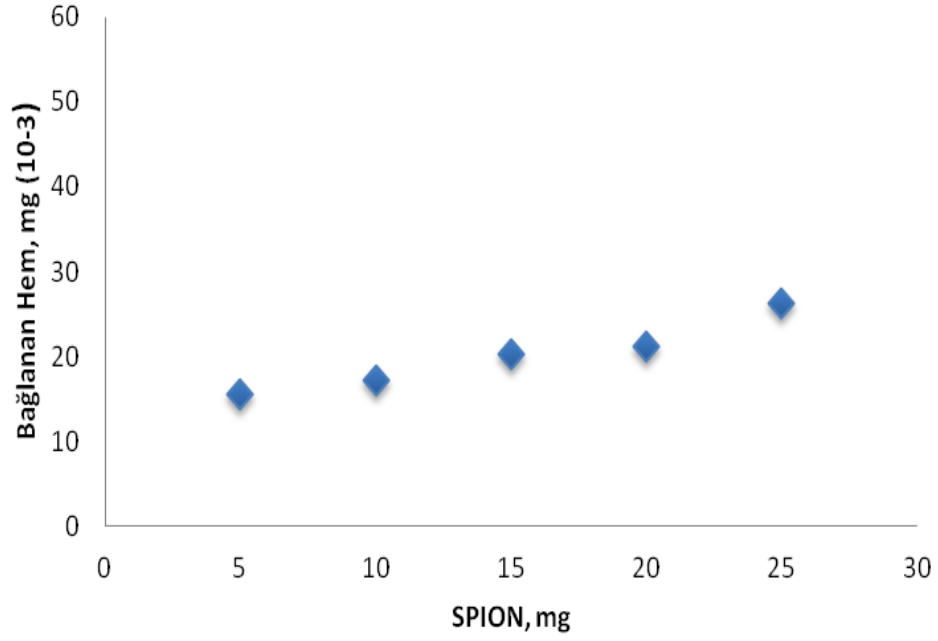
Farklı miktarda epoksi modifiye nanopartiküllere bağlanan protein miktarları (mg) epoksi modifiye nanopartikül miktarına karşı grafiğe geçirilmiştir. Şekil 4.9, Şekil 4.10 ve Şekil 4.11 sırasıyla bağlanan globulin, albumin ve hemoglobinin farklı miktardaki nanopartiküle karşı grafiğini göstermektedir.



Şekil 4.9. Farklı miktardaki epoksi modifiye magnetik nanopartiküllere bağlanan globulin miktarı.



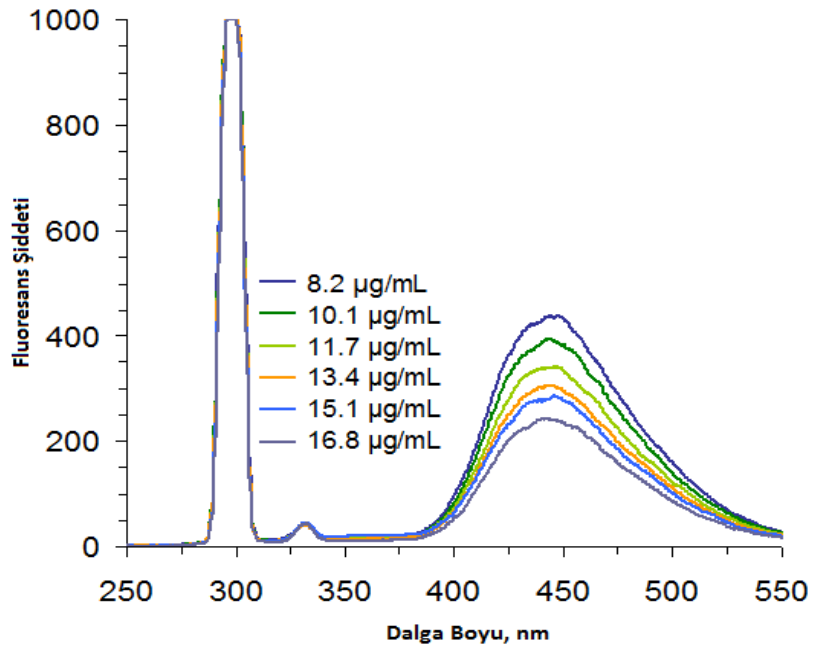
Şekil 4.10. Farklı miktarlardaki epoksi modifiye magnetik nanopartiküllere bağlanan HSA miktarı.



Şekil 4.11. Farklı miktarlardaki epoksi modifiye magnetik nanopartiküllere bağlanan hemoglobin miktarı.

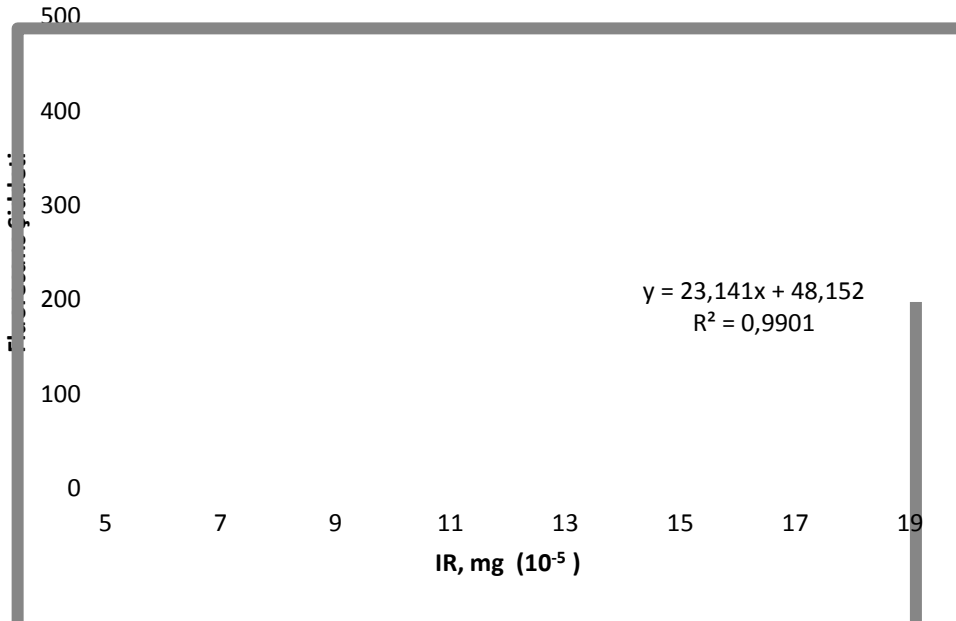
4.4. Epoksi Modifiye Nanopartiküle Bağlanmış Proteinlere (HSA, Hem, G1b) İrinotekan' ın Bağlanması

İrinotekan' ın sırasıyla 299 nm ve 448 nm' de eksitasyon ve emisyon dalga boyundaki spektrumu Şekil 4.12' de verilmiştir.



Şekil 4.12. İrinotekan' ın 299 nm eksitasyon ve 448 nm emisyon dalga boylarındaki floresans spektrumları.

İrinotekan' ın farklı konsantrasyonlardaki fluoresans şiddeti spektrofotometre ile ölçülerek Şekil 4.13' de ki kalibrasyon grafiği çizilmiştir.



Şekil 4.13 İrinotekan'ın kalibrasyon grafiği.

Çizilen kalibrasyon grafiğinden bağlanmadan kalan “İrinotekan” miktarı süpernatant üzerinde saptanmıştır. Başlangıçtaki “İrinotekan” miktarı ile bağlanmadan kalan “İrinotekan” miktarı arasındaki farktan bağlanan “İrinotekan” miktarı hesaplanmıştır. Epoksi modifiye SPION HSA, Glb ve Hem' e bağlanan ve bağlanmayan “İrinotekan” miktarı sırasıyla Çizelge 4.4, Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6' da gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. Farklı miktarlardaki epoksi modifiye SPION-HSA' e (mg) bağlanan İrinotekan miktarı (mg/ml).

SPION-Epoksi-HSA miktarı (mg)	5	10	15	20	25
Bağlanan irinotekan miktarı (mg)	2,3852	7,7869	16,2458	24,0472	37,2852

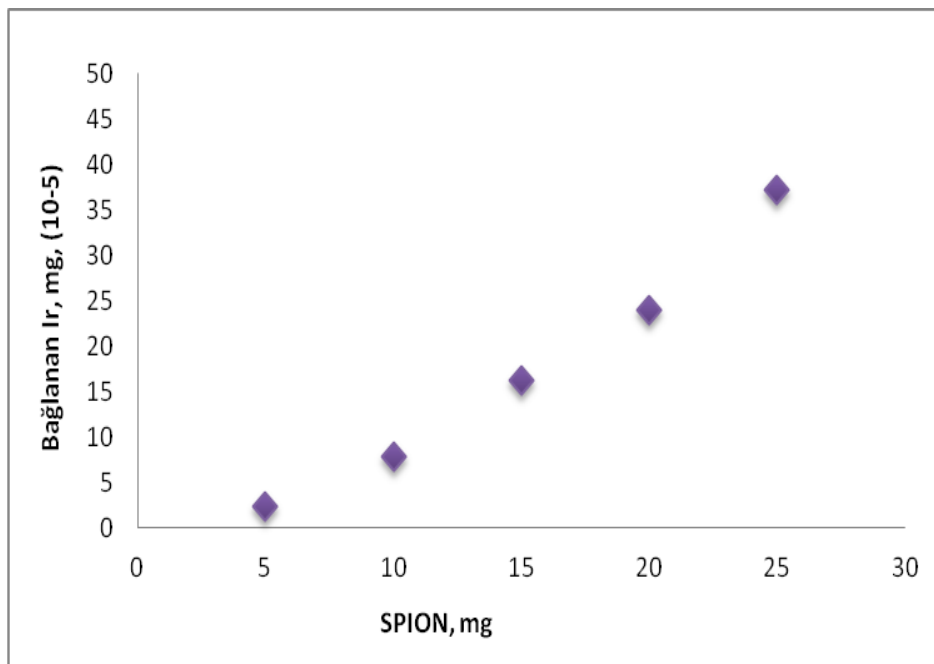
Çizelge 4.5. Farklı miktarlardaki epoksi modifiye SPION-Glb' e (mg) bağlanan İrinotekan miktarı (mg/ml).

SPION-Epoksi-Glb miktarı (mg)	5	10	15	20	25
Bağlanan irinotekan miktarı (mg)	12,4791	35,4269	37,7654	40,8689	43,1693

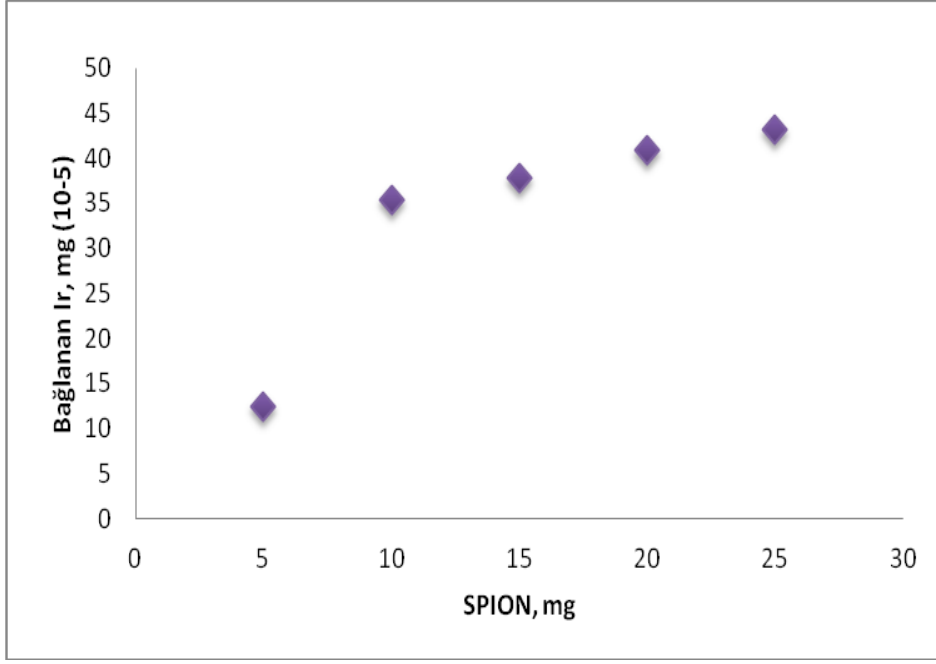
Çizelge 4.6. Farklı miktarlardaki epoksi modifiye SPION-Hem' e (mg) bağlanan İrinotekan miktarı (mg/ml).

SPION-Epoksi-Hem miktarı (mg)	5	10	15	20	25
Bağlanan irinotekan miktarı (mg)	15,8358	26,8474	29,4025	32,5041	40,8356

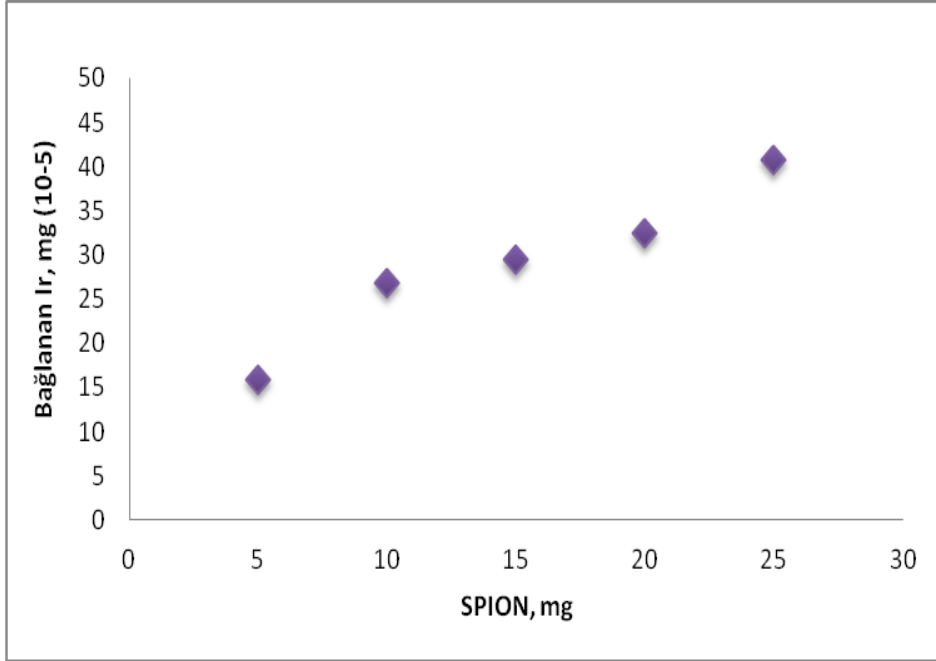
Aşağıdaki grafiklerde sırasıyla Şekil 4.14 SPION' a karşı bağlanan HSA yüzeyindeki irinotekan miktarı, Şekil 4.15 SPION' a karşı bağlanan Glb yüzeyindeki irinotekan miktarı ve Şekil 4.16 SPION' a karşı bağlanan Hem yüzeyindeki irinotekan miktarı gösterilmektedir.



Şekil 4.14. Farklı miktardaki SPION' a bağlanan HSA yüzeyindeki irinotekan miktarları.

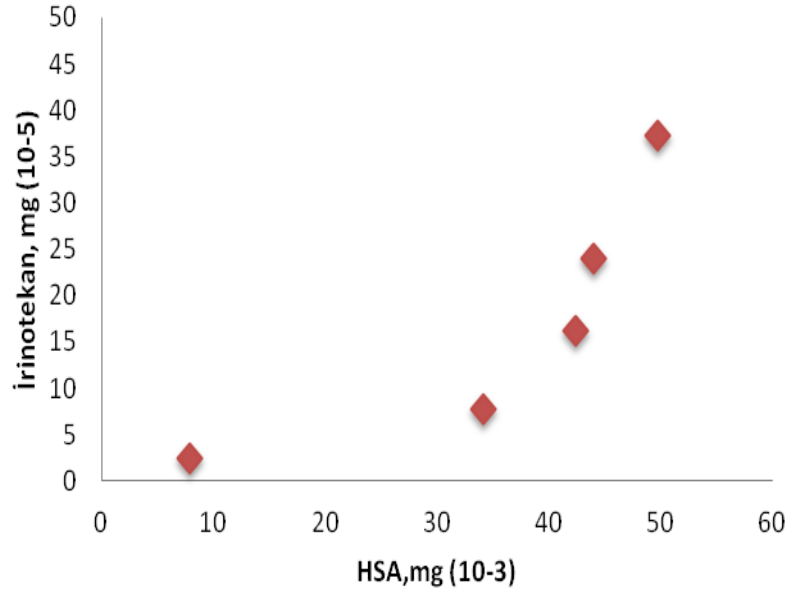


Şekil 4.15. Farklı miktardaki SPION' a bağlanan Glb yüzeyindeki irinotekan miktarları.

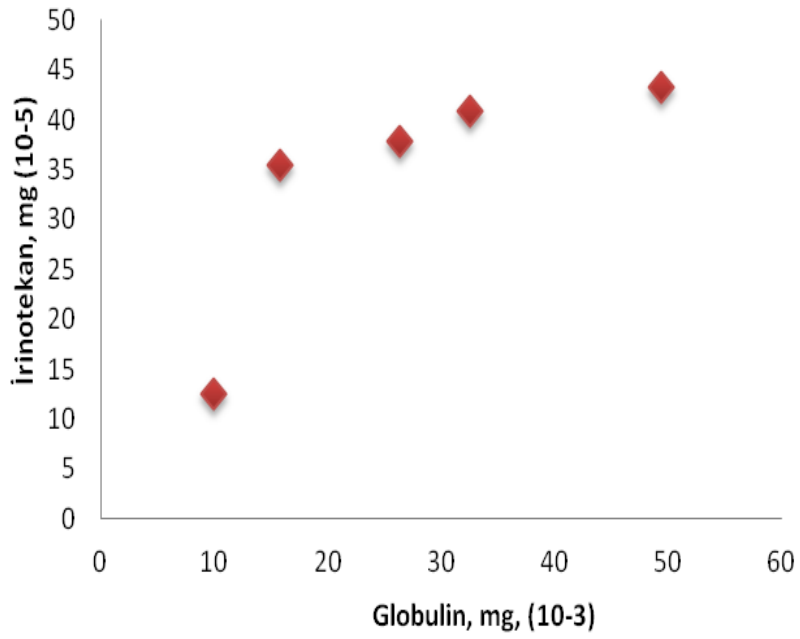


Şekil 4.16. Farklı miktarda SPION' a bağlanan Hem yüzeyindeki irinotekan miktarları.

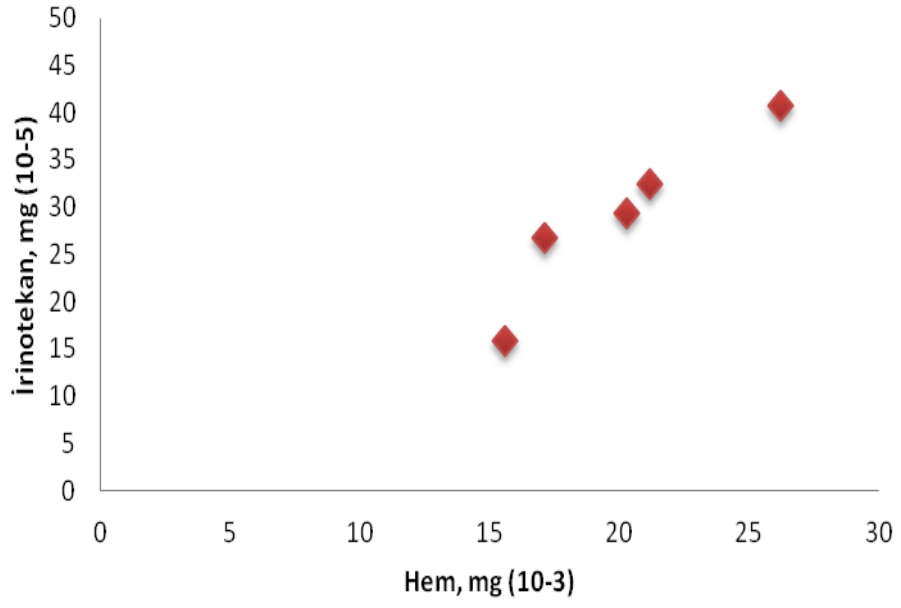
Şekil 4.17' de HSA' e bağlanan irinotekan miktarı, Şekil 4.18' de Glb' e bağlanan irinotekan miktarı ve Şekil 4.19' da Hem' e bağlanan irinotekan miktarı gösterilmektedir.



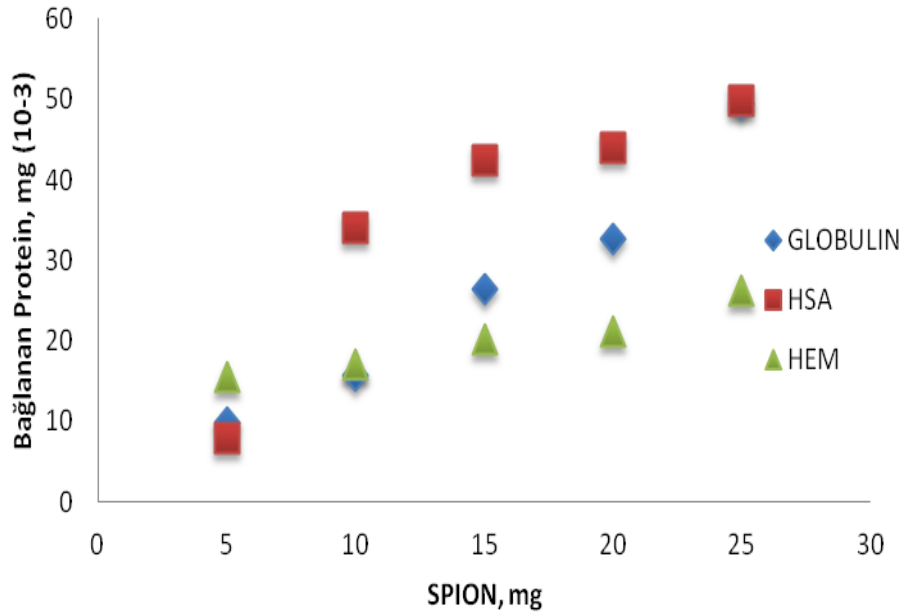
Şekil 4.17. HSA' e bağlanan irinotekan miktarı.



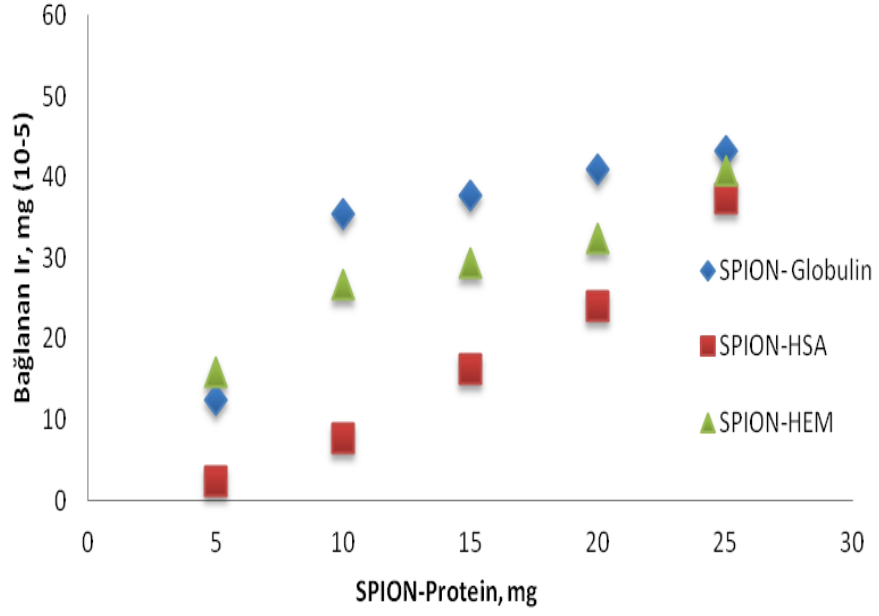
Şekil 4.18. Glb' e bağlanan irinotekan miktarı.



Şekil 4.19. Hem' e bağlanan irinotekan miktarı.



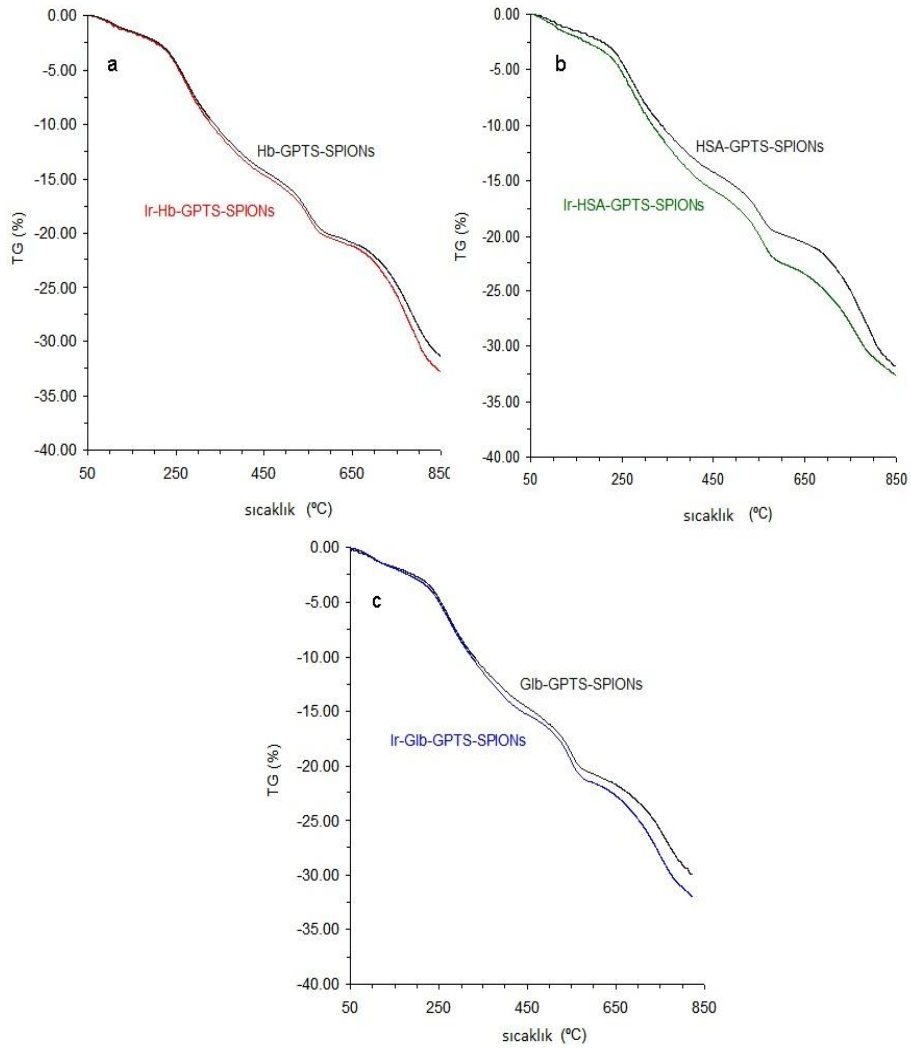
Şekil 4.20. Farklı miktardaki epoksi modifiye magnetik nanopartiküllere bağlanan proteinler.



Şekil 4.21. Farklı miktarlarda SPION-Proteinlere bağlanan irinotekan miktarı.

4.5. TGA

Hem-GPTS-SPION, HSA-GPTS-SPION, Gİb-GPTS-SPION, IR-Gİb-GPTS-SPION, IR-Hem-GPTS-SPION, IR-HSA-GPTS-SPION termal karalılıkları termal gravimetrik metot ile değerlendirilmiştir. TG eğrileri Şekil 4.22' de gösterilmiştir.



Şekil 4.22. Ir-Hem-GPTS-SPION ve Hem-GPTS-SPION TG eğrileri (a), Glib-GPTS-SPION ve Ir-Glib-GPTS-SPION TG eğrileri (b), HSA-GPTS-SPION ve Ir-HSA-GPTS-SPION TG eğrileri (c).

Tüm materyaller de ilk ağırlık kaybı 50 °C' den 120 °C' e sıcaklık artışında gözlenir. Bu ağırlık kaybının nedeni; yüzeydeki hidroksi gruplarından dolayı fiziksel olarak adsorbe edilen suyun uzaklaşmasıdır. 200-800 °C sıcaklık aralığında Hem-GPTS-SPION, Glib-GPTS-SPION ve HSA-GPTS-SPION sırasıyla % 26,45, % 26,47 ve % 26,97 ağırlık kaybı gözlenir. Bu ağırlık azalışına serum protein moleküllerinin immobilizasyonu ve epoksi gruplarının termal ayrışması neden olur.

Ir-Glib-GPTS-SPION, Ir-Hem-GPTS-SPION ve Ir-HSA-GPTS-SPION için aynı sıcaklık aralığında ki ağırlık kaybı sırasıyla % 27,78, % 28,23 ve % 27,92' dir. Bundan sonra daha yüksek sıcaklıklarda sadece demir oksit varlığını işaret eden bir ağırlık değişikliği yoktur. Ir' nin bulunduğu ve Ir' nin bulunmadığı materyaller arasında ağırlık kaybı Hb için % 1,33, Glib için % 1,76 ve HSA için % 0,95 olarak bulunmaktadır. Bu

durum serum proteinleriyle etkilemiş Ir moleküllerinin termal ayrışmasına bağlanmıştır.

Bu sonuçlar modifiye SPION üzerine serum proteinleri ve ır arasındaki etkileşimi doğrulamaktadır.

Hem-GPTS-SPION, Ir-Hem-GPTS-SPION, Gİb-GPTS-SPION, Ir-Gİb-GPTS-SPION, HSA-GPTS-SPION, Ir-HSA-GPTS-SPION' nın termal ayrışmasının termodinamik ve kinetik parametreleri Horowitz denklemi kullanılarak hesaplanmıştır. Horowitz denklemi ile hesaplanan termodinamik ve kinetik parametreler Çizelge 4.7' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7. Hem-GPTS-SPION, Ir-Hem-GPTS-SPION, Gİb-GPTS-SPION, Ir-Gİb-GPTS-SPION, HSA-GPTS-SPION ve Ir-HSA-GPTS-SPION' nın kinetik parametreler için termal dekompozisyonu Horowitz-Metzger metodu tarafından değerlendirilmesi.

Materyal	E^* (kJmol^{-1})	ΔH^* (kJmol^{-1})	Parameter	
			ΔS^* (Jmol^{-1})	ΔG^* (kJmol^{-1})
Hem-GPTS-SPION	36,12	31,61	-314,03	202,11
Ir-Hem-GPTS-SPION	37,71	33,17	-316,27	205,94
Gİb-GPTS-SPION	33,95	29,43	-310,48	198,21
Ir-Gİb-GPTS-SPION	35,61	31,06	-312,78	201,09
HSA-GPTS-SPION	29,29	24,74	-226,29	148,68
Ir-HSA-GPTS-SPION	32,78	28,26	-232,08	154,34

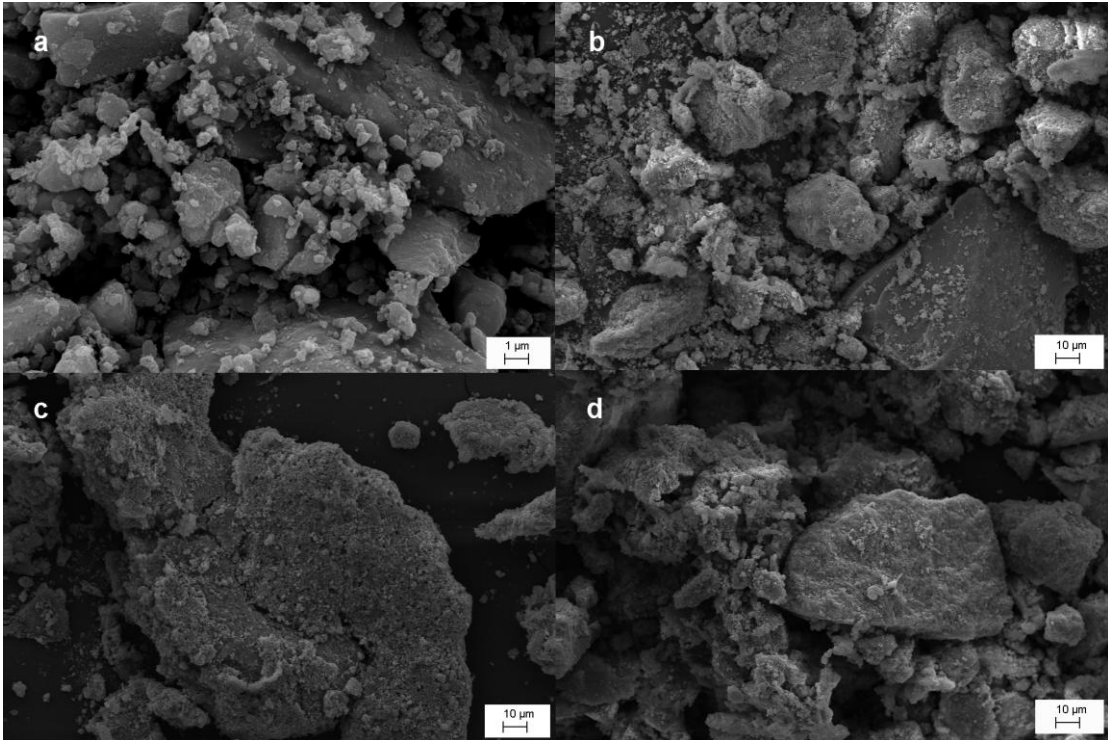
Elde edilen sonuçlara göre Hem-GPTS-SPION, Gİb-GPTS-SPION, HSA-GPTS-SPION aktivasyon enerjileri sırasıyla 36,12, 33,95 ve 29,29 kJmol^{-1} dür. Ir-Hb-GPTS-SPION, Ir-Gİb-GPTS-SPION, Ir-HSA-GPTS-SPION için aktivasyon enerjileri sırasıyla 37,71, 35,61 ve 32,78 kJmol^{-1} dür. GPTS-SPION üzerine immobilize serum proteinlerinin aktivasyon enerjilerine kıyasla GPTS-SPION üzerine immobilize serum proteinlerinin irinotekan ile etkileşimi daha yüksek bir aktivasyon enerjisine sahiptir. Bu E^* değerleri Ir-protein-GPTS-SPION' un protein-GPTS-SPION' dan daha kararlı olduğunu göstermektedir. Çizelge 4.7' den görülebileceği gibi tüm maddeler için ΔG^* pozitif iken ΔH^* pozitif ve ΔS^* negatiftir. Entalpi aktivasyonunun değişiminin pozitif işareti bozunma aşamalarının endotermik proses olduğunu göstermektedir.

Gibbs Serbest Enerjinin (ΔG^*) pozitif işareti maddelerin bozunma aşamalarının kendiliğinden olmayan proses olduğunu gösterir.

Entropinin negatif olması tüm maddelerin daha düzenli yapılar olduğunu gösterir.

4.6. Karakterizasyon

Taramalı Elektron Mikroskobu nanopartikül yüzeylerinin üzerindeki proteinler ve GPTS-SPION arasında morfolojik farklılıkların doğrulanmasına izin verir. Şekil 4.23 a, b, c, d 'de görüldüğü gibi her proteinin küresel yapısını, magnetik nanopartiküllerin düzenlenmesi gösterilmiştir. Nanopartiküllere protein immobilizasyonundan sonra morfoloji büyük ölçüde değişmiştir. Bununla birlikte küresel yapılar ilaç moleküllerinin parçacık yüzeyine bağlanabilmesi için artmıştır (Şekil 4.23 a, b, c, d).



Şekil 4.23. GPTS-SPION (a), Hem-GPTS-SPION (b), HSA-GPTS-SPION (c) ve Glb-GPTS-SPION (d) SEM görüntüleri.

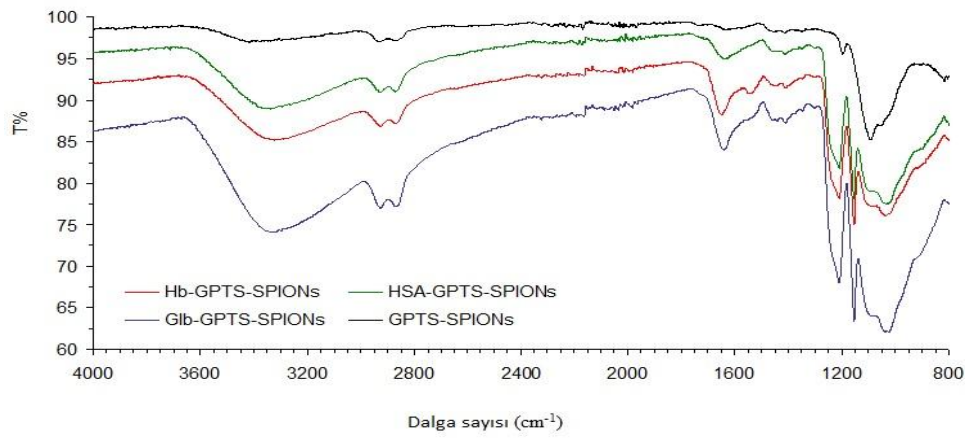
Şekil 4.24' de proteinlerin bağlanmasından sonra ve öncesinde GPTS modifiye SPION-IR spektrumları gösterilmiştir.

Düşük dalga boylarında ki FT-IR bantları ($\leq 700 \text{ cm}^{-1}$) demir oksitin Fe ve O bağlarının titreşimlerinden gelir. SPION üzerindeki epoksi grupları başlangıçta yaklaşık 910 cm^{-1} bantlarında görülmüştür. Demir epoksi silan grubunun varlığı 1080 cm^{-1} deki Si-O gerilme titreşimleri ile doğrulanmaktadır. Propil gruplarının varlığı 2913 cm^{-1} ve 2855 cm^{-1} de C-H gerilme titreşimlerinin gözlemlenmesiyle doğrulanmaktadır.

3380 cm^{-1} ve 1615 cm^{-1} pikler SPION' un yapısında reaksiyona girmemiş O-H bağlarından dolayıdır. Protein-GPTS-SPION' un IR spektrumu yaklaşık 3300 cm^{-1} civarındadır. Nanopartiküle bağlanmadan önce tüm proteinlerde olan amit bağının N-H

gerilmelerinden dolayı 3315 cm^{-1} 'de pik gözlenmektedir. Hemoglobin ve Globulinin 1526 cm^{-1} gözlenen pikleri lizin yapısındaki NH^+ (NH_3^+) asimetrik eğilmelerden kaynaklanabilir. 1630 cm^{-1} civarında gözlenen pik amit bağındaki C=O gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır. 1150 cm^{-1} görülen pik proteinlerin yapısındaki C-O gerilme titreşimlerinden ileri gelmektedir. 1220 cm^{-1} civarında görülen pik C-N gerilme titreşimleri ve N-H eğilme titreşimlerinin bir araya gelmesiyle oluşmaktadır.

Sonuç olarak; GPTS-SPION' a serum proteinlerinin başarılı bir şekilde immobilize olduğunu, yeni piklerin oluşmasından anlaşılır.



Şekil 4.24. GPTS-SPION (a), Hem-GPTS-SPION (b), HSA-GPTS-SPION (c) ve Glb-GPTS-SPION (d) FT-IR spektrumları.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Amino asitler, yağ asitleri, metaller ve canlı organizmadaki ilaç molekülleri gibi küçük moleküllerin taşınması için serum proteinler temel biyomoleküllerdir. Serum proteinler hedef hücreye ilaç taşınması için gereklidir. Son zamanlarda ilaç taşıma sistemi nanopartiküller üzerinde proteinlerin var olmasına odaklanmaktadır. Özellikle albumin nanopartiküllerin hazırlanması için ideal bir adaydır.

Albumin, hemoglobin ve albumin gibi proteinlerin birincil ve üç boyutlu yapıları çok iyi bilinmektedir.

Proteinlerin birincil yapıları arasındaki farklar amino asit sekanslarından kaynaklanmaktadır. Amino asit sekansları arasındaki farklar, üç boyutlu yapıdaki farklılıklara, ilaç ve magnetik nanopartikül üzerinde her proteinin bağlanma miktarındaki farklı olmasına neden olur.

Bu çalışmada proteinler arası bağlanma miktarı karşılaştırıldığı zaman en yüksek bağlanma miktarı GPTS-SPION immobilize albuminde gözlenmektedir. Bunu globulin ve hemoglobin izlemektedir.

Çalışmanın sonucunda albumin bağlı magnetik nanopartiküller taşıyıcı sistemler ilaç taşıma için ilgi çekici bir strateji temsil eder. HSA' in aksine irinotekanın büyük kısmı Glb-GPTS-SPION' a bağlanmaktadır. İlacın bağlanmasına bakıldığında ilaç ile proteinin etkileşmesi daha etkilidir. Bu nedenle ilacın bağlanma miktarı ile protein yüzeyinin miktarı arasında bir ilişki yoktur. Bağlanma miktarı proteinin yapısı ile ilgilidir. Hb-GPTS-SPION, Ir-Hb-GPTS-SPION, Glb-GPTS-SPION, Ir-Glb-GPTS-SPION, HSA-GPTS-SPION, Ir-HSA-GPTS-SPION kararlılıkları açıklandı. Kinetik parametreler Horowitz-Metzger yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir

KAYNAKLAR

- Anonim, 2008, Myoglobin, <https://en.wikipedia.org/wiki/File:Myoglobin.png> [10 Nisan 2013].
- Anonim, 2010, Amino asitler, Proteinler ve Enzimler, <http://landfood.ubc.ca/courses/fnh/301/protein/protprin.htm> [8 Mart 2013].
- Anonim, 2011, Alfa Sarmal, http://tr.wikipedia.org/wiki/Alfa_sarmal [10 Nisan 2013].
- Anonim, 2011, Proteinlerin Bağlanma Özellikleri, <http://tipnotlarim.wordpress.com/2011/03/14/proteinlerin-baglana-ozellikleri-fizyoloji/> [15 Nisan 2013].
- Anonim, 2009, Protein Birincil Yapısı, http://tr.wikipedia.org/wiki/Protein_birincil_yap%C4%B1s%C4%B1 [12 Nisan 2013].
- Anonim, 2010, Alfa Heliks, <http://what-when-how.com/molecular-biology/alpha-helix-310-helix-and-pi-helix-molecular-biology/> [12 Nisan 2013].
- Anonim, 2015, İrinotekan HCl, <http://www.ilactr.com/ilac/irinotekan.html> [25 Nisan 2015].
- Arruebo, M., Pacheco, R., F., Ibarra, M., R., Santamaria, J., 2007, Magentic nanoparticles for drug delivery, *Nanotoday*, 2(3), 22-32.
- Aykan, F., N., 2004, Topoizomeraz inhibitörleri etkileşimi, http://kanser.org/saglik/upload/Onkolojide_ilac_Etkilesimleri/Topoizomeraz_Inhibitorlerinin_Etkilesimi%23Faruk_Aykan.pdf [15 Nisan 2013].
- Aytaç, P., S., Tozkoparan, B., 2007, Kanser Kemoterapisinde Terapötik Hedef Olarak Glutatyon S-Transferazlar, *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 27, Ankara, 139-143.
- Banerjee, M., Pal, U., Subudhi, A., Chakrabarti, A., Basu, S., 2012, Interaction of merocyanine 540 with serum albumins: Photophysical and binding studies, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 108, 23-33.
- Bi, S., Sun, Y., Qiao, C., Zhang, H., Liu, C., 2009, Binding of several anti-tumor drugs to bovine serum albumin: Fluorescence study, *Journal of Luminescence*, 129, 541-547.
- Buzoglu, L., 2012, Blok Kopolimer Sentezi ve Biyolojik Uygulamaları, Yüksek Lisans Tezi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Konya, 1-68.

- Buzoglu, L., Maltas, E., Ozmen, M., Yıldız, S., 2013, Interaction of donepezil with human serum albumin on amine-modified magnetic nanoparticles, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 442, 1-7.
- Büyükbingöl, E., 2011, Antikanser İlaçlar ve Kanser Kemoterapisi Farmasötik Kimya Ders Notları, 1-3.
- Cingi, İ., Erol, K., 1996, Farmakoloji, *TC Anadolu Üniversitesi Yayınları*, Eskişehir, 1-3.
- Cingi, İ., Erol, K., 1996, Farmakoloji, *TC Anadolu Üniversitesi Yayınları*, Eskişehir, 121-145.
- Cingi, İ., Erol, K., 1996, Farmakoloji, *TC Anadolu Üniversitesi Yayınları*, Eskişehir, 156-158.
- Cox, M., M., Nelson, L., D., 2005, Lehinger Biyokimyanın Temelleri, *Palme Yayıncılık*, Ankara, 116.
- Cox, M., M., Nelson, L., D., 2005, Lehinger Biyokimyanın Temelleri, *Palme Yayıncılık*, Ankara, 126-129.
- Cox, M., M., Nelson, L., D., 2005, Lehinger Biyokimyanın Temelleri, *Palme Yayıncılık*, Ankara, 137-144.
- Cox, M., M., Nelson, L., D., 2005, Lehinger Biyokimyanın Temelleri, *Palme Yayıncılık*, Ankara, 159-173.
- Dizdar, Ö., Türker, A., 2005, Mised, Mustafa Aslan, *Türk Eczacılar Birliği*, Ankara, 80-81.
- Elzoghby, O., A., Samy, M., W., Elgindy, A., N., 2012, Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems, *Journal of Controlled Release*, 157(2), 168-182.
- Fidancı, 2009, Proteinler, http://80.251.40.59/veterinary.ankara.edu.tr/fidanci/Ders_Notlari/Ders_Notlari/Proteinler.html [11 Mart 2013].
- Hu, J., Y., Liu, Y., Shen, S., X., Fang, Y., X., Qu, S., S., 2005, Studies on the interaction between 1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil and bovine serum albumin, *Journal of Molecular Structure*, 738, 143-147.
- Kayaalp, O., 1991, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 1, *Feryal Matbaacılık*, Ankara, 5-10.
- Kayaalp, O., 1991, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 1, *Feryal Matbaacılık*, Ankara, 183-202.

- Kayaalp, O., 1991, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 1, *Feryal Matbaacılık*, Ankara, 248-294.
- Kayaalp, O., 1991, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 1, *Feryal Matbaacılık*, Ankara, 978-988.
- Kavaz, D., 2011, Nanobülten, Denkbaş, B., E., *Hacettepe Üniversitesi Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı*, Ankara, 12-19.
- Maltas, E., Ozmen, M., Yıldız, S., Ersoz, M., 2012, Binding affinity of serum proteins to epoxy modified magnetite nanoparticles, *Advanced Science Letters*, 17(1), 143-148.
- Maltas, E., Ozmen, M., Yıldırım, B., Kucukkolbası, S., Yıldız, S., 2013, Interaction between ketoconazole and human serum albumin on epoxy modified magnetic nanoparticles for drug delivery, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 13, 1-7.
- Mandal, M., Kundu, S., Ghosh, K., S., Panigrahi, S., Sau, K., T., Yusuf, S., M., Pal, T., 2005, Magnetite nanoparticles with tunable gold or silver shell, *Journal of Colloid and Interface Science*, 286(1), 187-194.
- Pala, B., B., 2011, Nanobülten, Denkbaş, B., E., *Hacettepe Üniversitesi Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı*, Ankara, 20-21.
- Pamuk, F., 2000, Biyokimya, *Gazi Kitabevi*, Ankara, 39-43.
- Şener, G., 2011, Nanobülten, Denkbaş, B., E., *Hacettepe Üniversitesi Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı*, Ankara, 70.
- Telefoncu, A., 1988, Protein Yapısı ve Fonksiyonları, İzmir, 5.
- Tüzün, C., 2002, Biyokimya, *Palme Yayıncılık*, Ankara, 62-63.
- Tüzün, C., 2002, Biyokimya, *Palme Yayıncılık*, Ankara, 73-80.
- Yıldız, S., 2012, Fotokimya Ders Notları, 69-103.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ecem Tamyürek
Uyruğu : TC
Doğum Yeri ve Tarihi : İstanbul/31.08.1989
Telefon : 05064434706
Faks :
e-mail : ecemtamyurek@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Karatay Lisesi, Kepez, Antalya	2007
Üniversite	: Selçuk Üniversitesi	2012
Yüksek Lisans	: Selçuk Üniversitesi	2015
Doktora	:	

YABANCI DİLLER

İngilizce

YAYINLAR

Tamyurek, E., Maltas, E., Bas, Z., Ozmen, M., Yıldız, S., 2015, Magnetic nanoparticles-serum proteins bioconjugates for binding of irinotecan, *Biological Macromolecules*, 76-83.