

**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**QD NANOPARÇACIKLAR KULLANILARAK LEKTİN  
KARBOHİDRAT İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

**Altan KARA**

**Tez Danışmanları: Prof. Dr. Perihan ÜNAK**

**İkinci Danışman: Doç. Dr. Cenk SELÇUKİ**

**Nükleer Bilimler Anabilim Dalı**

**Bilim Dalı Kodu: 622.02.01**

**Sunuş Tarihi: 30.05.2011**

**Bornova-İZMİR**

**2011**



Altan Kara tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan ‘QD nanoparçacıklar kullanılarak lektin karbohidrat ilişkisinin incelenmesi’ başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 30.05.2011 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

**Jüri Üyeleri:****İmza****Jüri Başkanı : Prof. Dr. Perihan ÜNAK****Raportör Üye : Doç. Dr. Cenk SELÇUKİ****Üye : Prof. Dr. Serhan SAKARYA****Üye : Prof. Dr. Suna TİMUR****Üye : Doç. Dr. F. Zümrüt BİBER MÜFTÜLER**



**ÖZET****QD NANOPARÇACIKLAR KULLANILARAK LEKTİN  
KARBOHİDRAT İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

KARA, Altan

Yüksek Lisans Tezi, Nükleer Bilimler Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Perihan ÜNAK

Mayıs 2011, sayfa 89

Hücre tanıma özelliğinden dolayı önemli lektin türlerinden biri olarak kabul edilen Phytohemagglutinin-L (PHA-L) kullanılmıştır. Bu lektin kırmızı barbunyadan elde edilmektedir. Phytohemagglutinin-L hücre aglütinasyonu ve mitojenik faaliyetler üzerinde güçlü etkiler içerir. Bu lektinler monosakkarit ve oligosakkaritler yardımıyla kendilerini hücre zarlarına bağlarlar. Lektinler bu özellikleri nedeniyle öncelikle hayvansal hücrelerin tanımlanmasında görev alırlar.

Phytohemagglutinin-L (PHA-L) hücre yüzeyindeki şekerlere spesifik dört yüzey içermektedir. Bu yüzeyler monosakkarit ve oligosakkaritlere spesifiktirler. Bu özellikleri sebebiyle meme kanser hücresi olan MCF-7 kanser hücrelerinin üzerindeki sialik asitlere spesifiktirler. PHA-L' nin monosakkarit özellik gösteren sialik asitlere olan bu ilgisi, bu lektinleri meme kanserinin görüntülenmesinde kullanılmasına olanak sağlamaktadır.

Bu bilgiler ışığında meme kanseri hücresi olan MCF-7 meme hücrelerinin yüzeylerinde bol miktarda bulunan ve aynı zamanda PHA-L ile spesifik etkileşim gösteren monosakkarit özellik taşıyan sialik asit ve PHA-L arasındaki etkileşim deneysel ve hesapsal teknikler kullanılarak araştırılmıştır. Deneysel olarak CdSe/CdS ile konjuge edilmiş PHA-L öncelikle <sup>125</sup>I ile işaretlenmiş daha sonra işaretli

örneklerin MCF-7 meme hücre yüzeylerinde göstermiş oldukları tutulum zaman parametresi kullanılarak incelenmiş ve zamanla artan bir verim gözlenmiştir.

Çalışmanın ikinci basamağında PHA-L' nin karbohidrat etkileşim yüzeyi kristal yapının içerisinde çıkarılarak yarı ampirik yöntemlerle bilgisayar ortamında sialik asit ile farklı pozisyonlarda etkileştirilmiştir ve yapılan hesaplamalar sonucunda PHA-L ve sialik asit arasındaki spesifik etkileşim gözlemlenmiştir. Etkileşimlerin hesaplanmasında yarı ampirik yöntemlerden PM3 ve AM1 metodları kullanılmıştır.

DeneySEL ve hesapsal çalışmalarımız sonucunda elde ettiğimiz anlamlı sonuçlar radyoiyot işaretli PHA-L'nin ve radyoiyot işaretli PHA-L ile konjuge quantum dot nanoparçacıklarının MCF-7 meme kanser hücrelerinin görüntülenmesinde etkili bir ajan olabileceğini göstermiştir.

**Anahtar Sözcükler:** CdSe/CdS kuantum dot nanoparçacıklar, <sup>125</sup>I, PHA-L, PM3, AM1, MCF-7.

**ABSTRACT****INVESTIGATION OF RELATIONSHIP BETWEEN LECTIN AND  
CARBOHYDRATE BY USING QD NANOPARTICLES**

KARA, Altan

MSc, Institute of Nuclear Sciences

Supervisor: Prof. Dr. Perihan ÜNAK

May 2011, 89 pages

Phytohemagglutinin-L (PHA-L) which is considered to be one of the major types of lectin due to its cell recognition property, was investigated. This lectin is obtained from red kidney bean. Phytohemagglutinin-L has strong effects on cell agglutination and mitogenic activities. These lectins can bind themselves to the cell membranes by interacting with monosaccharides and oligosaccharides. Because of these characteristics, lectins are primarily used for identification of animal cells.

Phytohemagglutinin-L (PHA-L) has four surfaces which are specific for cell surface sugars. These surfaces are specific for monosaccharides and oligosaccharides. Because of these features, PHA-L is specific for sialic acids which are located on the MCF-7 cell membranes. This property allows the use of lectins in the display of breast cancer.

In shed of these, we investigated the interaction between PHA-L and sialic acid, which is abundant on the breast cancer cell (MCF-7 cell) surface and displays monosaccharide characteristic, by experimental and computational methods. Experimentally, PHA-L is conjugated with CdSe/CdS and labeled with <sup>125</sup>I. Afterwards, attachment of these samples have been investigated with time dependence parameter on MCF-7 cell surface and the binding efficiency was increased with time.

In the second step of the study, the crystal structure of carbohydrate interaction surface of PHA-L was extracted from the crystal structure of PHA-L. The interactions between this surface and sialic acid are calculated by computational tools. These calculations, revealed specific interactions between PHA-L and sialic acid. Semi-empirical methods, PM3 and AM1, were used in the calculations.

Significant outcomes have been obtained from the experimental and computational studies and these results demonstrated that PHA-L may be an effective agent for imaging MCF-7 cells.

**Key Words:** CdSe/CdS quantum dot nanoparticles, <sup>125</sup>I, PHA-L, PM3, AM1, MCF-7.



## TEŞEKKÜR

Çalışmam süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşmakla kalmayıp, her konuda benim yanımda olan beni destekleyen tez danışmanım, Sayın Prof. Dr. Perihan ÜNAK'a,

Çalışmam süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan eş tez danışmanım, Sayın Doç. Dr. Cenk SELÇUKİ'ye,

Çalışmamın her aşamasında bana yardımcı olan, bilgi ve deneyimlerini paylaşan Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü'nden Sayın Doç. Dr. Armağan KINAL'a

Çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı'ndan Özlet AKÇA ve Dr. E. İlker MEDİNE'ye,

Hayatımın her aşamasında benimle birlikte olan, maddi ve manevi her türlü desteği sağlayan ve emeklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili AİLEME,

SONSUZ TEŞEKKÜRLERİMİ sunarım.



**İÇİNDEKİLER**

	Sayfa
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vii
TEŞEKKÜR .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xx
1.GİRİŞ .....	1
2.GENEL BİLGİLER .....	4
2.1 Kanser .....	4
2.1.1 Meme kanseri.....	4
2.2 Lektin .....	5
2.2.1 Phytohemagglutinin-L (PHA-L).....	6
2.3 İyot .....	7
2.3.1Kullanım alanları.....	8
2.3.2 <sup>123</sup> I .....	9
2.3.3 <sup>125</sup> I .....	9
2.3.4 <sup>131</sup> I .....	10

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	Sayfa
2.3.5 İyot radyoizotoplarının kullanım alanları .....	10
2.3.6 Radyoaktif iyodun çözelti kimyası.....	11
2.3.7 İyot ile işaretleme .....	12
2.3.8 Radyoaktif iyodinasyon yöntemleri .....	13
2.4 Nanoteknoloji.....	19
2.4.1 Nanoteknolojinin avantajları .....	20
2.4.2 Nanobiyoteknolojinin kanser araştırmalarında kullanımı .....	21
2.4.3 Nanoparçacık nedir ve niçin kullanılır .....	22
2.4.4 Nanoparçacıkların elde ediliş yöntemleri .....	23
2.5 Kalite Kontrolde Kullanılan Kromatografik Yöntemler .....	23
2.5.1 İnce tabaka kromatografisi (TLC).....	23
2.5.2 Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) .....	25
2.5.3 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) .....	25
2.6. Hesapsal Kimya.....	27
2.6.1 Hesapsal yöntemler .....	27
2.7 Moleküler Modelleme .....	29

## İÇİNDEKİLER (devam)

	Sayfa
2.7.1 Moleküler modelleme ile proteinlerin yapı tayini.....	29
3 MATERYAL VE METOD .....	34
3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar .....	34
3.1.1 Kullanılan kimyasallar .....	34
3.1.2 Kullanılan cihazlar .....	35
3.2 Moleküler Modelleme.....	36
3.2.1 Yarı ampirik (semi-empirical) yöntemler .....	36
3.3 Deneysel Sentez Basamakları .....	37
3.3.1 CdSe/CdS kuantum dot nanoparçacıklarının sentezlenmesi.....	38
3.3.2 Lektin (PHA-L) solüsyonunun hazırlanması .....	39
3.3.3 PHA-L'nin CdSe/CdS kuantum dot nanoparçacıklarına bağlanması .....	39
3.4 İşaretleme Prosedürü.....	40
3.4.1 İodojen yönteminde kullanılacak olan iodojen tüplerinin hazırlanması .....	40
3.4.2 PHA-L'nin <sup>125</sup> I ile işaretleme .....	41
3.4.3 CdSe/CdS kuantum dot nanoparçacıkları ile konjuge edilmiş PHA-L'nin <sup>125</sup> I ile işaretleme.....	41

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	Sayfa
3.5 Kalite Kontrol İşlemlerinde Kullanılan Kromatografik Yöntemler .....	42
3.5.1 İnce tabaka radyo kromatografi yöntemi (TLRC).....	42
3.5.2 Yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi (HPLC).....	43
3.6 MCF-7 (human breast adenocarcinoma) Hücreleri ile Yapılan Çalışmalar .....	43
3.6.1 MCF-7 hücrelerinin inkorporasyon (bağlanma) deneyleri için hazırlanması.....	44
3.6.2 Biyoaffinite testi .....	45
3.7 Elde Edilen Sonuçların İstatistikler Yöntemler Kullanılarak Analizi .....	47
3.7.1 İstatistiksel veri analizi.....	47
4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	48
4.1 Hesapsal Tekniklerle Elde Edilmiş Sonuçlar .....	48
4.1.1 Optimizasyon sonuçları.....	48
4.2 Karbohidrat Etkileşim Yüzeyi ile Sialik Asidin Etkileştirilmesi .....	59
4.2.1 Birinci etkileşim pozisyonundan elde edilen bileşik.....	59
4.2.2 İkinci etkileşim pozisyonundan elde edilen bileşik.....	60
4.2.3 Üçüncü etkileşim pozisyonundan elde edilen bileşik .....	61
4.2.4 Dördüncü etkileşim pozisyonundan elde edilen bileşik.....	62

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	Sayfa
4.2.5 Beşinci etkileşim pozisyonundan elde edilen bileşik.....	63
4.2.6 Altıncı etkileşim pozisyonundan elde edilen bileşik.....	64
4.3 Parçacıkların Karakterizasyonu .....	66
4.3.1 SEM analiz sonuçları .....	66
4.4 Kalite Kontrol Çalışmalarının Sonuçları.....	70
4.4.1 TLRC yöntemi ile elde edilen sonuçlar .....	70
4.4.2 HPLC analizi ile elde edilen sonuçlar .....	73
4.5 Reaksiyon Mekanizmaları.....	75
4.5.1 CdSe/CdS kuantum dot nanoparçacıkların hazırlanması.....	76
4.5.2 CdSe/CdS'ün radyoaktif ile bağlanma mekanizması.....	76
4.5.3 PHA-L'nin CdSe/CdS ile bağlanma ve radyoaktif iyotla işaretlenme mekanizması.....	77
4.6 Biyoaffinite Çalışmalarının Sonuçları .....	78
4.6.1 <sup>125</sup> I ile işaretli PHA-L, CdSe/CdS kuantum dotlar ve CdSe/CdS ile konjuge edilmiş PHA-L'nin MCF-7 hücreleri üzerindeki bağlanma verimlerinin zamana bağlı değişimi.....	79
5. SONUÇ VE YORUM.....	81

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	Sayfa
KAYNAKLAR DİZİNİ .....	83
ÖZGEÇMİŞ .....	89



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
3.1 CdSe/CdS kuantum dot nanopartiküllerinin hazırlanmasında kullanılan düzenek. ....	39
3.2 İodojenin 3D görüntüsü (solda) ve moleküler yapısı. ....	41
4.1 Protein bağlanma yüzeyinin optimizasyon öncesi görüntüsü. Kırmızı halkalar önemli bağları göstermektedir.....	48
4.2 Protein bağlanma yüzeyinin optimize edilmiş yapısı.....	49
4.3 Protein yüzeyini optimizasyon sonrası elde edilen teorik IR spektrumu. ....	51
4.4 Anti-paralel yapıyı oluşturan dizinin optimizasyon öncesi görünümü. Kırmızı halkalar önemli bağları göstermektedir.....	52
4.5 Anti-paralel yapıyı oluşturan dizinin optimize edilmiş yapısı.....	52
4.6 Anti-paralel yapıyı oluşturan dizinin optimizasyon sonrası elde edilen teorik IR spekturumu.....	54
4.7 Karbohidrat etkileşim yüzeyinin optimizasyon öncesi görünümü. ....	55
4.8 Karbohidrat etkileşim yüzeyinin optimizasyon sonrası görünümü.....	56
4.9 Karbohidrat etkileşim yüzeyindeki tek bir domainin optimizasyon öncesi görünümü .....	57
4.10 Karbohidrat etkileşim yüzeyindeki tek bir domainin optimizasyon sonrası görünümü. ....	57
4.11 Karbohidarat etkileşim yüzeyine ait domainin optimizasyon sonrası elde edilen teorik IR spekturumu.....	59

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil	Sayfa
4.12 Birinci etkileşim pozisyonu (solda) ve etkileşimden sonra oluşan bileşik (sağda) ve kurulan yeni bağlar (yeşil kesikli çizgiler) .....	60
4.13 İkinci etkileşim pozisyonu (solda) ve etkileşimden sonra oluşan bileşik (sağda) ve kurulan yeni bağlar (yeşil kesikli çizgiler). .....	61
4.14 Üçüncü etkileşim pozisyonu (solda) ve etkileşimden sonra oluşan bileşik (sağda) ve kurulan yeni bağlar (yeşil kesikli çizgiler) .....	62
4.15 Dördüncü etkileşim pozisyonu (solda) ve etkileşimden sonra oluşan bileşik (sağda) ve kurulan yeni bağlar (yeşil kesikli çizgiler) .....	63
4.16 Beşinci etkileşim pozisyonu (solda) ve etkileşimden sonra oluşan bileşik (sağda) ve kurulan yeni bağlar (yeşil kesikli çizgiler). .....	64
4.17 Altıncı etkileşim pozisyonu (solda) ve etkileşimden sonra oluşan bileşik(sağda) ve kurulan yeni bağlar (yeşil kesikli çizgiler).....	65
4.18 PHA-L'nin 5000 büyütmede SEM görüntüsü.....	67
4.19 PHA-L'nin 10000 büyütmede SEM görüntüsü.....	67
4.20 CdSe/CdS kuantum dotların 20000 büyütmede SEM görüntüsü.....	68
4.21 CdSe/CdS kuantum dotların 10000 büyütmede SEM görüntüsü.....	68
4.22 CdSe/CdS kuantum dotların ile konjuge edilmiş PHA-L'nin 20000 büyütmede SEM görüntüsü.....	69

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil	Sayfa
4.23 CdSe/CdS kuantum dotların ile konjuge edilmiş PHA-L'nin 21000 büyütmede SEM görüntüsü.....	69
4.24 İzopropil alkol-n bütanol-0.2 N NH <sub>4</sub> OH (4:2:1) banyosunda <sup>125</sup> I-PHA-L'e ait TLRC kromatogramı.....	70
4.25 İzopropil alkol-n bütanol-0.2 N NH <sub>4</sub> OH (4:2:1) banyosunda <sup>125</sup> I-PHA-L-CdSe/CdS'a ait TLRC kromatogramı .....	71
4.26 İzopropil alkol-n bütanol-0.2 N NH <sub>4</sub> OH (4:2:1) banyosunda <sup>125</sup> I-CdSe/CdS'a ait TLRC kromatogramı.....	72
4.27 PHA-L'ye ait HPLC kromatogramı .....	73
4.28 CdSe/CdS kuantum dot nanoparçacıklarına ait HPLC kromatogramı.....	74
4.29 CdSe/CdS kuantum dot nanoparçacıkları ile konjuge edilmiş PHA-L'ye ait HPLC kromatogramı.....	74
4.30 Üç örneğin kromatogramlarının bir birlerine göre konumu .....	75
4.31 CdSe/CdS nanoparçacıklarının sentez şemasının basitleştirilmiş gösterimi....	76
4.32 CdSe/CdS kuantum dot nanoparçacıklarının PHA-L ile konjugasyonunun ve sentezlenen örneğin radyoaktif iyotla işaretlenmesinin şematik gösterimi.....	77
4.33 <sup>125</sup> I işaretli PHA-L,Q-PHA-L, CdSe/CdS kuantum dot örneklerinin ve <sup>125</sup> I'in MCF-7 hücre hattında 30., 60., ve 120. dakikalardaki bağlanma oranı.....	79

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
3.1 HPLC yönteminde uygulanan kromatografik koşullar .....	43
4.1 Protein yüzeyindeki önemli bağların optimizasyon sonrası değişimi .....	50
4.2 IR korelasyon şeması .....	50
4.3 Anti-paralel yapıyı oluşturan dizinin önemli bağlarının optimizasyon sonrası değişimi .....	53
4.4 Karbohidrat etkileşim yüzeyine ait domainin önemli bağlarının optimizasyon sonrası değişimi.....	58
4.5 Farklı etkileşimler sonucu elde edilen bileşiklerin PM3 ve AM1 metodlarına göre elde edilmiş oluşum enerjileri .....	65
4.6 <sup>125</sup> I ile işaretlenmiş PHA-L'nin R <sub>f</sub> değeri ve yüzde bağlanma verimi .....	71
4.7 <sup>125</sup> I ile işaretlenmiş PHA-L-CdSe/CdS'nin R <sub>f</sub> değeri ve yüzde bağlanma verimi .....	72
4.8 <sup>125</sup> I ile işaretlenmiş CdSe/CdS'nin R <sub>f</sub> değeri ve yüzde bağlanma verimi .....	73
4.9 <sup>125</sup> I işaretli PHA-L, Q-PHA-L, CdSe/CdS kuantum dot örneklerinin ve <sup>125</sup> I'in MCF-7 hücre hattındaki % bağlanma verimlerinin zamanla değişimi .....	79

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

PHA-L	Phytohemagglutinin-L
RTLC	Radyo ince tabaka kromatografisi
SEM	Taramalı elektron mikroskopu
ACD	Asit sitrat-dekstroz tampon çözeltisi
R <sub>f</sub>	Alıkonma mesafesi
R <sub>t</sub>	Alıkonma Süresi
nm	Nanometre
mL	Mililitre
Å	Angström
AM1	Austin Method 1
PM3	Parameterized Method 3
Slk	Sialik Asit
GFS	Glisin, Fenilalanin ve Serin Aminoasitlerini içeren Peptid Parçası
LSW	Lösin, Serin ve Triptofan Aminoasitlerini İçeren Peptid Parçası
K	Glisin(2), İzolösin, Asparjin(2), Lizin ve Valin Aminoasitlerini İçeren Peptid Parçası
E	Eritrosit Reaktifleri
L	Lökosit Reaktifleri

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)**

MEM	Minimal Esansiyel Medyum
DEAE	Dietilaminoetil
DNA&rsquo	DNA zincirinin uç kısmı / DNA kalıntısı

## 1.GİRİŞ

Kanser son yılların en önemli sağlık sorunlarından biridir. Son zamanlarda kanser ile ilgili yapılan çalışmalarda genellikle diğer dokulara zarar vermeden kanserli hücreleri tanıyabilecek ve yine diğer dokulara zarar vermeden kanserli hücrelerin yok edilmesinde görev alabilecek ajanlar üretilmeye çalışılmaktadır. Bu amaca ulaşabilmek için kanser hücre yüzeyindeki karbohidrat gibi yapılara spesifik olan peptidler kullanılır veya bu peptidlerden yola çıkararak moleküler modelleme gibi tekniklerle yeni ajanların tasarlanması amaçlanır.

Bu ajanlar günümüzde daha çok taşıyıcı sistem olarak kullanılmakta ve kanserli bölgenin görüntülenmesinde görev almaktadır. Bu amaçla paralel olarak son yıllarda nanoteknoloji ve biyoteknoloji alanındaki gelişmeler kanserli hücrelerin tanınmasında ve tedavi edilmesinde araştırmacılara farklı seçenekler sunmuştur. Ayrıca bu alanlardaki gelişmeler sonucunda ilgili doku veya bölgeye doğrudan gidebilecek ve yine ilgili doku veya bölgeye spesifiklik gösterebilecek nanopartiküller üretilmiştir. Bu nanopartiküller görüntüleme ve tedavide kullanılacak olan etken maddeyi hedef dokuya götürme potansiyeli taşıdıkları gibi gösterdikleri spesifiklikten dolayı düşük dozlarda kullanılmaya olanak sağlamışlardır. Düşük dozlarda kullanım kolaylığı ise canlıda gözlenebilecek yan etkilerin iyice azaltılmasına olanak vermiştir.

Kanserin, tanı ve tedavisindeki bir diğer sorun ise, kullanılması planlanan ajanın ilgili bölgeye ulaştıktan sonra hücre içinde mevcut olan veya hücre zarında bulunan proteinler tarafından dışarı atılması veya saldırıya uğramasıdır. Bu gibi bir durumda eğer etken madde dışarıya atılırsa hem kanserli bölgede istenilen amaca uygun bir şekilde kullanılamamış olunacak hem de kanserli hücre dışındaki sağlıklı hücrelere zarar vermesi olası olacaktır. Hücre yüzey ve içindeki proteinlerin antikanser ajanına saldırması durumunda ise ajanın kimyasal yapısında meydana gelebilecek değişiklikten ötürü istenilen etkinin gözlenmesi mümkün olmayacaktır.

Bu sorunun nanobiyoteknoloji alanından faydalanılarak geliştirilen spesifik nanopartiküller ile aşılması amaçlanır. Bu yöntemde spesifik nanopartiküllere takılmış ajanların hücreden dışarıya atılma ve saldırıya uğrama gibi sorunları nanopartiküllerin ilgili bölgeye olan spesifikleriyle aşılması planlanmaktadır.

Deng ve arkadaşları, CdSe/CdS nanoparçacıklarını sentezlemiş ve yapmış oldukları karakterizasyon çalışmalarında sentezlemiş oldukları bu parçacıkların yüksek spesifiklikte ve suda çözünebilir özellikte olduğunu saptamışlardır. Ayrıca bu parçacıkların sentezinde kolay hazırlanabilen reaktifler ve basit bir deney düzeneği oluşturarak sentez basamaklarını pratik hale getirmişlerdir. Bu şekilde yüksek kalitedeki nanoparçacıkların sentezinde uygun ve pratik bir method geliştirmişlerdir (Deng *et al.*, 2006).

Smith ve arkadaşları, teorik kimya ve kimyayı matematiksel yöntemlerle tanımlamıştır. Kimyasal yapıları ve tepkimeleri temel fizik kanunlarına dayanarak açıklamaya çalışmıştır (Smith *et al.*, 1997). Hesapsal kimya ise teorik kimyacılar tarafından geliştirilmiş matematiksel yöntemleri uygular ve elde edilen sonuçları yorumlar, böylece deneysel kimya ile teorik kimya arasında bir köprü kurar. Hesapsal kimya ile sadece kararlı molekülleri değil, aynı zamanda kısa ömürlü, kararsız ara ürünler ve geçiş hallerini de çalışmak mümkündür.

Cerqueira ve arkadaşları, hesapsal kimyanın en önemli uygulama alanlarından biri olan moleküler modellemenin geliştirilmesinde ve bu alandan faydalanarak proteinlerin sahip oldukları görevleri belirleyebilmek, özelliklerini istenilen yönde değiştirebilmek ve proteinlerle ilgili daha birçok konuya ışık tutabilmek için proteinlerin 3 boyutlu yapılarını belirlemeye çalışan pek çok çalışma bulunmaktadır ve bu alanda önemli gelişmeler kaydedilmiştir (Cerqueira *et al.*, 2009 ve bu makaledeki referanslar).

Young, bir kimyasal sistemde atomlar arasındaki etkileşimleri klasik mekanik kuralları ile tanımlar ve buradan hareketle moleküler mekanik yöntemlerini açıklar (Young, 2001). Bu yöntemler oldukça hızlıdır ve temel haldeki sistemlerin enerjisini



tam olarak hesaplayabilirler. Enzimler gibi büyük yapıli sistemler için bile tepkime ısısı ve konformasyon kararlılıkları gibi nicelikler hesaplanabilir. Dolayısıyla bu yöntemler bilgisayar ortamında simüle ettiğimiz etkileşimlerin, etkileşim kararlılıklarını hesaplamak için uygundur.

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$  ile iodojen metodu uygulanarak yapılan işaretleme çalışmalarında değişik özellikteki protein ve peptidler işaretlenmiş ve biyolojik değerlendirmesi yapılmıştır. Yapılan bu biyolojik değerlendirmenin sonucunda monosakkarit ve oligosakkarit spesifikliğı olan legume lektinlerin  $^{125}\text{I}$  ile işaretlenme verimlerinin yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan bu tez çalışmasında, hücre tanıma özelliğinden dolayı önemli lektin türlerinden biri olarak kabul edilen PHA-L'nin hücre yüzeyindeki şekerlere göstermiş olduğu ilgiden yararlanılarak MCF-7 meme kanser hücrelerinin tanınması amaçlanmıştır. Buna göre meme kanseri hücresi olan MCF-7 meme kanser hücrelerinin yüzeylerinde bol miktarda bulunan ve aynı zamanda PHA-L ile spesifik etkileşim gösteren monosakkarit özellik taşıyan sialik asit ve PHA-L arasındaki etkileşim deneysel ve hesapsal teknikler kullanılarak araştırılmıştır. Bu araştırmalar sonucunda PHA-L'nin sialik aside spesifikliğinin gözlenmesi ve bu sonuçlardan hareketle PHA-L'nin MCF-7 meme kanser hücrelerinin tanınmasında etkili bir ajan olabileceğı sonucuna varılmıştır.

## 2.GENEL BİLGİLER

Bu bölümde tez çalışması ile ilgili olan alanlarla ilgili genel bilgi verilmiştir.

### 2.1 Kanser

Kanser, hücrelerde DNA'nın hasarı sonucu hücrelerin kontrolsüz veya anormal bir şekilde büyümesi ve çoğalmasdır. Hücreler henüz tam bilinmeyen bir nedenle, kontrolsüz olarak bölünmeye başlarlar. Bu yüzden bedende hızlı hücre çoğalmasından oluşan kötü urlar oluşur ve bunlara kanser denir.

Kanser oluştuğu dokuya bağlı olarak yüzden fazla çeşidi olan bir hastalık grubudur. Kanseler tümörlerin ilk olarak başladıkları organa bağlı olarak sınıflandırılırlar. Örneğin ilk olarak akciğerde oluşan kansere akciğer kanseri denir.

Kanser hücreleri civarlarındaki dokulara ulaşarak, kan ve lenf sistemi yoluyla ile vücudun diğer taraflarına yayılırlar. Buna metastaz denir. Metastaz yapan kanserlerin tedavisi genel olarak daha zordur (Rosen *et al.*, 2008).

Erken teşhis edilebildiği takdirde kanser tamamen tedavi edilebilir bir hastalıktır.

#### 2.1.1 Meme kanseri

Meme kanseri meme hücrelerinde başlayan kanser türüdür. Akciğer kanserinden sonra, dünyada görülme sıklığı en yüksek olan kanser türüdür. Her 8 kadından birinin hayatının belirli bir zamanında meme kanserine yakalanacağı bildirilmektedir. Erkeklerde de görülmekle beraber, kadın vakaları erkek vakalarından 100 kat fazladır. 1970'lerden bu yana meme kanserinin görülme sıklığında artış yaşanmaktadır ve bu artışa modern, batılı yaşam tarzı sebep olarak gösterilmektedir. Kuzey Amerika ve Avrupa ülkelerinde görülme sıklığı, dünyanın diğer bölgelerinde görülme sıklığından daha fazladır.

Meme kanseri, yayılmadan önce, erken tespit edilirse, hasta % 96 yaşam şansına sahiptir. Her yıl 44000'de bir kadın meme kanserinden ölmektedir. Meme kanserinin birçok tipi vardır. En sık rastlanan duktal karsinoma, memenin süt kanallarında başlar. Meme kanseri memenin dışına yayıldığında koltuk altındaki lenfatik nodüller en sık görülen yayılım yerleridir. Kansere hücreleri memenin diğer lenf nodlarına, kemiğe, karaciğere ve akciğere yayılabilir. Her kadın meme kanseri gelişme riskine sahiptir. Gerçekte meme kanseri gelişen kadınların çoğunda risk faktörleri belli değildir (Sariego., 2010).

## 2.2 Lektin

Lektinler güçlü bir şekilde şeker bağlama özelliğine sahip proteinlerdir. Bu sebepten dolayı lektinler hücre ve proteinleri içeren biyolojik tanıma olaylarında önemli bir yer tutarlar. Örneğin, bazı virüsler enfeksiyon sırasında konak organizmanın hücrelerine bağlanmak için lektinleri kullanırlar. Lektinler özel mono ve oligosakkaritler yardımıyla kendilerini hücre zarlarına bağlayabilirler.

Birçok lektinin etkisi enzimatik değildir. Lektinler doğada her zaman bulunurlar. Çözünür karbohidratları veya glikoprotein veya glikolipidlerin karbohidrat parçalarını bağlayabilirler. Bu özellikleri genellikle hayvan hücrelerini tanımlamada hizmet eder.

Lektinler hayvanlarda, hücre adezyonunun düzenlenmesinden glikoprotein sentezi ve kandaki protein düzeyinin kontrolüne kadar birçok fonksiyonda görev alırlar. Lektinler ayrıca çözünebilir ekstrasellüler ve intrasellüler glikoproteinleri bağlarlar.

Legume lektinlerin bitkilerdeki fonksiyonları halen belirsizliğini korumaktadır. Başlangıçta bu lektinlerin bitkilerde rhizobia bağlı özellikleri olduğu düşünülmüştür fakat daha sonra yapılan çalışmalarda bu olasılığın doğru olmadığı gösterilmiştir (Miyake *et al.*, 2007).

### 2.2.1 Phytohemagglutinin-L (PHA-L)

Phytohemagglutinin-L (PHA-L), kırmızı barbunya (*Phaseolus vulgaris*)'den alınan lektindir; hücre aglütinasyonu ve mitojenik faaliyetler üzerinde güçlü etkiler içerir. PHA-L 5 izolektin ailesi içerir. Bunlar L4E0, L3E1, L2E2, L0E4, L1E3 olarak isimlendirilmektedir. Her bir izomer PHA-L gibi kovalent olmayan etkileşimler sayesinde bir arada bulunan 4 alt gruptan oluşmaktadır. Bu alt gruplar lökosit reaktifleri (L) ve eritrosit reaktifleri (E) olmak üzere iki farklı başlık altında sınıflandırılmışlardır (Layzer *et al.*, 2007).

Bu gruplardan biri olan, L grubuna ait olan lektinlerin lenfosit yüzey reseptörlerine karşı ilgileri fazladır. Yani lenfosit yüzey reseptörlerine karşı afiniteleri yüksektir. Bu gruptakilerin çok az bir kısmı ise eritrositlerin yüzey reseptörlerine karşı afinite gösterirler. Bu grup ayrıca lektinlerin mitojenik özelliklerinden sorumludur.

Diğer grup da, E grubu ise L grubunun özelliklerini eritrositler için gösterir ve aglütinasyon özelliklerinden sorumludur. Bu bahsedilen gruplar ve özellikler izolektin aileleri için geçerlidir ve alt gruplar arasındaki etkileşim farkı gruplar arasında meydana gelen farklı katlanmaların sonucu olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bu alanda PHA-L ise hücre proliferasyonlarını uyarsın diye lenfosit kültürlerine eklenerek kullanılır. PHA-L sadece L-tipi alt birimlerden oluştuğu için isolectin L4, "leukoagglutinin" grubunun özelliklerini gösterir ve özellikle T-lenfositlerinin yüksek verimli indüksiyonu için uygundur (Layzer *et al.*, 2007).

PHA Lektinin dizisi aşağıdaki gibidir:

SNDIYFNFQRFNETNLILQRDASVSSSGQLRLTNLNNGEPRVGS LGRAFYSAP  
 IQIWDNTTGTVASFATSFTFNIQVPNNAGPADGLAFALVPVGSQPKDKGGFL  
 GLFDGSNSNFHTVAVEFDTLYNKDWDPTERHIGIDVNSIRSİKTTRWDFVNG  
 ENAEVLITYDSSTNLLVASLVYPSQKTSFIVSDTVDLKSVLPEWVSVGFSATT  
 GINKGNVETNDVLSWSFASKLS//SNDIYFNFQRFNETNLILQRDASVSSSGQL  
 RLTNLNNGEPRVGS LGRAFYSAPIQIWDNTTGTVASFATSFTFNIQVPNNAG  
 PADGLAFALVPVGSQPKDKGGFLGLFDGSNSNFHTVAVEFDTLYNKDWDPT  
 ERHIGIDVNSIRSİKTTRWDFVNGENAEVLITYDSSTNLLVASLVYPSQKTSFI  
 VSDTVDLKSVLPEWVSVGFSATTGINKGNVETNDVLSWSFASKLS//SNDIYF  
 NFQRFNETNLILQRDASVSSSGQLRLTNLNNGEPRVGS LGRAFYSAPIQIWDN  
 TTGTVASFATSFTFNIQVPNNAGPADGLAFALVPVGSQPKDKGGFLGLFDGS  
 NSNFHTVAVEFDTLYNKDWDPTERHIGIDVNSIRSİKTTRWDFVNGENAEVLI  
 TYDSSTNLLVASLVYPSQKTSFIVSDTVDLKSVLPEWVSVGFSATTGINKGNV  
 ETNDVLSWSFASKLS//SNDIYFNFQRFNETNLILQRDASVSSSGQLRLTNLN  
 GEPVGS LGRAFYSAPIQIWDNTTGTVASFATSFTFNIQVPNNAGPADGLAFAL  
 VPVGSQPKDKGGFLGLFDGSNSNFHTVAVEFDTLYNKDWDPTERHIGIDVNS  
 IRSİKTTRWDFVNGENAEVLITYDSSTNLLVASLVYPSQKTSFIVSDTVDLKS  
 VLPEWVSVGFSATTGINKGNVETNDVLSWSFASKLS

Yukarıda PHA-L proteinimizin yapısında yer alan 928 aminoasidin tek harfli kısaltmaları ve yapıdaki dizilimleri görülmektedir. Kırmızı işaretler ile ayrılan her bir bölüm bir alt grubu ifade etmektedir ve dizinler de göz önüne alınarak alt gruplar incelendiğinde alt grupların yapılarının birbirleri ile özdeş olduğu bu şekilde de görülmektedir.

### 2.3 İyot

İyot sembolü I, atom numarası 53 olan bir elementtir. Kimyasal olarak iyot halojenlerin en az reaktif olanı, astatin'den sonra en elektropozitif olanıdır. Diğer

halojenler gibi iyot da iki atomlu moleküller oluşturur, dolayısıyla moleküler formülü  $I_2$ 'dir. İyodun 37 izotopu vardır, bunlardan bir tek  $^{127}I$  kararlıdır.

$^{129}I$  pek çok bakımdan  $^{36}Cl$ 'ya benzer. Çok az çözünür, az reaktiftir, ve nükleer reaksiyonlardan meydana gelir. Hidrolojik çalışmalarda  $^{129}I$  yoğunluğu genelde  $^{129}I$ 'un toplam iyoda (hemen hemen sırf  $^{127}I$ ) olarak ifade edilir.  $^{36}Cl/Cl$  oranı gibi, doğadaki  $^{129}I/I$  oranı da çok düşüktür, ( $10^{-14}$ - $10^{-10}$  arası).  $^{36}Cl$ 'dan farklı olarak  $^{129}I$ 'un yarı ömrü daha uzundur (15.7 milyon yıl), canlılara alınma eğilimi yüksektir ve farklı kimyasal özelliklere sahip çeşitli iyonik şekillerde mevcuttur (başlıca  $I^-$  ve  $IO_3^-$ ). Bu yüzden  $^{129}I$  kolaylıkla biyosfere girebilir. Meteorlarda bulunan  $^{129}Xe$ 'nin, süpernovalarda üretilen  $^{129}I$ 'ın yıkımından kaynaklandığı, bunun da güneş sistemini oluşturan toz ve gazlarda yer aldığı gösterilmiştir. Güneş sistemimizin erken evrelerinde var olduğu gösterilmiş olan  $^{129}I$ 'nin yıkımı I-Xe radyometrik tarihlendirme yönteminde kullanılır. Bu yöntem güneş sisteminin ilk 50 milyon yılının tarihlenmesinde kullanılır (Wells, 2003).

### 2.3.1 Kullanım alanları

İyot ilaç yapımında, tuzlarda, antiseptiklerde, gıda katkılarında, boyalarda, katalizörlerde ve fotoğrafçılıkta kullanılır. Ayrıca tentürdiyotta da iyot vardır. Eskiden apikal apseli dişlerin tedavisinde kullanılan iyot bu dişlerde renklenmeye yol açmaktadır.

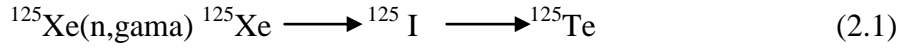
Bilindiği gibi iyot, tentürdiyot olarak deriye sürülür ve kesik tedavisinde kullanılır. Bu alkol ve iyodun sulandırılmış bir karışımıdır. İyot aynı zamanda fotoğraflarda, lazerlerde (gümüş iyodür), boyalarda kullanıldığı gibi tuz tabletine eklenen bir besin olarak da kullanılır. İyotlar, çoğunlukla tıbbi alanda en yaygın kullanılan radyonüklidler arasındadırlar. Çünkü iyodun kimyasal özellikleri, görüntüleme çalışmaları için molekülleri bağlamada kolaylık sağlar. Bu yolla ilaçlar ya da bileşiklerin metabolizmasını izleme ya da kalp gibi çeşitli organların yapısal kusurlarını görüntülemek mümkündür (Audi *et al.*, 2003).

### 2.3.2 $^{123}\text{I}$

Kısa yarı ömrü (13 saat) ve 159 keV' luk gama enerjisi nedeniyle tiroid sintigrafisi için idealdir. Siklotron ürünü olması ve temin güçlüğü nedeniyle ülkemizde kullanılmamaktadır. Oral yoldan verildikten 6 saat sonra çok iyi rezolüsyonlu, minimal zemin aktivitesi bulunan görüntüler elde edilir ( Venkat *et al.*, 1992).

### 2.3.3 $^{125}\text{I}$

$^{125}\text{I}$ ;  $^{127}\text{I}$ 'den 2 nötron azdır ve nötron eksikliği nedeniyle elektron yakalama (EC) bozunumuna uğrar ve bu reaksiyon sonucunda yarı kararlı Te-125'e dönüşür. Yarı ömrü 60 gündür.

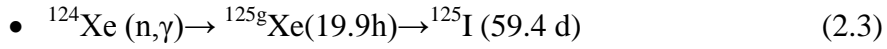
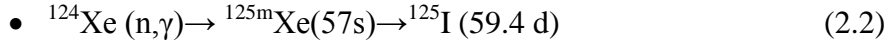


Bu geçiş için bozunum enerjisi 178 keV'dir. 178 keV'lik bu enerji nötrino; eksite olmuş Te-125 geçişinde 143 keV taşır ve 35 keV'lik enerji Te-125'in temel düzeyine geçişteki gama ışınması olarak salınır.

$^{125}\text{I}$  önceleri tiroid görüntülenmesinde kullanılmışsa da günümüzde büyük çoğunlukla invitro çalışmalarda kullanılmaktadır.  $^{125}\text{I}$  izotopu antijen radyo işaretlenmesi için çok kullanılmaktadır ve uzun yarı ömrü (60 gün) sayesinde avantaj sağlamaktadır. Ayrıca yine bu uzun yarı ömrü sayesinde birçok işaretleme çalışması ekonomik olarak  $^{125}\text{I}$  ile yapılabilir (Harper *et al.*, 2001).

$^{131}\text{I}$ 'e göre bir diğer avantajı ise; radyo işaretleme esnasında  $^{125}\text{I}$ 'un beta salınımı olmaması işaretli moleküllerin radyolitik dekompozisyonunu minimuma indirir. Yarı ömrü 60 gün olması nedeniyle bileşiklerin uzun süre metabolizma çalışmaları için tercih edilir ve böyle bileşikler için uzun süre raf ömrü sağlar. Böylece sıklıkla hazırlanmasına ihtiyaç duyulmaz.

$^{125}\text{I}$ 'i reaktörde üretmek için aşağıdaki reaksiyonlardan yararlanılmaktadır,



(Kahn ve Kleinberg, 1977)

### 2.3.4 $^{131}\text{I}$

Yüksek gama enerjisi (364 keV), beta partikülü ışınması, uzun yarı ömrü (8 gün) nedeniyle düşük dozlarda kullanmak gerektiği için gama kameralarla görüntülemeye uygun bir ajan değildir. Yüksek enerjisi sayesinde, substrenal guatrın araştırılmasında ve beta partikülü ışınımı nedeniyle hipertiroidi ile tiroid kanserlerinin tedavisinde kullanılmaktadır. Düşük dozlarda (30-100 uCi) oral yolla verilmesini takiben 24. Saatte görüntüleme yapılır (Rivkees *et al.*, 1998).

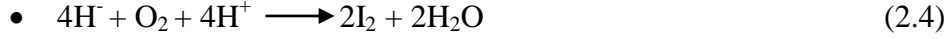
### 2.3.5 İyot radyoizotoplarının kullanım alanları

Tiroit bezinde toplanma eğilimi, iyodu özellikle tiroit problemlerinin teşhisi ve işlemleri için yararlı kılar.  $^{131}\text{I}$ , kısa yarı ömrü ve yararlı beta yayılımı nedeni ile nükleer tıpta yoğun bir şekilde kullanılır.  $^{131}\text{I}$ , tiroitten gelen tiroksin akışını izlemeyi ve görüntülemeyi içeren birçok tıbbi işlemler için faydalıdır (Hertz *et al.*, 2009). Aslında sekiz günlük yarı ömre sahip olan  $^{131}\text{I}$ , üç günden daha kısa bir sürede vücuttan atılır.  $^{123}\text{I}$  de tıbbi görüntülemede yaygın bir şekilde kullanılır. Buna karşılık  $^{124}\text{I}$ , hedeflenmiş terapi için yararlıdır.  $^{125}\text{I}$  izotopu ise bazen kanser dokusunu tedavi etmede kullanılır.  $^{129}\text{I}$  önemli tıbbi kullanımlara sahip değildir. Pratik kullanımda teşhise yönelik test etme laboratuvarlarında bazı radyoaktif sayıcıları kontrol etmek için kullanılır (Gilby *et al.*, 2010).



### 2.3.6 Radyoaktif iyodun çözelti kimyası

Radyoaktif iyot; genelde NaI formunda elde edilmektedir. Uygun koşullar altında iyot sulu çözeltilerde oksidasyon reaksiyonuna girer. Radyoliz veya oksidasyon ile oluşan çok önemli reaksiyonları aşağıda görülmektedir,



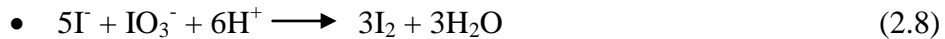
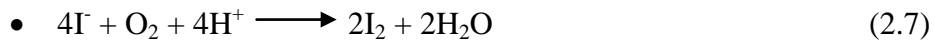
Okside olmuş ve  $\text{I}_2$  formundaki iyot uçucudur ve tehlike arz eder.

Reaksiyon 2.4, alkali pH'da radyoaktif iyot çözeltisi tamponlanarak tersinir reaksiyon 'sodyum sülfat' gibi indirgeyici ajanlar kullanılması vasıtasıyla etkili bir şekilde geciktirilebilir.

Reaksiyon 2.5 ve 2.6, radyoaktif iyodu içermesi durumunda radyasyon ile ilgili reaksiyonları tamamen engellemek zordur. Fakat radyoaktif konsantrasyonu (birim hacme düşen aktivite miktarı) düşürmek vasıtasıyla minimuma indirilebilir.

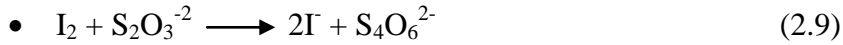
İyot anyonu kimyasal olarak oldukça reaktiftir. Uygun koşullar altında hızla elementel iyot ve HI gibi uçucu formlara okside olur. Bu şekildeki iyot çözeltisini elinde tutan kişiler için potansiyel sağlık tehlikesi mevcuttur.

İyot asidik ortamda atmosferik ve çözünmüş oksijen veya her hangi bir iyodad formunda reaksiyon verebilir.



Oksidasyon reaksiyonu birkaç yolla minimuma indirilebilir,

- 1) pH=7.5-9.0 alkali çözelti içeren tampon çözeltisi iyodun uçucu formlara yükseltgenmesini önler.
- 2) Sodyum tiosülfat gibi indirgenlerin kullanılması aşağıdaki reaksiyona göre iyodun iyodüre indirgenmesini sağlar.



Ayrıca iyot suda yavaş bir çözünürlüğe sahip olması nedeniyle buz dolabında saklanması halinde buhar basıncı azalacaktır. Sulu çözeltilerde iyodun yükseltgenmesi radyolitik etkiler vasıtasıyla oluşabilir. Bunun nedeni suda oluşan radikallerdir. Radyasyonun sebep olduğu serbest radikaller ve peroksitler iyodu,  $\text{I}_2$  (iyot) ve  $\text{IO}_3^-$  (iyodat) formuna yükseltir. Bu reaksiyonlar oksijen mevcudiyetinde ve yüksek radyoaktif konsantrasyonlarda hızlanır (Venkat *et al.*, 1992).

### 2.3.7 İyot ile işaretleme

Radyoaktif iyot ile işaretleme genelde ilgili molekülün aromatik halkasına  $\text{I}^*$  un elektrofilik özellikleri nedeniyle yaptığı girişim nedeniyle başarılabilir. Bu ya hidrojen ile iyodun yer değiştirmesi reaksiyonu ya da radyoaktif iyot atomunun molekülde mevcut olan stabil iyot ile yer değiştirmesi, izotopik yer değiştirme reaksiyonu ile oluşmaktadır. Bu reaksiyonlar aşağıda görülmektedir:

Yer değiştirme reaksiyonu,



İzotopik yer değiştirme reaksiyonu,



Serbest moleküler iyotta  $I_2$  ( $I^- + I^+$ ) formatındadır. Bununla beraber serbest  $I^+$  mevcut değildir. Fakat genelde sulu çözeltilerde nükleofilik ( $I^-$ ) özellikleri ile bir kompleks oluştururlar (Carey, 2006).

Aşağıda bu reaksiyonlar görülmektedir,



İyot ile işaretleme reaksiyonlarında iyodinyasyonun ya hidrate olmuş kompleksi ( $H_2OI^+$ ) ya da hipoyodür asit (HOI) ile olduğu düşünülmektedir.

Protein iyodinyasyonu nükleer tıpta çok önemli radyoaktif işaretleme tekniklerinden biridir. Protein molekülünde tipik iyodinyasyon yerleri mevcuttur. İyodinyasyonun asıl yeri olarak tirozinin aromatik zinciri veya sekonder yer olarak histidin imidazol halkası bilinmektedir. Genelde proteinlerin iyodinyasyonu pH=7-9'da olur. HOI'nın dönüşümsüz bozunumundan dolayı bu reaksiyonun pH=9'dan yüksek pH'lar da gözlemlenmesi zordur (Peters, 2006).

Protein molekülünün bozunmasını önlemek için iyodinyasyon ajanlarının kullanılması zorunludur. Çoğunlukla oldukça güçlü oksidasyon ajanları kullanmak gerekir. Ancak bu ajanlar protein molekülüne zarar verebilir. Genelde protein bütünlüğünü korumak için ortalama olarak protein molekülü başına bir iyot atomundan fazla atom olmaması tavsiye edilir. Çünkü proteinin farklı bir yere bağlanabilir, farklı bir biyolojik aktivite gösterebilir veya maskeleyebilir. Bu gibi sebeplerden iyodun konsantrasyonu iyi ayarlanmalıdır (Carey, 2006).

### 2.3.8 Radyoaktif iyodinyasyon yöntemleri

Radyoaktif iyodinyasyon yöntemleri moleküler iyot, triiyot metodu, iyot monoklorid, kloramin T yöntemi, elektroliz yöntemi, enzimatik yöntem, iodojen yöntemi, hunter ve greenwood yöntemi ve erime noktasında exchange yöntemidir.

- **Moleküler iyot (I<sub>2</sub>)**

Radyoaktif iyot genelde NaI olarak mevcut olmasından dolayı oksidasyon vasıtasıyla radyoaktif moleküler iyot elde etmek için kullanılması gerekir. Pressmen ve Keighly, proteinlerin işaretlenmesinde önce taşıyıcı moleküler iyoda Na<sup>131</sup>I ilavesiyle gerçekleştirmişlerdir (David P. ve Keighley G., 1957). Diğer araştırmacılar moleküler iyotla işaretleme yapmak için çok farklı oksidasyon ajanları kullanmışlardır. Proteinlerin işaretlenmesinde oksidant olarak iyot/iyodat sistemi veya demir sülfat, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, amonyum persülfat kullanılmıştır.

Radyoaktif işaretleme için iyot moleküllerinin kullanılmasının birçok dezavantajı vardır,

1. Mümkün olan radyokimyasal verim % 50'dir. Çünkü işaretlemenin yarısı radyo iyot olarak sonuçlanır. Bu gibi bir durumda saflaştırma yapmak çok zor olur.
2. Önceki oksidasyon basamakları, bazı aktivite kayıplarını içerir ve çalışan kişinin maruz kalacağı aktivite yüksektir. Bundan dolayı radyoaktif moleküler iyot ile çalışmaktan kaçınılır ve maliyeti çok fazladır.
3. Moleküler iyodun uçuculuğu nedeniyle risklidir. Bu zorluklara rağmen radyoaktif moleküler iyot küçük organik moleküllerin işaretlenmesi ve benzeri çalışmalarda önemli bir yere sahiptir (Arotsky *et al.*, 2010).

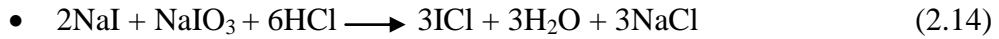
- **Triiyot metodu**

İyot (taşıyıcı konumunda) ve KI' un karışımının varlığında işaretlenebilecek bileşiklere radyoaktif iyodun ilavesini içeren bir yöntemdir. Bu metotta radyoaktif iyot, iyot-KI çözeltisi ve işaretlenecek bileşik ile karıştırılır. KI triiyot kompleksi için yardımcıdır. HOI için I<sub>2</sub>'in hidrolizinden sonra radyoaktif iyot (I\*), iyotlu bileşikte HOI\* üretmek için HOI ile izotop yer değiştirme reaksiyonuna sokulur.

Teorik olarak radyoaktif iyodun yalnızca yarısı,  $I^+$  formuna dönüştürüldüğünden genelde işaretleme verimi yalnızca % 10-20'dir. Bununla beraber reaksiyon koşulları hafif olduğu için protein bozunumu düşüktür. Kararlı iyotlanmış ve radyoaktif iyotlanmış bileşikler oluşturulabilir (Brisbois *et al.*, 2004). Bu metod çok geniş alanda kullanılmamaktadır.

- **İyot monoklorid**

ICl'de iyot klorür büyük elektronegatifliğinden dolayı  $I^+$  (yükseltgenmiş) formundadır. ICl aşağıdaki reaksiyona göre kuvvetli asidik ortamda iyodat ile iyodun oksidasyonu ile oluşturulur:



ICl ile radyoaktif iyot izotopu karıştırılarak yer değiştirme reaksiyonu yapılır. Çünkü ICl; iyodun tümü ve aşırısı da  $I^+$  formundadır. Esasen radyoaktif iyodun tümü aşağıdaki reaksiyona göre dönüştürülmektedir.



Bundan sonra  $I^*Cl$  HOI' ya hidrolizlenerek iyotlanan bileşiğe girer. Bu yöntemde yüksek işaretleme verimi (% 85) mümkündür. Fakat ürünün spesifik aktivitesi düşüktür. Çünkü kararlı iyot, mevcut ICl aşırısından dolayı bileşikte birleşebilir. Bu radyoaktif iyot işaretleme tekniğinde tamponlanmış bileşik ve ICl karışıma ilave edilir.

Radyoaktif iyottan önce ICl ilave edilirse; işaretleme verimi düşer. Çünkü bileşik ile direk bir şekilde ICl'ün reaksiyonundan dolayı izotop yer değiştirme reaksiyonu azalır. Bununla beraber ICl kullanımının avantajı, bileşik ile birleştirilmiş iyodun miktarı kullanılan ICl'in miktarıyla kontrol edebilmektedir (Brisbois *et al.*, 2004).

- **Kloramin T yöntemi**

Kloramin T yöntemi, yüksek spesifik aktivitede peptid ve proteinlerin radyoaktif iyodinasyonu için kullanılan çok genel bir yöntemdir. Kloramin T yöntemi ile radyoaktif iyodinasyondaki dikkat edilmesi gereken nokta protein işaretlemeye bileşiğin sert oksidasyon koşullarına maruz kalmasıdır. Bu istenmeyen birçok yan reaksiyonlara sebep olabilir. Bu tip zorluklara rağmen kloramin T çok sayıda küçük organik molekülün radyoaktif iyodinasyonunda başarı ile kullanılmıştır.

Bu yöntem, yüksek spesifik radyoaktif peptid ve proteinlerin radyoaktif iyodinasyonunda başarı sağlar. Ancak burada ortaya çıkan başka problemler reaksiyon koşullarının protein bozulmasına sebep olmaktadır.

Yöntemde kullanılan iyodinasyon ajanının kimyasal adı N-kloro-4-metilbenzen süldanamid sodyum tuzudur. CAT (oksidasyon ajanı), pH=7-8'de hipokloride hidroliz olur. Sodyum hipoklorid de hidroidi aside yükseltger.



Genel teknik radyoaktif iyot ve tampon ile işaretlenecek bileşik birleştirildikten sonra hızlı bir şekilde taze CAT çözeltisi ilave edilerek karıştırılır. Çünkü CAT güçlü oksidasyon ajanıdır. Proteinlere zarar verebilir. Eğer işaretleme koşulları dikkatli bir şekilde kontrol edilirse; yüksek iyodinasyon verimleri elde edilebilir (Rösch, 2004).

CAT'in avantajı, taşıyıcı iyoda ihtiyaç yoktur ve bununla beraber yüksek spesifik aktivitelere ulaşılabilir. Bu yöntem en çok kullanılanlardan biridir.

- **Elektroliz yöntemi**

İyot çözeltilerde inert bir elektrotta oluşturulmuş elektronlar ile okside edilerek işaretlenecek bileşiğe bağlanabilir. Bu yöntem ile birçok protein radyoaktif iyodun karışımının elektrolizi ile olur. Elektrolizle iyodu serbest bırakarak bileşik işaretlenir. Yavaş ve taşıyıcı iyot mevcut olmadığından işaretleme verimi genellikle yüksektir. Katotta bileşik ve iyot bulunur. Bu yöntem diğer yöntemlere göre daha karmaşık bir yapıda olduğu için geniş çapta kullanılmaz.

- **Enzimatik yöntem**

Enzimatik reaksiyonda kloroperoksidaz ve laktoperoksidaz gibi enzimler  $H_2O_2$ 'in nanomolar miktarı, işaretlenecek bileşik ve radyoaktif iyodu içeren karışıma radyoaktif iyodinasyon için ilave edilir.

$H_2O_2$ , reaktif iyodu iyoda yükseltgeyerek bileşiğin iyotlanmasında görev alır. Organik moleküllerde değişim veya proteinlerin bozunumu,  $H_2O_2$ 'nin yalnızca düşük konsantrasyonunda ilave edildiğinde minimuma indirilebilir. Bu yöntemde % 60-85'lik verimlere ve yüksek spesifik aktivitelere ulaşılabilmektedir (Minton, 2001). Bu metodun proteinlere diğer metodlara göre daha az zarar vereceğine inanılmaktadır.

- **İodojen yöntemi**

İodojen (1,3,4,6 tetrakloro 3-6 difenil glukonil) suda çözünmez, çözgen olarak  $CH_2Cl_2$  ve  $CHCl_3$ 'de kullanılır. Bu işlemden sonra çözgen uçurularak iodojenin kabın duvarında ince film oluşturması sağlanır. Böylece oksidasyon reaktifi ile organik bileşiğin çok zayıf kontağı bile işaretleme olayının gerçekleşmesini sağlar.

İodojen, urasiller ve tiourasiller serisinin radyoaktif iyodinasyonunda kullanılmaktadır. Bu reaksiyonlarda iodojen kloramin T'den daha iyi sonuçlar

alınmıştır. Proteinler ve hücre membranları iodojen yöntemiyle radyoaktif iyotlanabilir.

Reaksiyona girmemiş iyot sephadex jel veya DEAE iyon exchange materyali kullanılarak kolon kromatografisiyle ayrılabilir. Proteinlerin bozunumu minimumdur, çünkü reaksiyon katı fazda oluşur ve iodojen suda zayıf çözünür.

- **Hunter ve Greenwood yöntemi:**

Bu yöntemde de oksidantlar çok geniş bir alanda kullanılır. Bolton ve Hunter reaktifi ise çok geniş bir şekilde kullanılmaz. Bu reaktif 4-hidroksi 5 iyodo fenil propanoik asit N-süksinimid esteridir. Reaktif serbest asiti suda yavaş bir şekilde kendi kendine hidrolizlenir. Reaksiyon pH=8.5'de tamponda ve buz banyosu sıcaklığında gerçekleştirilir (Bolton ve Hunter, 2010). Fazla tercih edilen bir yöntem değildir.

- **Erime noktasında exchange yöntemi:**

Birçok bileşik yer değiştirme yöntemi kullanılarak radyoaktif iyot ile işaretlenebilir. Erime noktasında yer değiştirme yöntemi böyle bileşikleri işaretlemek için alternatif bir yöntemdir. Bu yöntem 3 farklı şekilde uygulanabilir;

- Erime noktasında yer değiştirme yönteminin en basit şekli radyoaktif olmayan aromatik bileşiğin erimesi sırasında oluşan yer değiştirme reaksiyonudur. Bu durumda işaretlenecek organik bileşiğin erime noktası civarında kararlı olması zorunludur ve eriğin radyoaktif iyoda karşı yeterince yüksek değerde dielektrik sabitine sahip olması gerekir. İyodun buharlaşma ihtimaline karşı; vakumlu kapalı sistem kullanılmalıdır. Bu işlemde genellikle karbon tuzağı kullanılır. Çünkü iyot oda sıcaklığında bile buharlaşabilir, bunun için bu konuda dikkatli olunması gerekir.



- Diğer bir yol,  $^{124}\text{Xe}$ 'un bozunma ürünü ile düşük erime noktalı açıl türevlerinin erimesi sırasında oluşan yer değiştirme vasıtasıyla 3-iodofenilalanin, 5 ve 6-iyodotriptophan gibi bileşiklerin radyoaktif iyot ile işaretlenmesidir. Bu yöntem geri tepilme ile işaretleme ve erime yönteminin kombinasyonu olarak düşünölebilir. Düşük dielektrik sabitli bileşiklerinin bu yöntemle işaretlenmesinde ortaya çıkan güçlükleri gidermenin bir yolu asetamid ortamında erime sırasında yer değiştirmedir. Asetamidin erime noktası 82 °C'dir ve 200 °C altında kararlıdır. Reaksiyon yaklaşık 180 °C'de gerçekleşir. Bu yöntemle iyodobenzoik asidin üç izomeri işaretlenmiştir.
- Erime ile yer değiştirme reaksiyonunun üçüncü şekli yer değiştirme reaksiyonunun erime noktası altındaki bir sıcaklıkta yapılmasıdır. Substrata (organiktir) 1-4 için (amonyum sülfatın veya substratın erime noktası altında) 120-160 °C'de radyoaktif iyot ve amonyum sülfat ile birlikte ısıtılır. Bu yöntemle organik moleküllerin işaretlenmesi amonyum sülfatın  $\text{NH}_3$  kaybı ile bozunması sırasında kalan asidik ortamın yer değiştirme reaksiyonunu katalizlemesi ile olur. Bu yolla yer değiştirme ortamının asitliğinin kademeli bir şekilde arttığı ileri sürölür. Bu sonuçlar ve reaksiyon koşullarına dayanarak, kuru ortamda (çözücünün olmadığı ortam) izotop yer değiştirme reaksiyonunun kısa ömürlü radyoaktif iyot izotopları kullanımı ile diğer organik moleküllerin işaretlenmesinin mümkün olduğu ileri sürölmüştür (Ram ve Tripathi, 1990).

## 2.4 Nanoteknoloji

Nanoteknoloji maddeyi atomik ve moleküler seviyede kontrol etme bilimidir. Genel olarak 100 nm ve daha küçük boyutta malzeme ve aygıt geliştirmekle ilgilidir.

Nanoteknoloji birçok alanı kapsayan bir bilim dalıdır. Aygıt fiziği, malzeme bilimi, elektronik, kimya, biyoloji gibi dallardan bilim araştırmacıları, nanoteknoloji çalışmaları yapmaktadır.

Nanoteknolojinin tıp, elektronik ve enerji üretimi gibi alanlarda da uygulanma potansiyeli vardır. Bunun yanında, her yeni teknolojide olduğu gibi, nano

malzemelerin de sağlık ve evre üzerindeki etkileri merak edilmektedir (Hunt *et al.*, 2008).

Nanoteknoloji kelimesini ilk defa kullanan Tokyo Bilim niversitesi'nden Norio Taniguchi olmuştur. 1974'de yayınlanan bir makalede Taniguchi'nin tanımı şöyledir: "'Nano-teknoloji' genel olarak malzemelerin atom atom ya da molekül molekül işlenmesi, ayrılması, birleştirilmesi ve bozulmasıdır." Nanoteknoloji kelimesinin ortaya çıkmasından önce, fikir olarak dile getirilmiştir. Bunlardan en erkeni Richard Feynman'ın "Aşağıda Daha Çok Yer Var" adlı konuşmasıdır. Feynman bu konuşmasında atomları ve molekülleri kontrol etmeyi becerebileceğimizden, bunu yapabilmek için de yeni aletlere ihtiyacımız olduğundan bahsetmiştir. Atomik seviyede yer çekimi kuvvetinin öneminin azalacağına, Van der Waals gibi zayıf kuvvetlerin öneminin artacağını da belirtmiştir. Feynman'ın yanında bir başka bir bilim adamı ise Eric Drexler'dir. 1986'da yayınladığı "Yaratma Motorları: Nanoteknolojin Yaklaşan Devri" ve "Nanosistemler: Moleküler Mekanizmalar, Üretim ve Hesaplama" kitaplarında istediğimiz maddeyi atom atom dizerek oluşturan nanorobotların var olabileceğini ispat etmeye ve bu teknolojinin etkilerini ortaya çıkarmaya çalışmıştır. Ayrıca "Yaratma Motorları: Nanoteknolojin Yaklaşan Devri" yayınlanan ilk nanoteknoloji kitabıdır. Nanoteknolojinin gelişmesini sağlayan buluş ise Tarama Tünelleme Mikroskobu'nun keşfedilmesidir. Bu mikroskop sayesinde iletken bir yüzeydeki atomların yerleri değiştirilebiliyordu. Bu gelişmeyi 1986'da karbon nanotüplerin keşfi izledi. 2000'de ABD'nin nanoteknolojiye yatırım yapması sonucu dünya'nın birçok ülkesinde nanoteknoloji araştırmaları başlamış oldu (Peterson, 2007).

#### **2.4.1 Nanoteknolojinin avantajları**

Nanoteknolojinin önemi, atomlar ve moleküller seviyesinde (1 ila 100 nanometre skalasında) çalışarak, gelişmiş ve/veya tamamen yeni fiziksel, kimyasal, biyolojik özelliklere sahip yapılar elde edilmesine imkan sağlamasından kaynaklanmaktadır. Teknik açıdan açıklamak gerekirse malzeme özellikleri ve cihazların çalışma prensipleri, genel olarak 100 nm'den büyük boyutları temel alarak yapılan varsayımların sonucunda ortaya çıkarılmış geleneksel modelleme ve teorilere

dayanmaktadır. Kritik uzunluklar 100 nm'nin altına indiğinde ise geleneksel teori ve modeller ortaya çıkan özellikleri açıklamakta çoğu zaman yetersiz kalmaktadır (Samar *et al.*, 2007).

Daha sağlam, daha kaliteli, daha uzun ömürlü ve daha ucuz, daha hafif, daha küçük cihazlar geliştirme isteği birçok iş kolunda gözlenen eğilimlerdir. Minyatürizasyon olarak tanımlanabilecek bu eğilim birçok mühendislik çalışmasının temelini oluşturmaktadır. Minyatürizasyonun sadece kullanılan parçaların daha az yer kaplamasından çok daha önemli getirileri vardır. Minyatürizasyon üretimde daha az malzeme, daha az enerji, daha ucuz ve kolay nakliye, daha çok fonksiyon ve kullanımda kolaylık olarak uygulamada kendini göstermektedir.

20. yüzyılın ikinci yarısından itibaren birçok endüstride kullanılan toleranslar sürekli iyileştirilmiş, üstün kalite anlayışı geliştirilmiştir. Mikroteknoloji ürünü olarak tanımlayabileceğimiz parçalar otomobil, elektronik, iletişim gibi sektörlerde yaygın olarak kullanılır olmuştur. Günümüzde ise mikroteknolojilerden daha küçük teknolojilerin, nanoteknolojinin, kullanımını yaygınlaşmaktadır (Gordon *et al.*, 2007).

Nanoteknoloji sayesinde sanayide, bilişim teknolojilerinde, sağlık sektöründe ve daha birçok alanda yeni ürünler geliştirilecek, günümüzün üretim süreçleri ve yöntemleri değişecektir. Bu teknolojiye yatırım yapılan ülkelerde ekonomik değerler yaratılacak ve toplumların yaşam kalitesi gelişecektir.

#### **2.4.2 Nanobiyoteknolojinin kanser araştırmalarında kullanımı**

Kanser hücrelerinin sağlıklı hücrelere zarar vermeden öldürülmesi üzerine çok yeni ve farklı metodlar üstünde laboratuvarlarda çok ileri düzeyde araştırmalar sürdürülmektedir. Örneğin, bakteri DNA'sinin bizimkinden yapısal farklılıklar gösterdiğinin keşfiyle DNA moleküllerinin bağışıklık sistemi üzerine olan uyarıcı etkisinden yararlanarak yeni ilaçlar tasarlanmaktadır. Bu ilaçları yeni jenerasyon aşı geliştirmekten, antikanser ve anti allerjik uygulamalara ve aşısı

olmayan hastalıklardan immün koruyucu ajan olarak kullanmaya kadar geniş bir yelpazedeki araştırmalar başlamıştır.

Sadece kanserli dokulara veya civarına kontrollü bir şekilde DNA&rsquo; yı ve istendiğinde de kemoterapi ajanını da birlikte salabilen nanokeseceklerle antikanser terapileri geliştirilmekte ve bunların deney hayvanlarındaki etkinlikleri tayin edilmektedir. Bu terapi yöntemi ile, insanda baş ve boyun da oluşan ve çok hızlı bir şekilde ilerleyebilen bu kütle kanseri modeli farelerde %90 DNA&rsquo; ın üzerinde bir başarıyla ortadan kaldırılabilmektedir (Ranjita *et al.*, 2010).

### **2.4.3 Nanoparçacık nedir ve niçin kullanılır**

Nanoparçacık, 100 nm'den daha küçük bir boyuta sahip mikroskobik parçacıklarıdır. Günümüzde özellikle biyomedikal, optik ve elektronik gibi sahalarda çok çeşitli potansiyel uygulamaları olduğu için nanoparçacıklar üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bu büyük ilginin en önemli sebebi kuşkusuz ki bu parçacıkların atomik yapılarla büyük kümelenmiş yapılar arasında bir köprü oluşturmasıdır. Büyük kümelenmiş yapılar boyutlara bağlı kalmaksızın belli fiziksel özelliklere sahiptirler fakat nano boyuttaki taneciklerde böyle bir durum söz konusu değildir, bir başka ifadeyle nano boyutuna bağlı olarak özellikleri değişebilmektedir.

Bu özellikten dolayı maddelerin yüzeylerindeki atomların yüzdesi büyük önem kazanmaktadır. Büyük kümelenmiş yapılarda ise maddelerin yüzeylerindeki atomların yüzdesi çok daha azdır. Bu açıdan düşünürsek katalizör sentezinde nano boyutta taneciklerin kullanılması daha avantajlı gözükmetedir. Çünkü nano boyuttaki taneciklerle oluşturulacak katalizörlerin aktif yüzey alanı, kümelenmiş daha büyük taneciklere göre çok daha geniştir. Bu amaçla büyük kümelenmiş yapılar yerine daha küçük boyutta (nano boyutta) tanecikler sentezlenmeli ve kullanılmalıdır (Fritz *et al.*, 2010).

#### 2.4.4 Nanoparçacıkların elde ediliş yöntemleri

Nano boyuttaki yapıların elde edilmesinde iki ana yöntem bulunmaktadır. Aşağıdan yukarıya (bottom-up) ve yukarıdan aşağıya (top down) olarak adlandırılan bu iki yaklaşımı şu şekilde özetleyebiliriz.

##### 1-Aşağıdan Yukarı (Bottom-up):

Aşağıdan yukarıya yaklaşımı (küçükten-büyüğe), moleküler nanoteknolojiyi belirtir ve organik veya anorganik yapıları, maddenin en temel birimi olan atomlardan başlayarak atom atom, molekül molekül inşa edilmesi yöntemini ifade eder (Levins *et al.*, 2006).

##### 2-Yukarıdan Aşağı (Top-down):

Yukarıdan aşağıya yaklaşımı (büyükten-küçüğe), makineler, asitler ve benzeri mekanik ve kimyasal yöntemler kullanılarak nano yapıların fabrikasyonu ve imal edilmesi yöntemlerini ifade eder (Das *et al.*, 2007). Teknolojinin bu günkü seviyesi sebebi ile yapılan çalışmaların birçoğu yukarıdan aşağıya klasmanında değerlendirilir.

### 2.5 Kalite Kontrolde Kullanılan Kromatografik Yöntemler

Inaktif (CdSe/CdS kuantum dot nanoparçacıklar, PHA-L ve QD nanoparçacıklar ile konjuge edilmiş PHA-L) ve aktif bileşenlerin ( $^{125}\text{I}$  ile işaretlenmiş inaktif örnekler) kalite kontrolünde kullanılan yöntemler ince tabaka kromatografisi (TLC), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve ince tabaka radyokromatografisidir.

#### 2.5.1 İnce tabaka kromatografisi (TLC)

Hareketli bir faz ile sabit bir fazın temas etmesi ile maddelerin yer değiştirme hızlarının farklılaştırılarak ayrılmasını sağlayan tekniğe kromatografi denir. Hareketli

faz, sıvı ya da gaz karışımından meydana gelebilir. Sabit faz ise katı ya da katı madde tarafından tutulan bir sıvıdır. Ayırmada etkin olan maddelerine göre adsorbsiyon, dağılma, iyon değişimi ve jel kromatografisi olarak dörde ayrılır. Hareketli ve sabit fazın cinsine göre de kağıt, ince tabaka, kolon ve gaz kromatografisi olarak dörde ayrılır.

İnce tabaka radyokromatografisi (TLRC) yönteminde; cam bir levhanın üzeri, toz haline getirilmiş adsorbanın sulu homojen tabakası ile kaplanır. Cam levhanın yüzeyinde, adsorban etkisini sağlamak için silikajel ya da alüminyum oksit gibi çeşitli maddeler kullanılır. Kaplanan levha fırında kurutulur ve desikatörde saklanır. Bu şekilde hazırlanmış levhalar, kağıt kromatografisindeki kağıtlar gibi kullanılabilirler (Vogel *et al.*, 2010).

İnce tabaka radyokromatografisinde çok çeşitli kromatografik maddeler kullanılabilir. Önemli olan madde ince tabaka levhasına ekilirken, çok az ya da çok fazla ekilmemesidir. Örnekler eklendikten sonra uygulama noktası çözgene değmeyecek şekilde levhalar küvetlere yerleştirilir ve sıvı fazın yürümesi bittikten sonra radyoTLC (bioscan 2000) cihazı ile sayım alınır. Cihaz sayım yoğunluğunun bulunduğu pozisyonla birlikte değerlendirerek kromatogramı oluşturur. Kromatogramdan yola çıkarak radyoaktif örneğin  $R_f$  değeri bu veriden de bağlanma verimi elde edilir (Reich ve Schibli, 2007).

### 2.5.2 Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)

HPLC genelde uçucu olmayan organiklerin analizinde kullanılan bir cihazdır. Bu yöntemle aminoasitlerin, proteinlerin, nükleik asitlerin, hidrokarbonların, yağ asitlerinin, karbohidratların, fenollerin, pestisitlerin ve antibiyotiklerin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Burada taşıyıcı sıvı, sisteme yaklaşık 40 atm basınçta verilir. Bazen kolon öncesinde bir ön kolon bulunabilir; bu ön kolonun amacı mevcut analizin gerçekleştirildiği kolonun ömrünü uzatmak ve girişim yapabilecek kirletici parametreleri önlemektir (Lloyd *et al.*, 2006).

HPLC de analitik kolondan çıkan numuneler dedektörde tutulur ve tayin edilerek kaydedilir. Ölçüm aralığının hassasiyetine ve tespit edilecek bileşiğin türüne göre uygun taşıyıcı solvent, kolon ve detektör tasarımı yapılmalıdır. Kullanılan solventler su, hekzan veya metanol gibi polar ve apolar solventlerin karışımı olabilir (Macherey-Nagel, 2006).

HPLC'de kolon uzunluğu 10 ile 30 cm arasında değişir. Kolon çapları ise 4-10 mm arasındadır, kolon içinde kullanılan dolgu malzemesi üniform yapıda ve çapı ise 3-10 cm arasındadır. Genelde kullanılan dolgu malzemesi inert karakterdeki silika türündendir (Ahuja, 2006).

### 2.5.3 Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

İnsan gözünün çok ince ayrıntıları görebilme olanağı sınırlıdır. Bu nedenle görüntü iletimini sağlayan ışık yollarının mercekle değiştirilerek, daha küçük ayrıntıların görülebilmesine olanak sağlayan optik cihazlar geliştirilmiştir. Ancak bu cihazlar, gerek büyütme miktarlarının sınırlı oluşu gerekse elde edilen görüntü üzerinde işlem yapma imkânının olmayışı nedeniyle araştırmacıları bu temel üzerinde yeni sistemler geliştirmeye itmiştir. Elektronik ve optik sistemlerin birlikte kullanımı ile yüksek büyütme üzerinde işlem ve analizler yapılabilen görüntülerin elde edildiği cihazlar geliştirilmiştir.

Elektrooptik prensipler çerçevesinde tasarlanmış taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscope), bu amaca hizmet eden cihazlardan birisidir. Taramalı Elektron Mikroskobu, birçok dalda araştırma-geliştirme çalışmalarında kullanımı yanında, mikro elektronikte yonga üretiminde, sanayinin değişik kollarında hata analizlerinde, biyolojik bilimlerde, tıp ve kriminal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. İlk ticari taramalı elektron mikroskobu 1965'de kullanılmaya başlanmış, bundan sonra teknik gelişmeler birbirini izlemiştir (Flegler *et al.*, 1993).

Taramalı Elektron Mikroskobunda (SEM) görüntü, yüksek voltaj ile hızlandırılmış elektronların numune üzerine odaklanması, bu elektron demetinin numune yüzeyinde taratılması sırasında elektron ve numune atomları arasında oluşan çeşitli girişimler sonucunda meydana gelen etkilerin uygun algılayıcılarda toplanması ve sinyal güçlendiricilerinden geçirildikten sonra bir katot ışınları tüpünün ekranına aktarılmasıyla elde edilir.

Modern sistemlerde bu algılayıcılardan gelen sinyaller dijital sinyallere çevrilip bilgisayar monitörüne verilmektedir. Gerek ayırım gücü, gerek odak derinliği, gerekse görüntü ve analizi birleştirebilme özelliği taramalı elektron mikroskobunun kullanım alanını genişletmektedir. Örneğin 1000X büyütmede optik mikroskobun odak derinliği yalnızca 0.1  $\mu\text{m}$  iken taramalı elektron mikroskobunun odak derinliği 30  $\mu\text{m}$ 'dir (Brundle *et al.*, 1992). Günümüzde modern taramalı elektron mikroskoplarının ayırım gücü 0.05 nm' ye kadar inmiştir. Büyütme miktarı ise 5X - 300 000X arasında değişmektedir.



## 2.6 Hesapsal Kimya

Teorik Kimya, kimyayı matematiksel yöntemlerle tanımlar. Kimyasal yapıları ve tepkimeleri temel fizik kanunlarına dayanarak açıklamaya çalışır. Hesapsal kimya ise teorik kimyacılar tarafından geliştirilmiş matematiksel yöntemleri uygular ve elde edilen sonuçları yorumlar, böylece deneysel kimya ile teorik kimya arasında bir köprü kurar. Hesapsal kimya ile sadece kararlı molekülleri değil, aynı zamanda kısa ömürlü, kararsız ara ürünler ve geçiş hallerini de çalışmak mümkün olur. Bu şekilde, gözlem yolu ile elde edilmesi mümkün olmayan moleküller ve tepkimeler hakkında bilgi sahibi olunabilir. Bu hesaplamalar ile elde edilen nitel veya nicel sonuçlar, kimyacıların çok faydalı öngörülerde bulunmasını sağlar (Smith *et al.*, 1997).

Deneysel çalışmalarını desteklemek ya da deneysel çalışma yapmadan elde edilecek sonuçları önceden tahmin edebilmek amacıyla hesaplamalı yöntemleri kullanacak olan araştırmacılar için üç farklı seçenek vardır. Bunlar; moleküler mekanik yöntemi (MM), ab initio yöntemi ve yarı-ampirik (semi empirical) yöntemlerdir.

### 2.6.1 Hesapsal yöntemler

Aşağıda hesapsal yöntemlerle ilgili genel bilgi verilmiştir.

- **Moleküler mekanik yöntemleri**

Bir kimyasal sistemde atomlar arasındaki etkileşimler klasik mekanik kuralları ile tanımlanır. AMBER, CHARMM ve HYPERCHEM moleküler mekanik programlarından bazılarıdır. Bu yöntem oldukça hızlıdır ve temel haldeki sistemin enerjisini tam olarak hesaplayabilir. Enzimler gibi büyük yapıları sistemler için bile tepkime ısı ve konformasyon kararlılıkları gibi nicelikler hesaplanabilir. Ancak, bu yöntemle elektronik yapıya bağlı olan özellikler elde edilemez (Young, 2001).

- **Ab initio yöntemleri**

Kuantum mekaniğine dayanır, bu yöntemler ile molekül yapısı ve buna bağlı özellikler hesaplanabilir. Hesaplama süresi moleküler mekanik yöntemlere göre çok daha uzundur. GAUSSIAN, GAMESS HYPERCHEM, CACHE v.s. ab initio yöntemlerinin kullanıldığı bazı paket programlardır.

Ab initio latince “başlangıçtan itibaren” anlamına gelir. Bu yöntem MM ve yarı ampirik yöntemlerden farklıdır, deneysel parametre kullanmaz. Ab initio hesaplamalarında iki farklı matematiksel yaklaşım kullanılır; kendi içinde tutarlı alan teorisi (Hartree-Fock Self Consistent Field, HF-SCF) ve yoğunluk fonksiyon teorisi (Density Functional Theory, DFT). HF modelinde, elektron-elektron etkileşimleri için ortalama bir potansiyel temel alınır.

Bu yaklaşım, molekül frekanslarının hesaplanması ve molekül geometrisinin tayini için uygundur. DFT modelinde, molekül dalga fonksiyonları yerine, elektron olasılık yoğunluğu ( $\rho$ ) hesaplanır, molekül özelliklerinin tayininde daha iyi sonuçlar verir (Young, 2001).

- **Yarı ampirik (semi-empirik) yöntemler**

Ab initio ve MM yöntemleri arasında yer alır ve kuantum mekaniğini kullanır. Bu yöntemlerde, molekül özelliklerin deneysel değerlere yakın sonuçlar vereceği parametreler mevcuttur. Schrödinger eşitliğinin yaklaşık çözümünü elde etmek için o sisteme uygun parametrelerin kullanılması gerekir. Etkileşim integralleri için yaklaşık fonksiyonların kullanılmasıyla hesaplama süresi ab initio yöntemlerinden çok daha kısadır (Young, 2001).

## 2.7 Moleküler Modelleme

Hesapsal (Computational) Kimya'nın en önemli uygulamalarından biridir. Molekül Modelleme kısaca moleküllerin 3 boyutlu yapılarını ve tepkimelerini bulmak ve göstermek için kullanılan yöntemdir (Cramer, 2002).

Kağıt üzerinde moleküllerin yapılarını çizmek, mekanizmalarını göstermek için en basit molekül modellemedir. Kağıt üzerinde iki boyutlu ve gerçeğe pek yakın olmayan çizimler dışında, bilgisayarla Schrödinger denkleminin istenilen moleküller için değişik yöntemlerle çözülmesi ve bu yöntemle molekülün 3 boyutlu yapısının, elektronik özelliklerinin aydınlatılmasına, gerçek moleküler modelleme diyebiliriz. Modelleme için günümüzde birçok program mevcuttur. Schrödinger denkleminin farklı yaklaşımlarla çözülmesi sonucu farklı programlar ortaya çıkmıştır (Ramachandran *et al.*, 2009).

Moleküler modellemenin oldukça sık olarak kullanıldığı alanlardan biri de, ilaç tasarımıdır. İlaçların etki mekanizmalarının incelenmesinde oldukça sık olarak kullanılır. İlaçların yanı sıra, vücuttaki birçok biyokimyasal tepkimenin mekanizmalarının açıklanmasında, proteinlerin ve enzimlerin 3 boyutlu yapılarının bulunmasında da kullanılır.

Son zamanların oldukça gözde araştırma konularındandır ve 1998 de Pople ve Kohn'a computational yöntemlerin ve moleküler modellemenin geliştirilmesi konusunda yaptıkları katkılardan dolayı Nobel Ödülü verilmiştir (Leach, 2001).

### 2.7.1 Moleküler modelleme ile proteinlerin yapı tayini

Biyoinformatik proteinlerin sahip oldukları görevleri belirleyebilmek, özelliklerini istenilen yönde değiştirebilmek ve proteinlerle ilgili daha birçok konuya ışık tutabilmek için proteinlerin 3 boyutlu yapılarını belirlemeye çalışır (Young, 2001).

Bilindiği gibi temelde proteinler peptid bağları ile birbirine bağlanmış çok sayıda aminoasitten oluşurlar. Bu yapı proteinlerin birincil yapısıdır. Aminoasitlerin özellikleri, hangi sırada dizildikleri proteinlerin ikincil yapısının oluşmasında önem taşır. İkincil yapı hidrojen bağları ile bir arada tutulan katlanmalardan oluşur:  $\alpha$  (alfa) sarmal ve  $\beta$  (beta) tabaka. Üçüncül yapı tek bir polipeptid molekülünün tüm yapısıdır. Disülfit bağları, hidrojen bağları, tuz bağları gibi bağlar ile kararlı hale getirilen yapının oluşmasında hidrofobik etkileşimler de rol oynar. Post-translasyonel modifikasyonlarla üçüncül yapı tamamlanır. Dördüncül yapı ise birden fazla polipeptid molekülünün etkileşimi ile oluşan yapıdır (Cerqueira *et al.*, 2009).

### **Birincil yapı:**

Proteinlerin birincil yapıları deneysel yöntemlerle çözümlenebildiği gibi, DNA dizisinden yararlanılarak tahmini olarak da belirlenebilmektedir. Aminoasit kodunun organizma türleri arasında farklılık göstermesi birincil yapı tahminini zorlaştıran etmendir.

### **İkincil yapı:**

Üç boyutlu yapıyı oluşturmada kullanılabilecek bir model bulunmadığında bir sonraki adım proteinin ikincil yapılarını tahmin etmektir. Veri eksikliği nedeniyle ikincil yapı tahmini ilk ortaya çıktığı dönemde homolog dizi aileleri yerine tek bir polipeptid üstünde uygulanmıştır. İlk dönem yöntemlerin doğruluk oranı %50–60 civarındadır. Tek bir diziye dayanarak yapılan ikincil tahmin yöntemlerinden en ünlüleri Chou–Fasman ve GOR (Garnier, Osguthorpe, Robson)'dur. Levin'in “Çoklu Dizi Analizi” yöntemini de kullanması bu oranın %70 olmasını sağlamıştır. İkincil yapı tahminindeki en büyük zorluk proteinin sahip olduğu transmembran bölgelerdir, bu nedenle önce transmembran bölgelere ait dizilerin belirlenmesi önemlidir.

### **Üçüncül yapı:**

Proteinlerin 3 boyutlu yapılarının çözülmesi için bazı deneysel yöntemler vardır. Uygulanabilirlikleri zor olmakla beraber, proteinlerin yapılarının doğru bir şekilde belirlenebilmesini sağlarlar. X-ışını kristalografisi ve NMR (Nuclear Magnetic Resonance) spektroskopisi bu deneysel yöntemlerdendir. Proteinlerin yapılarının deneysel yöntemlerle çözülemediği durumlarda proteinlerin üç boyutlu yapılarını tahmin edebilmek için kullanılan 3 yöntem vardır: Ab initio, Homoloji Modelleme ve giydirme yoluyla benzetme.

### **Ab initio:**

Yalnızca diziye bağlı olarak proteinlerin katlanmalarını (üçüncül yapı) belirlemeye olanak tanıyan bir yöntemdir. Ancak diğer modelleme yöntemlerine göre çok zor ve genel bir yaklaşıma sahiptir. Yöntemin herhangi bir homoloji gereksinimi yoktur.

### **Katlanmaların belirlenmesi:**

Pek çok yaklaşım mevcuttur. Ancak temelde amaç bir dizinin oluşturacağı en iyi katlanmayı belirlemekten çok katlanmanın bir diziye ne kadar iyi uyduğunu bulmaktır. Bilinen protein yapılarına ait bilgiler, ikincil yapı tahminleri dikkate alınarak kullanılacak “giydirme yoluyla benzetme” yöntemleri daha etkili sonuçlar verecektir.

### **Homoloji modelleme:**

Karşılaştırmalı modelleme olarak da bilinir. Bu yöntemin kullanılması proteinlerin 3 boyutlu model sayısında önemli artışlar sağlamıştır. Yöntemin uygulanabilmesi için hedef diziye (3 boyutlu yapısı belirlenecek dizi) homoloji gösteren, yapısı belirlenmiş proteinlerin varlığı şarttır.

**4 temel basamak vardır:**

1. Kalıp dizinin seçilmesi
2. Kalıp dizi ile hedef diziyi sıralamak (alignment)
3. Modeli tasarlamak
  - a. Korunmuş bölgeler
  - b. Değişken bölgeler
4. Modelde düzeltmeler yapmak, modeli değerlendirmek.

**Kalıp dizi veya dizilerin seçilmesinde iki ön koşul vardır:**

- 1) Kalıp dizi(ler) ile hedef dizi arasında en az % 25-30 homoloji olmalıdır.
- 2) Kalıp dizi veya dizilerin yapısının deneysel yöntemlerle (X ray kristallografi, NMR) çözülmüş olması gerekmektedir. İlk iki basamak (kalıp dizinin seçilmesi ve sıralama) genellikle bir arada yapılmaktadır. Oluşturulmuş protein veritabanları araştırmacılara bu konuda büyük kolaylıklar sağlamaktadır. Veritabanları arama sonucunda en yüksek homoloji gösteren dizileri, bu dizilerin kalıp dizi ile sıralamasını ve yapısı çözülmüş dizileri gösterebilir. Protein Data Bank (PDB) yapısı çözülmüş proteinlere ait bilgilerin depolandığı veritabanıdır, BLAST kullanılarak yapılacak aramada bu veritabanına erişebilmek mümkündür. PSI-BLAST (BLAST veritabanında oluşturulmuş, arama sırasında seçilebilecek bir algoritmadır) gibi çoklu dizi sıralaması yöntemi kullanılarak oluşturulmuş veritabanları daha duyarlı sonuçlar verirler. Bu nedenle kalıp seçiminde çoklu dizi sıralaması, ikili dizi sıralaması yönteminden daha çok tercih edilir. Arama sonuçlarında hedef diziye ait birden fazla homolog bulunması modelleme için kolaylık sağlayacak bir durumdur. En yüksek homolojiye sahip en fazla 10 dizi seçilir, bunlar arasından en iyi kalıp adayına referans denir. Kalıp diziler belirlendikten sonra sıra dizi sıralamasındadır. Sıralama işleminde yapılan benzer bölgeleri eşleştirmek ve arada kalan boşlukları (gap) belirtmektir. Veritabanları arama sonuçlarında bu sıralamayı bize göstermektedir. İki dizi

arasındaki homoloji % 40'tan fazla ise genellikle iyi bir sıralama elde edilebilir, ama homoloji % 40'tan az ise boşluklar kalır. Sırlamadan sonra model tasarımına geçmek üzere korunmuş ve değişken bölgelere karar verilir. Korunmuş bölgelerin koordinatları çıkarılarak omurga belirlenir (aminoasitlerin  $\alpha$ C'larının yerleşimi). Birden fazla kalıp olması durumunda en yüksek benzerliğin görüldüğü bölgeler kalıpların içinden seçilerek bir araya getirilir ve omurga oluşturulur. Yan zincirler omurgaya yerleştirilirken benzer bölgeler için kalıptaki korunmuş bölgelerden yararlanır, korunmuş bölgelerdeki farklılıklar için ise rotamer olarak bilinen genellikle korunmuş konformasyon izomerlerinden yararlanır. Değişken bölgeler için kalıpta bilgi olmadığından kalıptan yararlanılamaz. Bu durumda yeniden veritabanı araması yapmak gerekir. Temelde hedef dizinin tamamını aratmak gibi bir işlemdir. Fakat bu sefer sadece hedef dizideki değişken bölgeler veritabanlarında aratılarak benzer yapılar bulunur. Benzer yapılardan alınan  $\alpha$ C koordinatları ve yan zincir bilgisi korunmuş bölgelerde olduğu gibi elde edilerek korunmuş bölgelerden oluşturulan omurga yapısı ile birleştirilir. İlk üç basamaktan sonra oluşturulan modellerin stereo kimyası zayıftır. Bu nedenle modelin bağ geometrisi yeniden değerlendirilmeli ve uygun olmayan bağlar kaldırılmalıdır. Bu işlemi yerine getirmek üzere tasarlanan programlar enerji minimizasyonundan yararlanırlar. CHARMM, AMBER veya GROMOS bu programlardan bazılarıdır (Cerqueira *et al.*, 2009).

### 3. MATERYAL VE METOD

Bu bölümde çalışmada kullanılan materyal ve metodlar yer almaktadır.

#### 3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

Aşağıda çalışmada kullanılan kimyasallar ve cihazlar ile ilgili bilgi verilmiştir.

##### 3.1.1 Kullanılan kimyasallar

- Hidroklorik asit (HCl) (Merck)
- Sodyumhidroksit (NaOH) (Merck)
- Sodyum Sülfür (Na<sub>2</sub>S) (Sigma)
- Sülfirik asit (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (Merck)
- Trisodyumyumsitratdihidrat (Sigma)
- Selenyum tetra klorür (Sigma)
- Serum Fizyolojik (SF) (% 0.9 NaCl çözeltisi) (Eczacıbaşı-Baxter H. Ü. San. ve Tic. A.Ş.)
- İodojen (1,3,4,6-tetrakloro-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -difenilglukoril) (Sigma)
- Sodyumborhidrür (NaBH<sub>4</sub>) (Sigma)
- Kadmiyum asetat (Cd(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O) (Sigma)
- 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimide hidrokloride (EDC)
- Tris-HCl Tamponu (PH=9)
- Etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) (Merck)



- Diklorometan ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) (Merck)
- N-bütanol ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{OH}$ ) (Merck)
- İzopropil Alkol ( $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ ) (Merck)
- Asetik asit ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) (Merck)
- Phytohemagglutinin\_L (PHA-L)
- Amonyak ( $\text{NH}_3$ ) (Merck)
- MCF-7 meme epiteli (adenokarsinoma) (American Type Culture Collection, Rockville, MD, ABD)
- PBS (Bio.Ind.)
- Azot gazı (Habaş)
- Ripa (Sigma)
- İyot-125 ( $\text{Na}^{125}\text{I}$ ) (Institute of isotopes Co., Ltd., Budapest)
- ITLC-SG Silika kaplı plastik şeritler (Merck-5554)

### 3.1.2 Kullanılan cihazlar

- TLC küvetleri (Sigma) (Ege Üni. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Su banyosu Nüve BM 302 (Ege Üni. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- RadyoTLC (Bioscan 2000) (Ege Üni. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- UV lamba (G15T8 15W Germicidal Lamp UV-C) (Ege Üni. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)

- HPLC Shimadzu (LC-10Atvp quaterner pompalı, SPD-10AV UV dedektörlü, FRC-10A fraksiyonlama kolektörü) (Ege Üni. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)

### 3.2 Moleküler Modelleme

Bu bölümde çalışmada kullanılan moleküler modelleme yöntemlerine yer verilmiştir.

#### 3.2.1 Yarı ampirik (semi-empirical) yöntemler

Ab initio ve MM yöntemleri arasında yer alır ve kuantum mekaniğini kullanır. Bu yöntemlerde, molekül özelliklerin deneysel değerlere yakın sonuçlar vereceği parametreler mevcuttur. Schrödinger eşitliğinin yaklaşık çözümünü elde etmek için o sisteme uygun parametrelerin kullanılması gerekir. Etkileşim integralleri için yaklaşık fonksiyonların kullanılmasıyla hesaplama süresi ab initio yöntemlerinden çok daha kısadır.

#### PM3

Parameterized Method 3, olarak ta bilinen bu metod 1980'lerin sonunda Jimmy Stewart tarafından geliştirilmiştir. Bu hesaplamaların kesinlik ve doğruluğunun artmasına olanak sağlamıştır. PM3 methodu parametrize edilen her atom için 18 farklı parametre içermektedir. Bu parametrelerden 11 tanesi hidrojenler için mevcuttur. Kullanışlı ve hızlı olmasından ötürü PM3 metodu hesapsal kimya alanında yaygın olarak kullanılmaktadır.

PM3 method atomlar arasındaki itme kuvvetini hesaplarken, 2 gaussian fonksiyonu kullanır. AM1 aynı işlemi yaparken element başına 1-4 arasında gaussian fonksiyonu kullanır, bu da hesaplamayı daha karmaşık hale getirir.

## AM1

Austin Method 1 (AM1), Michael Dewar ve çalışanları tarafından 1985'te geliştirilmiştir. Bu yöntemde diferansiyel diatomik örtüşme integrali ihmal edilir. AM1 yöntemi atomdan atoma itme kuvvetlerin hesaplanmasında kullanılan pratik bir yöntemdir. PM3'den farklı olarak parametrize edilen her atom için 10-19 arasında parametre içermektedir. AM1 hesaplamalarının sonuçları bazen moleküler modellemede kuvvet alanlarının parametrizasyonu için başlangıç noktası olarak kullanılabilir. Bu yönüyle kullanışlı bir yöntemdir.

Bu çalışmada SPARTAN programını kullanarak yukarıda bahsetmiş olduğumuz yarı-ampirik metodlara dayanan PM3 ve AM1 yöntemleri ile ayrı ayrı molekülümüzü (PHA-L) ve substratımızı (sialik asit) optimize ettik. Optimizasyon sonrası SPARTAN programı tarafından molekül ve substrat için oluşturulan arşiv dosyasından PM3 ve AM1 yöntemlerine göre ayrı ayrı standart oluşum enerjilerini hesapladık. Bu aşamadan sonra optimize molekül ve substratımızı farklı geometrik pozisyonlarda etkileştirdik ve bu pozisyonların etkileşimleri sonucunda açığa çıkan enerjiyi hesaplayarak molekül ve substrat arasındaki etkileşimi gösterdik.

### 3.3 Deneysel Sentez Basamakları

Çalışmada kullanılan deneysel basamaklar CdSe/CdS kuantum dot nanoparçacıklarının sentezlenmesi, PHA-L'nin hazırlanması, PHA-L'nin CdSe/CdS ile konjugasyonu, 125I ile işaretleme prosedürü ve iodojen metodu, kalite kontrol yöntemleri, MCF-7 hücreleri ile yapılan hücre kültürü çalışmaları, bioafinite testi ve istatistiksel hesaplamaları içermektedir.

### 3.3.1 CdSe/CdS kuantum dot nanoparçacıklarının sentezlenmesi

- **1. Basamak:**

Bu basamakta NaHSe'nin renksiz etanol çözeltisi hazırlanır. Bunun için 7.5 mg sodyumborhidrür ( $\text{NaBH}_4$ ) ve 3.5 mg selenyum tetra klorür (5 mL distile su içinde çözüldü) balon içerisine aktarıldı. Çözeltinin üzerine 1.5 mL mutlak etanol ilave edildi. Azot ( $\text{N}_2$ ) gazı altında, 45 °C sıcaklıkta, karıştırıcı üzerinde 15 dakika reaksiyonun sonlanması beklendi (köpürmenin durduğu bu süre sonunda gözlendi) ve istenilen çözelti elde edilmiş oldu.

- **2. Basamak:**

1. Adım :

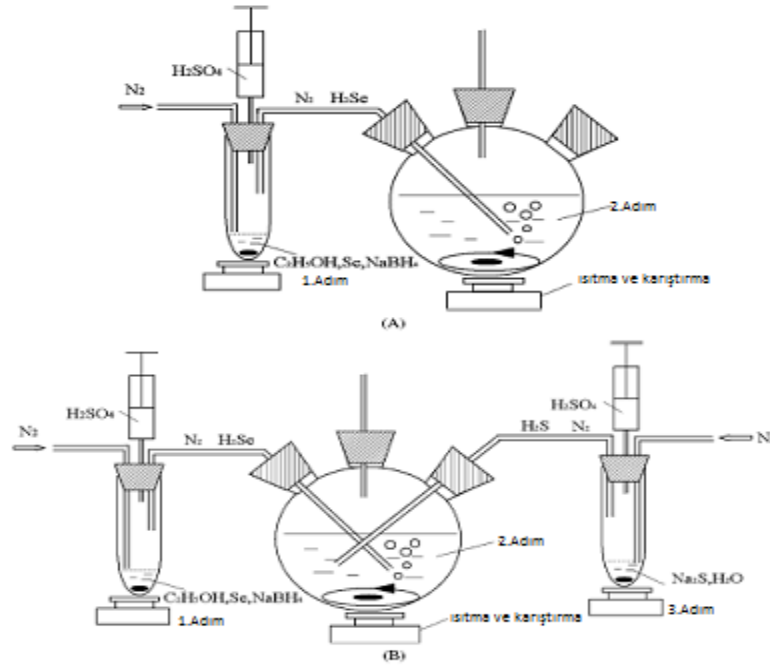
$\text{N}_2$  gazı altında, karıştırıcı üzerinde; NaHSe'nin etanol çözeltisi 50 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ile (3-4 mL) dilüe edilerek  $\text{H}_2\text{Se}$  gazı elde edildi.

2. Adım :

0.0710 g Trisodyumsitratdihidrat tartılarak, 50 mL Tris-HCL tamponunda (pH=9) çözüldü. Karıştırıcı üzerinde 0.266 g  $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ilave edildi. Reaksiyon 75 °C sıcaklıkta gerçekleştirildi.

3. Adım :

Sodyum sülfür ( $\text{Na}_2\text{S}$ )'ün sülfürik asit ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (3-4 mL) ile dilüe edilmesiyle  $\text{H}_2\text{S}$  gazı oluşturuldu. Reaksiyon oda sıcaklığında (25 °C) gerçekleştirildi.



Şekil 3.1 CdSe/CdS kuantum dot nanopartiküllerinin hazırlanmasında kullanılan düzenek (Babu et al., 2007).

### 3.3.2 Lektin (PHA-L) solüsyonunun hazırlanması

Liyofilizasyon ve sterilizasyon işlemlerine tabi tutulmuş kuru ve steril lektin (PHA-L) kullanılmıştır. Kuru ve steril halde bulunan PHA-L'den 2 mg alıp 50  $\mu$ L distile su içerisinde çözüldü ve stok solüsyon elde edildi. Saklama süresi boyunca agregatlaşmayı engellemek için stok her tüpe 2  $\mu$ L gelecek şekilde 25 eş tüpe dağıtılarak saklandı.

### 3.3.3 PHA-L'nin CdSe/CdS kuantum dot nanoparçacıklarına bağlanması

1 mL kuantum dot solüsyonundan alındı. Üzerine 0.5 mg ECD eklendi ve karışım soğuk oda da 2 saat karışmaya bırakıldı. 2 saat sonunda elde edilen solüsyonun üzerine hazırlanmış olduğumuz lektin stoğundan 5  $\mu$ L alınarak ilave edildi. Bu işlemin sonunda elde edilen karışım tekrar soğuk oda da 1 saat karışmaya bırakıldı. 1 saatin sonunda elde edilen solüsyon santrifüj edildi. Üstteki sıvı faz

santrifüj işleminden sonra uzaklaştırıldı. Bu işlemden sonra elde edilen karışım ortamdaki safsızlıkları uzaklaştırmak için 2 kez yıkama işlemine tabi tutuldu. Yıkama işleminin ardından kuantum dot nanoparçacıklarına bağlanmış lektin elde edildi.

### **3.4 İşaretleme Prosedürü**

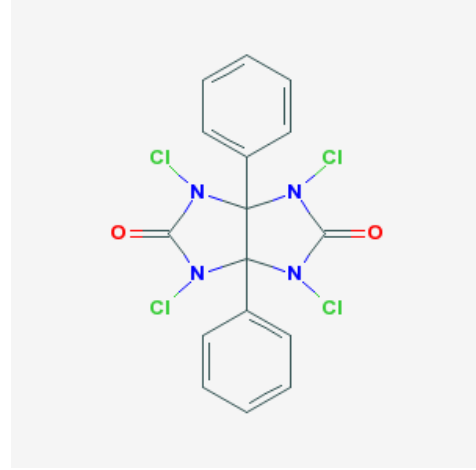
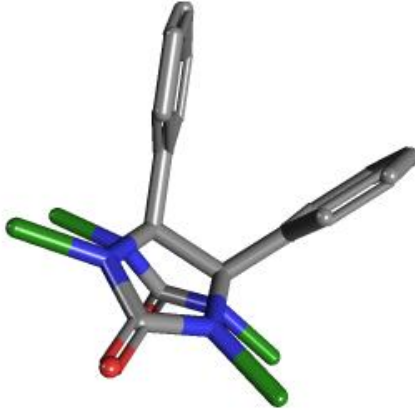
Bu bölümde iodojen metodu kullanılarak PHA-L ve PHA-L-CdSe/CdS bileşikleri <sup>125</sup>I radyonüklidi ile işaretlenmesine yer verilmiştir.

#### **3.4.1 İodojen yönteminde kullanılacak olan iodojen tüplerinin hazırlanması**

İodojen, 1, 3, 4, 6-1,3,4,6 tetrakloro 3-6 difenil glukonil açık isimli bir yükseltgeyici ajandır. İodojenin suda çözünmemesine rağmen sulu çözeltilerde iodojen iyodun heterojen olarak yükseltgenmesini sağlayarak hızlı iyodinasyona olanak sağlar. İyodun yükseltgenmesi, elektrofilik süstitüsyon ile yer değiştirme reaksiyonuna dayanır. Yükseltgenme reaksiyonunda iodojenin yapısında bulunan iki karbonil grubunun rol oynadığı düşünülmektedir.

İodojenin kloroformda veya diklorometanda çözünmesi ve çözgenin uçurulması ile çözeltinin hazırlandığı kabın yüzeyi iodojen ile kaplanmış olur. Bu ortamda etkileşime sokulan lektin gibi büyük glikoprotein yapısındaki moleküller ortamda bulunan yükseltgenmiş iyot iyonları ile yapılarında bulundukları tirozin gibi aminoasitler ile elektrofilik süstitüsyon reaksiyonu üzerinden etkileşirler.

Bu ortamda başlatılan reaksiyon gerekli inkübasyon süresinin ardından çözeltinin ortamdaki uzaklaştırılması ile ( başka bir kaba aktararak ) sonlandırılır.



Şekil 3.2 İdojenin 3D görüntüsü (solda) ve moleküler yapısı.

### 3.4.2 PHA-L'nin $^{125}\text{I}$ ile işaretlenmesi

Daha önceden PHA-L için hazırlamış olduğumuz stoktan 5  $\mu\text{L}$  alınıp ve 100  $\mu\text{l}$  bidistile su ile seyreltildi. Üzerine aktivitesi 33  $\mu\text{Ci}$ 'ye karşılık gelen 1.8  $\mu\text{L}$   $\text{Na}^{125}\text{I}$  ilave edildi. Bu işlem 100  $\mu\text{g}$ 'lık iodojen tüpü içerisinde yapıldı. Çözelti reaksiyonun sona ermesi için gerekli süre boyunca (20 dak) 100  $\mu\text{g}$ 'lık iodojen tüpü içerisinde bekletildi. Bu süre sonunda çözelti boş bir tüpe aktarılarak reaksiyon sonlandırıldı. İşaretleme işlemi tamamlandıktan sonra, işaretleme verimi TLRC yöntemi kullanılarak test edildi.

### 3.4.3 CdSe/CdS kuantum dot nanoparçacıkları ile konjuge edilmiş PHA-L'nin $^{125}\text{I}$ ile işaretlenmesi

100  $\mu\text{L}$  PHA-L-CdSe/CdS kuantum dot nanoparçacık çözeltisi ve aktivitesi 33  $\mu\text{Ci}$ 'ye karşılık gelen 1.8  $\mu\text{L}$   $^{125}\text{I}$  önceden hazırlanan 100  $\mu\text{g}$ 'lık iodojen tüpü içerisine konuldu. Reaksiyon için gerekli olan 20 dakikanın bu koşullar altında sonlanması beklendi. Reaksiyon oda sıcaklığında (25  $^{\circ}\text{C}$ ) gerçekleştirildi. 20 dakika sonunda çözelti boş bir tüpe aktarılarak reaksiyon sonlandırıldı. İşaretleme işlemi tamamlandıktan sonra, işaretleme verimi TLRC yöntemi kullanılarak test edildi.

### 3.5 Kalite Kontrol İşlemlerinde Kullanılan Kromatografik Yöntemler

Inaktif ve aktif bileşenlerin kalite kontrolünde kullanılan yöntemler ince tabaka kromatografisi (TLC), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve ince tabaka radyokromatografisidir.

#### 3.5.1 İnce tabaka radyo kromatografi yöntemi (TLRC)

TLRC yönteminde kalınlığı 0.1 mm olan 20 x 20 cm boyutlarındaki silika kaplı alüminyum şeritler 1.5 x 10 cm olacak şekilde kesildi ve işaretli örnekler şeritlerin tabanından 0.5 cm yukarıya mikropipet yardımıyla 2  $\mu$ L'lik damlalar şeklinde uygulandı. Bu işlemden sonra uygulama noktalarının kuruması oda sıcaklığında beklendi. Kuruma işleminden sonra şeritler ağzı kapalı olan TLC küvetlerine uygulama noktası yürütücü çözeltiye değmeyecek şekilde yerleştirildi. Yürütücü çözeltilinin şeridin üst noktasına yakın bir noktaya kadar yürütmesi beklenildi ve şeritler bu işlemin ardından TLC küvetlerinden çıkarılarak oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruma işleminin ardından şeritler olası kontaminasyonu engellemek için kağıt bant ile kaplandı. Şeritler tarama için hazır hale getirildikten sonra Bioscan AR2000 TLC cihazının üzerine yerleştirildi. Taramanın sağlıklı bir şekilde gerçekleştirilebilmesi için taramaya tabi tutulan örneklerine bilgiler ve tarama esnasında korunması gereken koşullar bilgisayar programı yardımıyla tarama öncesi belirlendi ve kaydedildi. Tarama işlemi tamamlandıktan sonra her bir örneğe ait radyokromatogramlar elde edildi. Bu kromatogramlar kullanılan örnek ve radyoaktif maddenin taşındığı  $R_f$  değerleri ve bağlanma verimi elde edildi.

Ayırma güçleri açısından 5 farklı banyo çözeltisi denenmiştir. Bunlar,

- ✓ İzopropil alkol-n bütanol-0.2 N  $NH_4OH$  (4:2:1)
- ✓ ACD



- ✓ Etil alkol-su (3:2)
- ✓ n-bütanol-su-asetik asit (4:2:1)
- ✓ n-bütanol-etanol-NH<sub>4</sub>OH (5:2:1)

Bu banyo çözeltileri içinde deneme için en ideal olan yani ayırma gücü en yüksek olan çözelti izopropil alkol-n bütanol-0.2 N NH<sub>4</sub>OH (4:2:1) çözeltisi olarak belirlenmiştir.

Aşağıda optimum koşulları sağlayan banyo görülmektedir.

- ✓ 1.Banyo : izopropil alkol-n-bütanol-0.2 N NH<sub>4</sub>OH (4:2:1)

### 3.5.2 Yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi (HPLC)

Bu çalışmada kullanılan HPLC analizlerinde, LC-10Atvp dörtlü pompa ve UV-VIS (SPD-10AV) dedektörüne sahip olan Shimadzu marka HPLC cihazında çalışılmıştır.

Çizelge 3.1 HPLC yönteminde uygulanan kromatografik koşullar.

Kolon	Aqua-OH 40-8 (Nucleogel)
Akış Hızı	1 mL / dak
Dalga Boyu	Ex : 347 nm / Em : 474 nm
Mobil Faz	Su
Sıcaklık	25 °C

### 3.6 MCF-7 (human breast adenocarcinoma) Hücreleri ile Yapılan Çalışmalar

Aşağıda MCF-7 meme kanser hücreleri ile yapılan deneyler ile ilgili bilgi verilmiştir.

### 3.6.1 MCF-7 hücrelerinin inkorporasyon (bağlanma) deneyleri için hazırlanması

Hücre denemelerinde MCF-7 (human breast adenocarcinoma) meme kanser hücreleri kullanılmıştır. Laboratuvar ortamında pasajı yapılmış olan MCF-7 meme kanser hücrelerine, hazırlanan  $^{125}\text{I}$  ile işaretli örneklerin uygulanabilmesi için hücreler 2 adet 24'lük plate'e ekildi. Bu işlem için izlenen prosedür aşağıda görülmektedir:

1. Hücrelerin bulunduğu flasklar içerisindeki RPMI ( % 10 FBS + % 1 non esansiyel aminoasit + % 1 Na-pirüvat + % 0.1 insülin + % 1 penisilamin / streptomisin + % 1 L-glutamin ) ortamı atıldı.
2. Flasklar 5'er mL PBS ile yıkandı.
3. Flaskların içerisindeki hücreler 3'er mL tripsin ile kaldırıldı ve flasklardan 2'şer mL falkon tüplerine alındı.
4. 1300 rpm'den santrifüjlenerek süpernatant atıldı.
5. Santrifüj sonunda tüpün dibinde kalan hücreler 5 mL PBS eklenerek süspanse edildi.
6. Hücre sayımı yapıldı.

Hücreler sayım için 2 kat ve 5 kat olmak üzere iki farklı oranda seyreltildi ve triphan mavisi ile boyandı. Hücre sayımında Neubauer Hemositometresi yöntemi kullanıldı. Bu yöntemle hücre konsantrasyonu yani mililitredeki hücre miktarı bulundu. Bu işlem için öncelikle seyreltilmiş olan hücreler Neubauer lamına damlatıldı ve her seyreltme için 4 alan sayıldı. Daha sonra aşağıdaki formül kullanılarak hücre miktarı belirlendi.

$$\text{Hücre konsantrasyonu: Sayım} \times \text{Seyreltme Faktörü} \times 10^4$$

Bu formül kullanılarak yapmış olduğumuz hesaplamalar sonucunda her bir kuyucukta yaklaşık olarak  $0.75 \times 10^5$  tane hücre olması için önceden hazırlanmış

olduğumuz stok hücre süspansiyonumuzdan 187  $\mu\text{L}$  alındı. Bu hacim kuyucuklara eklendi ve üzerlerine 1'er mL PBS ilave edildi. Bu işlem sonucunda kuyucuk başına  $0.75 \times 10^5$  tane hücre ekilmiş oldu.

### 3.6.2 Biyoaffinite testi

Aşağıda biyoaffinite testi sonucunda MCF-7 meme kanser hücrelerinin yüzeyindeki bağlanma veriminin zamanla nasıl değiştiği açıklanmıştır.

- **$^{125}\text{I}$  ile işaretlenmiş örneklerin MCF-7 meme kanser hücreleri üzerindeki bağlanma veriminin zamana bağlı değişimi**

Hücre denemelerimiz için önceden hazırlamış olduğumuz platelerdeki kuyucuklara ekilen hücreler,  $^{125}\text{I}$  işaretli PHA-L, CdSe/CdS kuantum-dot,  $^{125}\text{I}$  işaretli CdSe/CdS kuantum-dot-PHA-L'nin MCF-7 meme kanser hücrelerine olan afinitesinin incelenmesi için kullanıldı. İşaretlenmiş örneklerin MCF-7 meme kanser hücrelerindeki bağlanma veriminin en yüksek olduğu zamanı tespit etmek için zaman parametreleri 30., 60. ve 120. dakika olarak belirlendi.

Kuyucuklara uygulanacak olan işaretli örneklerin kuyucuk başına spesifik aktivitesi 3  $\mu\text{Ci/mL}$  olarak belirlendi. Bunun için örnekler aşağıda verilmiş olan prosedüre uygun olarak hazırlanmıştır:

1.  **$^{125}\text{I}$ :** Her kuyucuk başına 500  $\mu\text{L}$  gelecek şekilde toplam 8 kuyucuk için 4 mL MEM besiyerine 33  $\mu\text{Ci}$  (1.8  $\mu\text{L}$ )  $^{125}\text{I}$  eklendi.
2.  **$^{125}\text{I}$  İşaretli PHA-L:** Denemede bu örnek için kullanılan 11 kuyucuk için 5.4 mL MEM besiyerine 33  $\mu\text{Ci}$  (1.8  $\mu\text{L}$ )  $^{125}\text{I}$  işaretli PHA-L örneğinden 100  $\mu\text{L}$  eklendi.

3. **<sup>125</sup>I işaretli CdSe/CdS kuantum-dot-PHA-L:** Denemede bu örnek için kullanılan 11 kuyucuk için 5.4 mL MEM besiyerine 33  $\mu$ Ci (1.8  $\mu$ L) <sup>125</sup>I işaretli CdSe/CdS kuantum-dot-PHA-L örneğinden 100  $\mu$ L eklendi.

Örnekler yukarıda belirtilen şekilde hazırlandıktan sonra, hücrelere uygulama aşamasına geçilmeden önce hücrelerin bulunduğu kuyucuklardaki besiyerleri vakum pompası yardımı ile uzaklaştırıldı. Daha sonra kuyucuklar SF (% 0.9'luk NaCl çözeltisi) ile 3 kez yıkandı. Yıkama işleminin ardından hazırlanmış olduğumuz örnekler, her bir örnek için 11 kuyucuk kullanılmak üzere ve kuyucuk başına 0.5 mL örnek gelecek şekilde eklendi.

Örneklerin kuyucuklara yerleştirilmesinden sonra önceden belirlemiş olduğumuz gerekli inkübasyon sürelerimiz olan 30., 60. ve 120. dakikalar beklenildi. Bu süreler sonunda hücreler üzerindeki besiyeri vakum pompası ile uzaklaştırıldı ve SF ile 3 kez yıkama işlemi tekrar edildi. Yıkama işleminin ardından her bir kuyucuğa 200  $\mu$ L Ripa eklendi. Ardından mikropipet ucu yardımıyla kuyucuklar kazınarak hücrelerin Ripa tamponuna geçmesi sağlandı.

Kazıma işleminin ardından her bir kuyucukta 200  $\mu$ L bulunan Ripa tamponunun 100  $\mu$ L'si hücre yüzeyinde tutulan radyoaktivite miktarını tespit etmek için sintilasyon cihazıyla sayıma ayrıldı. Bu işlem için ependorf tüplerine ayırmış olduğumuz 100  $\mu$ L Ripa tamponunun üzerine 900  $\mu$ L sintilatör (1, 2, 4-Trimetilbenzen) (LSC-cocktail) çözeltisi eklendi ve ependorf tüpleri sıkıca kapatıldıktan sonra güçlü bir şekilde vorteks işlemine tabi tutulduktan sonra sintilasyon için özel olarak hazırlanmış kapların içerisine yerleştirildi. Sayım işlemi Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalında bulunan Packard Tri-corb-1200 sıvı sintilasyon cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Daha sonra kuyucuklarda kalan 100  $\mu$ L Ripa tamponunun 25  $\mu$ L'si hücrelerin protein miktarının belirlenmesi için kullanıldı. Protein analizi Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalında bulunan Thermo Scientific Multiscan FC Biorad cihazı kullanılarak Bicinchoninic asit yöntemi ile 560 nm de tespit edildi. Elde edilen protein sonuçlarından yola çıkarak hücre başına düşen aktivite değeri hesaplandı.

Kontrol grubuna ait sayımlar ile bu değerler oranlanarak % bağlanma verimleri hesaplandı.

Her bir zaman parametresi için elde edilen sonuçlar istatistiksel yöntemlerle incelendi ve istatistiksel açıdan sonuçların anlamlı olup olmadığı gösterildi. Bunun için tek yönlü ANOVA analizi yapıldı. P değerleri göz önüne alınarak % bağlanma değerleri arasında 0.95 güven düzeyinde anlamlı bir farkın olup olmadığı tespit edildi. P değeri 0.05'den küçük olan veriler anlamlı kabul edilmedi.

### **3.7 Elde Edilen Sonuçların İstatistikler Yöntemler Kullanılarak Analizi**

Aşağıda çalışma sonucunda elde edilen deneysel sonuçların istatistiksel analiz sonuçları verilmiştir.

#### **3.7.1 İstatistiksel veri analizi**

Evrenin tümü üzerinde çalışıldığında, çıkan sonuçlar kesindir. Anlamlılık testi uygulanmaz. Eğer evrenden örneklem alınarak çalışılıyorsa, bir hipotez testi (anlamlılık testi) uygulanır. Bu sebepten denemelerimiz sonucunda elde ettiğimiz bağlanma verimlerine karşılık gelen değerleri, bağlanma değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olup olmadığını göstermek için tek yönlü ANOVA testi ile kontrol edildi. Testin sonucunun güvenilirliği açısından hata payı % 95 olarak belirlendi. Buna göre deneysel sonuçlar değerlendirilirken bağlama verimlerine karşılık gelen değerler arasında 0.95 düzeyinde anlamlı bir fark olup olmadığı kontrol edildi. Bu kontrol P değerlerinden yola çıkılarak gerçekleştirilmiştir. Buna göre P değeri 0.05'in altında olan veriler anlamlı kabul edilmiştir.

## 4.BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu bölümde tüm deneysel ve hesapsal yollarla elde edilen sonuçlar ve sonuçlarla ilgili yorumlar yer almaktadır.

### 4.1 Hesapsal Sonuçlar

Aşağıda PHA-L'nın protein ve karbohidrat etkileşim yüzeyler ve bu yüzlerin parçalarının ayrı ayrı optimize edilmesi sonucunda elde edilen yeni geometriler, bu geometrilere ait yeni enerjiler, yapıdaki bağlarda optimizasyon sonucu meydana gelen değişim ve hesapsal IR sonuçları görülmektedir.

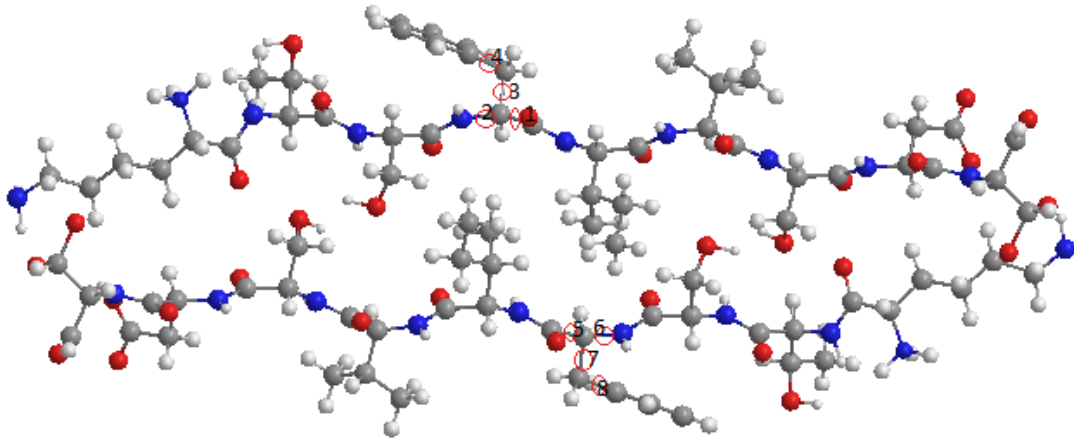
#### 4.1.1 Optimizasyon sonuçları

Aşağıda optimizasyon sonrası elde edilen yapılar verilmiştir.

#### Protein bağlanma yüzeyi

Aminoasit dizilimi ;

KTSFIVSDT/KTSFIVSDT

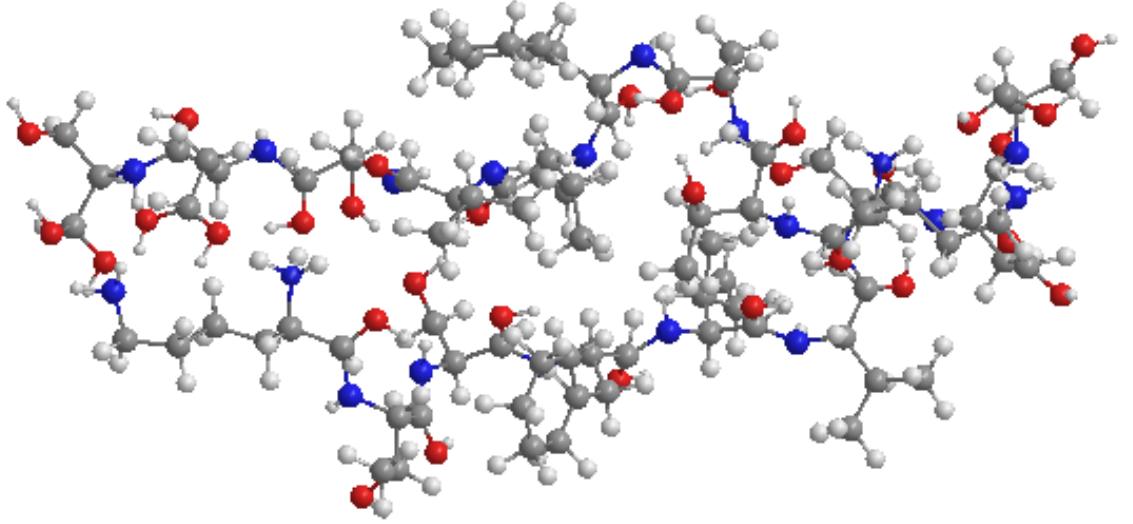


Şekil 4.1 Protein bağlanma yüzeyinin optimizasyon öncesi görüntüsü. Kırmızı halkalar önemli bağları göstermektedir.

*Enerji =2413.77 kJ/mol*

*Net yük =0.00*

Şekilde 4.2’de protein etkileşim yüzeyi olan yapının, aynı diziye sahip iki peptidin anti-paralel olarak konumlanması sonucu oluştuğu görülmektedir.



**Şekil 4.2** Protein bağlanma yüzeyinin optimize edilmiş yapısı.

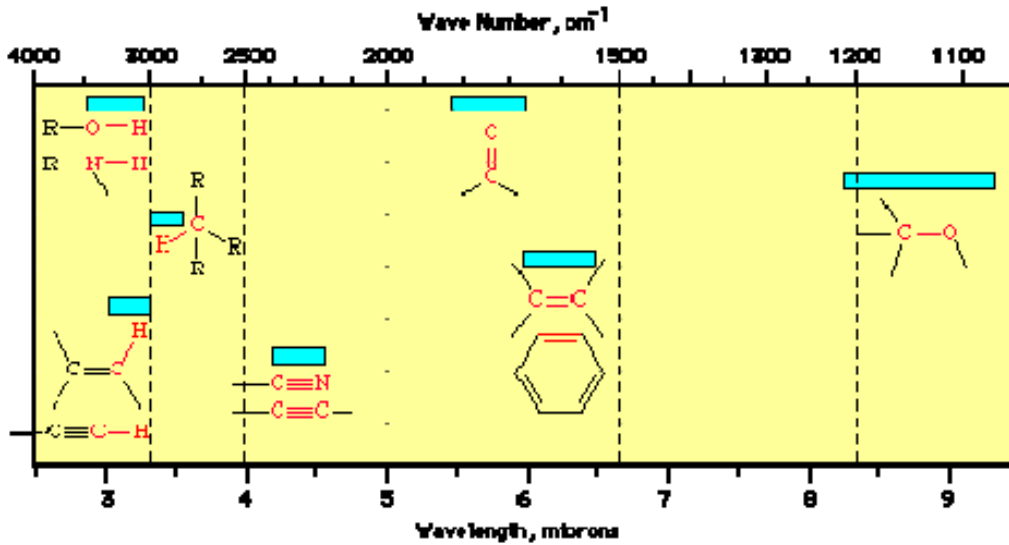
*Enerji =365.42 kJ/mol*

*Net Yük =0.00*

Çizelge 4.1 Protein yüzeyindeki önemli bağların optimizasyon sonrası değişimi.

Bağ Numarası ve Tipi	Optimizasyon Öncesi Bağ Uzunluğu	Optimizasyon Sonrası Bağ Uzunluğu
1 (C-C)	1.523 Å	1.517 Å
2 (N-C)	1.457 Å	1.466 Å
3 (C-C)	1.535 Å	1.549 Å
4 (C-C)	1.503 Å	1.549 Å
5 (C-C)	1.525 Å	1.517 Å
6 (N-C)	1.460 Å	1.468 Å
7 (C-C)	1.533 Å	1.551 Å
8 (C-C)	1.505 Å	1.536 Å

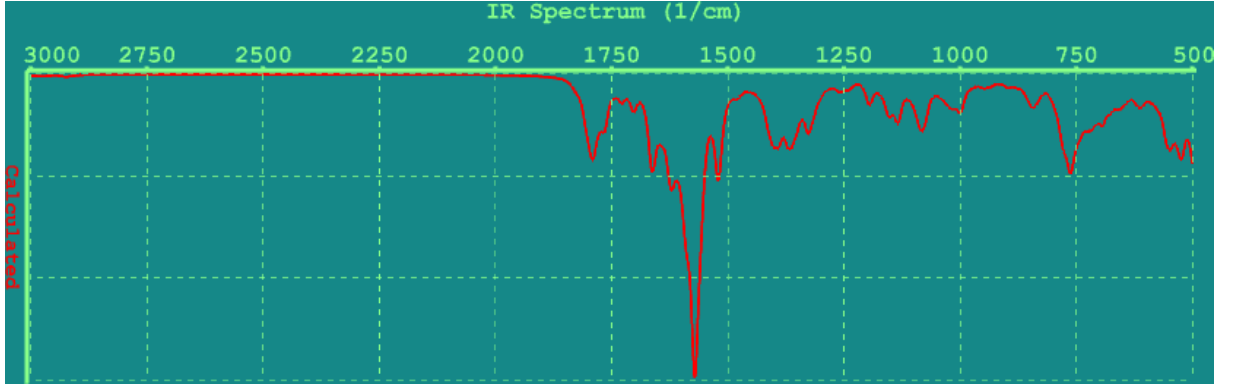
Çizelge 4.2 IR korelasyon Şeması.



Infrared (IR) spektroskopisi moleküllerdeki çeşitli bağların titreşim frekanslarını ölçer ve moleküldeki fonksiyonel gruplar hakkında bilgi verir. Polar bağlar genelde IR-aktiftir. Simetrik bir moleküldeki apolar bağlar zayıf absorbsiyon gösterirler veya hiç absorbsiyon göstermezler (IR-aktif değildir).



Bir Fourier transformasyonu (matematiksel metot) uygulayarak veri zaman alanından frekans alanına aktarılır. Verinin değişik frekanslarda gösterdiği absorpsiyonlar grafiğe dökülür.

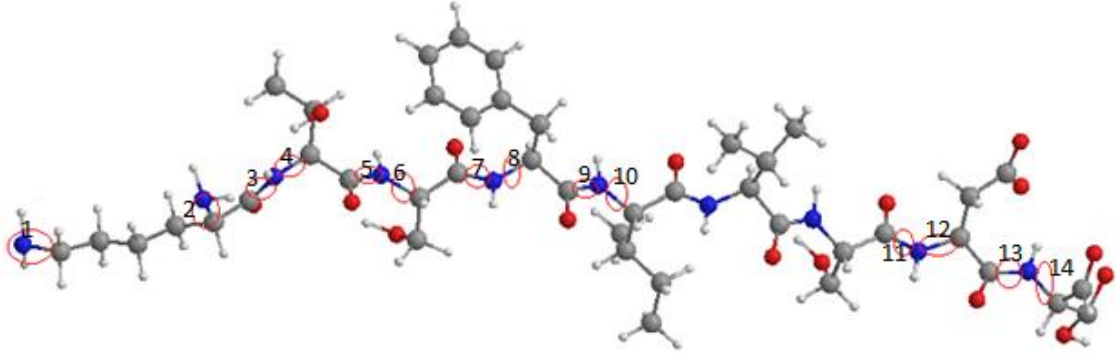


Şekil 4.3 Protein yüzeyini optimizasyon sonrası elde edilen teorik IR spektrumu.

Yukarıda yer alan protein etkileşim yüzeyine ait IR spekturumuna baktığımızda:

750-610 cm<sup>-1</sup> civarı görülen pik bize yapıda =C-H bağlarının 'bükülme' modlarının etkinliğini gösterir. 1250-1000 cm<sup>-1</sup> arasında kalan pikler ise C-O bağlarının 'gerilme' formunun ve C-H bağlarının zig zag (hareketli bağlar) formlarının aktivitesini simgeler. 1500-1250 cm<sup>-1</sup> arasında görmekte olduğumuz pikler ise C-C bağlarındaki gerilimi gösterir. (C-C gerilme) 1750-1500 cm<sup>-1</sup> arasında görmekte olduğumuz pikler ise C=O gerilme ve N-H bağlarının bükülme formlarının aktivitesini gösterir. 1800 cm<sup>-1</sup> civarı görülen pik ise 'döngü' olarak bilinen zayıf bağların varlığını gösterir.

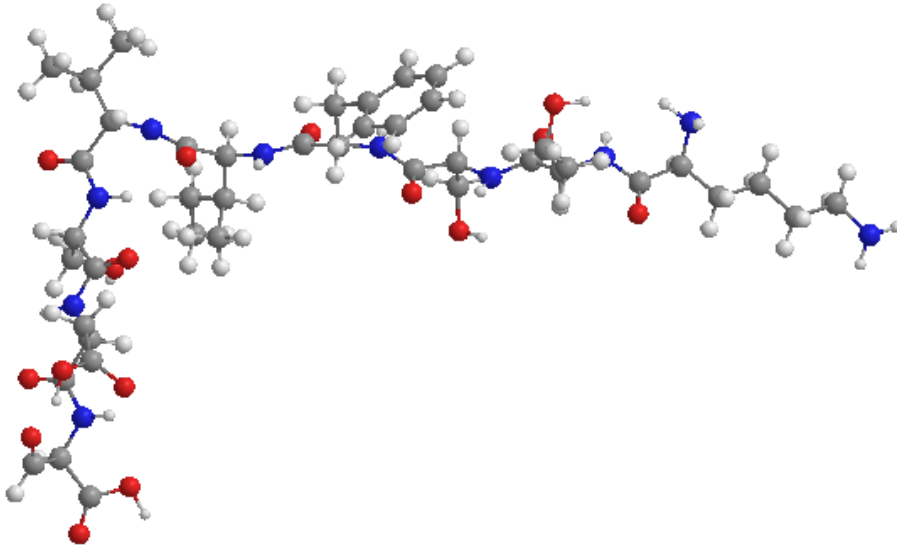
### Anti-paralel yapıyı oluşturan dizilerin ayrı ayrı incelenmesi



Şekil 4.4 Anti-paralel yapıyı oluşturan dizinin optimizasyon öncesi görünümü. Kırmızı halkalar önemli bağları göstermektedir.

*Enerji = 679.27 kJ/mol*

*Net yük = 0.00*



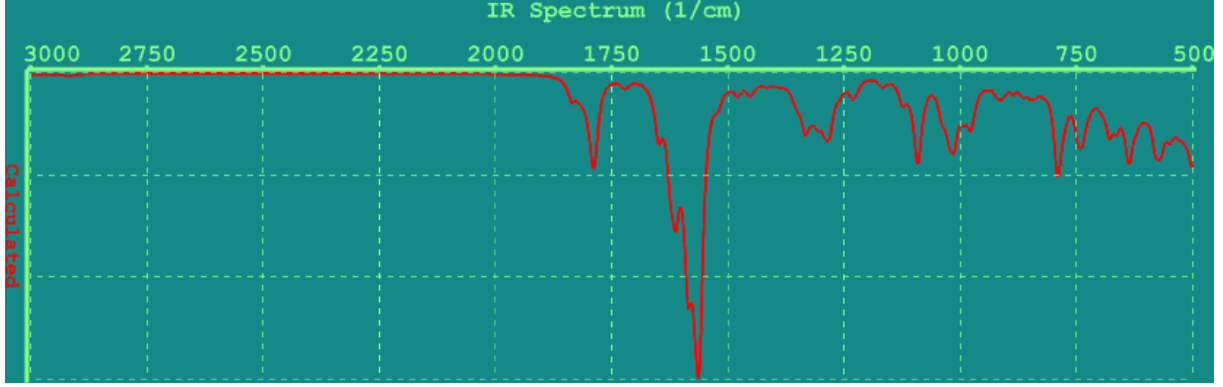
Şekil 4.5 Anti-paralel yapıyı oluşturan dizinin optimize edilmiş yapısı.

*Enerji = 462.067 kJ/mol*

*Net Yük = 0.00*

Çizelge 4.3 Anti-paralel yapıyı oluşturan dizinin önemli bağlarının optimizasyon sonrası değişimi.

<b>Bağ Numarası ve Tipi</b>	<b>Optimizasyon Öncesi Bağ Uzunluğu</b>	<b>Optimizasyon Sonrası Bağ Uzunluğu</b>
1 (N-C)	1.490 Å	1.478 Å
2 (N-C)	1.459 Å	1.478 Å
3 (N-C)	1.331 Å	1.308 Å
4 (N-C)	1.459 Å	1.464 Å
5 (N-C)	1.324 Å	1.310 Å
6 (N-C)	1.452 Å	1.467 Å
7 (N-C)	1.325 Å	1.309 Å
8 (N-C)	1.457 Å	1.466 Å
9 (N-C)	1.324 Å	1.309 Å
10(N-C)	1.452 Å	1.467 Å
11(N-C)	1.325 Å	1.309 Å
12(N-C)	1.451 Å	1.468 Å
13(N-C)	1.324 Å	1.308 Å
14(N-C)	1.450 Å	1.461 Å



Şekil 4.6 Anti-paralel yapıyı oluşturan dizinin optimizasyonu sonrası elde edilen teorik IR spekturumu.

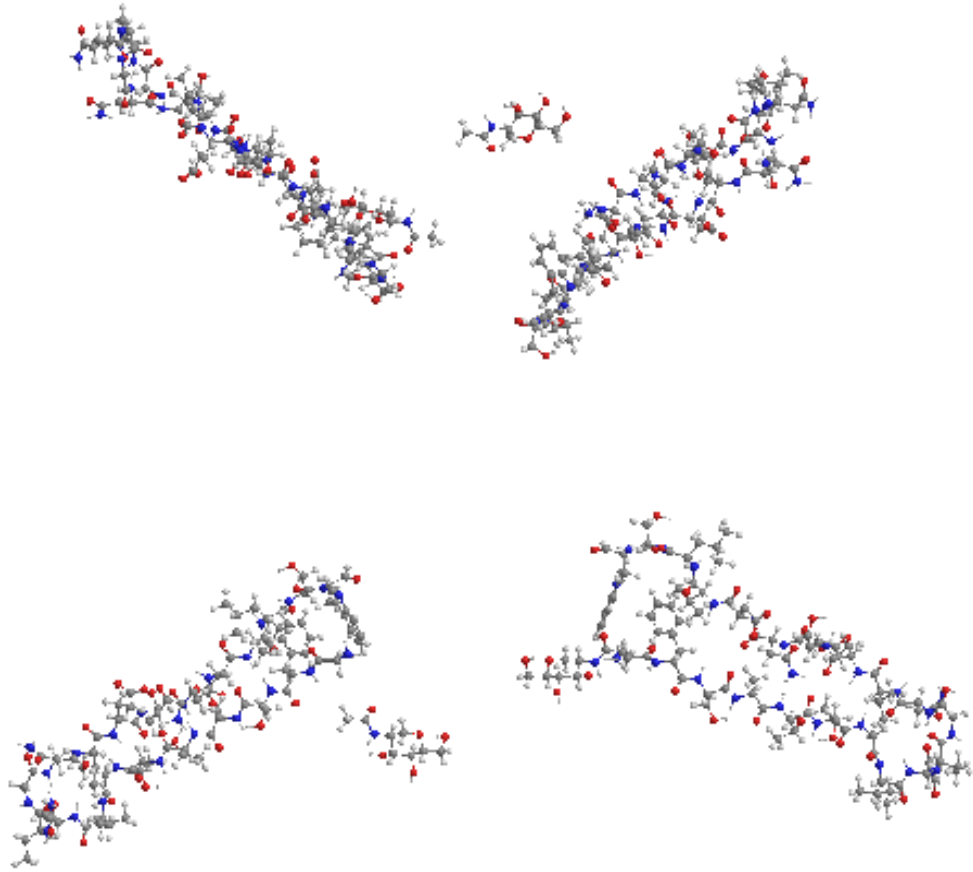
Şekil 4.6'ya bakacak olursak; 800-500  $\text{cm}^{-1}$  arası görülen pikler bize yapıda  $=\text{C}-\text{H}$  bağlarının 'bükülme' formunun etkinliğini gösterir. 1250-1000  $\text{cm}^{-1}$  arasında kalan pikler ise  $\text{C}-\text{O}$  bağlarının 'gerilme' formunun ve  $\text{C}-\text{H}$  bağlarının zig zag (hareketli bağlar) formlarının aktivitesini simgeler. ( $-\text{CH}_2\text{X}$  yapısındaki  $\text{C}-\text{H}$  bağları gibi) 1260-1050  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki pik  $\text{C}-\text{O}$  bağlarının 'gerilme' formunun etkinliğini simgeler. 1500-1250  $\text{cm}^{-1}$  arasında görmekte olduğumuz pikler ise  $\text{C}-\text{C}$  bağlarındaki gerilimi gösterir. 1750-1500  $\text{cm}^{-1}$  arasında görmekte olduğumuz pikler ise  $\text{C}=\text{O}$  gerilme ve  $\text{N}-\text{H}$  bağlarının bükülme formlarının aktivitesini gösterir. 1800  $\text{cm}^{-1}$  civarı görülen pik ise 'döngü' olarak bilinen zayıf bağların varlığını gösterir.

## Karbohidrat etkileşim yüzeyi

Aminoasit dizilimi;

GFSATTGINKGNVETNDVLSW/GFSATTGINKGNVETNDVLSW/GFSATTGINKGNVETNDVLSW/GFSATTGINKGNVETNDVLSW

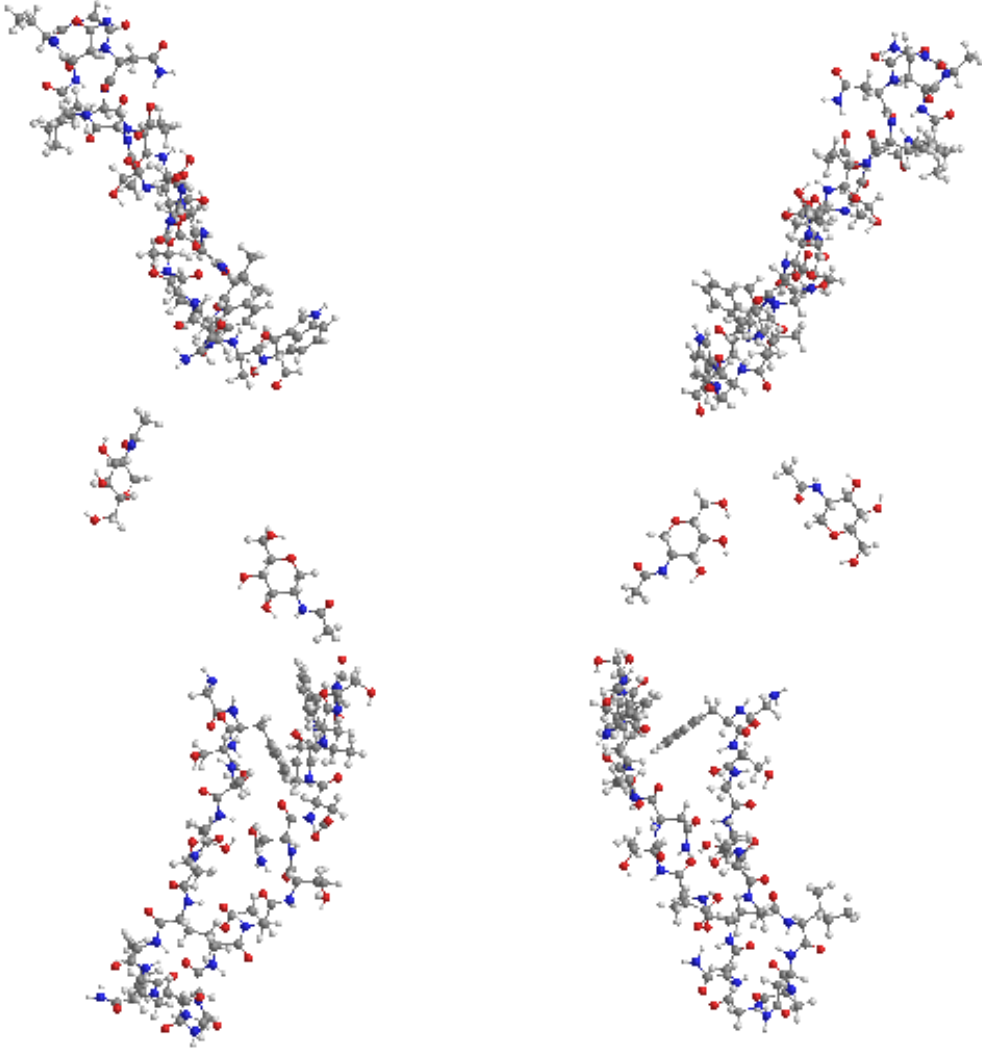
Aminoasit dizisine bakıldığında aynı yapının 4 domainde de tekrar edildiği görülmektedir.



Şekil 4.7 Karbohidrat etkileşim yüzeyinin optimizasyon öncesi görünümü.

*Enerji = 1607.59 kJ/mol*

*Net Yük = 0.00*

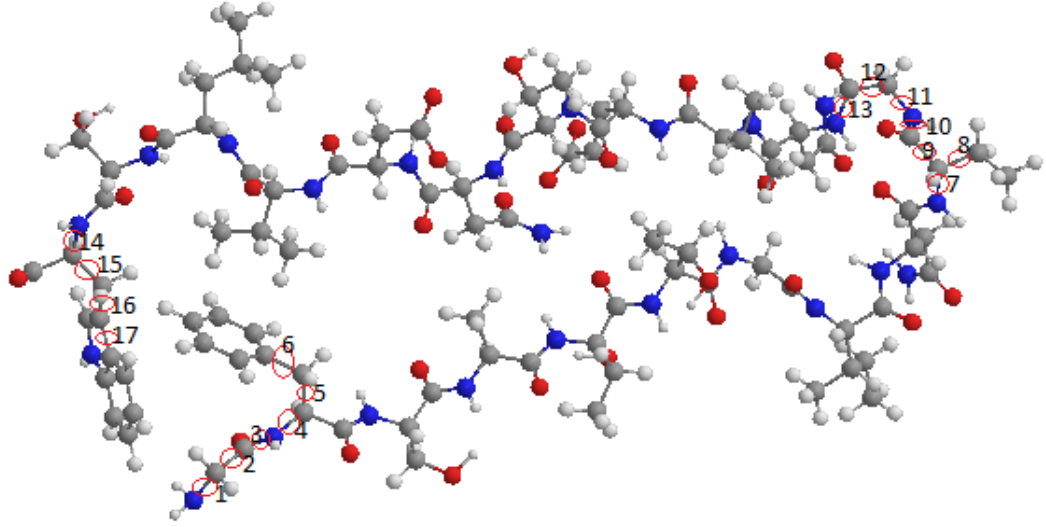


Şekil 4.8 Karbohidrat etkileşim yüzeyinin optimizasyon sonrası görünümü.

*Enerji = 894.53 kJ/mol*

*Net Yük = 0.00*

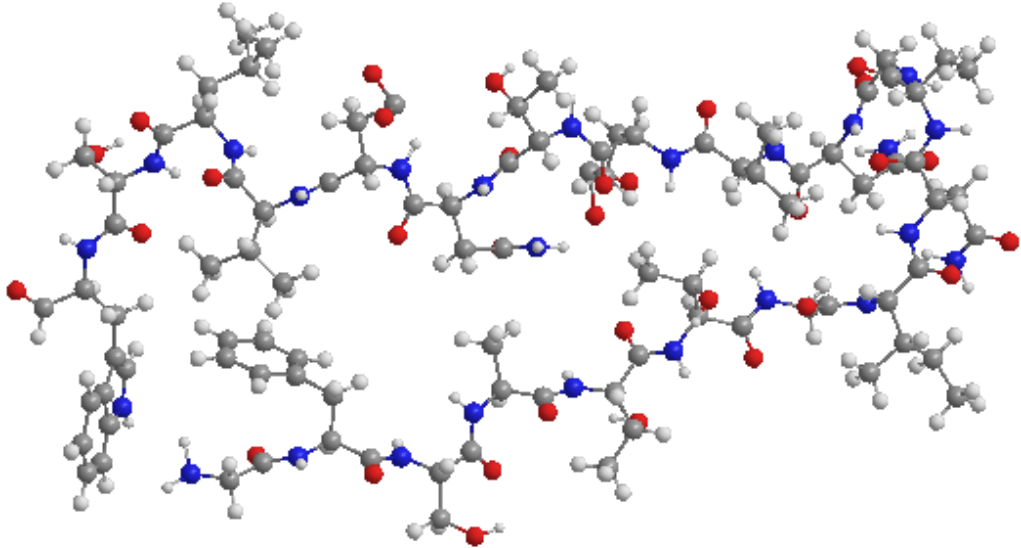
### Domainlerin tek tek incelenmesi



Şekil 4.9 Karbohidrat etkileşim yüzeyindeki tek bir domainin optimizasyon öncesi görünümü.

*Enerji = 492.94 kJ/mol*

*Net yük = -2.00*



Şekil 4.10 Karbohidrat etkileşim yüzeyindeki tek bir domainin optimizasyon sonrası görünümü.

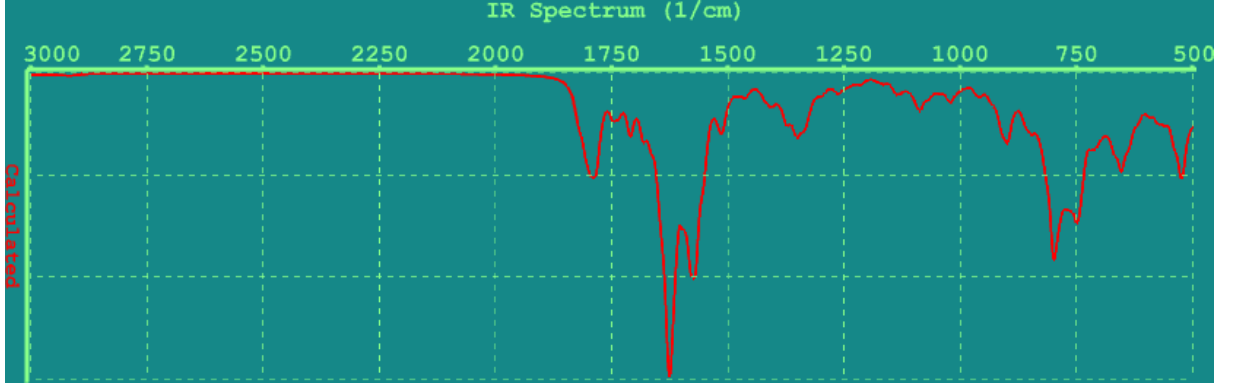
*Enerji = 491.28 kJ/mol*

*Net Yük = -2.00*

Çizelge 4.4 Karbohidrat etkileşim yüzeyine ait domainin önemli bağlarının optimizasyon sonrası değişimi.

<b>Bağ Numarası ve Tipi</b>	<b>Optimizasyon Öncesi Bağ Uzunluğu</b>	<b>Optimizasyon Sonrası Bağ Uzunluğu</b>
1 (N-C)	1.450 Å	1.478 Å
2 (N-C)	1.332 Å	1.309 Å
3 (C-C)	1.519 Å	1.510 Å
4 (N-C)	1.461 Å	1.465 Å
5 (C-C)	1.529 Å	1.551 Å
6 (C-C)	1.494 Å	1.535 Å
7 (N-C)	1.454 Å	1.462 Å
8 (C-C)	1.537 Å	1.514 Å
9 (C-C)	1.532 Å	1.554 Å
10(N-C)	1.330 Å	1.309 Å
11(N-C)	1.459 Å	1.463 Å
12(C-C)	1.516 Å	1.511 Å
13(N-C)	1.328 Å	1.309 Å
14(N-C)	1.450 Å	1.465 Å
15(C-C)	1.531 Å	1.551 Å
16(C-C)	1.490 Å	1.507 Å
17(C-C)	1.429 Å	1.468 Å





Şekil 4.11 Karbohidrat etkileşim yüzeyine ait domainin optimizasyon sonrası elde edilen teorik IR spekturumu.

Şekil 4.11’de 750-500  $\text{cm}^{-1}$  arası görülen 2 pik yapıdaki =C-H bağlarının ‘bükülme’ formunun etkinliğini gösterir. 1000-750  $\text{cm}^{-1}$  arasında kalan pikler ise C-H bağlarının ‘zayıf’ formunun aktivitesini simgeler. 1250-1000  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki pik C-O bağlarının ‘gerilme’ formunun etkinliğini simgeler. 1400-1300  $\text{cm}^{-1}$  arasında görmekte olduğumuz pik ise C-H bağlarındaki ‘sert’ formunu gösterir. 1750-1500  $\text{cm}^{-1}$  arasında görmekte olduğumuz pikler ise C=O gerilme ve N-H bağlarının bükülme formlarının aktivitesini gösterir. 1800  $\text{cm}^{-1}$  civarı görülen pik ise ‘döngü’ olarak bilinen zayıf bağların varlığını gösterir.

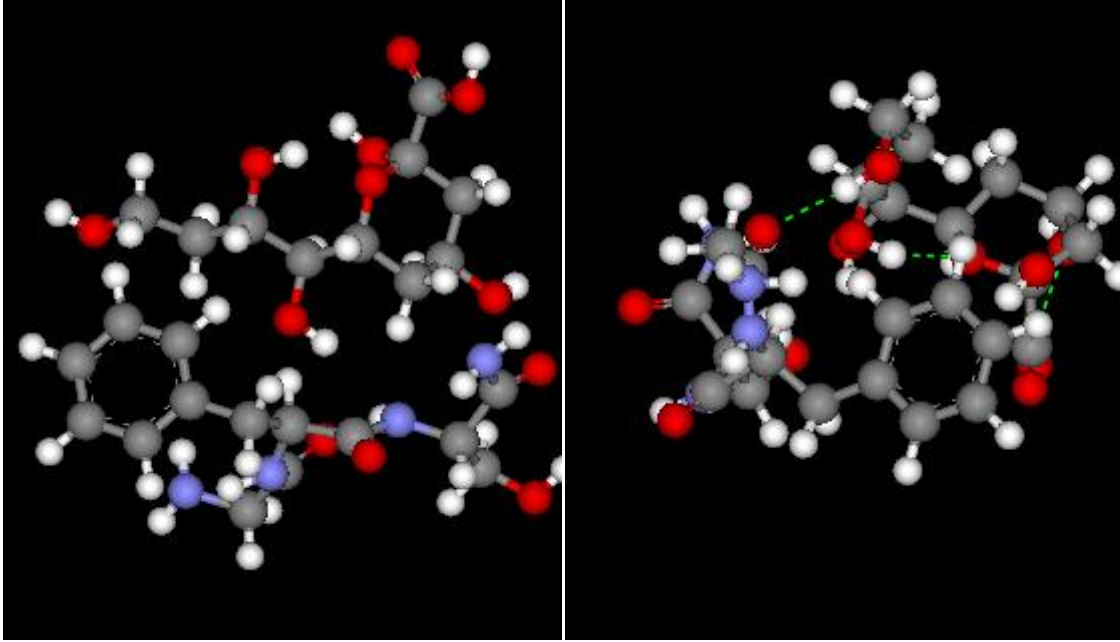
## 4.2 Karbohidrat Etkileşim Yüzeyi ile Sialik Asidin Etkileştirilmesi

Bu kısımda PHA-L’nin karbohidrat etkileşiminde görev alan yüzeyini, parça parça ve farklı pozisyonlarda sialik asit ile hesapsal teknikler yardımıyla etkileştirerek incelemiştir.

### 4.2.1 Birinci etkileşim pozisyonundan elde edilen bileşik

Birinci etkileşim pozisyonunda PHA-L’nin karbohidrat etkileşiminde görev alan yüzeyinin glisin, fenilalanin ve serin aminoasitlerini içeren peptid dizisi incelenmiştir. Etkileşim öncesi mevcut olan ve etkileşimden sonra elde edilen geometrik yapılar, yeni geometrik yapıda etkileşimden sonra kurulan ve yapıdaki

kararlılıkta son derece önemli olan yeni hidrojen bağları (yeşil kesikli çizgiler) görülmektedir. Ayrıca etkileşim sonrası elde edilen bileşiğin enerjisi ve net yükü şeklin altında verilmiştir.



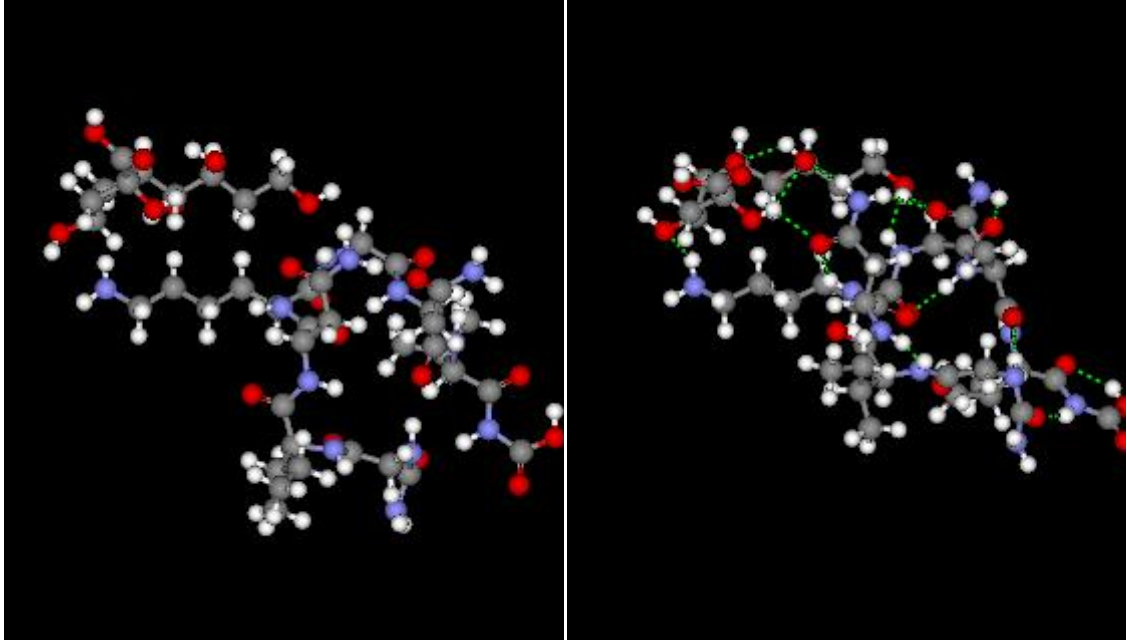
Şekil.4.12 Birinci etkileşim pozisyonu (solda) ve etkileşimden sonra oluşan bileşik (sağda) ve kurulan yeni bağlar (yeşil kesikli çizgiler).

$$\text{Enerji} = -2298.75 \text{ kJ/mol}$$

$$\text{Net Yük} = 0.00$$

#### 4.2.2 İkinci etkileşim pozisyonundan elde edilen bileşik

İkinci etkileşim pozisyonunda PHA-L'nin karbohidrat etkileşiminde görev alan yüzeyinin glisin(2), izolösin, asparajin(2), lizin ve valin (GINKGNV) aminoasitlerini içeren peptid dizisi incelenmiştir. Etkileşim öncesi mevcut olan ve etkileşimden sonra elde edilen geometrik yapılar, yeni geometrik yapıda etkileşimden sonra kurulan ve yapıdaki kararlılıkta son derece önemli olan yeni hidrojen bağları (yeşil kesikli çizgiler) görülmektedir. Ayrıca etkileşim sonrası elde edilen bileşiğin enerjisi ve net yükü şeklin altında verilmiştir.



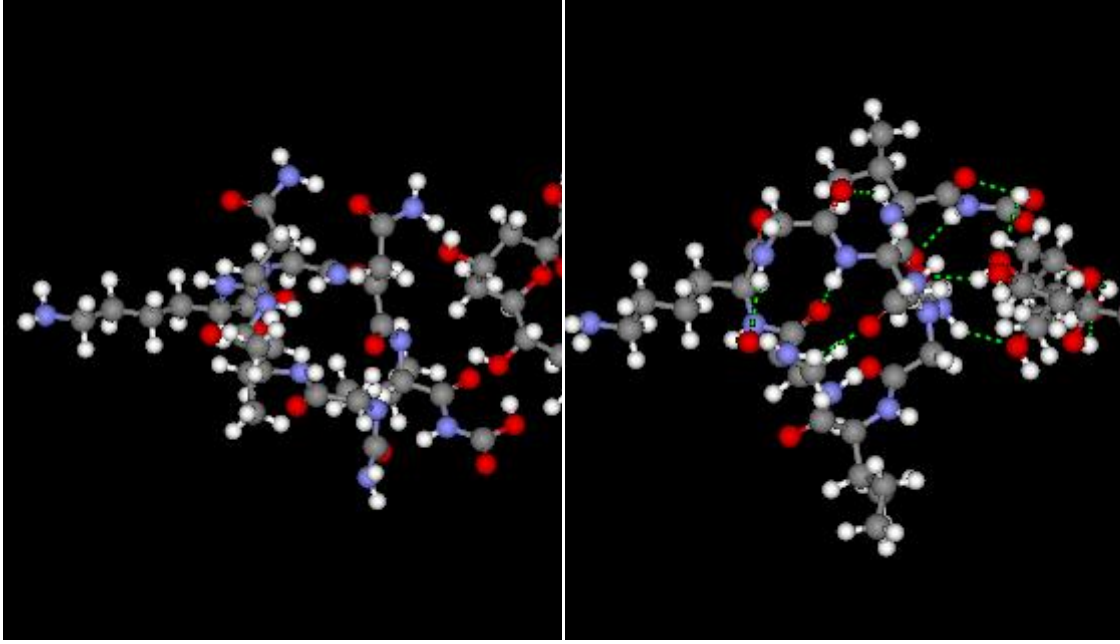
**Şekil.4.13** İkinci etkileşim pozisyonu (solda) ve etkileşimden sonra oluşan bileşik (sağda) ve kurulan yeni bağlar (yeşil kesikli çizgiler).

*Enerji* = -3932.04 kJ/mol

*Net Yük* =0.00

### 4.2.3 Üçüncü etkileşim pozisyonundan elde edilen bileşik

Üçüncü etkileşim pozisyonunda, ikinci etkileşim pozisyonunda kullanılan grup (glisin(2), izolösin, asparajin(2), lizin ve valin (GINKGNV) aminoasitlerini içeren grup) farklı bir açı ve geometri kullanılarak tekrar etkileştirilmiştir. Bu yeni etkileşim pozisyonu sonucunda elde edilen bileşik, kurulan yeni hidrojen bağları ve bu bileşiğe ait enerji ve net yük belirlenmiştir. Yeni hidrojen bağlarını kesikli yeşil çizgiler göstermektedir. Yeni bileşiğin enerjisi ve yükü ise şeklin altında verilmiştir.



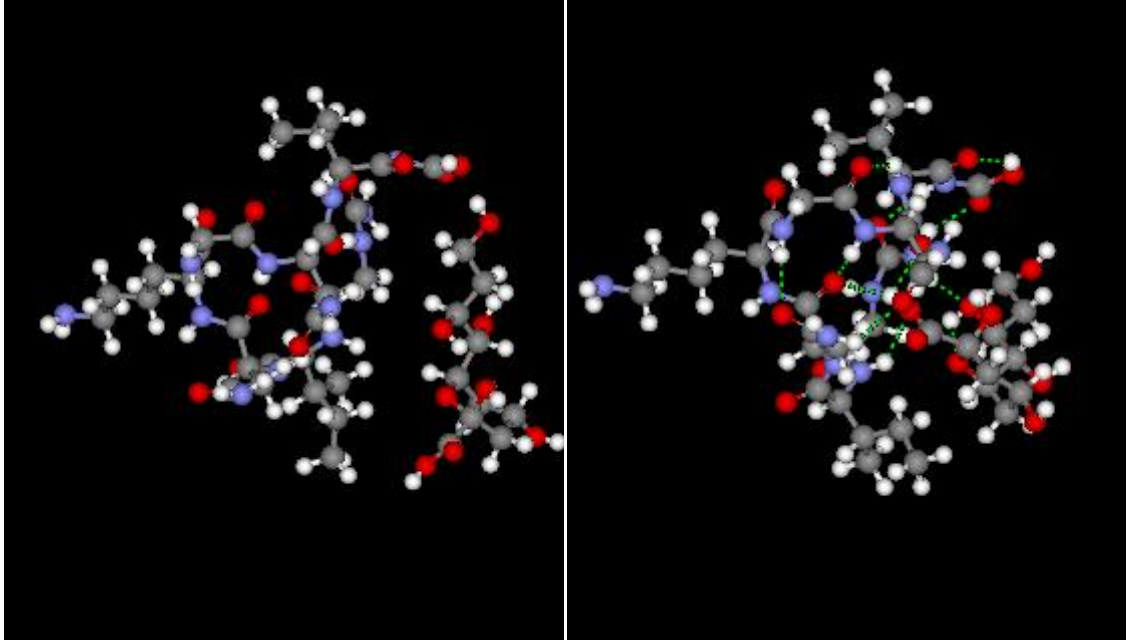
**Şekil.4.14** Üçüncü etkileşim pozisyonu (solda) ve etkileşimden sonra oluşan bileşik(sağda) ve kurulan yeni bağlar (yeşil kesikli çizgiler).

*Enerji* = -3955.38 kJ/mol

*Net Yük* =0.00

#### 4.2.4 Dördüncü etkileşim pozisyonundan elde edilen bileşik

Dördüncü etkileşim pozisyonunda, ikinci ve üçüncü etkileşim pozisyonlarında kullanılan grup (glisin(2), izolösin, asparajin(2), lizin ve valin (GINKGNV) aminoasitlerini içeren grup) farklı bir açı ve geometri kullanılarak tekrar etkileştirilmiştir. Bu yeni etkileşim pozisyonu sonucunda elde edilen bileşik, kurulan yeni hidrojen bağları ve bu bileşiğe ait enerji ve net yük belirlenmiştir. Yeni hidrojen bağlarını kesikli yeşil çizgiler göstermektedir. Yeni bileşiğin enerjisi ve yükü ise şeklin altında verilmiştir.



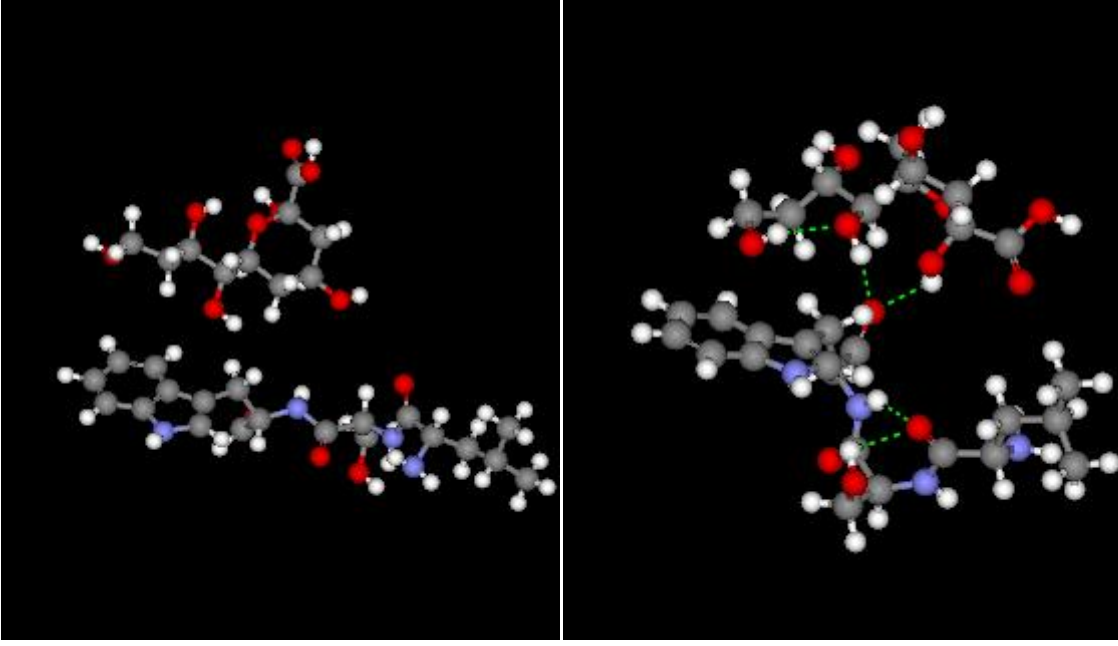
**Şekil.4.15** Dördüncü etkileşim pozisyonu (solda) ve etkileşimden sonra oluşan bileşik(sağda) ve kurulan yeni bağlar (yeşil kesikli çizgiler).

*Enerji* = -3944.41 kJ/mol

*Net Yük* =0.00

#### 4.2.5 Beşinci etkileşim pozisyonundan elde edilen bileşik

Beşinci etkileşim pozisyonunda PHA-L'nin karbohidrat etkileşiminde görev alan yüzeyinin lösin, triptofan ve serin aminoasitlerini içeren peptid dizisi incelenmiştir. Etkileşim öncesi mevcut olan ve etkileşimden sonra elde edilen geometrik yapılar, yeni geometrik yapıda etkileşimden sonra kurulan ve yapıdaki kararlılıkta son derece önemli olan yeni hidrojen bağları (yeşil kesikli çizgiler) görülmektedir. Ayrıca etkileşim sonrası elde edilen bileşiğin enerjisi ve net yükü şeklin altında verilmiştir.



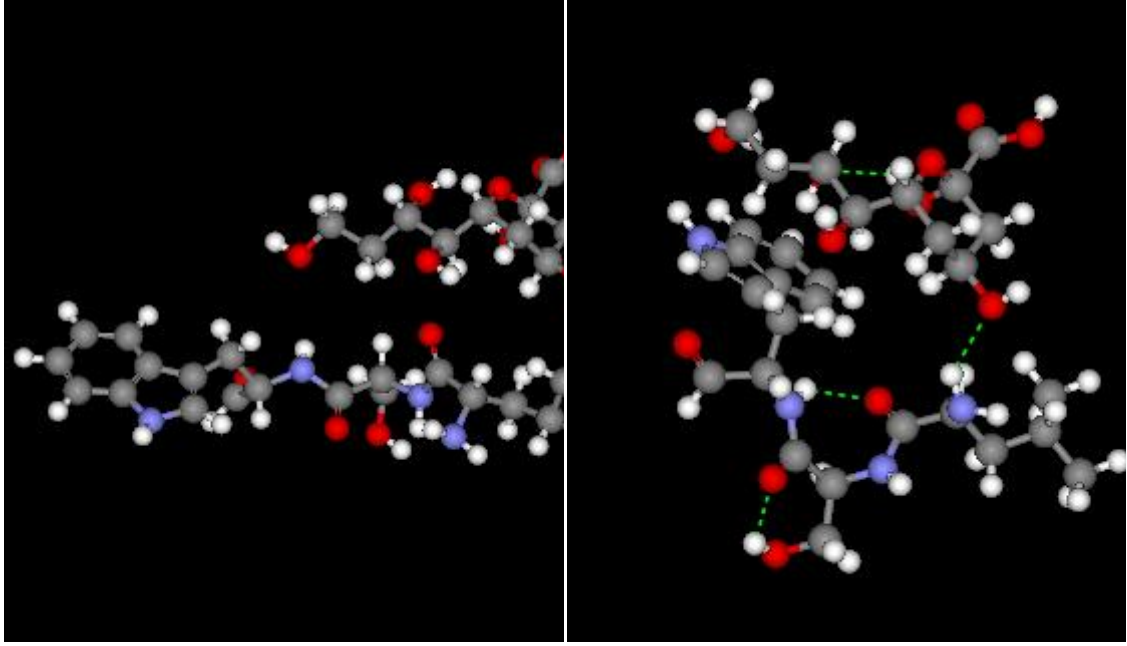
**Şekil.4.16** Beşinci etkileşim pozisyonu (solda) ve etkileşimden sonra oluşan bileşik (sağda) ve kurulan yeni bağlar (yeşil kesikli çizgiler).

*Enerji* = -2292.16 kJ/mol

*Net Yük* =0.00

#### 4.2.6 Altıncı etkileşim pozisyonundan elde edilen bileşik

Altıncı etkileşim pozisyonunda, beşinci etkileşim pozisyonunda kullanılan grup (lösin, triptofan ve serin aminoasitlerinden oluşan grup) farklı bir açı ve geometri kullanılarak tekrar etkileştirilmiştir. Bu yeni etkileşim pozisyonu sonucunda elde edilen bileşik, kurulan yeni hidrojen bağları ve bu bileşiğe ait enerji ve net yük belirlenmiştir. Yeni hidrojen bağlarını kesikli yeşil çizgiler göstermektedir. Yeni bileşiğin enerjisi ve yükü ise şeklin altında verilmiştir.



**Şekil.4.17** Altıncı etkileşim pozisyonu (solda) ve etkileşimden sonra oluşan bileşik (sağda) ve kurulan yeni bağlar (yeşil kesikli çizgiler).

$$\text{Enerji} = -2283.685 \text{ kJ/mol}$$

$$\text{Net Yük} = 0.000$$

Çizelge 4.5 Farklı etkileşimler sonucu elde edilen bileşiklerin PM3 ve AM1 metodlarına göre elde edilmiş oluşum enerjileri.

	<b>Oluşum Enerjisi(<math>\Delta H</math>) PM3</b>	<b>Oluşum Enerjisi(<math>\Delta H</math>) AM1</b>
<b>Sialik+GFS</b>	-2086.05 kJ/mol	-2304.57 kJ/mol
Slk_GFS (1. Pozisyon)	-2121.60 kJ/mol	-2298.75 kJ/mol
<b>Sialik+K</b>	-3664.58 kJ/mol	-3906.68 kJ/mol
Slk_K1 (2. Pozisyon)	-3682.73 kJ/mol	-3932.04 kJ/mol
Slk_K2 (3. Pozisyon)	-3710.02 kJ/mol	-3955.38 kJ/mol
Slk_K3 (4. Pozisyon)	-3685.41 kJ/mol	-3944.41 kJ/mol
<b>Sialik+LSW</b>	-2097.69 kJ/mol	-2234.04 kJ/mol
Slk_LSW1 (5. Pozisyon)	-2116.23 kJ/mol	-2292.16 kJ/mol
Slk_LSW2 (6. Pozisyon)	-2119.25 kJ/mol	-2283.68 kJ/mol

Tabloda yukarıda bahsedilmiş ve şekilleri verilmiş olan farklı dizilerin farklı geometrilere etkileştirilmelerinden elde edilen bileşiklerin oluşum enerjileri görülmektedir. Bu etkileşimlerde yarı-ampirik yöntemlerden faydalanılmıştır. Hesaplamalar paralel olarak çalışılmıştır. Hesaplamaların güvenilirliğini arttırabilmek açısından aynı işlem farklı metodlar kullanılarak tekrar edilmiştir. Kullandığımız iki farklı metod PM3 ve AM1 metodudur.

Hesaplamaların sonucunda elde edilen bileşiklerin oluşum enerjileriyle, bileşik oluşmadan önceki moleküllerin enerji toplamları karşılaştırıldığında etkileşimden sonra açığa çıkan enerjinin moleküllerin toplan enerjilerinden fazla olduğu görülmektedir. Bu sayısal veri bize moleküller arasında bir etkileşimin gerçekleştiğini yani bir bağ oluştuğunu bunun sonucunda da kararlı bir bileşik elde edildiğini göstermektedir. Aynı grupları içeren farklı etkileşim pozisyonlarından elde edilen bileşiklerin oluşum enerjileri bir birleri ile kıyaslanarak hangi grubun daha kararlı olduğu belirlenebilir. Örneğin, 2., 3. ve 4. etkileşim pozisyonlarını ele alacak olursak her iki hesaplamamızın sonucunda da en fazla enerjinin 3. Etkileşim pozisyonunda açığa çıktığı görülmektedir. Bu sonuç 3. etkileşim pozisyonunun 2 ve 4. etkileşim pozisyonlarında daha kararlı olduğunu ortaya koymaktadır

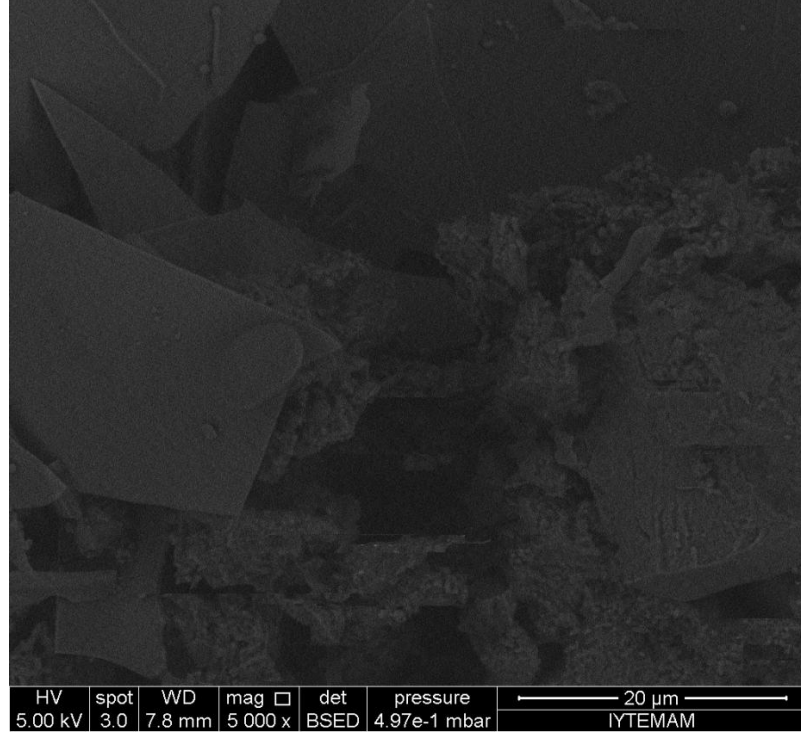
### **4.3 Parçacıkların Karakterizasyonu**

İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsünde denemelerde kullanmış olduğumuz, lektin (PHA-L), CdSe/CdS kuantum-dot nanoparçacıkları ve bu nanoparçacıklarla konjuge edilmiş lektin örneğimizin SEM (Scanning Electron Microscope) görüntüleri alınarak örnekler için boyut ve yüzey morfolojisi incelenmiştir.

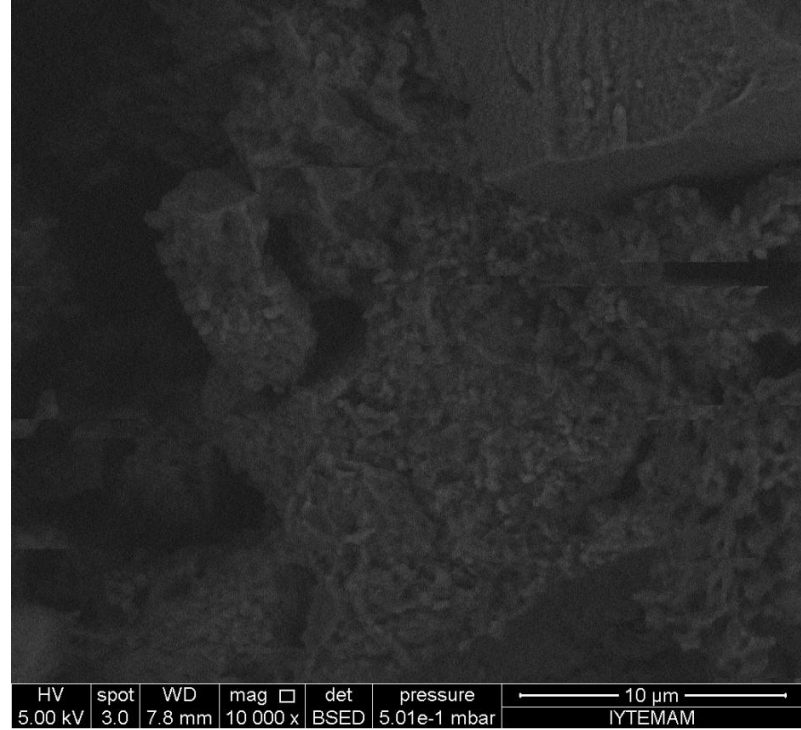
#### **4.3.1 SEM analiz sonuçları**

Bu çalışmada elde edilen SEM görüntüleri şekil 4.18, 4.19, 4.20, 4.21, 4.22 ve 4.23'de yer almaktadır.

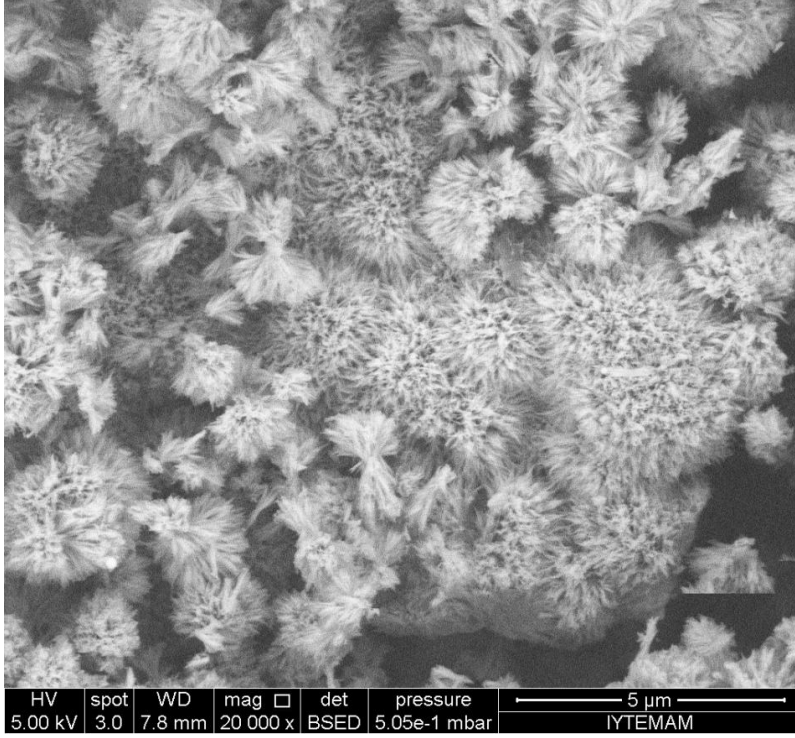




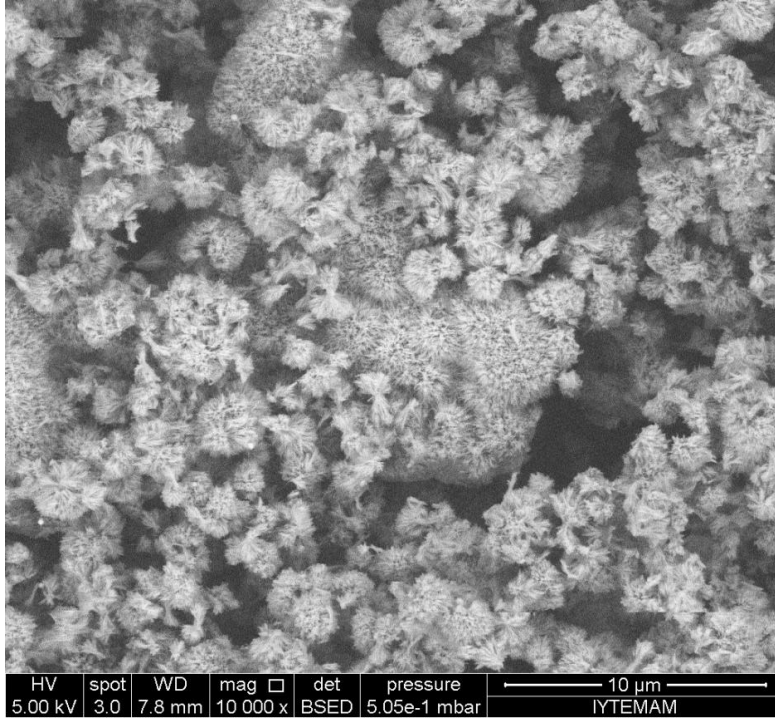
Şekil 4.18 PHA-L'nin 5000 büyütmede SEM görüntüsü.



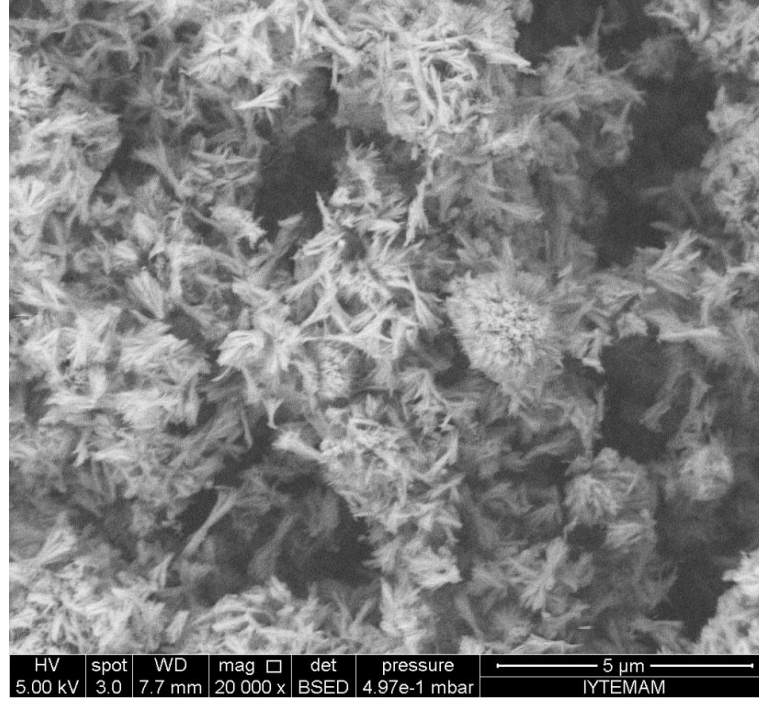
Şekil 4.19 PHA-L'nin 10000 büyütmede SEM görüntüsü.



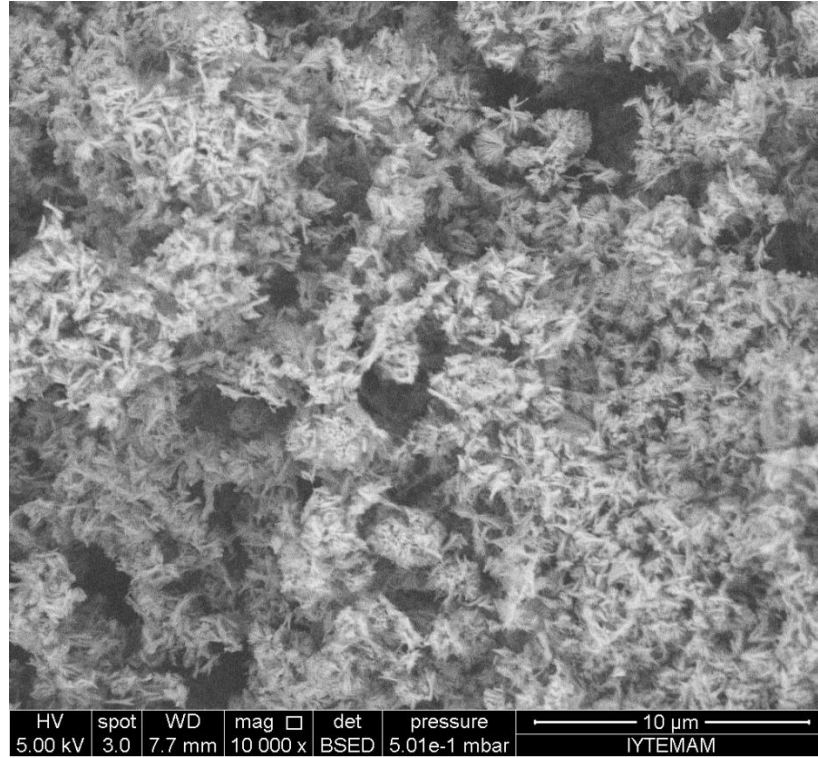
Şekil 4.20 CdSe/CdS kuantum dotların 20000 büyütmede SEM görüntüsü.



Şekil 4.21 CdSe/CdS kuantum dotların 10000 büyütmede SEM görüntüsü.



**Şekil 4.22** CdSe/CdS kuantum dotlarının ile konjuge edilmiş PHA-L'nin 20000 büyütmede SEM görüntüsü.



**Şekil 4.23** CdSe/CdS kuantum dotlarının ile konjuge edilmiş PHA-L'nin 21000 büyütmede SEM görüntüsü.

#### 4.4 Kalite Kontrol Çalışmalarının Sonuçları

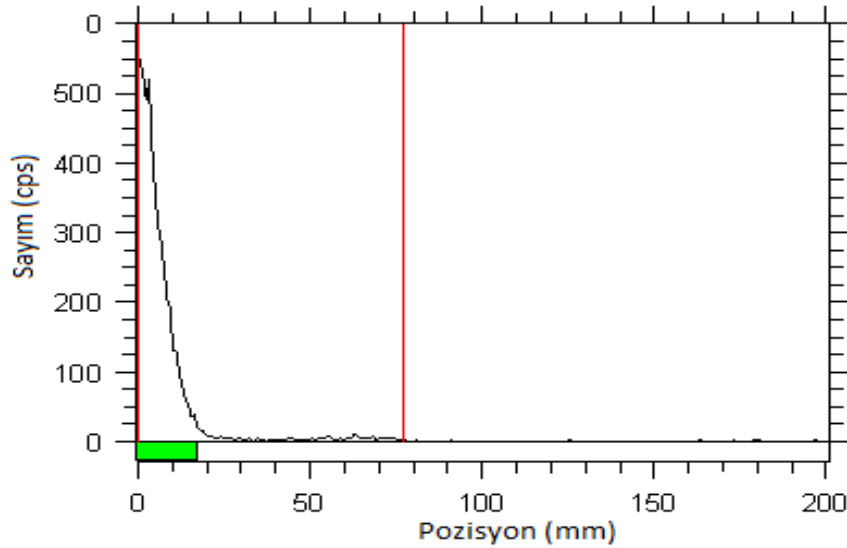
Aşağıda inaktif ve  $^{125}\text{I}$  ile işaretli bileşiklere ait kalite kontrol çalışmaları sonucunda elde edilen veriler ve bu sonuçlardan yola çıkarak sentezlenen ürünlerin saflığı görülmektedir.

##### 4.4.1 TLRC yöntemi ile elde edilen sonuçlar

Bu kısımda  $^{125}\text{I}$  ile işaretli bileşenlere ait TLRC ile yapılan kalite kontrol sonuçları yer almaktadır.

- $^{125}\text{I}$  ile işaretli PHA-L moleküllerine ilişkin TLRC yöntemi ile elde edilen sonuçlar

İnce tabaka radyokromatografisi (TLRC) yöntemi ile yapılan kalite kontrol çalışmalarında yukarıda da belirtilen denemeler sonucunda elde edilmiş optimal koşullar kullanılmıştır ve elde edilen kromatogram aşağıda görülmektedir.



**Şekil 4.24** İzopropil alkol-n bütanol-0.2 N  $\text{NH}_4\text{OH}$  (4:2:1) banyosunda  $^{125}\text{I}$ -PHA-L'e ait TLRC kromatogramı.

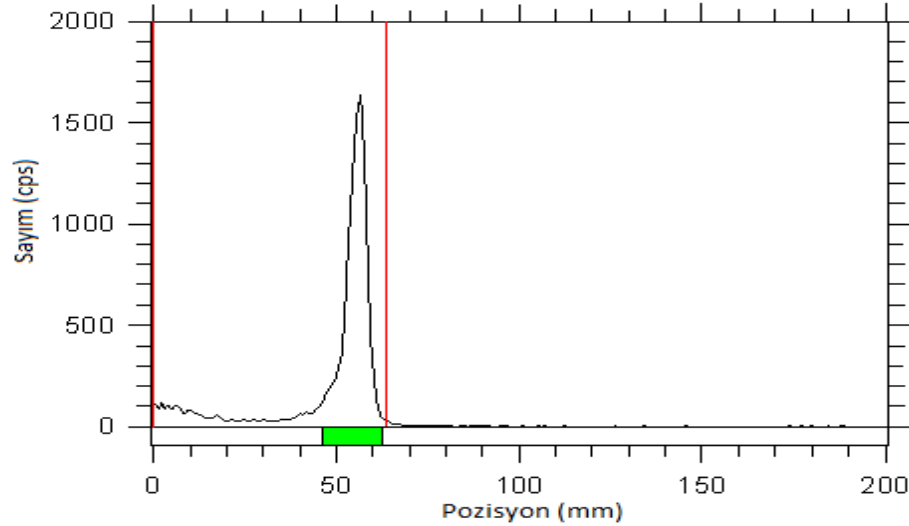
Çizelge 4.6  $^{125}\text{I}$  ile işaretlenmiş PHA-L'nin  $R_f$  değeri ve yüzde bağlanma verimi.

Madde	$R_f$ Değeri	Verim % (n=6)
$^{125}\text{I}$ -PHA-L	0.05	97±1.2
$^{125}\text{I}$	0.90	100±0.0

Çizelge 4.6'ya baktığımızda işaretli örnek ve  $^{125}\text{I}$ 'un  $R_f$  değerlerinin farklı olduğunu fakat kromatogramda sadece bileşiğin gözlemlendiği görülmektedir. Bu sentezin gerçekleştiğini göstermiştir.

- $^{125}\text{I}$  ile işaretli PHA-L-CdSe/CdS moleküllerine ilişkin TLRC yöntemi ile elde edilen sonuçlar

İnce tabaka radyokromatografisi (TLRC) yöntemi ile yapılan bu kalite kontrol çalışmasında PHA-L bileşiği önceden sentezlenmiş olan CdSe/CdS kuantum dot nanoparçacıkları ile konjuge edilmiştir. Elde edilen kromatogram şekil 4.25'de  $R_f$  ve % verim değeri ise çizelge 4.7'de yer almaktadır.



Şekil 4.25 İzopropil alkol-n bütanol-0.2 N  $\text{NH}_4\text{OH}$  (4:2:1) banyosunda  $^{125}\text{I}$ -PHA-L-CdSe/CdS'a ait TLRC kromatogramı.

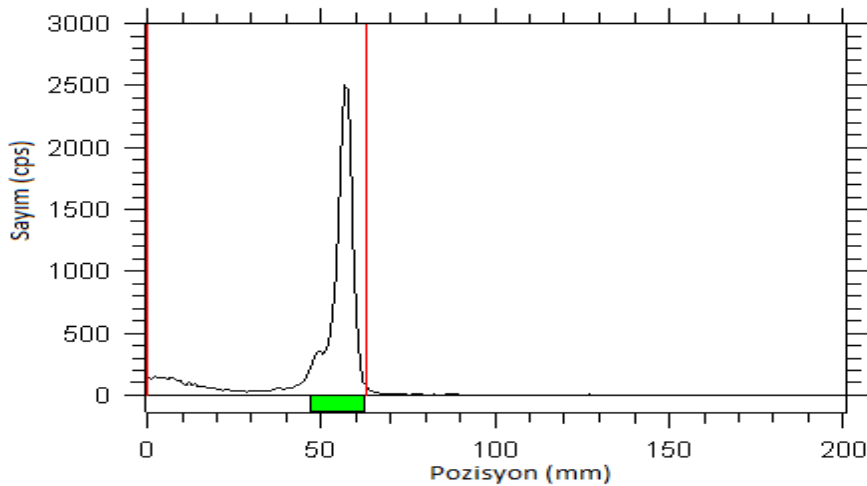
Çizelge 4.7  $^{125}\text{I}$  ile işaretlenmiş PHA-L-CdSe/CdS'nın  $R_f$  değeri ve yüzde bağlanma verimi.

Madde	$R_f$ Değeri	Verim % (n=6)
$^{125}\text{I}$ -PHA-L-CdSe/CdS	0.08	96±0.8
$^{125}\text{I}$	0.90	100±0.0

Çizelge 4.7'ye baktığımızda işaretli örnek ve  $^{125}\text{I}$ 'un  $R_f$  değerlerinin farklı olduğunu fakat kromatogramda sadece bileşiğin gözlemlendiği görülmektedir. Bu sentezin gerçekleştiğini göstermiştir.

- **$^{125}\text{I}$  ile işaretli CdSe/CdS moleküllerine ilişkin TLRC yöntemi ile elde edilen sonuçlar**

İnce tabaka radyokromatografisi (TLRC) yöntemi ile yapılan bu kalite kontrol çalışmasında önceden sentezlenmiş olan CdSe/CdS kuantum dot nanoparçacıkları test edilmiştir. Elde edilen kromatogram ve çalışma sonucu elde edilmiş sayısal verilere ( $R_f$  değeri, % Verim) ait veriler çizelge 4.8'de görülmektedir.



Şekil4.26 İzopropil alkol-n bütanol-0.2 N  $\text{NH}_4\text{OH}$  (4:2:1) banyosunda  $^{125}\text{I}$ -CdSe/CdS'a ait TLRC kromatogramı.

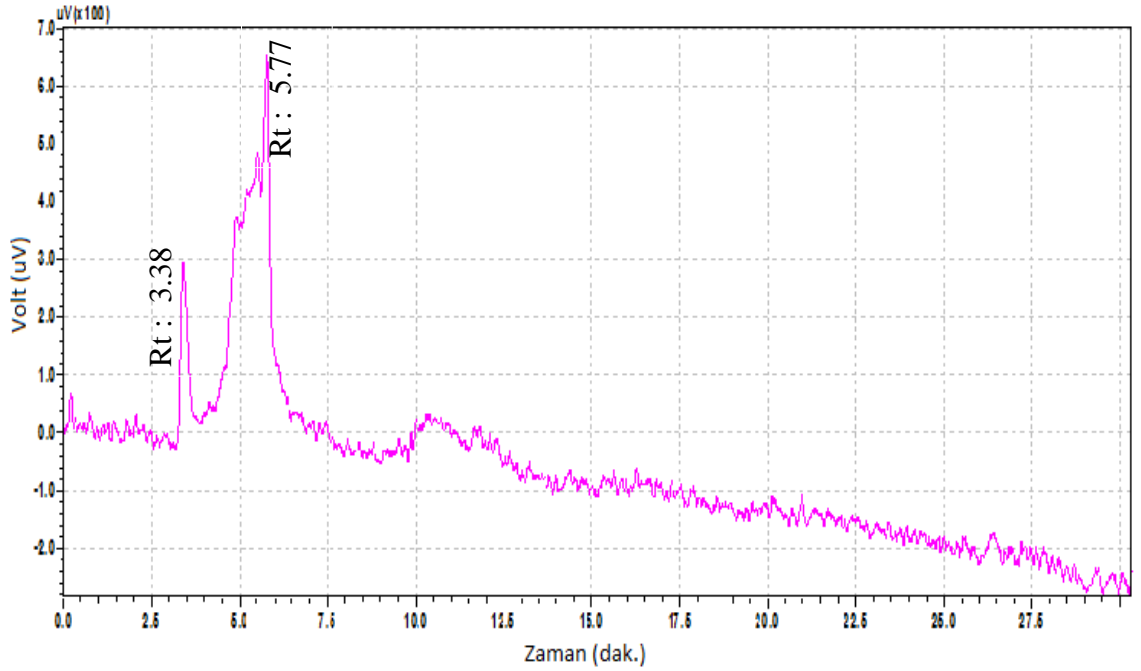
Çizelge 4.8  $^{125}\text{I}$  ile işaretlenmiş CdSe/CdS'nın  $R_f$  değeri ve yüzde bağlanma verimi.

Madde	$R_f$ Değeri	Verim % (n=6)
$^{125}\text{I}$ -CdSe/CdS	0.09	98±0.2
$^{125}\text{I}$	0.90	100±0.0

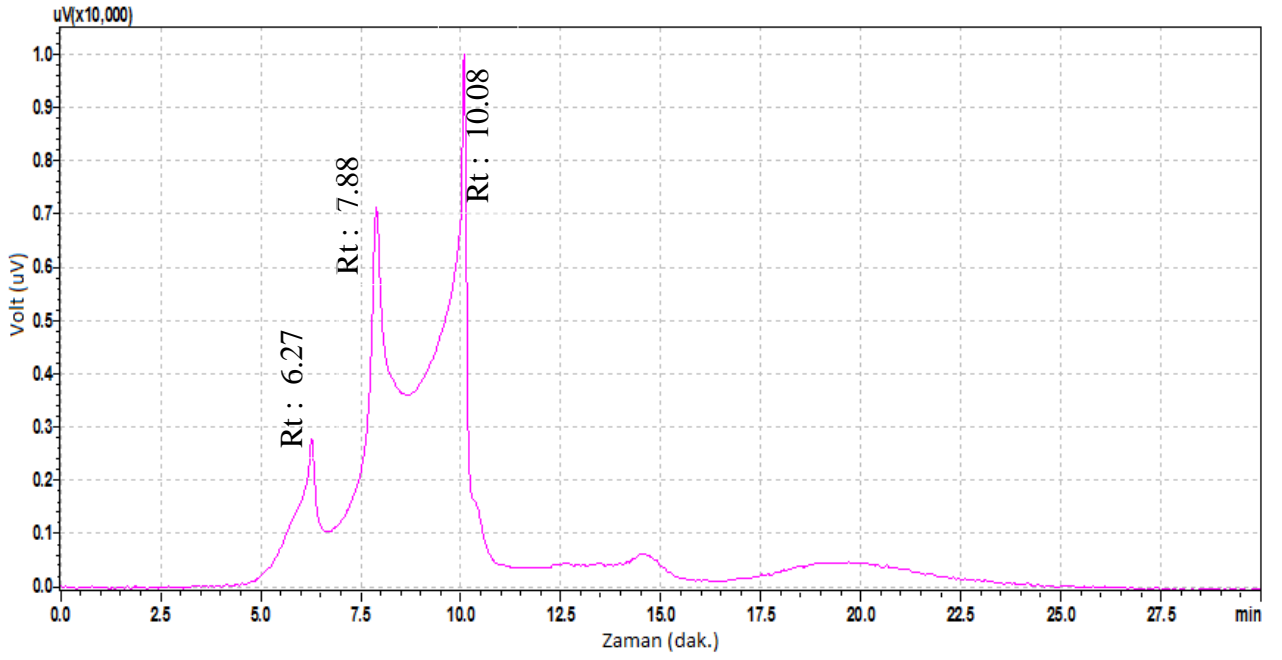
Çizelge 4.8'e baktığımızda işaretli örnek ve  $^{125}\text{I}$ 'un  $R_f$  değerlerinin farklı olduğunu fakat kromatogramda sadece bileşiğin gözlemlendiği görülmektedir. Bu sentezin gerçekleştiğini göstermiştir.

#### 4.4.2 HPLC analizi ile elde edilen sonuçlar

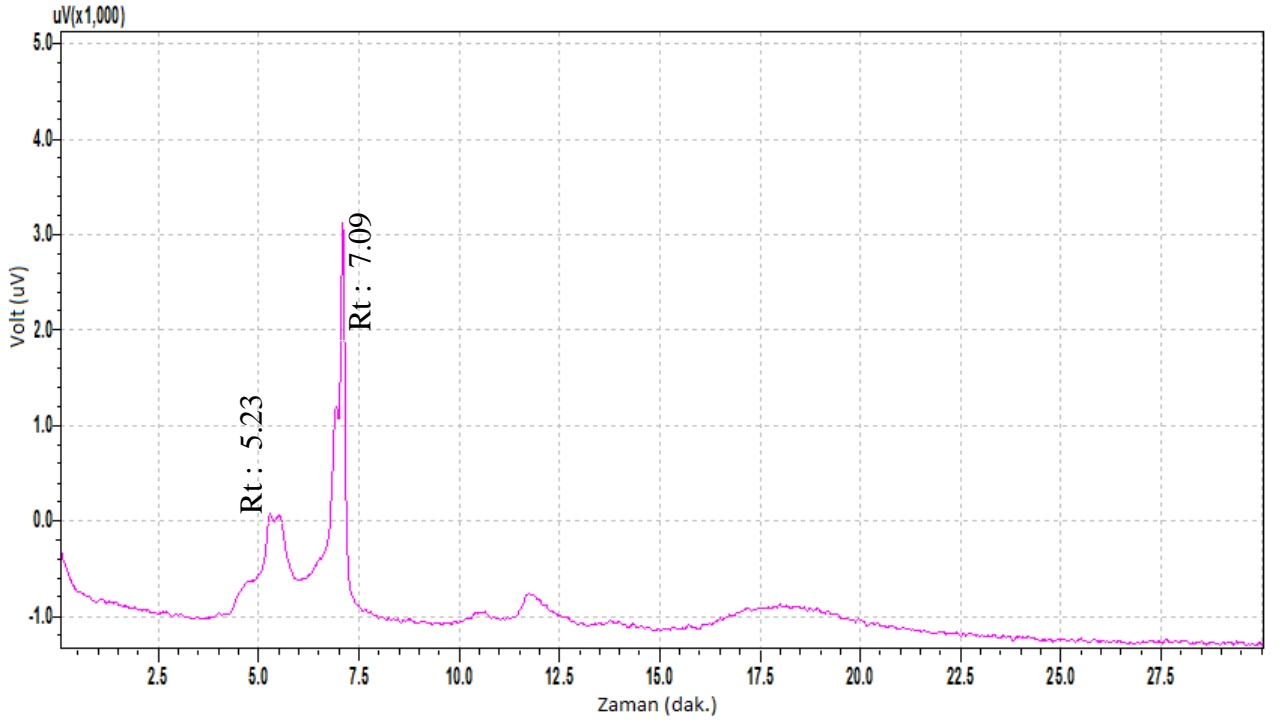
Bu yöntem kullanarak PHA-L, CdSe/CdS kuantum dot, PHA-L-CdSe/CdS kuantum dot, örneklerinin kalite kontrol çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen HPLC kromatogramları şekil 4.27, 4.28, 4.29 ve 4.30'da yer almaktadır.



Şekil 4.27 PHA-L'ye ait HPLC kromatogramı.

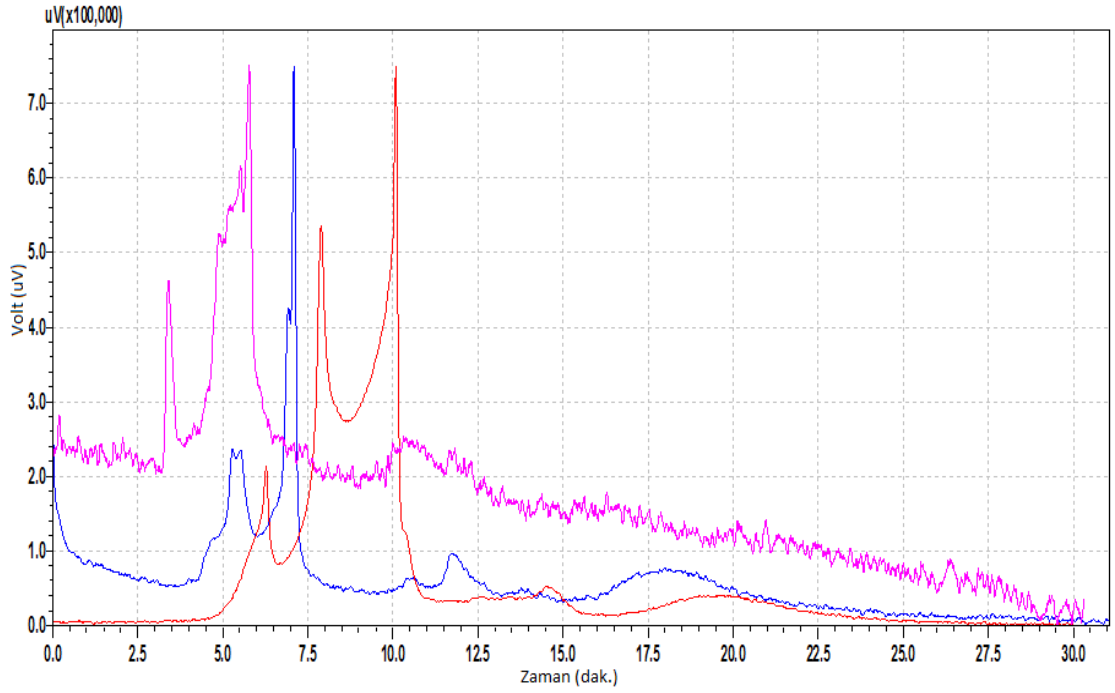


Şekil 4.28 CdSe/CdS kuantum dot nanoparçacıklarına ait HPLC kromatogramı.



Şekil 4.29 CdSe/CdS kuantum dot nanoparçacıkları ile konjuge edilmiş PHA-L'ye ait HPLC kromatogramı.





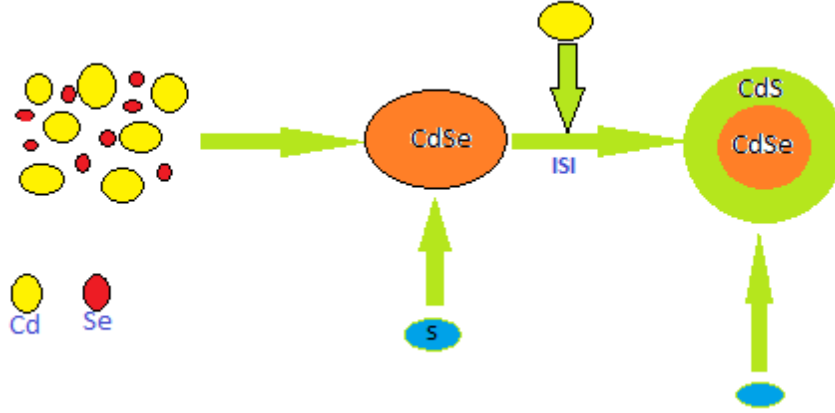
**Şekil 4.30** Üç örneğin kromotogramlarının birbirlerine göre konumu. (Pembe: PHA-L, Mavi: QD-  
PHA-L, Turuncu: QD)

Bu çalışmada yukarıda verilmiş olan çizelgedeki koşullar altında çalışılmış ve moleküllere ait alıkonma zamanları ( $R_t$ ) kromotogramlar üzerinde gösterilmiştir. Kullanılan kolonda ilk olarak molekül boyutu büyük olan moleküller ve bunları takip eden küçük boyutlu moleküller gözlenmiştir. Buna göre örneklerin tutulum zamanları birbirlerine göre kıyaslandığında sentezimizin gerçekleştiği konjugatın tutulum zamanındaki farklılıktan görüldü.

#### 4.5 Reaksiyon Mekanizmaları

Bu bölümde CdSe/CdS nanoparçacıkların sentez şeması verilmektedir.

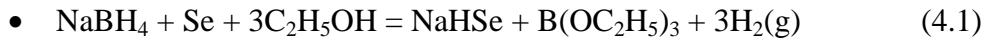
#### 4.5.1 CdSe/CdS kuantum dot nanoparçacıkların hazırlanması



Şekil 4.31 CdSe/CdS nanoparçacıklarının sentez şemasının basitleştirilmiş gösterimi.

CdSe/CdS kuantum dot nanoparçacıklarının hazırlanmasında genelde TOPO (tri-n-oktilfosfin) veya TOP, heksadesilamin gibi organik çözücüler kullanılır ve reaksiyon genelde 250-300 °C gibi yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilir (Akça, 2010).

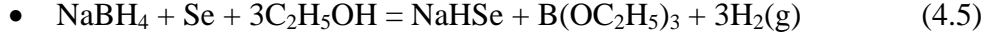
Yapılan bu çalışmada, klasik yöntemlerden farklı olarak düşük sıcaklıkta (80 °C) basit reaksiyon mekanizmalarından yararlanılmıştır. Bu reaksiyon mekanizmaları aşağıda verilmiştir.



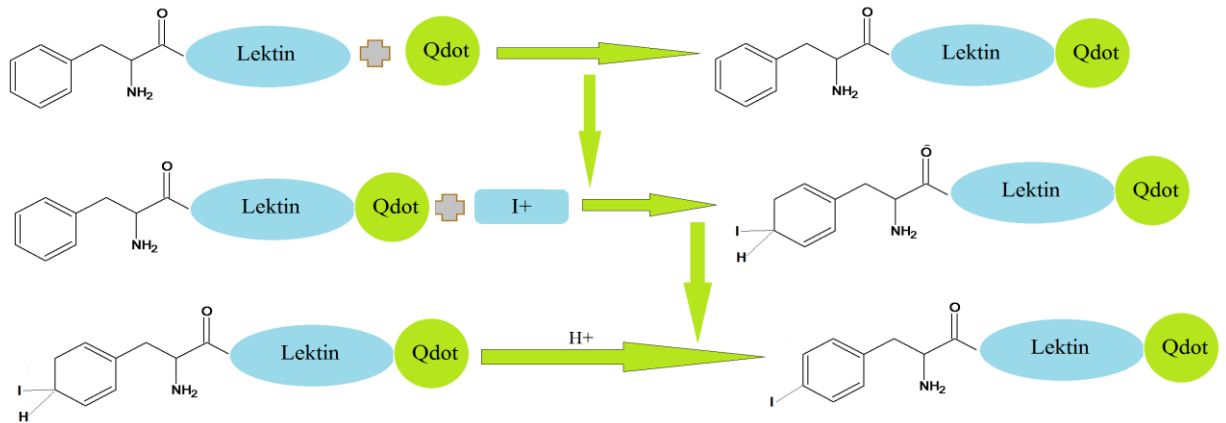
#### 4.5.2 CdSe/CdS'nin radyoaktif iyot ile bağlanma mekanizması

Yapılan bu çalışmada, kuantum dotların radyoaktif iyot ile işaretlenme potansiyelleri lektin ile konjuge edilmiş örneklerden ayrı olarak incelenmiştir. Çalışmanın bu basamağına göre, kuantum dotların radyoaktif iyot ile yüzeylerinde

mevcut olan kükürt grupları üzerinden etkileşime girdiği öngörülmüştür. Etkileşimin reaksiyon basamakları aşağıda görülmektedir,



#### 4.5.3 PHA-L'nin CdSe/CdS ile bağlanma ve radyoaktif iyotla işaretlenme mekanizması



**Şekil 4.32** CdSe/CdS kuantum dot nanoparçacıklarının PHA-L ile konjugasyonunun ve sentezlenen örneğin radyoaktif iyotla işaretlenmesinin şematik gösterimi.

Yapılan bu çalışmada, PHA lektin ile floresans özelliği gösteren CdSe/CdS kuantum dot nanoparçacıkların, lektinin doğal yapısında ve nanoparçacıkların yüzeyinde de mevcut olan kükürt gruplarının etkileşimi sonucunda disülfid köprüleri ile bir birlerine bağlandıkları öngörülmüştür. Radyoaktif işaretleme basamağında ise iodojen yöntemi ile yükseltgenmiş olan iyot ( $\text{I}^+$ ) elektrofilik substitüsyon reaksiyonları sonucunda lektinin ana yapısının dışına uzanan fenilalaninlerin

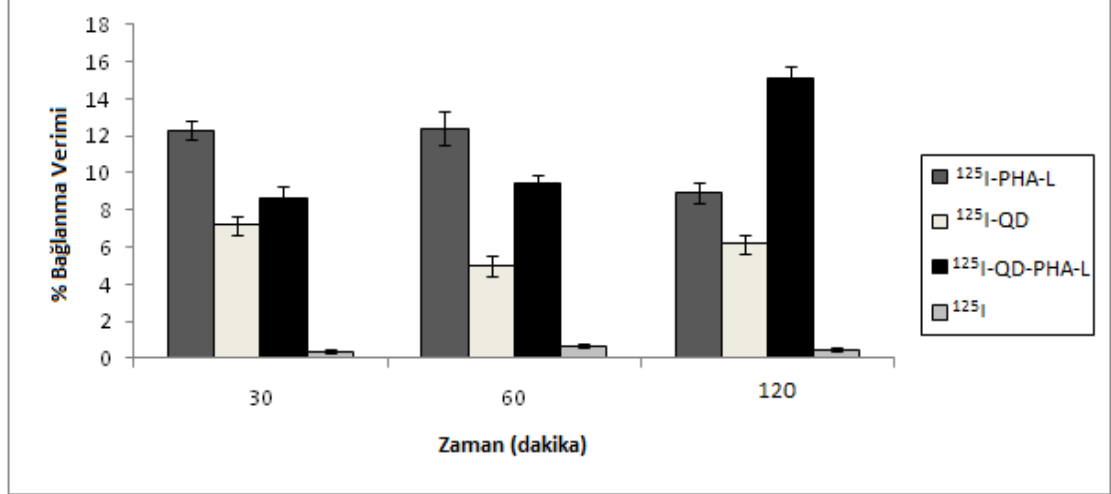
yapısında mevcut olan benzen halkasındaki  $H^+$ 'ler ile yer değiştirerek ana yapıya bağlanmıştır.

Bu reaksiyonda yükseltgenmiş iyodun benzen halkasına saldırısı sonucunda öncelikle bir sigma kompleksi oluşmuştur ve oluşan bu kompleks benzen halkası üzerinde  $H^+$  ve  $I^+$  iyonlarını aynı anda bulundurmaktadır (Mekanizmanın 2. basamağında bu oluşum şematize edilmiştir). Bu aşamada sigma kompleksi daha kararlı bir yapıya ulaşmak için bir proton kaybetmiş ve benzen halkası üzerinde sadece  $I^+$  iyonunu taşıyan sübstitiye benzen halkasını meydana gelmiştir. Bu reaksiyonlar sonucunda yükseltgenmiş iyot ve hidrojenin yer değiştirmesi geręekleřmiřtir.

#### **4.6 Biyoaffinite alışmalarının Sonuçları**

Aşağıda biyoaffinite çalışmaları grafik üzerinde gösterilmiştir ve sonuçlar yorumlanmıştır.

**4.6.1  $^{125}\text{I}$  ile işaretli PHA-L, CdSe/CdS kuantum dotlar ve CdSe/CdS ile konjuge edilmiş PHA-L'nin MCF-7 hücreleri üzerindeki bağlanma verimlerinin zamana bağlı değişimi.**



**Şekil 4.33**  $^{125}\text{I}$  işaretli PHA,Q-PHA, CdSe/CdS kuantum dot örneklerinin ve  $^{125}\text{I}$ 'in MCF 7 hücre hattında 30., 60., ve 120. dakikalardaki bağlanma oranı.

Çizelge 4.9  $^{125}\text{I}$  işaretli PHA, Q-PHA, CdSe/CdS kuantum dot örneklerinin ve  $^{125}\text{I}$ 'in MCF-7 hücre hattındaki % bağlanma verimlerinin zamanla değişimi.

Örnek	30.dak'daki % bağlanma verimi	60.dak'daki % bağlanma verimi	120.dak'daki % bağlanma verimi
$^{125}\text{I}$ -PHA-L	% 12.3±1.2	% 12.4±1.6	% 8.94±0.7
$^{125}\text{I}$ -QD	% 7.2±0.4	% 5.0±0.6	% 6.2±1.0
$^{125}\text{I}$ -QD-PHA-L	% 8.6±1.3	% 9.41±0.8	% 15.1±0.9
$^{125}\text{I}$	% 0.4±0.2	% 0.7±0.1	%0.5±0.1

Çizelge 4.10'da üzerinde çalışılmış örneklerle ait grafik ve çizelge görülmektedir. Bu çizelge ve grafik referans alınarak örneklerin zamana bağlı olarak MCF-7 hücreleri üzerinde bağlanma verimleri karşılaştırıldığında, PHA-L'nin afinitesinin zamanla doğru orantılı olarak en kararlı ana kadar arttığı görülmektedir. Kuantum-dotların bağlanma verimleri yine kendi içlerinde zaman karşı incelendiğinde bağlanma verimlerinde zamanla artış görülmektedir. Kuantum-dotlar

ile konjuge edilmiş PHA-L'nin zamana bağlı bağlanma verimine baktığımızda ise kuantum dotlar ile konjuge edilmiş lektinin stabilitesi arttığından, bağlanma veriminin zamana bağlı olarak doğru orantılı bir artış gösterdiği görülmektedir.

30. dakikada lektin farmakokinetiğinin hızlı olması nedeniyle 90. dakikada lektin bağlı nannoparçacıkların hücrelere daha yüksek oranda bağlandığı görülmektedir. I-125 afinitesi hiçbir zaman yüksek bulunmamıştır. Bu sonuçlar, PHA-L lektin bağlı CdSe/CdS nanoparçacıkların hem floresans hücre görüntülenmesinde hem dual olarak görüntüleme amaçlı radyonüklid hücre görüntülenmesinde hem de radyonüklid terapi için uygun potansiyellerinin olduğunu göstermektedir.

## 5. SONUÇ ve YORUM

Bu çalışmada, CdSe/CdS kuantum dot nanoparçacıkları sentezlendi. Sentezlenen kuantum dot nanoparçacıklarının boyutları SEM ile tayin edilip ve parçacıkların boyutlarının 8-14 nm civarında olduğu görülmüştür. Bu boyuttaki kuantum dot nanoparçacıklar vücudun birçok yerine ulaşma potansiyeline sahip olduklarından görüntüleme ve radyoterapi gibi uygulamalarda kullanılmaya uygun oldukları düşünülmektedir.

Sentezlenen CdSe/CdS kuantum dot nanoparçacıklar PHA-L ile konjuge edilmiş ve bu işlemten sonra  $^{125}\text{I}$  ile nükleofilik yöntemle göre işaretlenmiştir. İşaretleme verimi TLRC yöntemi % 98 civarında bağlanma verimleri elde edilmiştir.

$^{125}\text{I}$  ile işaretlenmiş örnekler MCF-7 meme kanser hücreleri üzerine uygulanmıştır. İşaretleme oranlarının hücre üzerindeki tutulum oranlarının zamanla değişimi gözlenmiştir. Kuantum-dotlar ile konjuge edilmiş radyoaktif iyot işaretliPHA-L'nin zamana bağlı bağlanma verimine baktığımızda kuantum dotlar ile konjuge edilmiş lektinin stabilitesi arttığından, bağlanma veriminin zamana bağlı olarak doğru orantılı bir artış gösterdiği görülmektedir. Bu sonuçlar göz önüne alındığında kuantum dotlar ile konjuge edilmiş PHA-L'nin MCF-7 meme kanseri hücrelerine olan spesifikliğı görülmektedir.

Çalışmamızda ayrıca deneysel sonuçları desteklemek ve teorikle olan uyumunu gözlemek için hesapsal teknikler kullanılmıştır. Hesapsal çalışmalarımızda protein data banktan almış olduğumuz PHA-L'nin kristal yapısı incelenmiştir. Spesifik etkileşimleri daha iyi gözleyebilmek için kristal yapının aktif bölgeleri üzerinde moleküler modelleme çalışmaları yapılmıştır.

Öncelikle yapımızdan çıkardığımız aktif kısımlar hesaplamadan önce optimize edilmiştir. Optimizasyon işleminin sonucunda yapıda mevcut olan atomlar itme kuvvetlerinin minimum ve çekme kuvvetlerinin maksimum olduğu pozisyona gelmiş ve yapılarımızın en kararlı geometrileri elde edilmiştir. Ayrıca bu işlem

sonucunda atomların arasındaki etkileşimler gözlemlenmiştir. Bu değişimleri gözlemek deneysel açıdan çalışırken kullanılacak prosedürlerin planlanmasında önemli bir yol gösterici etkindir.

MCF-7 meme kanser hücrelerine spesifik olan PHA-L'nin, MCF-7 hücrelerini hücre yüzeyindeki sialik asitle etkileşerek tanıdığı deneysel ve hesapsal sonuçlardan elde edilen bilgiler sonucunda bilinmektedir. Bu bilgiler doğrultusunda optimizasyon işleminden sonra PHA-L'nin MCF-7 meme kanser hücrelerinin yüzeyindeki sialik aside olan ilgisinin açıkça gözlenebilmesi için PHA-L'nin kristal yapısından karbohidrat etkileşim yüzeyi çıkarılmış ve moleküler modelleme yoluyla farklı pozisyonlarda etkileştirilmiştir.

Çalışmanın bu basamağında SPARTAN programı kullanılarak yarı ampirik metodlara dayanan PM3 ve AM1 yöntemleri kullanılmıştır. Bu yöntemlerle farklı etkileşim pozisyonları için yapılan hesaplamaların sonucunda yeni bileşikler (Çizelge 4.5), bu bileşiklere ait oluşum enerjileri ve aktif bölge ile sialik asit arasında kurulan bağlar gözlemlenmiştir.

Oluşum enerjisi termokimyada grup etkileşimlerinde bileşik oluşumunun belirlenmesinde etkin bir parametredir. Her elementin standart durumlarda bütün ögeleri için sıfırdan farklı olan bir oluşum enerjisi vardır. Bu enerji yapılarıdaki farklılık veya başka elementlerle etkileşmeleri sonucunda yeni bileşik oluşumlarından farklıdır. Bu standart enerji değişiklikleri termokimyada yeni bileşik oluşumlarını belirlemek için kullanılır. Bu hesap ürünlerin standart oluşum enerjisinin toplamından tepkime sonucunda meydana gelen bileşiğin standart oluşum enerjisinin çıkarılmasıyla yapılır.

Ayrıca denemelerimiz sonucunda elde ettiğimiz bileşikleri incelediğimizde en optimum H- bağlarına sahip bileşiklerin en kararlı geometride oldukları gözlemlenmiştir. Elde ettiğimiz yeni bileşiklerin oluşum enerjileri incelendiğinde PHA-L'nin sialik asitle spesifik olarak etkileştiği görülmektedir (Çizelge 4.5).



**KAYNAKLAR DİZİNİ**

**Ahuja, S.**, 2006, High-pressure liquid chromatography, *Comprehensive Analytical Chemistry*, 47(15): 485-559pp.

**Akça, Ö.**, 2010, Radyoiyot İşaretli Noktasal Özellikli Cd(Se) Nanoparçacıkların Sentezi ve Biyo-affinitelerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, 31s.

**Arotzky J., Darby A. C. and Hamilton J. B. A.**, 2010, The kinetics of aromatic iodination by means of the tri-iodine cation, *Journal Chemistry Society B*, 739 – 742pp.

**Audi G., Wapstra A. H., C. Thibault, Blachot J. and Bersillon O.**, 2003, The NUBASE evaluation of nuclear and decay properties. *Nuclear Physics A* 729: 3–128pp. DOI:10.1016/j.nuclphysa.2003.11.001

**Babu, P., Sihna, S. and Surolia, A.**, 2007, Sugar-Quantum Dot Conjugates for a Selective and Sensitive Detection of Lectins, *Bioconjugate Chemistry*, 18(1): 146-151pp.

**Bolton A. E. and Hunter W. M.**, 2010, The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a <sup>125</sup>I-containing acylating agent, Application to the radioimmunoassay, *Biochem J.*; 133(3): 529–538pp.

**Brisbois, R. G.; Wanke, R. A.; Stubbs, K. A. and Stick, R. V.**, 2004, Iodine Monochloride *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley & Sons. DOI: 10.1002/047084289X.ri014.

**Brundle C.R. , Evans C.A. and Wilson S., Jr.**, 1992, *Encyclopedia of Materials Characterization*, Butterworth-Heinemann,534-556pp. ISBN #0-7506-9168-8.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Carey, FA.**, 2006, Organic Chemistry, Sixth Edition. New York, NY: McGraw Hill. 342-360pp. ISBN 0-07-111562-5.

**Cerqueira NM., Fernandes PA., Eriksson LA. and Ramos MJ.**, 2009, MADAMM: A multistaged docking with an automated molecular modeling protocol, Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics 74 (1): 192–206pp.

**Cramer C. J.**, 2002, Essentials of Computational Chemistry, John Wiley & Sons. 353-421pp. ISBN 0471485519.

**Das S, Gates AJ, Abdu HA, Rose GS, Picconatto CA. and Ellenbogen JC.**, 2007, Designs for Ultra-Tiny, Special-Purpose Nanoelectronic Circuits, IEEE Transactions on Circuits and Systems I 54 (11): 2528–2540pp.

**David P. and Keighley G.**, 1957, Radiolabeled Antibodies, Immunology and Cancer, 69, 644-650pp., DOI: 10.1111/j.1749-6632.1957.tb49702.

**Deng, D.-W., Yu, J.-S. and Pan, Y.**, 2006, Water-soluble CdSe and CdSe/CdS nanocrystals: A greener synthetic route, Journal of Colloid and Interface Science, 299: 225-232pp.

**Flegler S.L., Heckman J.W. and Klomparens K.L.**, 1993, Scanning and Transmission Electron Microscopy: An Introduction, Oxford Univ. Press., 251-263pp. ISBN #0-19-510751-9.

**Fritz A., Patrick L. and Daniel M.**, 2010, What is nanotechnology and why does it matter?: John Wiley and Sons, from science to ethics.,3-5 pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Gilby, ED; Jeffcoate and Edwards,** 2010, 125-Iodine tracers for steroid radioimmunoassay, Journal of Endocrinology 58 (1). PMID 4578967.

**Gordon, A.T., Lutz, G.E. and Haselton, F.R.,** 2007, Introduction to nanotechnology: potential applications in physical medicine and rehabilitation, American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation, 86: 225-38pp.

**Harper, P.V.; Siemens, W.D.; Lathrop, K.A.; Brizel, H.E. and Harrison, R.W.,** 2001 Iodine-125. Proc. Japan Conf. Radioisotopes; 4th, 1961p.

**Hertz, B., Schuleller, K. and Saul H.,** 2010, MD, A Pioneer in the Use of Radioactive Iodine, Endocrine Practice 2010 16,4;713-715pp.

**Hunt, G and Mehta, M (eds),** 2008, Nanotechnology: Risk, Ethics & Law, Earthscan, London.

**Jain, K.K.,** 2005, Nanotechnology in clinical laboratory diagnostics, Clinica Chimica Akta, 358: 37-54pp.

**Kahn, M. and Kleinberg, J.,** 1977, Radiochemistry of Iodine, National Academy of Sciences-National Research Council, 25-34pp.

**Layer P, Carlsson GL. and DiMagno EP.,** 2007, Partially purified white bean amylase inhibitor reduces starch digestion in vitro and inactivates intraduodenal amylase in humans, Gastroenterology; 88(6):1895-1902pp.

**Leach R.,** 2001, Molecular Modelling: Principles and Applications, 241-258pp. ISBN 0-582-38210-6

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Levins, C. G. and Schafmeister C. E.**, 2006, The Synthesis of Curved and Linear Structures from a Minimal Set of Monomers, ChemInform 37. DOI: 10.1002/chin.200605222

**Lloyd R., Snyder and John W. Dolan**, 2006, A recent book provides a comprehensive treatment of the theory of high-performance gradient chromatography: High-Performance Gradient Elution: The Practical Application of the Linear-Solvent-Strength Model, Wiley Interscience. 129-137pp.

**Macherey-Nagel.**, 2006, LC Applications. DOI: 10.1002/9780470087954.ch20.

**Minton AP**, 2001, The influence of macromolecular crowding and macromolecular confinement on biochemical reactions in physiological media, Journal Biological Chemistry 276 (14): 105–80pp.

**Miyake K, Tanaka T. and McNeil PL**, 2007, Lectin-based food poisoning: a new mechanism of protein toxicity, PLoS ONE 2 (1): e687. DOI:10.1371/journal.pone.0000687.

**Peters W.**, 2006, Radical Halogenation, Chemistry 3421 Lecture Notes. University of Colorado, Denver.

**Peterson, C.**, 2007, Nanodot: Nanotechnology News and Discussion» Blog Archive» Nanotechnology Roadmap launch: Productive Nanosystems Conference, Oct 9-10.

**Ramachandran K.I., Deepa G. and Krishnan N.**, 2009, Computational Chemistry and Molecular Modeling Principles and applications, Springer-Verlag GmbH. 534-559pp. ISBN 978-3-540-77302-3

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Ranjita M., Sarbari A. and Sanjeeb K. S.,** 2010 Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy, *Drug Discovery Today*: 15, 842-850 pp.

**Reich, E. and Schibli A.,** 2007, High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants, Thieme: New York, 132–156pp.

**Rivkees S. A., Sklar C., Freemark M. and Clin J.,** 1998, The Management of Graves' Disease in Children, with Special Emphasis on Radioiodine Treatment, *Endocrinol. Metab.* 83: 3767-3776, DOI: 10.1210/jc.83.11.3767.

**Rosen ST, Winter JN, Gordon LI, Non-Hodgkin lymphoma. In: Pazdur R, Wagman LD, Camphausen KA and Hoskins WJ,** 2008 eds. *Cancer Management: A Multidisciplinary Approach.* 11th ed. Lawrence, KS: CMPMedica; 719–774pp.

**Rösch F.,** 2004, *Radiochemistry and Radiopharmaceutical Chemistry in Life Sciences*, 4. Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers. 624-632pp. ISBN 1-4020-1316-7.

**Samar J. K., Abhilasha B. and Himesh A. B.,** 2007, Nanocrystalline calcium phosphate ceramics in biomedical engineering, Department of Mechanical, Materials and Aerospace Engineering, University of Central Florida, P.O. Box 162450, Orlando, FL 32816-2450, United States, 441-449pp.

**Sariego, J.,** 2010, Breast cancer in the young patient, *The American surgeon* 76 (12): 1397–1400pp. PMID 21265355.

**Smith, S. J. and Sutcliffe B. T.,** 1997, The development of Computational Chemistry in the United Kingdom, *Reviews in Computational Chemistry* 70: 271–316pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

**Venkat R. Narra, Roger W. Howell, Raw S. Harapanhalli, Kandula S. R. Sastry and Dandamudi V. Rao.**, 1992, Radiotoxicity of Some Iodine-123, Iodine-125, and Iodine- 131-Labeled Compounds in Mouse Testes: Implications for Radiopharmaceutical Design, *Journal Nuclear Medicine*;33:2196–2201pp.

**Vogel A.I., Tatchell A.R., Furnis B.S., Hannaford A.J. and Smith P.W.G.**, 2010, *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, 5th Edition, Hardcover. 458-523pp. ISBN: 0582462363.

**Wells, O.F.**, 2003, *Structural Inorganic Chemistry*, Oxford: Clarendon Press. 29, 5, 535 – 536pp. ISBN 0-19-855370-6.

**Young D.**, 2001, *Computational Chemistry: A Practical Guide for Applying Techniques to Real World Problems*, John Wiley & Sons. DOI: 10.1002/0471220655.ch25.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Altan KARA

**Doğum Yeri:** Vakfikebir/TRABZON

**Doğum Tarihi:** 10.05.1985

**Öğrenim Durumu:**

**Lise** Soma Rifat Dağdelen Anadolu Lisesi (1996 – 2003)

**Lisans** Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü (2005 – 2009)

**Yüksek Lisans** Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü,

Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı (2009 – 2011)