



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HÜCRE GÖRÜNTÜLEMEDE ALTERNATİF BOYA OLARAK TİYAZOL TÜREVLERİNİN KULLANIMI VE NANOBİYOTEKNOLOJİ ALANINDA UYGULANABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Havva Nur GÜRBÜZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nanoteknoloji ve İleri Malzemeler Anabilim Dalı

Aralık-2018
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HÜCRE GÖRÜNTÜLEMEDE ALTERNATİF BOYA OLARAK TİYAZOL TÜREVLERİNİN KULLANIMI VE NANOBİYOTEKNOLOJİ ALANINDA UYGULANABİLİRLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Havva Nur GÜRBÜZ

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Nanoteknoloji ve İleri Malzemeler Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Esra Maltaş ÇAĞIL
Yrd. Danışman: Pembegül Uyar ARPACI

2018, 82 Sayfa

Jüri
Doç. Dr. Esra Maltaş ÇAĞIL
Dr. Öğr. Üyesi Pembegül Uyar ARPACI
Doç. Dr. Erdal KOCABAŞ
Doç. Dr. Salih Zeki BAŞ

Hızla gelişmekte olan teknolojiyle beraber, insan yaşamını kolaylaştırmak ve daha kaliteli hale getirmek için bilimsel çalışmaların önemi artarak devam etmektedir. Biyoteknoloji, nanoteknoloji gibi tüm alanları içinde barındıran multidisipliner alanlar sayesinde; yeni nanobiyoteknolojik ilaç tasarımları, hücre görüntülemede alternatif boya sentezleri, antibakteriyel, antimikrobiyal bileşiklerin üretimi mümkün olmuştur. Bu tezde tiyazolün floresans özelliklerini inceleyerek tıp, biyokimya ve moleküler biyolojide kromozomların, DNA ve hücrelerin görüntülenmesinde kullanılan boyar maddelere alternatif maddeler olarak kullanılması üzerine çalışmalar yapıldı. Daha önce sentezlenen potansiyel biyolojik aktiviteye sahip tiyazol ve tiyadiazol halkası içeren, ABS-34 ve ABS-40 olarak adlandırılan , 2-amino-5-(piren-1-il)-tiyazol (ABS-34) ve 2-N-metilamino-5-(piren-1-il)-tiyazolün (ABS-40) floresans özellikleri, DNA ve HSA ile etkileşimi araştırıldı. Daha sonra floresent özellik gösteren bu moleküllerin, L-929 fare fibroblast hücreleri ile sitotoksisite çalışmaları ve floresans etkiletleme (hücre görüntüleme) çalışmaları yapıldı.

Elde edilen verilere göre ABS-34 ve ABS-40'ün her ikisi de, L-929 hücrelerini ticari bir boya olan DAPI ile aynı dalga boylarında boyayarak konfokal mikroskobu ile 403,7 nm'de hücreleri görüntüledi. XTT analizinden elde edilen sonuçlara göre, 750 μM ve 1500 μM dozlarında hücre canlılıklarının hızlı bir şekilde azalmaya başlamış olduğu görüldü (sırasıyla ortalama % 65 ve % 55). ABS-34 ve ABS-40 moleküllerinin L-929 hücrelerinin üzerindeki doza bağlı etkileri karşılaştırıldığında anlamlı bir fark gözlemlenmedi. Buna göre düşük toksisite gösteren ABS-34 ve ABS-40'ın hücre görüntülemede akternatif bir boya olarak kullanılabileceği ve bu sonuçların nanobiyoteknolojik yöntemlerle aynı sonucu verdiği gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Floresans, Hücre Görüntüleme, Nanobiyoteknoloji, Tiyazol

ABSTRACT

MS THESIS

USAGE OF THIAZOLE DERIVATIVES AS ALTERNATIVE DYES IN CELL IMAGING AND THEIR APPLICABILITY IN NANOBIOTECHNOLOGY

Havva Nur GÜRBÜZ

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE OF NANOTECHNOLOGY AND ADVANCED MATERİALS

Advisor: Assoc.Prof.Dr. Esra Maltaş ÇAĞIL
Asst. Advisor: Dr. Öğretim Üyesi Pembegül Uyar ARPACI

2018, 82 Pages

Jury
Assoc.Prof. Dr. Esra Maltaş ÇAĞIL
Asst. Advisor: Assoc.Prof. Dr. Pembegül Uyar ARPACI
Assoc.Prof.Dr. Erdal KOCABAŞ
Assoc.Prof.Dr. Salih Zeki BAŞ

With the rapidly developing technology, the importance of scientific studies continues to make human life easier and better. Thanks to multidisciplinary fields that include all fields such as biotechnology and nanotechnology; new nanobiotechnological drug designs, alternative dye syntheses in cell imaging, antibacterial, antimicrobial compounds were possible. In this thesis, by studying the fluorescence properties of thiazole, studies on the use of chromosomes as alternative substances to dyes used in the imaging of DNA and cells in medicine, biochemistry and molecular biology were conducted. 2-amino-5- (pyri-1-yl) -thiazole (ABS-34) and 2-N-methylamino-5, containing the thiazole and thiadiazole ring having potential biological activity previously synthesized and named ABS-34 and ABS-40 - (piren-1-yl) -thiazole, the fluorescence properties, the interaction with DNA and HSA was investigated. The cytotoxicity studies of these molecules with L-929 mouse fibroblast cells and fluorescence enhancement ie cell screening studies were performed.

According to the data obtained, both ABS-34 and ABS-40 were stained at 403.7 nm with confocal microscopy by staining L-929 cells with the same wavelengths as DAPI, a commercial dye. According to the results obtained from XTT analysis, it was observed that the cell viability started to decrease rapidly at 750 µM and 1500 µM doses (65% and 55% respectively). No significant difference was observed when the dose-related effects of ABS-34 and ABS-40 molecules on L-929 cells were compared. Accordingly, it was observed that ABS-34 and ABS-40, which show low toxicity, can be used as an alternative dye in cell imaging and these results give the same results as nanobiotechnological methods.

Keywords: Cell Imaging, Fluorescence, Nanobiotechnology, Thiazole

ÖNSÖZ

Hayatımın en hayırlısını bilen ve yaşatan Allah'a hamd ederim. Tez çalışmalarım boyunca desteğini esirgemeyen, tüm zorluk yaşadığım anlarda yanımda olan danışmanım sayın Doç. Dr. Esra Maltaş ÇAĞIL'a, tezimin Ar-Ge kısmındaki çalışmalarında destek olan, katkılarını esirgemeyen sayın Dr. Öğretim Üyesi Pembegül Uyar ARPACI'ya ve Ar-Ge uzmanı arkadaşım Emine GÖK'e, Moleküllerin sentezinde ve her aşamada destek olan sayın Doç.Dr. Erdal KOCABAŞ'a, Molekülleri sayın Prof.Dr. Ahmet Çoşkun danışmanlığında sentezleyen sayın Arş. Görevlisi Ahmet Burak SARIGÜNEY'e, eğitim hayatım boyunca, maddi-manevi, her anlamda beni destekleyen ve yanımda olan, babam İbrahim GÜRBÜZ ve annem Gülşen GÜRBÜZ'e, tez boyunca maruz bıraktığım bütün sorularıma sıkılmadan cevap veren ablam İrem Gürbüz'e, zor durumlarımda beni dinleyen, yol gösteren Hatice ve Aliye ablama, mutluluk kaynaklarım yeğenlerime, aklıma gelmeyen tezime desteği olan herkese çok teşekkür ederim.

Havva Nur GÜRBÜZ
KONYA-2018

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **vii**

ABSTRACT ..... **viii**

ÖNSÖZ ..... **ix**

İÇİNDEKİLER ..... **x**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **xii**

ŞEKİLLER VE TABLOLAR DİZİNİ ..... **xiii**

1. GİRİŞ **1**

1.1. Tiyazoller 2

1.1.1. Tiyazoller 2

1.1.2. Nanobiyoteknoloji 4

1.1.3. Tiyazollerin nanobiyoteknolojideki önemi 10

1.2. Hücre Görüntüleme 12

1.2.1. Hücre Kültürü 12

1.2.2. Hücre Kültürü Uygulama Alanları 14

1.2.3. Hücre Görüntüleme Teknikleri 15

1.3. Floresans Spektroskopisine Genel Bakış 22

1.3.1 Spektroskopi 22

1.3.2. Floresans ve Fosforesans 23

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI 27

3. MATERYAL VE YÖNTEM 32

3.1. 2-amino-5-(piren-1-il)-tiazolün (ABS-34) Sentezi 32

3.2. 2-N-metilamino-5-(piren-1-il)-thiazolün (ABS-40) Sentezi 32

3.3. Zeta Potansiyel 33

3.4. ABS-34 ve ABS-40'ın Floresans Analizleri 34

3.4.1. ABS-34'ün floresans analizi 35

3.4.2. ABS-40'ın floresans analizi 35

3.5. Ligand ile DNA Etkileşimi 35
3.5.1. ABS-34'ün DNA ile etkileşimi 35
3.5.2. ABS-40'ın DNA ile etkileşimi 36
3.6. Ligand-Protein Etkileşimi 36
3.6.1. ABS-34'ün protein ile etkileşimi 36
3.6.2. ABS-40'ın protein ile etkileşimi 36
3.7. Konfokal Mikroskobu ile Görüntüleme 36
3.8. L-929 Hücre Hattı 37
3.9. İn-vitro Sitotoksisite Testi 37
3.10 Nanopartikül Sentezi ve modifikasyonu 37
3.11. Nanopartiküllere DNA Bağlanması 38
3.12. Floresans etiketleme 39
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA 40
4.1. ABS-34'ün sentezi 40
4.2. ABS-40'ın sentezi 40
4.3. Zeta Potansiyel 40
4.4. ABS-34'ün Floresans Analizi 43
4.5. ABS-40'ın Floresans Analizi 44
4.6. ABS-34 ile DNA Etkileşimi 45
4.7. ABS-40 ile DNA Etkileşimi 47
4.8. ABS-34 ile Protein Etkileşimi 48
4.9. ABS-40 ile Protein Etkileşimi 50
4.10. Hücre Görüntüleme Çalışmaları 52
4.11. Floresans Etiketleme 58
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 60
KAYNAKLAR 62
ÖZGEÇMİŞ 69

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

M : Molar Konsatrasyon (mol/litre))
n : Mol sayısı
V : Hacim (litre)
m : Kütle (gram)
mA : Molekül Ağırlığı
mm : Milimetre
μm : Mikrometre
nm : Nanometre
^{o}C : Santigrat Derece
Hz : Hertz

Kısaltmalar

IUPAC : Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
rDNA : Rekombinant DNA
TEM : Geçirimli elektron mikroskobu
SEM : Taramalı elektron mikroskobu
RNA : Ribonükleik asit
DNA : Deoksiriboznükleik asit
mAb : Monoklonal Antikor (antibody)
2B : 2 Boyutlu
3B : 3 Boyutlu
SPIONs : Süperparamanyetik Demiroksit Nanopartikülü
PNA : Peptit nükleik asit
TO : Tiyazol turuncu
DMF : Dimetilformamid
ABS-34 : 2-amino-5-(piren-1-il)-tiyazolün
ABS-40 : 2-N-metilamino-5-(piren-1-il)-tiyazolün
HSA : İnsan Serum Albümin
TLC : İnce tabaka kromatografisi
TRIS : 2-Amino-2-hİdroksimetil-propan-1,3-diol
XTT : 3-[4,5-Dimetiltiyazol-2-il]1-2.5- difeniltetrazolyum bromür
DAPI : 2-(4-amidinofenil)-1H -indole-6-karboksamidin)
L-929 : Sağlıklı fare fibroblast hücresi
TRITC : Tetrametil rodamin izosiyanat,
FITC : Floresan izotiyosiyanat)
APTES : (3-Aminopropil) trietoksisilan
Fe : Demir
$FeCl_2$: Demir (2) klorür
$FeCl_3$: Demir (3) klorür
Fe_3O_4 : Manyetit

ŞEKİLLER VE TABLOLAR DİZİNİ

Şekiller

Şekil 1.1. Tiyazol konfigürasyonu....1
Şekil 1.2. 1,3-tiyazol konfigürasyonu....2
Şekil 1.3 a. Tiyamin (B1 vitamini) , b. Penisilin G (R=CH2Ph)....3
Şekil 1.4. Bazı aktif tiyazol türevleri ve etkileri....3
Şekil 1.5 Nano ölçekli biyolojik yapılar....4
Şekil 1.6. Nanopartiküler boyutta olan bazı biyomoleküller....8
Şekil 1.7. Kontrollü salım sistemleri ve klasik doz şekillerinin kandaki ilaç konsantrasyonuna göre zamanla değişimlerinin karşılaştırılması....9
Şekil 1.8. (a) Penisilin G, (b) Penisilin V, (c) Ampisilin ve (d) Rodaninin yapısı....11
Şekil 1.9. Benzotiyazol konfigürasyonu....11
Şekil 1.10. Biyolojik organizasyon düzeyleri....15
Şekil 1.11. Leuwenhook'un Animalculus adını verdiği mikroskobu....16
Şekil 1.12. (a) Jannsen bileşik mikroskobu, (b) Robert Hooke mikroskobu, (c) Hooke el çizimi (mantar dokusu)....17
Şekil 1.13. Konfokal mikroskobu....18
Şekil 1.14.(a) Işık mikroskobu ve (b) faz-kontrast mikroskobuyla elde edilen canlı hücrelerin görüntü farklılığı....19
Şekil 1.15. Faz-kontrast mikroskobunda Bacillus anthracis sporlarının görüntüsü....20
Şekil 1.16. TEM ve SEM çalışma prensibi....21
Şekil 1.17. Newton prizma deneyi temel mantığı....22
Şekil 1.18. Elektromanyetik spekturum....23
Şekil 1.19. Jablonski Diagramı....24
Şekil 1.20. Singlet ve triplet durumdaki uyarılmış elektronların spin yönelimlerinin şematik gösterimi....25
Şekil 1.21. Fluoresans temel fizik kuramı (a), uygulamasının gösterimi (b), epi-fluoresan mikroskop gösterimi (c)....26
Şekil 2.1. Tiyazol bazlı- nitrojen (5a-j)....27
Şekil 2.2. a 50 °C' de (min) ısı ölçümü b) DNase- I....29
Şekil 2.3. N , N -bis [tris (2-aminoetil) amin] -3,4,9,10- bisimide (PBI-TRİS) sentezi....31
Şekil 3.1. Demir nanopartiküllerin yüzey modifikasyonu....38
Şekil 4.1. 2-amino-5-(piren-1-il)-tiazolün (ABS-34) sentez reaksiyonu....40
Şeki 4.2. 2-N-metilamino-5-(piren-1-il)-thiazolün (ABS-40) sentez reaksiyonu....40
Şekil 4.3. ABS-34 maddesinin zeta potansiyel hareketlilik dağılım grafiği....42
Şekil 4.4. ABS-34 maddesinin zeta potansiyel hareketlilik dağılım grafiği....42
Şekil 4.5. ABS-34'ün 320 nm uyarma ve 409 nm yayılma dalga boylarındaki fluoresans spektrumları....43
Şekil 4.6. ABS-34'ün kalibrasyon grafiği....43
Şekil 4.7. ABS-40'ün 350 nm uyarma ve 400 nm yayılma dalga boylarındaki fluoresans spektrumları....44
Şekil 4.8. ABS-40'ün ait kalibrasyon grafiği....45
Şekil 4.9. ABS-34'ün farklı konsantrasyonlardaki Ct-DNA ilavesi sonrası 320 nm uyarma ve 409 nm yayılma dalga boylarındaki fluoresans spektrumları....45

Şekil 4.10. %1 DMF-su ortamında sabit Ct-DNA konsatrasyonunda (0.8 mg), değişen ligand konsantrasyonuna (10-100 μM) bağlı olarak 320 nm uyarma ve 409 yayılma dalga boyundaki fluoresans değişim grafiği 46
Şekil 4.11. ABS-40'ın farklı konsantrasyonlardaki Ct-DNA ilavesi sonrası 350 nm uyarma ve 400 nm yayılma dalga boylarındaki fluoresans spektrumları 47
Şekil 4.12. Sabit Ct-DNA (1 mg) konsatrasyonunda değişen ABS-40 konsantrasyonuna (0.1-0.5 μM) bağlı fluoresans değişim grafiği.....48
Şekil 4.13. ABS-34'ün farklı konsantrasyonlarda HSA ilavesi sonrası 320 nm uyarma ve 409 nm yayılma dalga boylarındaki fluoresans spektrumları.....49
Şekil 4.14. ABS-34'ün ve ABS-34-HSA komplekslerinin 320 nm uyarma ve 409 nm yayılma dalga boylarındaki fluoresans şiddetine karşı konsantrasyon grafiği 49
Şekil 4.15. ABS-40'ın farklı konsantrasyonlarda HSA ilavesi sonrası 350 nm uyarma ve 400 nm yayılma dalga boylarındaki fluoresans spektrumları.....51
Şekil 4.16. ABS-40'ın 350 nm uyarma ve 400 nm yayılma dalga boylarındaki değişen ligand konsantrasyonlarına karşı konsantrasyon grafiği……52
Şekil 4.17. ABS-34'ün (A) negatif kontrol, (A1), Nyquest; (B) DAPI, (B1) Nyquest; (C) 6.66 μM, (C1) Nyquest, Büyütme (A-B-C) ,(10x10)X; (A1-B1-C1), Nyquest; konfokal görüntüleri; DAPI (λex: 403.7 ve λem: 425–475 nm) kanalında. 53
Şekil 4.18. ABS-34'ün (D) 33,3 μM, (D1), Nyquest; (E) 166,6 μM, (E1) Nyquest; (F) 333,2 μM, (F1) Nygquest; Büyütme (A-B-C) (10x10)X; (A1-B1-C1), Nyquest; konfokal görüntüleri; DAPI (λex: 403.7 ve λem: 425–475 nm) kanalında. 54
Şekil 4.19. ABS-40'In (A) negatif kontrol, (A1), Nyquest; (B) DAPI, (B1) Nyquest; (C) 6.36 μM, (C1) Nyquest, Büyütme (A-B-C) ,(10x10)X; (A1-B1-C1), Nyquest; konfokal görüntüleri; DAPI (λex: 403.7 ve λem: 425–475 nm) kanalında 55
Şekil 4.20. ABS-40'In (D) 31.8 μM, (D1), Nyquest; (E) 159 μM, (E1) Nyquest; (F) 318 μM, (F1) Nyquest, Büyütme (A-B-C) ,(10x10)X; (A1-B1-C1), Nyquest; konfokal görüntüleri; DAPI (λex: 403.7 ve λem: 425–475 nm) kanalında 56
Şekil 4.21. ABS-34 ve ABS-40 Maddelerinin L-929 Hücrelerinin Canlılığı üzerine etkileri (24 saat) 58
Şekil 4.22. a) ABS-40 etiketli DNA-SPIONs b) ABS-34 etiketli DNA-SPIONs nanopartiküllerinin 403.7 nm (mavi)'deki konfokal mikroskop görüntüleri.....59

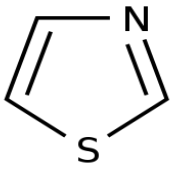
Tablolar

Tablo 1.1. Sıklıkla kullanılan hücre dizileri.....13
Tablo 1.2. Günlük yaşamdaki bazı cisimlerin mikro, nano ölçekleri 18
Tablo 3.1. ABS-34 maddesinin zeta potansiyel sonuç dağılımı 33
Tablo 3.2. ABS-40 maddesinin zeta potansiyel sonuç dağılımı 34

1. GİRİŞ

Hastalıkların tanı ve tedavisinde, ilaç endüstrisinde çeşitli hücre boyama tekniklerinden yararlanılmaktadır. Konfokal mikroskopu, flow sitometrisi, real time PCR gibi DNA ve hücre boyama teknikleri araştırma laboratuvarlarının sıklıkla tercih ettiği tekniklerdendir. Bu tekniklerin işlevsel olabilmesi ve hücrelerin görüntülenebilmesi için özel ticari boyalara ihtiyaç vardır. Yapılan deneyde kullanılacak ürün miktarıyla, orantılı olarak artacak ticari boya miktarının pahalı olması tekniklerin kullanımını kısıtlamasından dolayı, alternatif boya üretimi hem bilimsel hem de ticari olarak oldukça önem taşımaktadır.

Tiyazol, Şekil 1.1'de görüldüğü gibi bir azot ve bir kükürt atomu bulunduran beşli halka yapısına sahip heterosiklik bileşiklerin ortak adıdır (Akdoğan, 2013). Tiyazol ile türevlerinin; fluoresent özellikleri, düşük toksitite, DNA-protein bağlama kapasiteleri vb. özelliklerinden dolayı, DNA ve hücreleri boyamak için, kimya laboratuvarlarında sentezlenmektedir. Yeni bir uygulama alanı kazandırılarak, DAPI, SYBEER green, PicoGreen, FTIC ve YOYO gibi ticari olarak pahalı boyalara alternatif olması hedeflenmektedir. Böylece daha düşük maliyetle ve görüntülemeyi daha iyi yapabilecek yeni boyaların sentezi ya da daha önce sentezlenmiş moleküllere yeni kullanım alanları sunma olanağı sağlayacaktır.



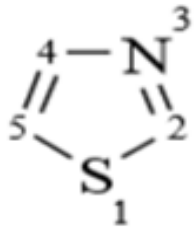
Şekil 1.1. Tiyazol konfigürasyonu
(https://tr.wikipedia.org/wiki/Tiyazol)

Tezin ana amacı, tiyazolün floresans özelliklerini inceleyerek tıp, biyokimya ve moleküler biyolojide kromozomların, DNA ve hücrelerin görüntülenmesinde kullanılan boyar maddelere alternatif, daha ekonomik maddeler olarak kullanılmasıdır. Elde edilen bu yeni tiyazol bileşiklerinin kimyasal yapıları ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR ve FT-IR yöntemleri kullanılarak aydınlatılmıştır.

1.1. Tiyazoller

1.1.1. Tiyazoller

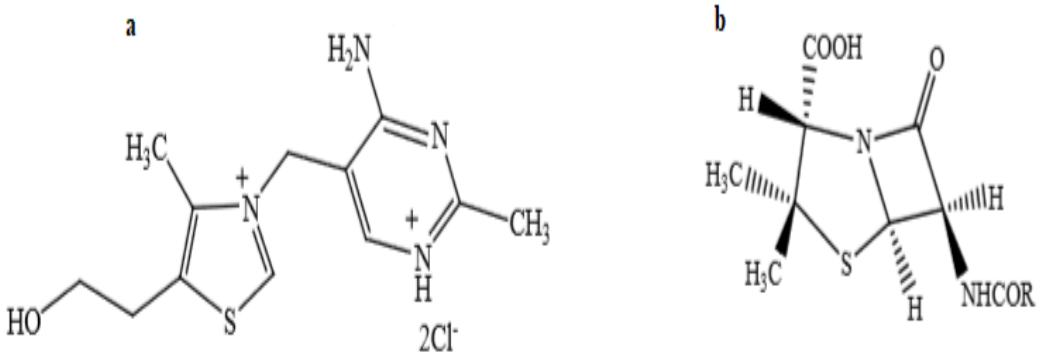
19 yy'da Gabriel, Hantzsch, Hubacher, Miolatti, Tcherniac ve Trauman tarafından tiyazol halkasının ilk sentezi gerçekleştirilmiştir (Duran, 2006). 1887 yılında Hantzsch tarafından günümüzde kullanılan en yaygın sentezi üretilmiştir. Tiyazolleri Hantzsch ve Weber, tiyofen serisinin piridini olarak ifade etmiş (Şekil 1.2) ve IUPAC'a göre 1-tiya-3-aza-2,4siklopentadien olarak adlandırılmıştır (El-Sabbgah, 2009; İkizler, 1985).



Şekil 1.2. 1,3-tiyazol konfigürasyonu (Belder, 2012)

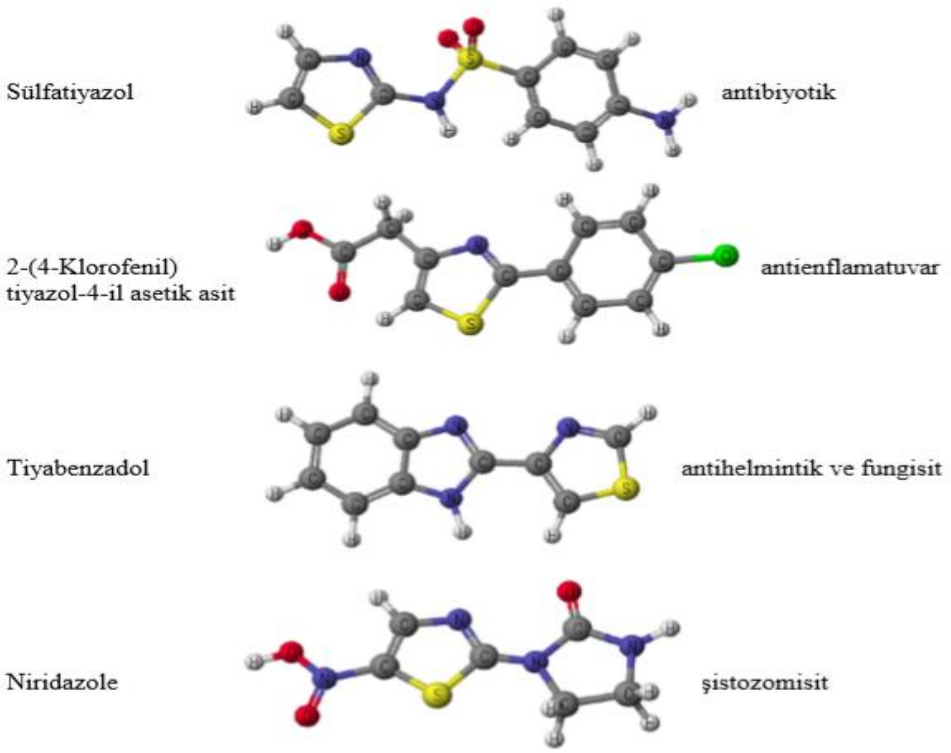
Tiyazol, yapısında bir azot (N) ve bir kükürt (S) atomu bulunduran beşli halka sistemindeki heterosiklik bileşiklerin ortak adıdır (Akdoğan N, 2013). Kapalı formülü, C_3H_3NS olan tiyazol heterosiklik bileşiklerin en basit üyesidir. Yaklaşık olarak kaynama noktası 118 °C ve mol kütlesi 85,13 g/mol olan molekül, oldukça kararlı bir yapıdadır. Aromatik yapılı, sıvı ve renksizdir. Zayıf bir baz ve doğal bir halka olan tiyazoller, 530°C'de bozunan, ısıya dayanıklı moleküllerdir (Belder, 2012).

Tiyazollerin bir kısmı doğal kaynaklarda bulunurken (tiyamin, penisilin (Şekil 1.3a-3b) bir kısmı da uzun yıllar süren araştırmalar sonucunda sentezlenerek bilime kazandırılmıştır. Tiyazoller bazı canlılarda bulunur ve bu canlılardan elde edilebilir. Örneğin; erkek fare (Mus musculus) idrarından elde edilen 2-sec-butil-4,5-dihidrotiyazol ve yine bir erkek fareden elde edilen başka bir feromon da 2-isopropil-4,5-dihidrotiyazol'dur (Tashiro, 2008).



Şekil 1.3 a. Tiyamin (B1 vitamini) , b. Penisilin G (R=CH_2Ph)
(Duran, 2006)

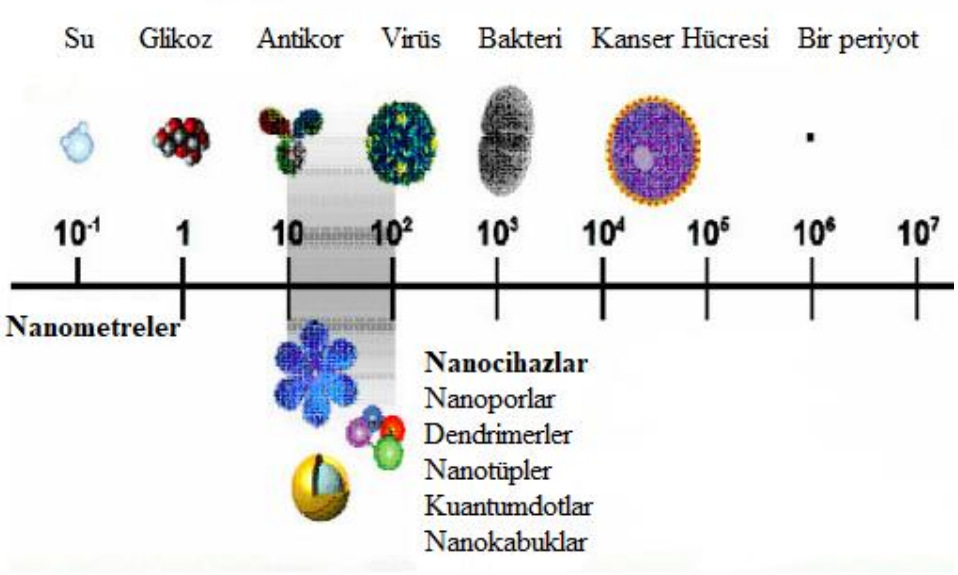
Tiyazoller yüksek sıcaklığa karşı dirençli olup, yüksek termal kararlılığa sahiptir. Bu özelliğinden dolayı, tiyazol halkası içeren polimer sistemleri sentezlenmiştir (Gupta, 1998). Aşağıda Şekil 1.4'te bazı aktif tiyazol molekülleri ve etkileri verilmiştir.



Şekil 1.4. Bazı aktif tiyazol türevleri ve etkileri (Duran, 2006)

1.1.2. Nanobiyoteknoloji

Nanobiyoteknoloji iki kavramı içeren, son dönemlerde teknolojiyle birlikte önemi giderek artan multidisipliner bir alandır. Bu multidisipliner alanı tanımlayabilmek için nanoteknoloji ve biyoteknoloji kavramlarını bilmek gerekir (Gilmartin ve O'Kennedy, 2011). Nanometre, Yunanca cüce anlamına gelir ve ölçek olarak metrenin milyarda biridir. Nanoteknoloji maddeyi atom, moleküler ve supramoleküler düzeyde kontrol ederek yeni malzeme, cihaz (proses, sensör vb.) ve sistemlerin üretilmesini içerir (Alshora, 2016). Nanoteknoloji tek bir atomdan büyük bir moleküle ya da daha büyük DNA'ya kadar çok geniş bir alanı kapsar (Şekil 1.5). Nanoteknolojinin bütün dikkatleri çekmesinin ve hızlı gelişmesinin nedeni, çok küçük boyutlarla (maddeyle atom ya da molekül seviyesinde) çalışarak, istenen özellikte ya da tamamen yeni kimyasal, biyolojik, fiziksel özelliklere sahip yapıların üretimine imkan sağlamasından kaynaklanır (Özkan, 2007). Çünkü ancak 100 nm'nin altına inildiğinde geleneksel teorilerin açıklamakta yetersiz kaldığı bilgilerin aydınlatılması mümkün olmaktadır (Ada, 2009).



Şekil 1.5. Nano ölçekli biyolojik yapılar (Grodzinski, 2005)(Özkan, 2007)

Nanoteknoloji uygulama alanları şöyledir;

1. Gen terapisi

Belirli bir hastalığı önlemek veya değiştirmek için, hasarlı genlerin çıkarılması ya da istenen özellikteki genlerin (sağlıklı genler) eklenmesine gen terapisi denir (Lee, 2018). Gen terapisiyle; genetik hastalıkları ortadan kaldırmak ve vücut işleyiş ve fonksiyonlarını düzenleyerek, daha kaliteli yaşama olanak sağlanır (Jain, 2011). Kanser, kistik fibroz, kalp hastalıklarında, diyabet, hemofili ve AIDS başta olmak üzere çeşitli ciddi hastalıkların teşhis ve tedavisi için umut vadeden bir uygulama alanıdır (Jain, 2011).

2. Kontrollü ilaç salımı

Nano-biyoteknolojinin ilaç tasarımı ve üretimi uygulamaları nanotıp olarak adlandırılır (Kargazor, 2018). Mevcut ilaçlarla bugün tanımlanan 30 bin hastalığın sadece 10 binin tedavisi tam anlamıyla yapılabilmektedir (Gürbüz, 2018). Geleneksel ilaçların belli bir hastalığı tedavi ederken başka hastalıklara zemin hazırladığı, bu ilaçların kan beyin bariyeri gibi koruyucu mekanizmaları aşamadığından tanı ve tedavide eksik kaldığı bilinmektedir. Kimyasal ilaçların yeterli olmadığı öldürücü hastalıkların tedavisinde, biyoteknolojik ilaçlarla oldukça başarılı sonuçlar elde edilebilmektedir. Kanser, alzheımer, romatoid artrit, kalp hastalıkları, diyabet hastalıkları gibi 200 hastalığın tedavisi için geliştirilen ilaçların büyük kısmını biyoteknolojik ilaçlar oluşturmaktadır. Günümüzde nanopartikül formülasyonunda olan, kanser tedavisinde kullanılan bazı ilaçlar şunlardır: Herceptin®, Caelyx®, Doxil®, Transdrug®, Abraxane® (Gregoriadis, 1974).

3. Teşhis ve hücre görüntüleme

Nano-biyoteknolojinin teşhis ve hücre görüntülemede kullanılması, kromozomların incelenmesi, DNA fragment uzunluğunun ölçülmesi, DNA parmak izi analizi, nanoteknoloji tabanlı DNA dizilimi, moleküler teşhis için nanomakine-nanorobotlar vb. birçok uygulamaya olanak sağlar (Wang, 2018).

4. İlaç hedeflendirme stratejileri

Nanobiyoteknoloji ilaç geliştirmenin tüm aşamalarında kullanılır. Aktif, fiziksel ve pasif hedeflendirme stratejileri kullanılarak bazı ciddi hastalıkların tedavisi minimum dozda etkin bir şekilde sağlanabilmektedir. Günümüzde bilim insanlarının üzerine yoğunlaştığı en önemli uygulamalardan biri, kişiye özel ilaç geliştirilerek etkin tedavinin sağlanmasıdır. Kişiye özel ilaçlarla, yaş, cinsiyet, kilo, kalıtsal hastalıklar vb. kişisel bilgilerle kişiye özel tedavi amaçlanmaktadır. Örneğin; ilaca, proteine, enzime, antikorlara vb. bağlanabilen manyetik nanopartiküller, ilaç hedeflendirmede spsesifik olarak kullanılabilmektedir (Frey, 2018).

5. Yenilenebilir teknolojiyle alternatif enerji kaynaklarının geliştirilmesi (Kumar, 2010)

6. Nanoelektronik (nanotüpler, nanoteller, nanotransistörler vb.) (Türkan, 2015)

Paramanyetik parçacıklar hücre ayırma, protein ayırma ve tek moleküllü ölçümler için önemli araçlardır. Örneğin; uygun yüzey kimyasıyla süperparamanyetik demir oksit nanopartiküller MR, kontrast artışı, doku onarımı, immumoassay, hipertermi, hücre ayrımı gibi bir çok in-vivo uygulamaya olanak sağlar. Ayrıca nano-biyosensör çip sayesinde aynı anda 64 farklı protein araştırılabilir. Farelerde yapılan deneylerde nano-biyosensörlerin tümörün erken teşhisi için etkili olduğu görülmekte bu doğrultuda kemoterapi vb. tedavilere gerek kalmadan, ölümlerin önlenmesine katkı sağlayacağını göstermektedir. Nano-biyosensörlerin en önemli uygulama alanları kanser, nörolojik bozuklukları ve kardiyovasküler hastalıklardır.

7.Toprak, su ve hava kaynaklarının kalitesinin korunması (membran teknolojileri, nano- zeolitler, nano-adsorbentler vb.) (Kargozar ve Mozafari, 2018)

Atmosferdeki parçacık konsantrasyonlarına katkıda bulunan emisyon kaynaklarının karakterizasyonu ve tanımlanması, parçacıkların kökeninin atmosferde doğal veya antropojenik olup olmadığını anlamak için gereklidir. Parçacık morfolojisi ve tek parçacıkların temel bileşimini analiz etmeyi sağlayan görüntüleme teknikleri (TEM, SEM) sayesinde (Wardencki ve Bielawska, 2016), sterilizasyonun her türlü içme suyu arıtımı, atık su geri dönüşümü, toprak ve hava kirliğinin giderilmesi gibi işlemler klasik metodlara göre daha derinlemesine yapılabilmektedir (Kargozar ve Mozafari, 2018).

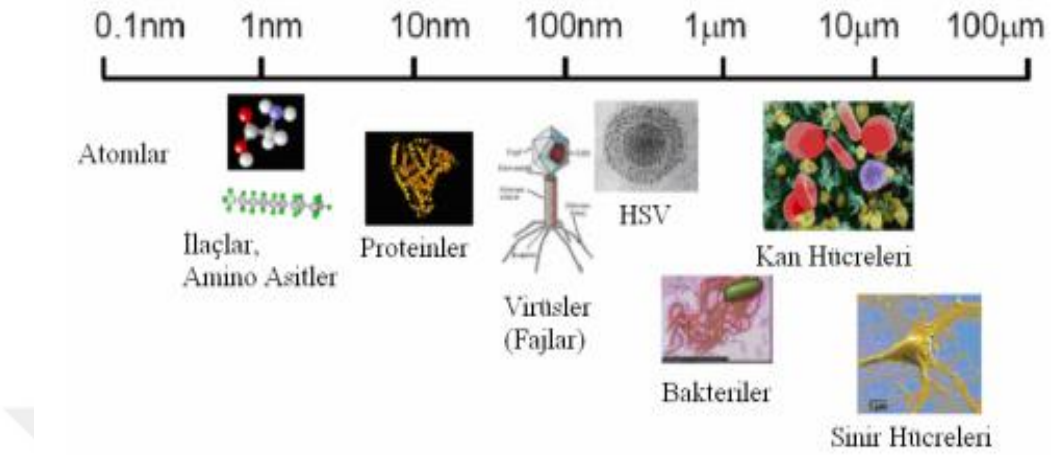
Biyoteknolojinin babası olarak bilinen Karl Ereky'e göre Biyoteknoloji: 'Biyoteknolojik sistemler yardımıyla hammaddelerin yeni ürünlere dönüştürülme işlemleri' olarak tanımlanmaktadır. Biyoteknolojinin özellikle son yıllarda gündeme gelmesiyle beraber birçok tanımı yapılmış ve hala da yapılmaya devam etmektedir. Biyoteknolojinin uluslararası kabul görmüş tanımı ise: Biyoteknoloji, belirli amaçlar için ürün veya süreçler yaratmak veya değiştirmek için biyolojik sistemleri ve canlıları veya bunların türevlerini kullanan her teknolojik başvuruyu ifade eder (Birleşmiş Milletler 1992. Madde, Biyolojik Çeşitlilik Sözleşmesi, Madde 2. Kullanım). Biyoteknolojinin çok çeşitli tanımları yapılmasına rağmen tüm tanımlardaki odak noktası ve mantık aynıdır. Biyoteknolojik çalışmalarla, yeni, kaliteli, istenilen özellikte ürünler üretip, insan yaşam kalitesini artırmaktır. Bu teknoloji sayesinde bilim insanları canlıyı, canlı için kullanır (Gürbüz, 2018).

Biyoteknoloji uygulama alanları şunlardır;

1. Doku mühendisliği (Frey, 2018)
2. Gen terapi
3. İmmünoterapi
4. İlaç üretimi (rDNA teknolojisi, monoklonal antikorlar, PCR)
5. Kök hücre tedavisi
7. Transgenik bitki ve transgenik hayvan
8. GDO'lu ürünler
9. Arıtma, biyolojik temizleme, sterilizasyon

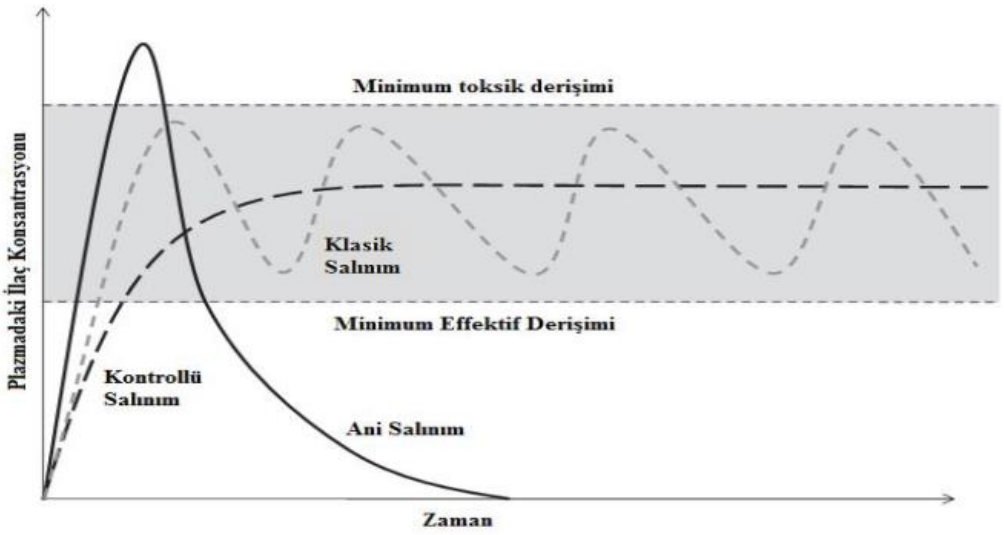
Nanobiyoteknoloji kavramı nanoteknoloji ve biyoteknoloji kavramlarının oluşmasından sonra, özellikle ilaç salınımında yapılan çalışmalarla gündeme gelmiştir (Jain, 2011). Nano-biyoteknoloji, bir yandan canlı hücrelerin DNA, RNA, lipidleri, karbonhidratları, proteinleri (Şekil 1.6), bunların birbirleriyle ilişkilerini ve hareketlerini incelerken (Taktak, 2008), diğer yandan ise bu yapıları, etkileşimleri ve hareketleri daha hızlı, daha ekonomik, istenen zamanda istenen hızda sadece hedef bölgeye ulaşacak materyalleri üretmeyi amaçlar (Canefe ve Duman, 1994). Özellikle yeni farmasötik ilaç keşifleri ve ilaç hedeflendirme üzerine oldukça yoğunlaşılmıştır.

Şekil 1.6.'da hayati öneme sahip nanopartiküler boyutta olan biyomoleküllerden bazılarının büyüklükleri verilmiştir.



Şekil 1.6. Nanopartiküler boyutta olan bazı biyomoleküller (Ada, 2009)

Klasik ilaçların etki gösterebilmesi için belli dozaja ulaşması, bu nedenle sık ve tekrarlanan dozlarda alınması gereklidir. Yarılanma ömrünün artırılmasıyla alınan doz miktarı orantılı olarak azalacaktır (Şekil 1.7). Üretilen modern biyoteknolojik ilaçlarla az dozla etkin tedavi mümkün olacaktır. Aynı zamanda etken maddenin ve akıllı ilaçların (Gürbüz, 2018) sadece hedef bölgede dağılmasını sağlayarak, sağlıklı hücrelerde yan etki minimuma indirilecektir (Tomlinson, 1989). İlaç hedeflendirilmesi TÜBİTAK'ın destek verdiği konular arasındadır (Gürbüz, 2018).



Şekil 1.7. Kontrollü salım sistemleri ve klasik doz şekillerinin kandaki ilaç konsantrasyonuna göre zamanla değişimlerinin karşılaştırılması (William, 2010)

Nanobiyoteknoloji moleküler biyoloji alanında, nano boyutta bilgilere ulaşıp, biyolojik sistemlerin nano düzeyde araştırılmasına olanak sağlayarak, gen üstüne gen ekleme, gen terapi, biyouyumlu, biyobozunur her türlü biyo-malzemeler elde etmek, biyoprosesler, biyosensörler, GDO ya da transgenik bitki- hayvanların üretilmesi, monoklonal antikorlar, DNA teknolojisinin geliştirilmesi vb. akla gelebilecek her türlü düşünceyi imkan dahiline alır (Fortina, 2005).

Nanobiyoteknolojinin uygulama alanları şunlardır;

1. Kontrollü ilaç salımı
2. Kanser araştırmaları
3. Doku mühendisliği
4. Tıbbi görüntüleme
5. Nanotaşıyıcılar
6. Biyonanorobotikler
7. Nanobiyomalzemeler (Jain, 2011)

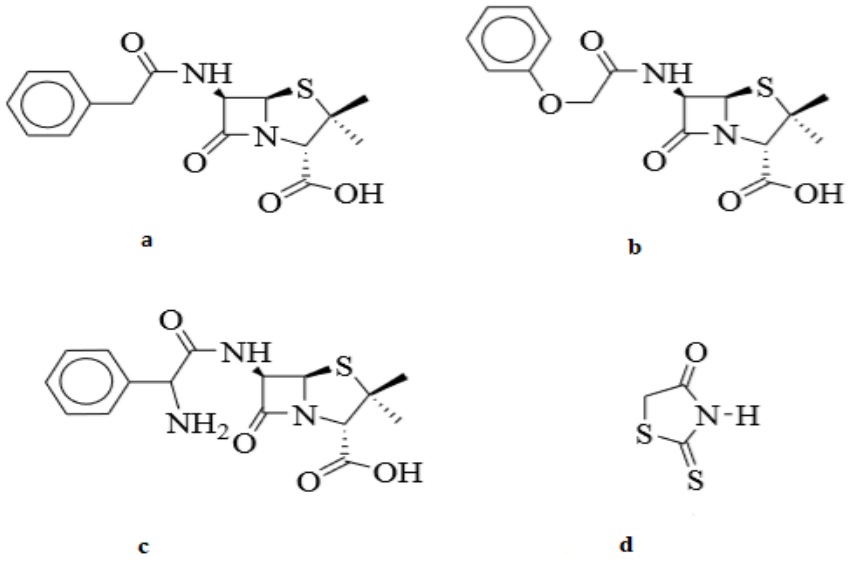
Canlılığın hala tam olarak çözülememiş olmasına rağmen, her alanda yapılan değişik uygulamalarla karşımıza çıkan bu nanobiyoteknoloji kavramıyla; yediğimiz etten içtiğimiz suya kadar aklımıza gelebilecek her türlü olgu imkan dahiline girmiştir.

İnsan insülinini, büyüme hormonlarını in-vivo ortamda üreterek insanlığın hizmetine sunmak ya da doku iskelesi çalışmalarıyla özellikle fareyi kullanarak insan organlarını insana gerek duymadan başka bir canlıda üretebilmek gibi aklın sınırlarını zorlayan her türlü fikirler bu alanın tam olarak kapsamıdır. Stephan Hawking'in "Bugünün bilim kurgusu, genellikle yarının bilim gerçeğidir" sözü nano-biyoteknolojinin önemini ve gelişimini vurgulamaktadır (Gürbüz, 2018).

1.1.3. Tiyazollerin nanobiyoteknolojideki önemi

Hastalıklara yol açan hastalık etkenlerinin (virüs, bakteri vb.) ilaçlara direnç kazanmalarından dolayı yeni alternatif bileşiklerin sentezlenmesine gereksinim duyulmuştur (Belder, 2012). Canlı olmanın getirdiği kaçınılmaz bir gereklilik olan sağlık için, gelişen teknolojiyle beraber nano-biyoteknolojik ilaç tasarımının önemi her gün artarak devam etmektedir.

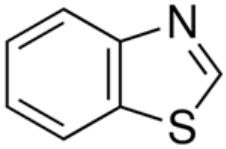
Tiyazol halkası B_1 vitamini, penisilin, karboksilaz gibi doğal bileşiklerin yapısal bileşeni olmasından dolayı biyolojik ve farmasötik alanda çok geçmeden heterosiklik kimyanın temeli olmuştur. Tiyamin ya da bilinen adıyla B_1 vitamini, hücre oluşumu, kas, sinir sistemi, dolaşım sistemini ve beynin enerji üretimi için gerekli olan, suda çözünen bir vitamindir. Buğday başağı, kepek, taze sebzeler, kırmızı et gibi çoğu besinde fazlaca bulunur (Polat, 2012). Doğal antibiyotik aktif maddeler olan, Penisilin G, Penisilin V ve Ampisilin (Şekil 1.8.a,b,c) gibi, sentez yoluyla elde edilen ilaç aktif maddeleride tiyazol içerir. Rodanin (Şekil 1.8.d), primulin boyası da tiyazol bileşikleri arasındadır. Suni ilaç aktif maddeleri olan sülfatiyazol, sülfasüksidin ve promizolda tiyazol grubundandır (Solomons, 2002).



Şekil 1.8. (a) Penisilin G, (b) Penisilin V, (c) Ampisilin ve (d) Rodaninin yapısı (Solomons, 2002)

Çok çeşitli biyolojik aktiviteye sahip olan heterohalkalı bileşiklerin başında gelen tiyazol ve türevleriyle, bu halkaları içeren yapılar; alerjik, bakteriyel, HIV gibi enfeksiyonlarda, viral, iltihaplı hastalıklarda (Khalil, 2009), günümüzün en önemli sağlık sorunu olan kansere karşı anti-kanser etkili olarak (Lesyk, 2007),(Lesyk, 2006) ve anti-konvülsan (Bachir, 1990), anti-tüberküloz (Lu, 2012) olarak ilaç üretiminde, fibrinojen reseptör antigonisti olarak ve DNA Gyrase B'nin inhibitörleri olarak kullanılmaktadır (Belder, 2012). Baz 2-amino tiyazol türevlerinin ise; bakteriyosit, fungisit, pestisit olarak kullanım alanları bulunmaktadır (Duran, 2006).

Benzotiyazoller (Şekil 1.9) pek çok biyokimyasal ajan uygulamalarında, moleküler biyoloji çalışmalarında, tıbbi ve kimyasal uygulamalarda fluoresent özellikleri nedeniyle kullanılmaktadır. Literatürde bu tip bileşiklerin tiyazol türevleri üzerinde çalışmalar fazla bulunmamakla birlikte, bu bileşiklerin bazıları nonlinear optik (Costa, 2006) ve luminesans (Day, 2004), floresans (Batista, 2004) özelliklerini gösterdikleri tespit edilmiştir (Akdoğan, 2013)



Şekil 1.9. Benzotiyazol yapısı (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Benzothiazole_simple_structure.png)

Biyolojik açıdan aktif olan bileşiklerin (tiyamin, basitrasin, penisilinler, koenzimkarboksilaz vb.) yanında, sentezlenerek elde edilen boya, sanayi ve ilaç aktif maddesi olarak kullanılan çoğu kimyasal maddeler yapısında tiyazol halkası bulundurur (Tashiro, 2008). Farmakolojide önemli bir konu olan nano-biyoteknolojik ilaç tasarımında (özellikle ağrı kesici ve ateş düşürücü) ilaç etken maddesi olarak kullanılmasının yanında; antibakteriyal-parazitik (Ghasemi, 2015), antimikrobiyal, antihistaminik, anti-inflamator (Hassan, 2012; Şen, 2018) ve anti-oksidan (Jaishree, 2012) özelliklerinde olduğu araştırmalarda kaydedilmiştir (Özel, 2006).

1.2. Hücre Görüntüleme

1.2.1. Hücre Kültürü

Hücre, doku ve organ kültürlerinin başlangıcı 1907'de Ross Harrison'ın Yale Üniversitesi laboratuvarında, bir kurbağanın sinirlerini çıkararak, basit bir tuz çözeltisinde kontrol etmesiyle ortaya çıkmıştır (Lynn, 2009). 1950'lerde insan epitelyal servikal kanserinden kültüre edilen 'HeLa' ilk hücre dizisi, memeli hücre kültürünün daha değerli hale gelmesini sağlamıştır. Bu gelişmeler sayesinde ancak 1980 yıllarında tekrarlanabilen, geniş ölçekli memeli hücre kültürleri oluşturulmuştur. 2000'li yıllardan itibaren insan genom projesi; genomiks ve proteomiks üzerindeki çalışmalar hücre kültürü laboratuvarlarının önemini daha da belirginleştirmiştir (Tiryaki, 2010).

Hücre kültürü, canlıdan alınan küçük bir parça doku veya organdaki bireysel olarak ayrılan hücrelerin, in-vitro ortamda (laboratuvar ortamında) kontrollü bir şekilde büyütülmesi ve çoğaltılması işlemine denir. Hücre kültürü laboratuvarları, üzerinde çalışılmak istenen hücrelerin (fibroblast, düz kas vb) kültüre edilerek, hücre içi ve hücreler arası biyokimyasal etkilerini (hücresel veya moleküler düzeyde) (Amelian, 2017) in-vivo ortamda (canlı ortam) yapılamayan deneylerde, devamlı olarak deneysel çalışmalara imkan vermesinden dolayı vazgeçilmezdir. Kültüre edilebilen 2 tip hücre vardır. 1.Tutunarak çoğalabilen hücreler (endotel, düz kas, fibroblast vb.) 2.Süspansiyon kültürler (kan, dalak, kemik iliği hücreleri vb.) (Tiryaki, 2010).

Hücre kültürü çalışmalarında genel olarak;

1.Hücrelerin beslenmesi 2.Pasajlanması 3.Dondurularak saklanması 4.Çözme, 5.Hücre sayımı ve sitotoksite gibi işlemler yapılır.

Çalışılacak hücrelerin bireysel olarak ayrışması enzimatik ya da mekanik yollarla gerçekleştirilir. Bu amaçla hücre kültürü laboratuvarlarında sıklıkla kullanılan proteolitik enzimler vardır. Hücreleri flask yüzeyinden kaldırmak için en çok kullanılan enzimler tripsin ve kollojenazdır (Alberts, 2002). Aşağıdaki tabloda hücre kültürü laboratuvarlarında en sık kullanılan bazı hücre dizileri verilmiştir.

Tablo 1.1. Sıklıkla kullanılan hücre dizileri (Amelian, 2017)

Hücre dizisi	**Menşei**	**Uygulamaları**
HeLa, A431	Epitelyal servikal kanser	Çok hızlı büyüme, kanser araştırmalarında yaygın olarak kullanılan hücreler
Caco-2, HT29, HCT-116	Kolon adenokarsinomu	Emilim çalışmalar ile bağırsak epiteli, toksisite testleri
U2OS	Osteosarkom hücreleri	İlaçların taşınması ve emilimi çalışmaları
SkBr3, MCF-7, MDA-MB231, ZR-75-1	Meme kanseri	İlaçların taşınmasıve emilimi,antikanser bileşiklerini tarama çalışmaları
Calu-3	Submukozal bezin seröz hücreleri	Emilim çalışmalar yoluyla bronş epiteli, metabolik ve nakil modeli respiratuar epitel ilaç teslim çalışma
HaCaT	Yetişkin insan derisi	Cildin içinden ilaç penetrasyonu
16HBE140	Bronş epitel	Bronş epitelinden emilim ve boşaltım çalışmaları

Hücreler, metobolik aktivitelerini sürdürebilmeleri için gerekli mikroçevre sağlandığı zaman laboratuvar ortamında canlı kalır, büyür ve çoğalabilir. Büyüme mitoz (hücre bölünmesi) veya farklılaşma gibi süreçlerin kontrol edilmesiyle sağlanabilir. Bu süreçte hücreler organizmanın doku ve organlarına benzer, fonksiyonel özel tip hücrelere dönüşebilir (Lynn, 2009). Deneysel çalışmaların tekrarlanabilirliği, ölçüm performansının güvenirliği ve çalışmaların tutarlılığını bulmak için hücre sayımının yapılması gerekir. Bundan dolayı canlı hücre sayılarını ve proliferasyonlarını tespit etmek için çeşitli yöntemler vardır. Canlı ve cansız hücre sayımlarının kolay, hızlı ve ekonomik bir yöntemi olan direkt hücre sayımlarında, çoğunlukla hemositometre ile trypan blue boyası kullanılarak yapılır.

1.2.2. Hücre Kültürü Uygulama Alanları

Hücre ve doku regülasyonu üzerine yapılan çalışmaların çoğu kullanımı kolay, ekonomik ve yüksek hücre canlılığı sağlayan 2B yüzeyler (doku kültürü plakaları, mikrowell plakaları, petri kapları) üzerinde büyütülen hücrelerin analizine dayanır. Fakat 2B in-vitro ortamda kültüre edilmiş hücreler farklılaşmış fonksiyonlarını koruyamazlar ve morfolojileri 3B (üç boyutlu) bir ortamda kültüre edilmiş hücrelerden farklıdır. 2B hücre kültürlerinin in-vivo ortamda fenotipik ve genotipik özellikleri (Page, 2013) taklit etme yeteneği sınırlıdır. Bundan dolayı 2B ortamları, kompleks 3B mikro-çevresinde büyüdüğü in-vivo durumu göstermez (Joshi, 2018). Bu dezavantajlarından dolayı canlı organizmanın doğru replikasyonunu kolaylaştıran, insan dokularının morfolojik ve fonksiyonel özelliklerinin tam olarak anlaşılabilmesi için 3B yapıları içeren 3B hücre kültürü sistemleri geliştirilmiştir (Nilghaz, 2018)

In-vivo ortamı taklit edebilen hücre kültürü sistemlerinin (McKee ve Chaudhry, 2017) uygulama alanları şunlardır;

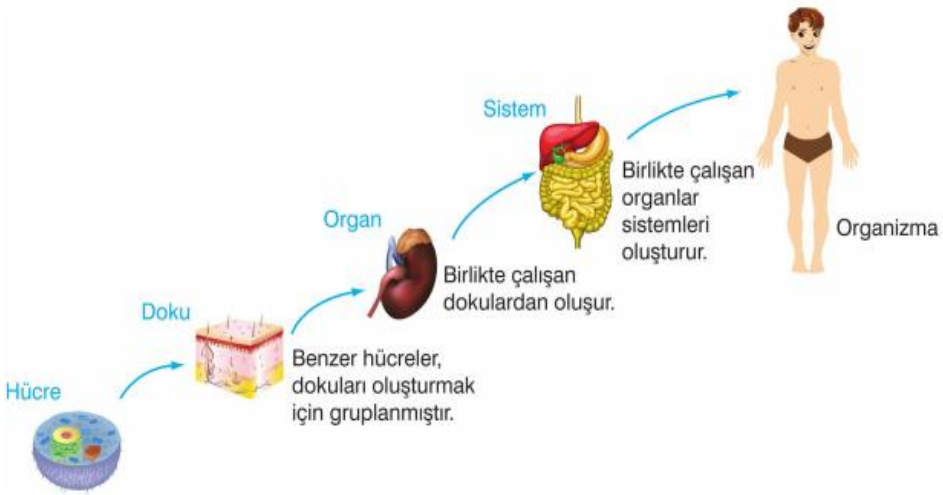
1. Doku ve deri mühendisliği
2. Hücre biyolojisi
3. İlaç keşfi ve tasarımı (Mathieu ve Ruohola-Baker, 2013)
4. Farmokokinetik
5. In-vitro toksikoloji (kanser araştırmaları)
6. Tüp bebek, kısırlık tedavileri, embriyonik araştırmalar
7. DNA ve RNA replikasyon araştırmaları

8. Hücre haberleşmesi, sinyal iletim mekanizması araştırmaları
9. Kimyasal transformasyon (Amelian, 2018)

Günümüzde, kesin tedavisi olmayan, ciddi sağlık sorunlarından biri olan kanser hastalığında, hücre kültürleri yapılarak patolojik sonuçlar elde edilmekte ve elde edilen sonuçlarla kanser hücrelerinin yapısı anlaşılarak onlara karşı etkin tedavi araştırılmaktadır. Hücre ve doku kültürü çalışmaları; hücre mekaniğinin anlaşılması, aşı, mAb'ler, sitogenetik, biyokimyasal, moleküler biyolojik (Takahashi, 2015) çalışmalarda hayati önem taşıyan bir tekniktir. Bu vb. birçok nedenden dolayı hücre kültürü, bilim insanları tarafından biyoteknoloji, nanoteknoloji ve nano-biyoteknoloji alanında yapılan araştırmaların vazgeçilmez parçasıdır.

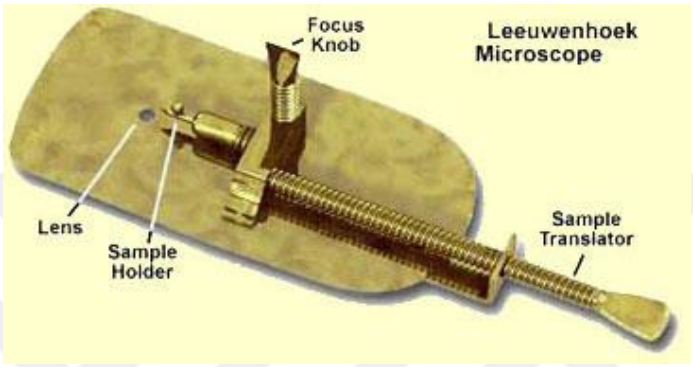
1.2.3. Hücre Görüntüleme Teknikleri

Tıpta ve biyolojide, biyolojik organizasyonun (Şekil 1.10) yapı ve fonksiyonları hakkında ulaşılan tüm bilgiler, canlılığın temel fonksiyonel birimi hücre ve yapıları hakkındaki araştırmalar sayesindedir. Organizmanın yapısının anlaşılabilmesi için, canlılık özelliği gösteren en küçük yapıtaşının tüm yönleriyle bilinmesi gerekir. Bundan dolayı gözle görülemeyen hücreyi ve yapısını görünür hale getirebilmek, canlılığın tüm sırlarını çözmek için, bilim insanları yıllardır çeşitli büyütme araçları ya da görüntüleme teknikleri üzerine çalışmışlardır (Herman, 1998).



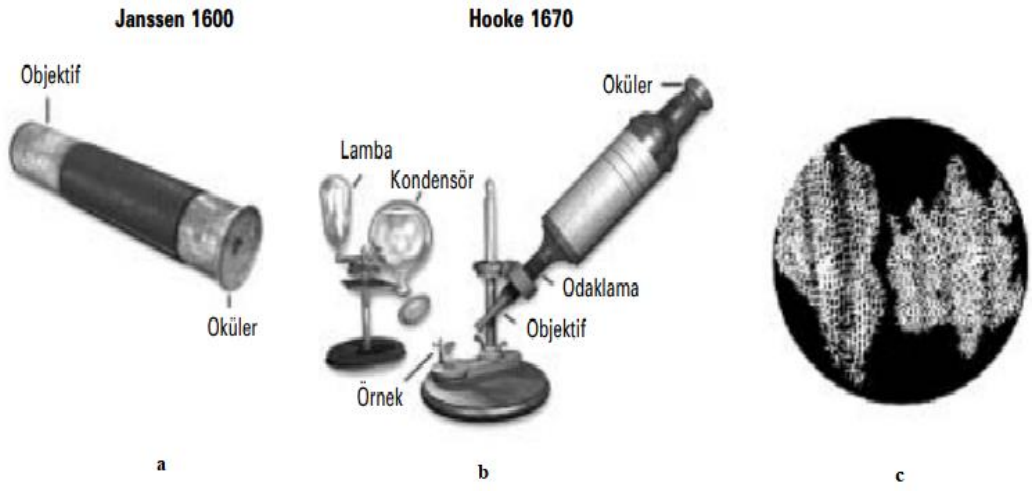
Şekil 1.10. Biyolojik organizasyon düzeyleri
(https://fenogretmeni.net/2016/09/14/6-sinif-hucre/)

Mikroskoplar; insan gözünün göremediği mikro yapıları (bakteri, virüs, hücre vb.) gelişmiş mercekler sayesinde detaylı görüntülenmesini sağlayan ve bunu bilgisayar ortamına taşıyan aletlerdir. Bazı kaynaklar ilk basit mikroskobun (Şekil 1.12a) Hollandalı Zacharias Janssen (1580-1638) tarafından bulunduğunu ileri sürer. 1600'lerde Leuwenhook 'Animalculus' (Şekil 1.11) ismini verdiği mikroskobuyla şişe mantarını incelemiştir.



Şekil 1.11. Leuwenhook'un Animalculus adını verdiği mikroskobu (http://www.nkfu.com/anton-van-leeuwenhoek-neyi-icat-etti/)

Robert Hooke bilim tarihinde hücre görüntülemede başlangıç olarak kabul edilen mikroskobuyla (Şekil 1.12b), şişe mantarına odaklanarak çizmeye çalıştığı delikli yapıyı hücre (Şekil 1.12c) olarak tanımlamış ve ilk kez hücre kavramını kullanmıştır. Hooke'un ürettiği mikroskobuyla günümüz mikroskopları arasında dış görüntüleri olarak çok farklılık olsa da, genel itibariyle görüntülemenin temel mantığını oluşturan fizik kanunları aynıdır (Puralı, 2004)



Şekil 1.12. (a) Jannsen bileşik mikroskobu, (b) Robert Hooke mikroskobu, (c) Hooke el çizimi (mantar dokusu) (Puralı, 2004)

Laboratuvarlarda sıklıkla kullanılan 3 çeşit mikroskop vardır. 1.Işık mikroskobu, 2. Elektron demeti mikroskobu ve 3. Ultrases mikroskobu (Puralı, 2004). In-vivo çalışmaya olanak sağlayan ışık mikroskobu genel prensipleri itibariyle; 1a.Fluoresan mikroskobu 1b. Konfokal mikroskobu, 1c. Faz kontrast mikroskobu olarak 3 başlık altında incelenebilir (Murthy, 2011). Nano boyutlu malzemelerin yapı ve özelliklerini, görüntüleme olanağı sunan elektron mikroskopları; 2a. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve 2b.Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) olmak üzere ikiye ayrılır (Wardencki ve Bielawska, 2016). İnsan gözü 0,1 mm, ışık mikroskobu 0,2 μm ve elektron mikroskobunun ayırt etme gücü 0,1 nm'dir (Karakoç, 2016).

Tablo 1.2. Günlük yaşamdaki bazı cisimlerin mikro, nano ölçekleri (İşçi, 2008)

Cisim / dalga	Büyüklük (nm, nanometre)	Büyüklük (mikrometre, µm)	Büyüklük (mm)
Pire	1,500,000	1500	1.5
Toz Mite	200,000	200	0.2
Saç kılı-çap	50,000	50	0.05
Alyuvarlar	7000	7	0.007
Mikrop,Bakteri	1000	1	0.001
Virüs	100	0.1	0.0001
DNA	2	0.002	0.000002
Görünür ışık, λ	400-800	0.4-0.8	0.0004-0.0008
Elektron,100keV, λ	0.004	$4x10^{-6}$	$4x10^{-9}$

$1mm = 10^{-3}\ \mu m = 10^{-6}\ nm = 10^{-7}\ A^{o}$

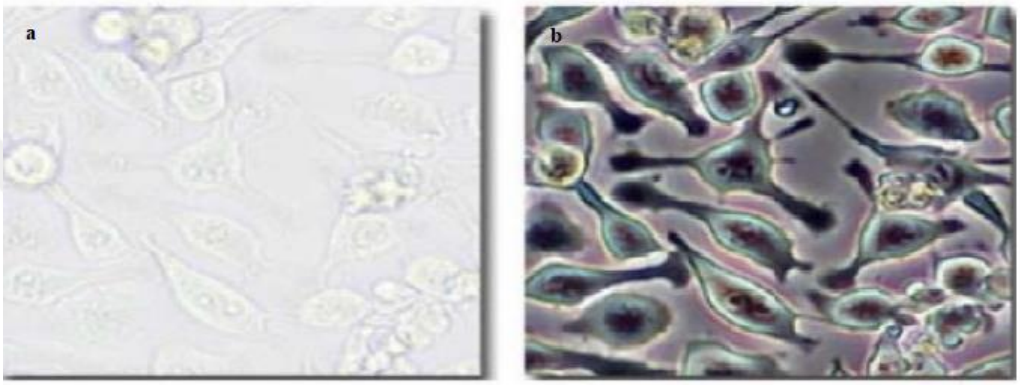
$1\ A^{o}\ (Angstrom) = 10^{-1}\ nm = 10^{-4}\ \mu m\ = 10^{-7}\ mm = 10^{-10}\ m$

Konfokal mikroskobu doku mühendisliği 3B görüntülemede yaygın olarak kullanılan yüksek çözünürlüklü lazer tarama mikroskobudur (Hao, 2018). Mevcut konfokal mikroskopları lazer ışının taranması prensibine dayanır (Wang ve Larina, 2017). Konfokal mikroskobu genel itibariyle; hücre-doku içi protein organizasyonunu GPF (yeşil fluoresan protein) kullanarak görüntüleme, genlerin (Paddock, 1998), dokuların, hücrelerin ayrıntılı morfolojik ve fonksiyonel bilgilerinin görselleştirilmesi-analiz edilmesi, canlı hücre ve dokuların yüksek çözünürlüklü görüntülenmesi, yüzey ve yakın yüzey yapılarını hasarsız görüntülenmesi, hücrelerin ve yüzeylerin üç boyutlu rekonstrüksiyonları gerçekleştirilebilir (Murthy, 2011).



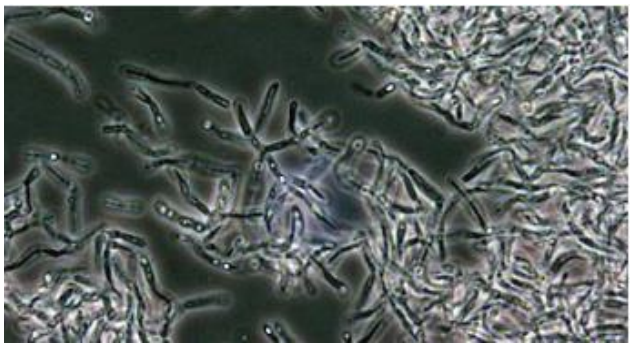
Şekil 1.13. Konfokal mikroskobu

Faz kontrast mikroskobu biyolojik çalışmalarda sıklıkla kullanılan bir görüntüleme tekniğidir. Işığın farklı kırılma özelliğiyle hücre ve hücre dışı yapılardan geçerken şeffaf objeden incelenen örneklerin hücre içi yapılarının görüntülenmesini sağlar (MEB, 2011). Boyanmamış canlı hücrelere gönderilen ışık organeller ile karşılaşır ve yansır. Farklı fazlarda ve farklı zamanlarda yansıyan ışık, sağlanan faz-kontrastlık sayesinde detaylı görüntünün oluşmasını sağlar. Aşağıda Şekil 1.14a- 1.14b' de iki mikroskop görüntüleri arasındaki farklılık gösterilmiştir.



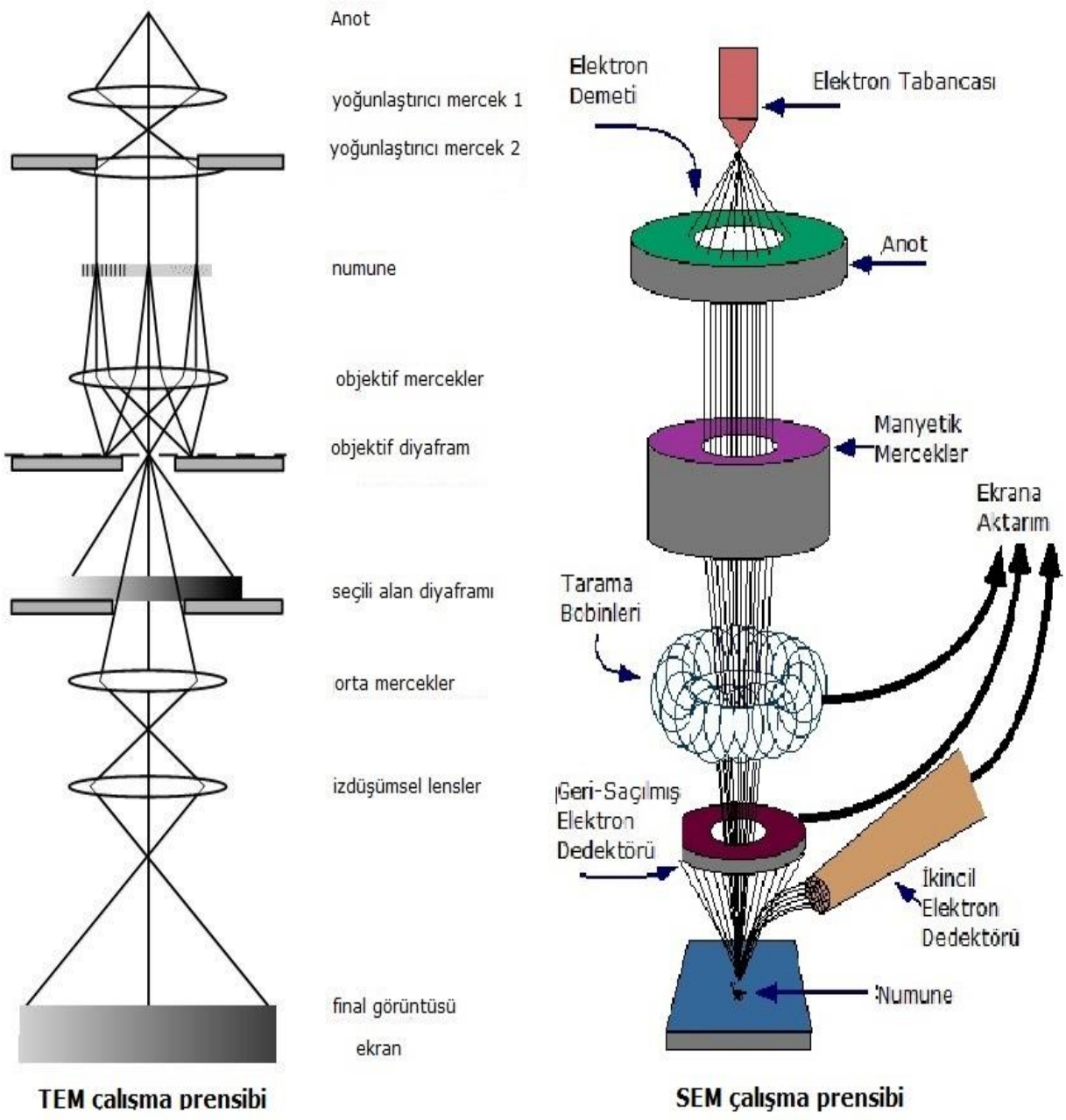
Şekil 1.14. (a) Işık mikroskobu ve (b) faz-kontrast mikroskobuyla elde edilen canlı hücrelerin görüntü farklılığı (Karakoç ve ark., 2016)

Işık ya da karanlık alan mikroskoplarının yetersiz kaldığı durumlarda, boyanmamış canlı hücre ve dokular, ölü hücreler, hücre sitoplazması, detay incelenmesi gereken yüksek büyütmelerde membran farklılıklarının belirlenmesinde kullanılır (Karakoç ve ark., 2016; MEB, 2011). Konfokal mikroskobu ile geleneksel faz kontrast mikroskobunun farkı, konfokal konfigürasyonu, daha derin kesite imkan sağladığından dolayı yüksek çözünürlüklü 3D rekonstrüksiyonu sağlayabilmektedir (Wang ve Larina, 2017).



Şekil 1.15. Faz-kontrast mikroskobunda Bacillus anthracis sporlarının görüntüsü
(Karakoç ve ark., 2016)

Elektron mikroskopları; son 80 yıldır nano boyutlu malzemelerin yapı ve özelliklerinin belirlenmesini sağlayan devrim niteliğinde bir görüntüleme teknolojisidir (Inkson, 2016). Işık mikroskobunda görüntüleme için ışığın dalga boyu kullanılırken, elektron mikroskoplarında ise elektronun dalga boyu kullanılır. Elektronların dalga boyu ışığın dalga boyundan daha düşük olduğu için çözünürlük ışık mikroskoplarına göre bin kat daha fazladır (Woodford, 2018). Tek atomik boyutlarına kadar, mikron altı boyutlu nesnelerin görüntülemesine imkan tanıyarak, nanoteknoloji ve nano-biyoteknoloji gibi alanların gelişmesine katkı sağlar. Günlük yaşamda kullanılan tüm akıllı telefonlar, televizyonlar, arabalar, uçaklar gibi kullanılan nesnelerin çoğunun gelişimi elektron mikroskobu sayesindedir (Inkson, 2016). TEM (Geçirimli elektron mikroskobu) ve SEM'in (taramalı elektron mikroskobu) genel çalışma prensibi Şekil 1.16'da verilmiştir.



Şekil 1.16. TEM ve SEM çalışma prensibi
(http://biyologlar.com/daha-yakin-olmak-icin-elektron-mikroskoplari)

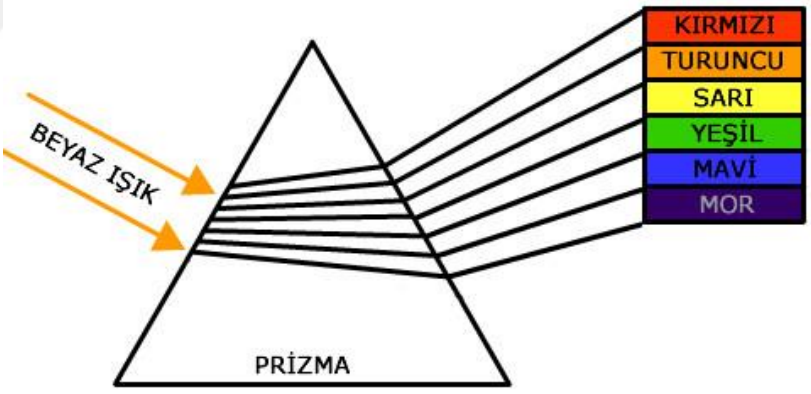
2B ve 3B malzeme karakterizasyonu için çok yönlü tekniklerinden olan SEM ve TEM, hem görüntüleme hem de kimyasal analizlerde nano boyutlardan mikro boyutlara kadar uzanan geniş aralığı vardır. (Corradini ve McClements, 2017). Materyal örnekleri 1-10 nm (Abraham, 2007) olan elektron mikroskobuyla; malzemelerin morfolojisi, kristal yapısı, element kompozisyonu ve elektronik

özellikleri, (Adams ve Barbante, 2015) molekülün doğal boyutunu, şeklinin detaylı görüntüsünü, membran bütünlüğü ve değişiklikleri, hücre matriks ilişkileri, (Rhodes, 2009) gıdaların yüzeyini veya yapısını değerlendirmek vb. görüntülemek için kullanılır (Corradini ve McClements, 2017).

1.3. Floresans Spektroskopisine Genel Bakış

1.3.1 Spektroskopi

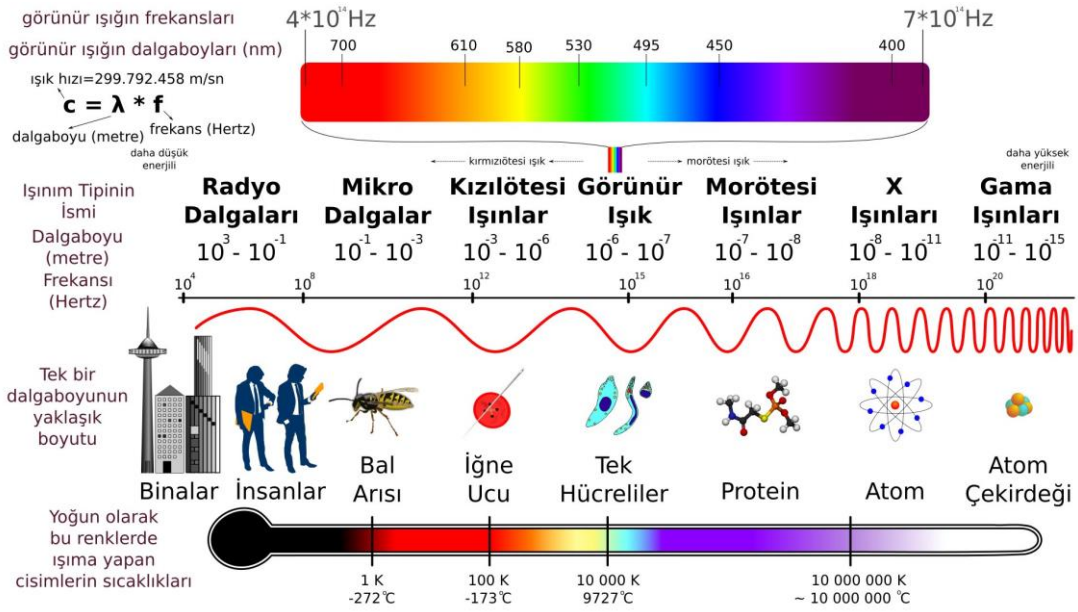
Spektroskopi kimya biliminde sıklıkla duyulan bir kavram olsa da yaptığı incelemeler ve çalışma alanlarıyla fizik, fonotik ve optik temelli metodlardır. Moleküler biyoloji, biyofizik, kimya, astrofizik, elektrokimya vb. birçok alanda spektroskopi kullanılır (Ghosh, 2018). Spektroskopik teknikler, biyokimyasal aktivitenin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapıya bağlı olduğu nano-biyoteknolojik ürünlerin karakterize edilmesinde önemli yere sahiptir (Hills, 2017). Spektroskopinin başlangıcı Isaac Newton'un prizma deneyi (Şekil 1.17) kabul edilir. (Eskier, 2017).



Şekil 1.17. Newton prizma deneyi temel mantığı
(http://www.karmabilgi.net/renk-tayfi-ve-gorunur-isik/)

Deneysel olarak sadece frekans ölçümlerini gösteren, atomların elektromanyetik yapılarını tayin etmek için kullanılan metotlara spektroskopi denir. Temel mantığı; enerji ile (elektromanyetik dalga) moleküllerin etkileşmesine (yansıtma, soğurulma veya salınma) dayanır (Cüce, 2012). Beyaz ışığın prizmadan geçirilmesiyle elde edilen ışınların bütün dalga boyları ve renklerini içeren çizgiler spektrum (Şekil 1.17) olarak

tanımlanır (Eskier, 2017). Elektromanyetik spektrumda (Şekil 1.18) beyaz ışık görünür bölgede (400-800 nm) yer alır (Karakoç, 2016).



Şekil 1.18. Elektromanyetik spektrum
(https://www.youtube.com/watch?v=7kpUIOjYu84)

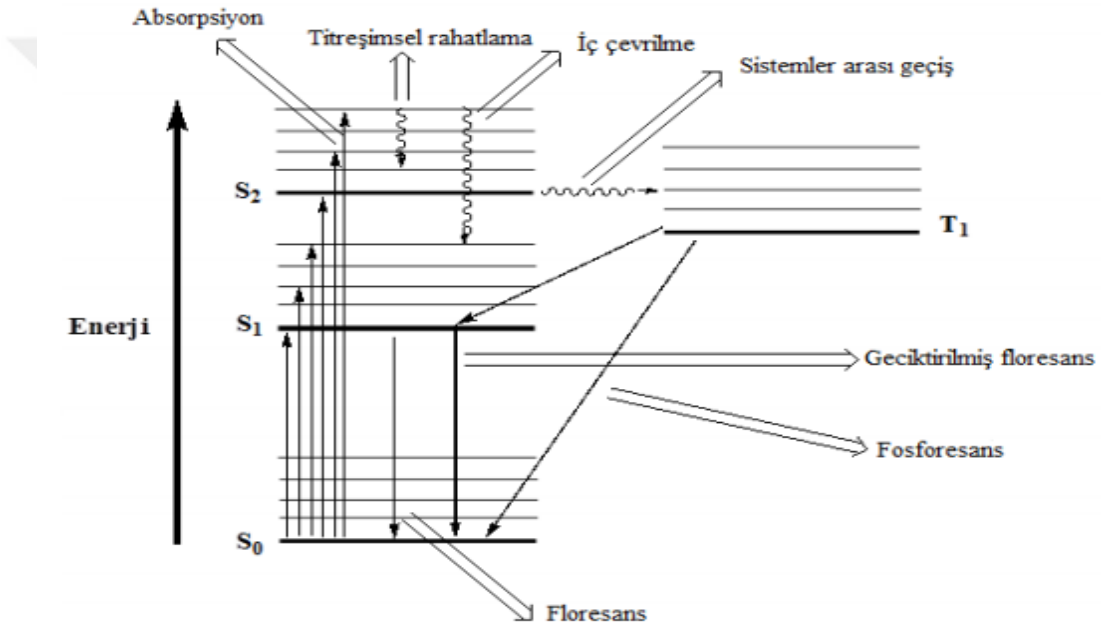
Floresans ve fosforesans spektroskopinin bilinen, sıklıkla tercih edilen dallarındandır. Bu iki kavramın temel mantığı; Elektromanyetik ışımayla uyarılan maddenin (iyon, atom, molekül) elektronunun, uyarılmış düzeye geçmesi ve daha sonra bu düzeyde kararlı olarak kalamayan elektronun, temel enerji düzeyine dönmek için fazla enerjisini ortama verirken yaptığı ışımanın ölçülmesidir (Eskier, 2017; Cüce, 2012).

1.3.2. Floresans ve Fosforesans

Bir maddenin iyon, atom veya molekülünün fotonu soğurması sonucunda temel enerji seviyesinden, daha yüksek enerjili uyarılmış enerji seviyesine geçerler. Uyarılmış halde ki foton $10^{-9}10^{-8}$ sn'de (yaklaşık olarak) fazla enerjisini ortama vererek tekrar temel haline döner. Molekülün foton soğurması ışık absorbsiyonudur (Cüce, 2012). Uyarılmış haldeki elektron farklı yolları izleyerek temel düzeye geçer (Jablonski Diagramı). Molekülün fotonu soğurarak uyarılan elektronun uyarılmış (singlet) halden

temel (singlet) hale dönüşmesine floresans denir. Bu olay molekülün foton vermesiyle gerçekleşir (Kuzu, 2016)

Jablonski Diagramında (Şekil 1.19); singlet (S_0, $S_{1..}$) ve triplet (T_1) elektronik enerji düzeylerini, kalın yatay çizgiler ifade ederken; elektronik enerji seviyelerindeki titreşimlerini ince yatay çizgiler göstermektedir. Foton ile elektron ilişkisini düz siyah oklar; ışınımsız elektron geçişlerini dalgalı oklar göstermektedir (Kuzu, 2016). Floresans özellik gösteren birçok madde vardır. Çinko silikat, kadmiyum slikat, benzotiyazol, magnezyum volframat vb. bileşikler örnek olarak verilebilir.



Şekil 1.19. Jablonski Diagramı
(Kuzu, 2016)

Floresans özellikli maddeler üzerlerine gelen belli dalga boyundaki ışınlarını, başka dalga boyundaki ışınlar şeklinde yansıtır. Bazı molekülleri fluoresans özellikleri diğerlerine göre daha etkilidir. Belli dalga boyunda uyarıldığında başka dalga boyunda ışıma yapan bu tip moleküllere florofor veya fluoresans madde denir. Uyarı enerjisinin kaynağı ışıksa; uyarı ışığı (excitation), yüksek enerji düzeyinden düşük enerji düzeyine geçerken foton yayması olayına emisyon denir (Puralı, 2004). Floresans mikroskobunda görüntü oluşturmak için ışınlara karşı floresans etkili boyalar kullanılır.

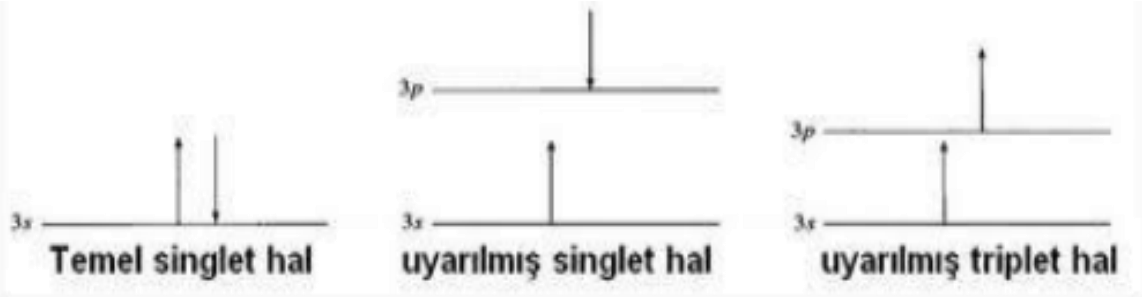
Floresans maddeler belli dalga boyundaki ışıkla etkileştikten sonra ışık yayınımı kısa süreli oluşur (Rettig, 2012); eğer uzun süreli bir yayınım söz konusu ise bu tür maddeler fosforesans adını alır. Bir başka deyişle fosforesans; uyarılmış triplet halden temel singlet haline geçerken yapılan ışıma olarak tanımlanır. Fosforesansta ışık yayınımın uzun sürmesinin nedeni (diamanyetik ve paramanyetik özellikler) spin farklılıklarıdır. Fosforesansa bilinen en iyi örnek uzun süre açık kalan lamba anahtarlarının kapatıldıktan sonra da ışık yaymasıdır (Valeur, 2001)

Floresans yayılımının hızlı olmasının nedeni, singlet uyarılmış enerji seviyesinden singlet temel enerji seviyesine dönerken spin yönelimi değişmemesidir. Fosforesans olayında ise triplet durumdaki elektronlar eşleşmemiş ve aynı spin yönelimlerine sahiptir. Ancak spin yönelimi aynı olan iki elektron aynı anda, aynı hareket durumuna sahip olamaz. Bir orbitalde zıt spinli olmak kaydıyla yalnızca iki elektron bulunabilir (Pauli- Dışarlama İlkesi). Bundan dolayı triplet durumdan yapılan geçişler 10^{-4} sn < gibi çok yavaş olarak gerçekleşir ya da hiç gerçekleşmez. Fosforerans ve floresans arasındaki yayılım sürelerinin farklı olmasının nedeni bu singlet ve triplet durumlardan geçişlerdir (Skoog, 2004).

Uyarılma mantığı aşağıda özetlenmiştir;

Temel Singlet Hal→Uyarılmış Singlet Hal→Floresans (Kısa ömürlü ışın= 10^{-9} -10^{-8} sn) (Rettig ve ark., 2012).

Temel Singlet Hal→Uyarılmış Singlet Hal→Uyarılmış Triplet Hal→Fosforesans (Uzun ömürlü ışın= 10^{-4} sn <)

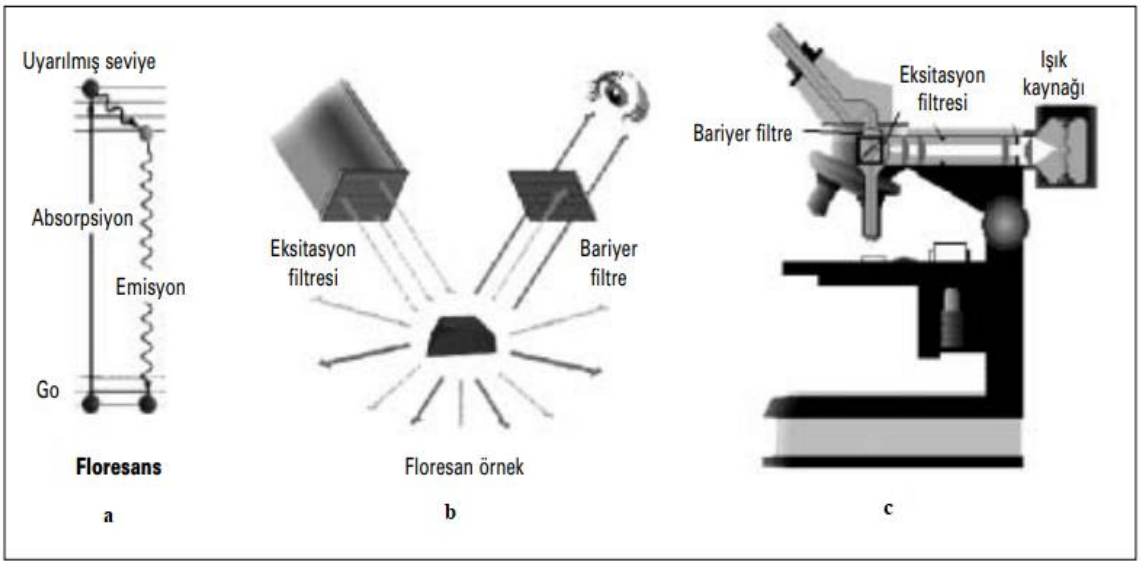


Şekil 1.20. Singlet ve triplet durumdaki uyarılmış elektronların spin yönelimlerinin şematik gösterimi (Cüce, 2012)

Foton absorbsiyonu yapan çoğu molekülün floresansı yoktur. Çünkü floresans diğer türlere göre çok yavaş gerçekleşir. Bazen floresans çok etkili iken, bazen etkili olmayabilir. Floresans kuantum verimi (ΦF veya Q) olarak adlandırılan bu floresans

etkinliği, floresans ile verilen foton sayısının, soğurulan foton sayısıyla oranından elde edilir (Valeur, 2001).

Floresans, madde veya canlı sistemlerin, moleküler ve supramoleküler düzeyde yapı- dinamiklerini araştırmak için sıklıkla tercih edilen bir tekniktir. İlk olarak nötr ve iyonik karakterlerin konsantrasyonlarını belirlemek için kullanılan floresans yöntemi; yüksek hassasiyet, düşük toksisite ve yüksek hızları gibi önemli özelliklerinden dolayı analitik kimya, biyokimya, biyoloji, fizyoloji gibi moleküler etkileşimlerinin incelenmesinde sıklıkla tercih edilmektedir (Valeur, 2001). Floresan boyalar, genellikle bir yüzeye veya floroforlara yüksek çözünürlüklü, gelişmiş görüntüleme sağlamak için kullanılır (Brabazon, 2018). Görünür bölgenin dışında kalan UV gibi ışıklar, floresan maddeyle absorbe edilerek görünür bölge spektrumu içinde bir dalga boyunda yansıtıldığı zaman görülebilir (Karakoç, 2016). Piko ve femtomolar düzeylerde ölçüm alınabilmesinden dolayı nano-biyoteknolojide; protein-DNA bağlama çalışmalarında, makromoleküllerin ve biyolojik bileşenlerin mesafelerinin ölçülmesi çalışmalarında, protein katlanmaları veya dinamiklerinin tespitinde, membran yapı ve işlev çalışmalarında, kontrollü ilaç salınımında reseptör- membran etkileşimlerinde kullanılmaktadır (Cüce, 2012).

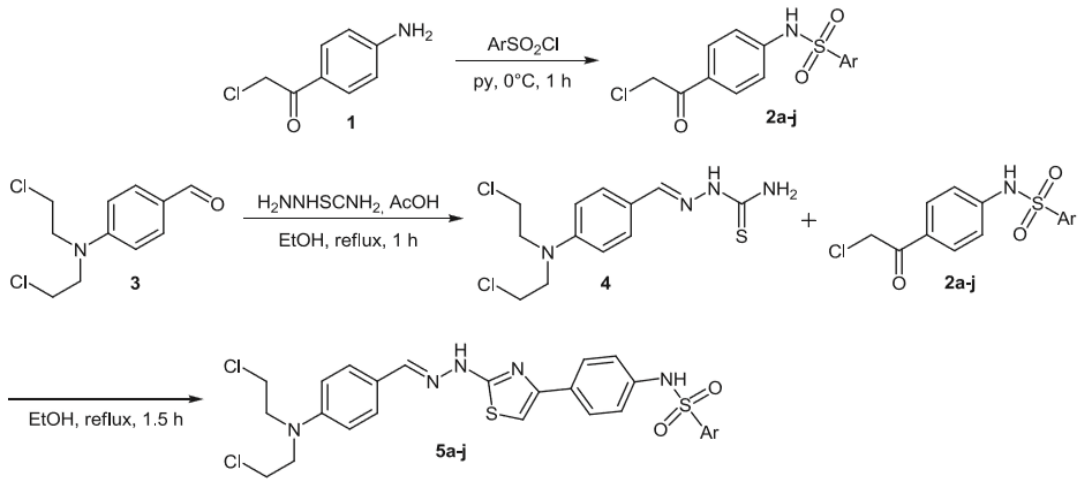


Şekil 1.21. Fluoresans temel fizik kuramı (a), uygulamasının gösterimi (b), epi- fluoresan mikroskop gösterimi (c) (Puralı, 2004)

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Bilim insanları daima araştırmalarını, insan yaşamı için en iyisini bulmaya yönlendirmiş ve bu doğrultuda özellikle sağlık alanında nano-biyoteknoloji çalışmalarına yönelmiştir. Bu kısımda, nanobiyoteknoloji kapsamında yapılan araştırmalardan bazılarına değinilmiştir.

Łączkowski ve arkadaşları, MV4-11, A549, MCF-7 ve HCT116 ve normal fare fibroblastına (BALB/3T3) karşı 10 tiyazol bazlı nitrojen antiproliferatif sentezlemişlerdir. Bileşiklerin karakterizasyonu ^{1}H and ^{13}C NMR, FAB(+)–MS ve element analizleri kullanılarak yapılmıştır. Türevleri arasında, 5b, 5c, 5e, 5f ve 5i'nin IC_{50} değerleri 2,17-4,26 µg/mL olan insan lösemi MV4-11 hücrelerine karşı yüksek aktivite sergilediğini saptamışlardır. Bileşik 5c ve 5f'nin BALB / 3T3 hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesi, kanser hücre çizgilerine karşı 20 kat daha düşüktür. Elde ettikleri sonuçlar, 5e ve 5i bileşiklerinin, MCF-7 ve HCT116'ya karşı, 3,02-4,13 µg/ml IC_{50} değerleri ile çok güçlü bir aktiviteye sahip olduğunu gösteren çalışmada aynı zamanda potansiyel ilaç hedeflerini tanımlamak için, hTopoI - hTopoII'nin DNA bağlama bölgesi ve guaninle aktif beş bileşiğin komplekslerindeki etkileşiminin, bağlanma enerjilerinin kuantum kimyasal hesaplaması bilgisayar simülasyonlarıyla gerçekleştirilmiştir (Łączkowski, 2016).



Şekil 2.1. Tiyazol bazlı- nitrojen (5a-j)

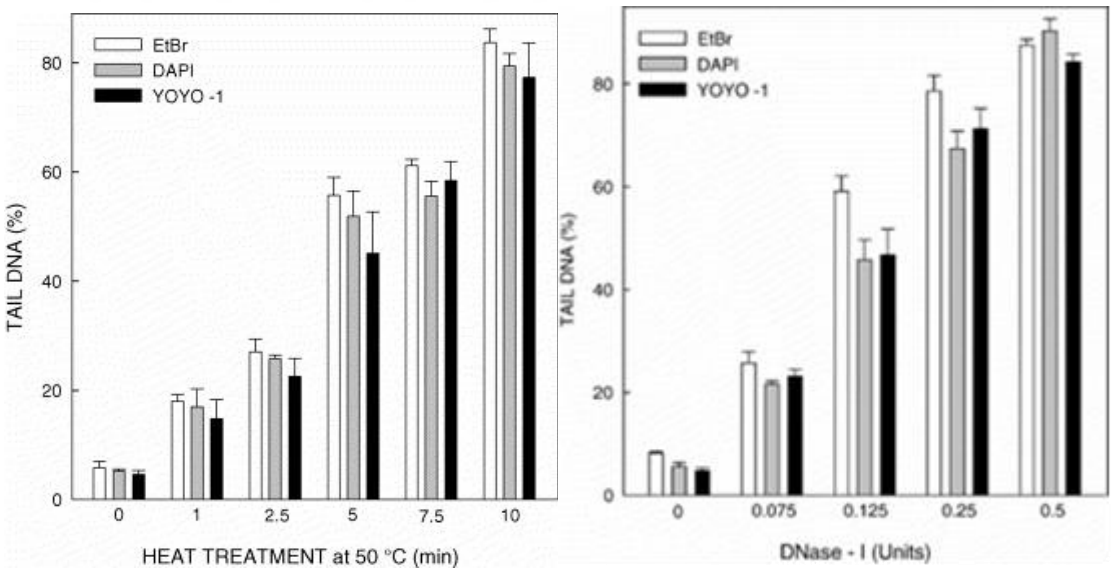
[Cu(Btptpy)(ClO_4)](ClO_4) 1 ve [Cu(Bttpy)(ClO_4)](ClO_4) **2,** (Btptpy **(L_1)** = 4'-(Benzotiyofen)-2,2':6′,2″-terpiridin, Bttpy (L_2**)** = 4'-(Benziltiyazolil)-2,2':6′,2″-terpiridin) olan 2 bakır kompleksleri sentezlemişlerdir. Absorpsiyon spektral titrasyonu, DNA erime çalışması, dairesel dikroizm ve viskozite ölçümleri, kompleks 1 ve 2'nin interkalasyon yoluyla DNA'ya bağlandığını bulmuşlardır. SDS-PAGE jel elektroforezi kullanılarak bakır kompleksleri ve BSA arasındaki etkileşim floresan titrasyonu, dairesel dikroizm ve bunların proteaz aktivitesi araştırılmıştır. Agaroz (AGE) ve SDS-PAGE jel elektroforezi, her iki kompleksin de katkı maddesi hidrojen peroksit varlığında iyi nükleolitik ve proteolitik özelliklere sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Her iki kompleks de, üçlü negatif CAL-51 insan meme kanseri hücre çizgisine ve hepatoselüler karsinoma (HepG2) kanser hücre dizilerine karşı belirgin sitotoksik özellik gösterir ve karaciğer normal hücre hattına (Changs) karşı çok daha az sitotoksisite taşır. DCF-DA ve TBRAS testi ayrıca kompleks 1 ve 2'nin kanser hücrelerinde normal hücre hattından daha yüksek düzeyde reaktif oksijen türleri (ROS) ve oksidatif stres oluşturduğunu desteklemiştir. Ayrıca, FACS analizi, kompleks 1 ve 2'nin, büyüme fazı hücre döngüsü tutukluğu ile apoptosisi getirdiğini doğrulamaktadır. (Manikandamathavan, 2017)

Maltaş ve arkadaşları, 4- (2-hidroksibenzilidenamino) benzoik asit (PHBA) ve 4- (2-hidroksibenzilidenamino) ftalik asit (PHPA) iki yeni floresan ligand sentezleyerek DNA'ya bağlanma kapasitelerini spektroskopik yöntemle incelemişlerdir. SPIONs üzerinde DNA bağlanma kapasitesi belirlenmiştir. 23,1 µg DNA, 25 mg nanopartikül üzerine immobilize edilmiş ve DNA-APTS-SPIONs yapısına floresan ligandların bağlanma kapasitesi PHBA için 2.36 µM bulunmuştur. 25 mg nanopartiküllerde ise PHPA için 1,97 olarak bulunmuştur.

Tıbbi ve biyolojik araştırmalarda sıklıkla kullanılan akış sitometrisi ile floresan mikroskobu hücre görüntüleme teknikleri, floresan kimyası alanındaki yenilikler, ekonomik ve kullanışlı ticari boyaların sentezlenmesiyle yakından etkili iki alandır. Siyanür bazlı boyalar, yüksek uyarım katsayısı, dar emisyon aralığı ve nükleik asitlere bağlandığında yüksek floresan özelliğinde olduğundan dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır. Apoptoz ve hücre döngüsünün değerlendirilmesinde anahtar yöntemler, çeşitli akış sitometrik tekniklerle DNA içeriğinin ölçülmesini sağlar. Yeni

monometin siyan boyaları sentezledik ve canlı ve/veya apoptotik hücrelerin boyanması için uygulanabilirliklerini akış sitometrisi ve konfokal lazer tarama mikroskobu (CLSM) ile görüntüleme deneyleri de gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak; Boyaların ikisinin 10−9 M'ye kadar yüksek dilüsyonlarda, çekirdeğe yüksek afiniteli bağlanma gösterdiği tespit edilmiştir. Akış sitometrisi ve CLSM, bu boyaların, seçici olarak işaretlenmediğini doğrulamıştır (örn etanol sabit hücreleri). Yeni yapıların hücre döngüsünün analizi için uygun olduğu kanıtlanmıştır (Nikolova, 2013)

Gichner ve arkadaşları tek hücreli jel elektroforezi (kuyruklu yıldız) testinin alkali versiyonunu; 1. Alkilleyici ajan olarak etil metansülfonat, 2. 50°C nekrotik ısı tedavileri ve 3. DNaz-I ile (üç işlemin tümü) tedavi edilen tütün (Nicotiana tabacum) fidelerinin köklerine, yapraklarına ve yaprak çekirdeklerine uygulamıştır. DNA migrasyonunda doza bağımlı bir artışa yol açarak, kuyruk DNA'sının yüzdesi olarak ifade edilmiştir. Sonuç olarak; florokrom DNA boyalarının, bitkilerde kuyruklu tayininin alkali versiyonu için yaygın olarak kullanılan etidyum bromür, DAPI veya YOYO-1 gibi ticari boyalar ile aynı verimlilikte kullanılabileceği sonucuna ulaşılmıştır. (Gichner, 2006)



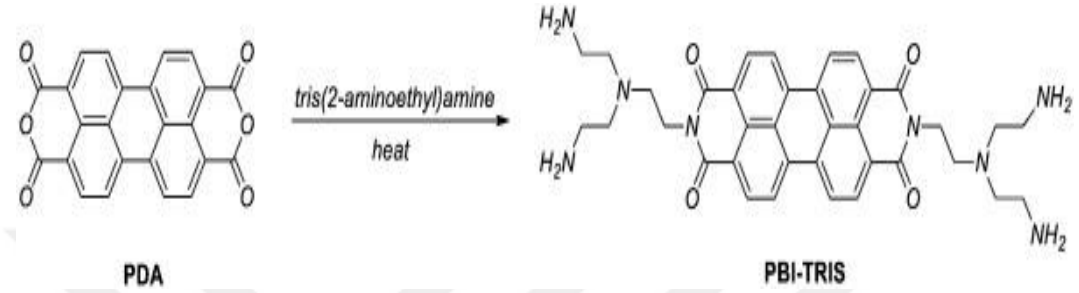
Şekil 2.2. a 50 °C' de (min) ısı ölçümü b) DNase- I

Mikrodalga ışımasının kullanıldığı tek basamaklı reaksiyon yöntemiyle steroidal tiyazol türevi (4-6, 8) sentezlenmiştir. Steroidal ketonların (1-3, 7) tiyosemikarbazid ve fenasil bromür ile reaksiyonu ile sentezlenen bileşiğin yapısı ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, MS ve analitik veriler ile IR'de doğrulanmıştır. Sentezlenen bileşikler, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) yöntemi kullanılarak in-vitro antioksidan aktivitesi açısından değerlendirilmiştir. Ek olarak deneyde 4-6,8 de pBR322 DNA bölünme aktivitesi, genotoksisite, reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi ve RBC hemolizi için test edilmiştir. Yeni sentezlenmiş bileşiklerin spesifik bağlanma modunu aktif DNA bölgesine doğrulamak için moleküler yerleştirme analizi gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar sırasıyla, -8.1 ve 8 kcal/mol olan serbest bağlanma enerjileri olan 4 ve 8 numaralı bileşiklerin daha kararlı komplekslerinin oluştuğunu bulmuşlardır. Bundan dolayı; tek çekirdekli tiyazol yapılı steroidal bileşiklerin, güçlü birer biyolojik ajan olarak kullanabileceğini belirlemişlerdir (Asif, 2017)

Svanvik ve arkadaşları nükleik asitleri tespit etmek amacıyla ışıklandırma probu oluşturmuştur. Bu prob, asimetrik siyanin boya, tiyazol turuncunun (TO) bağlandığı PNA oligonükleotididir. PNA'nın çok iyi hibridizasyon özelliklerini ve DNA'ya bağlanarak TO'nun floresan geliştirilme özellikleri birleştirilmiştir. Peptik nükleik asit hedef DNA'ya melezleştiğinde, boya bağlanır ve floresan özellik göstermiştir. Işıklandırma probları homojen hibridizasyon deneyleri için uygun olduğu tespit edilmiştir. Hibridizasyon üzerine floresan geliştirmenin, esas olarak serbest prob floresansındaki değişikliklere bağlı olarak farklı problar arasında değiştiğini görülmüştür. Sekiz prob için, bağlanmamış durumdaki 25 °C'de floresan kuantum verimi, 0.0015 ila 0.08 arasında değişmiştir ve esas olarak PNA dizisine bağlı olduğu görülmüştür. Işık probların, hedef DNA'ya bağlanması yüksek oranda sekansa özeldir ve 10-mer'lik bir hedef sekansta tek bir uyumsuzluk kolayca tanımlanmıştır (Svanvik, 2000).

DNA floresan etiketlemesi için, N,N′-Bis[tris-(2-aminoetil) amin]-3,4,9,10-perilentetrakarboksilik diimide (PBI-TRIS) yapısıyla boyanmıştır. DNA immobilizesini sağlamak için (3-aminopropil) trietoksisilan (APTS) modifiye süperparamanyetik demir oksit nanopartiküller (SPIONs) sentezlenmiştir. Amin grubuyla fonksiyonelleştirilen nanopartiküllerin Calf thymus DNA için 25 mg nanopartikül konsantrasyonunda yüksek bir immobilizasyon kapasitesi (% 82.70) tespit edilmiştir. PBI-TRIS'in DNA-SPION'a bağlanma kapasitesi de UV-vis spektroskopisi kullanılarak 25 mg nanopartiküllerde

1.93 µM olarak bulunmuştur. PBI-TRIS etiketli Konfokol mikoskobunda, DNA-SPION ve meme hücrelerinin, 488 ve 561.7 nm'de eksitasyon dalga boyları alındı .Ayrıca 403.7 nm uyarma dalga boyunda alınarak ticari bir boya olan DAPI ile karşılaştırılmış ve sonuç olarak hücre görüntülemede PBI-TRIS'in kullanılabileceği saptanmıştır (Maltas, 2015)



Şekil 2.3. N , N -bis [tris (2-aminoetil) amin] -3,4,9,10- bisimide (PBI-TRİS) sentezi

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. 2-amino-5-(piren-1-il)-tiazolün (ABS-34) Sentezi

Proje kapsamında kullanılan, 2-amino-5-(piren-1-il)-tiyazol (ABS-34) molekülünün sentezi, Necmettin Erbakan Üniversitesi Ahmet Keleşoğlu Eğitim Fakültesi Kimya Bölümünde Organik Kimya Laboratuvarında, Prof. Dr. Ahmet Coşkun danışmanlığında Dr. Ahmet Burak Sarıgüney tarafından gerçekleştirildi.

Birinci adımda 7 mL deiyonize su içinde, 1-bromoasetil piren (0,1 mmol) ile tiyoüre (0,11 mmol) karıştırılmıştır. Bu karıştırma işlemi gece boyunca devam ettirildi. Reaksiyon süreci TLC (İnce tabaka kromatografisi) ile izlenerek tamamlanmıştır. Oluşan çökelti, 2 kez 25 mL etil asetat ile muamele edilmiştir. Etil asetatın çıkarılmasından sonra, elde edilen ürün kurutularak, etanolden kristallendirilmiş ve %76 verimle sentezlenmiştir.

Katı, E.N: >260 ^{o}C (Dekompoze); ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 8.50 (Ar-1H, d), 8.23 (Ar-4H, m), 8.13 (Ar-3H, d), 8.06 (Ar-1H, t), 6.62 (tiyazol-1H, s), 5.05 (NH_2-2H, bs).

3.2. 2-N-metilamino-5-(piren-1-il)-thiazolün (ABS-40) Sentezi

Proje kapsamında kullanılan, 2-N-metilamino-5-(piren-1-il)-tiyazolün (ABS-40) sentezi, Necmettin Erbakan Üniversitesi Ahmet Keleşoğlu Eğitim Fakültesi Kimya Bölümünde Organik Kimya Laboratuvarında, Prof. Dr. Ahmet Coşkun danışmanlığında Dr. Ahmet Burak Sarıgüney tarafından gerçekleştirildi.

Birinci adımda 7 mL deiyonize su içinde, 1-bromoasetil piren (0.1 mmol) ile N-metiltiyoüre (0.11 mmol) gece boyunca karıştırılmıştır. Reaksiyon süreci TLC (İnce tabaka kromatografisi) ile izlenerek tamamlanmıştır. Oluşan çökelti, 2 kez 25 mL etil asetat ile muamele edilmiştir. Etil asetatın çıkarılmasından sonra, elde edilen ürün kurutularak, etanolden kristallendirilmiş ve % 69 verimle sentezlenmiştir.

Katı, E.N: >260 oC (Dekompoze); ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): 8.51 (d, 1H, Ar), 8.26 (m, 4H, Ar), 8.10 (Ar-3H, d), 8.07 (Ar-1H, t), 6.59 (s, tiyazol-1H), 5.65 (bs, 2H, NH_2), 3.04 (s, 3H, CH_3).

3.3. Zeta Potansiyel

ABS-34 ve ABS-40 moleküllerinin her birinin yüzey yükünü belirlemek amacıyla Mikromeritiks- Nanoplus-3 zeta potansiyel cihazıyla ölçülmüştür. İki madde % 10'luk DMSO-su (60 mL-540 mL) içerisinde dispersiyon edildi. Cihaz sıcaklığı 25 °C'ye ayarlandı ve 3 tekrarda 10 ölçüm alındı.

Tablo 2.1. ABS-34 maddesinin zeta potansiyel sonuç dağılımı

(ABS-34) Ölçüm Sonuçları

Zeta Potansiyel	: 0.87	(mV)	Doppler Kayması	: -0.62	(Hz)
Hareketlilik	: 6.239e-006	(cm^2/Vs)	Baz Frekansı	: 121.3	(Hz)
İletkenlik	: 0.0468	mS/cm	Dönüşüm Denklemi	: Smoluchowski	

Hücrenin Zeta Potansiyeli

Üst Yüzey	: -4.70	(mV)
Alt Yüzey	: -2.01	(mV)

Hücre Kontrol

Hücre Tipi	: Flow cell	
Ort. Elektrik Alan	: -20.59	(V/cm)

Çözelti Özellikleri

Çözelti İsmi	: %10'luk DMSO-su	
Sıcaklık	: 25	(^oC)
Kırılma İndisi	: 1.3328	
Viskosite	: 0.8878	(cP)
Dielektrik Sabiti	: 71.8	

Pik Veri Tablosu Dağılımı

Pik	Frekansı (Hz)	Şiddet	Yarı Genişlik (Hz)	Zeta Potansiyel	Hareketlilik (cm^2/ Vs)
1	-0.62	4.81	5.31	0.87	6.239e-006

Tablo 3.2. ABS-40 maddesinin zeta potansiyel sonuç dağılımı

(ABS-40) Ölçüm Sonuçları

Zeta Potansiyel	: 0.47	(mV)	Doppler Kayması	: -0.62	(Hz)
Hareketlilik	: 3.344e-006	(cm^2/Vs)	Baz Frekansı	: 121.3	(Hz)
İletkenlik	: 0.0300	mS/cm	Dönüşüm Denklemi	: Smoluchowski	

Hücrenin Zeta Potansiyeli

Üst Yüzey	: -0.67	(mV)
Alt Yüzey	: -5.89	(mV)

Hücre Kontrol

Hücre Tipi	: Flow cell	
Elektrik Alan	: 20.65	(V/cm)

Çözelti Özellikleri

Çözelti İsmi	: %10'luk DMSO-su	
Sıcaklık	: 25	(^oC)
Kırılma İndisi	: 1.3328	
Viskosite	: 0.8878	(cP)
Dielektrik Sabiti	: 71.8	

Pik Veri Tablosu Dağılımı

Pik	Frekansı (Hz)	Şiddet	Yarı Genişlik (Hz)	Zeta Potansiyel	Hareketlilik (cm2/ Vs)
1	0.33	5.25	5.24	0.47	3.344e-006

Tablo 3.1'de verilen bilgilere göre, ABS-34 maddesinin zeta potansiyeli 0.87 ve pozitif yüklü bir madde olduğu belirlenmiştir. Tablo 3.2'de verilen bilgilere göre ABS-40 maddesinin zeta potansiyeli 0.47'dir ve pozitif yüklü bir madde olduğu belirlenmiştir

3.4. ABS-34 ve ABS-40'ın Floresans Analizleri

Sentezlenen ABS-34 ve ABS-40 molekülleri, Perkin Elmer LS55 floresans spektroskopisi ile DMF-su ortamında incelendi. Her birinin uyarma ve yayılma dalga boyları ile floresans şiddetleri tespit edilmiştir.

3.4.1. ABS-34'ün floresans analizi

Molekül ağırlığı (mA) 300,38 olan ABS-34 molekülünden 0,0023 g tartıldı. M = n/ V (n= m/mA) denklemleriyle, DMF ile 25 mL'ye tamamlanarak 0,03 M çözelti hazırlandı. 0,03 M çözelti $M_{1\times}V_1 = M_{2\times}V_2$ eşitliği kullanılarak 25 mL'ye seyreltildi. Bu işlemlerle seyreltme işlemi 10; 20; 40; 60; 80 ve 100 µM olarak 6 farklı konsantrasyon için yapıldı. Hazırlanan çözeltiler, 200-800 nm uyarma ye yayılma dalga boyunda, 10 nm slit aralığında, Floresans Spektoremetre cihazında ölçüldü.

3.4.2. ABS-40'ın floresans analizi

Molekül ağırlığı (mA) 314,41 olan 0,0024 g ABS-34 molekülü tartıldı. M = n/ V (n= m/mA) denklemleri denklemleriyle, DMF ile 25 mL'ye tamamlanarak 0,03 M çözelti hazırlandı. 0,03 M çözelti $M_1V_1 = M_2V_2$ eşitliği kullanılarak 25 mL'ye seyreltildi. Bu işlemlerle seyreltme işlemi 0.1; 0.4; 0.6; 1 ve 2 µM olarak 5 farklı konsantrasyonla yapıldı. Hazırlanan çözeltiler 200-800 nm uyarma ye yayılma dalga boyunda, 10 nm slit aralığında, Flouresans Spektoremetre cihazında ölçüldü.

3.5. Ligand ile DNA Etkileşimi

ABS-34 ve ABS-40 molekülleri % 1'lik DMF (dimetilformamid) ile hazırlanan stok çözeltileri uygun konsantrasyonlarda calf tymus DNA'nın (Ct-DNA) tris tamponunda (pH= 7,6) hazırlanan çözeltileri ile karıştırılarak 200-800 nm uyarma ve yayılma dalga boyları aralığında floresans şiddetleri ölçülerek etkileşim olup olmadığı tespit edildi.

3.5.1. ABS-34'ün DNA ile etkileşimi

0,1 µM ABS-34'e 6 farklı konsantrasyonda, 0,4; 1; 2; 3; 4; 5 µg DNA ilave edilerek 200-800 nm uyarma ve yayılma dalga boyu aralığında floresans ölçümleri alınarak floresans şiddeti grafiği ve kalibrasyon eğrileri çizildi.

3.5.2. ABS-40'ın DNA ile etkileşimi

1 μM ABS-40'e 5 farklı konsantrasyonda, 0,05; 0.125; 0.25; 0.375; 0.5 ng DNA ilave edildi. 200-800 nm uyarma ve yayılma dalga boyu aralığında floresans ölçümleri alınarak Floresans şiddeti grafiği ve kalibrasyon eğrileri çizildi.

3.6. Ligand-Protein Etkileşimi

ABS-34 ve ABS-40 moleküllerinin DMF ya da DMSO'da (Dimetil sülfoksit) hazırlanan stok çözeltileri, uygun konsantrasyonlarda insan serum albümini proteininin tris tamponda (pH= 7,6) hazırlanan çözeltileri ile karıştırılarak 200-800 nm uyarma ve yayılma dalga boylarında floresans şiddetleri ölçülerek etkileşim olup olmadığı tespit edildi (Maltaş, 2015).

3.6.1. ABS-34'ün protein ile etkileşimi

ABS-34'e 6 farklı konsantrasyonda, 2; 5; 10; 15; 20; 25 μg insan serum albümin proteini (HSA) ilave edilerek 200-800 nm uyarma ve yayılma dalga boyu aralığında floresans ölçümleri alınarak floresans şiddeti grafiği ve kalibrasyon eğrileri çizildi.

3.6.2. ABS-40'ın protein ile etkileşimi

ABS-40'a 4 farklı konsantrasyonda, 0.1; 0.50; 0.75; 1 μg insan serum albümin proteini (HSA) ilave edilerek 200-800 nm uyarma ve yayılma dalga boyu aralığında floresans ölçümleri alınarak floresans şiddeti grafiği ve kalibrasyon eğrileri çizildi.

3.7. Konfokal Mikroskobu ile Görüntüleme

L-929 hücrelerine, ABS-34 ve ABS-40 molekülleri eklendikten sonra hücrelerin büyümesi ve morfoloji değişikliklerini incelemek için 2 ve 10 μM madde ile ve pozitif kontrol olarak DAPI ile boyama yapıldı. Besiyeri ortamına ekilen ve ligand ilave edilen hücreler, 24 saat sonra konfokal mikroskobunda görüntülenerek, 3 farklı filtrenin (kanal, DAPI, FTIC ve TRICT) dalga boyu aralığında 200-800 nm uyarma ve yayılma dalga boylarında görüntü verip vermedikleri tespit edildi. İlgili kanalların dalga boyları

şu şekildedir. DAPI (2-(4-amidinofenil)-1H-indol-6-karboksamidin; λex: 403.7 ve λem: 425–475 nm), FITC (floresan izotiyosiyanat, λex: 488 nm ve λem: 500-550 nm) ve TRITC (tetrametil rodamin izosiyanat, λex: 561.7 ve λem: 570–620 nm) filtreleri kullanılarak (Maltas, 2015).

3.8. L-929 Hücre Hattı

Fare fibroblast hücre dizisi (L-929), C3H / 100 günlük bir erkek fareden 1948'de deri altı bağ dokusundan türetilen L cinsinin NTCL 929 klonudur. L-929 Hücre Hattı biyouyumluluk çalışmalarında model organizma olarak kullanılmaktadır. Yüzeye yapışarak monolayer olarak büyür. Hücreler yüzeyi kapladığında haftada 2-3 kez pasajlanarak subkültürleri tripsin ile yapılır (Maltaş, 2015).

3.9. İn-vitro Sitotoksisite Testi

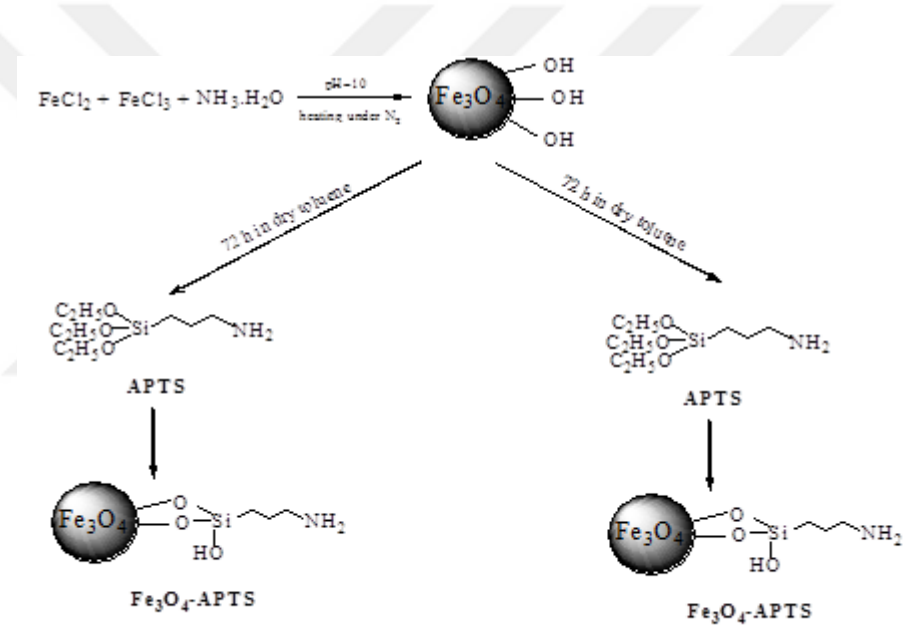
Tiyazol molekülleri, ABS-34 ve ABS-40'ın hücre boyama deneylerinde kullanımı öncesi, sağlıklı doz aralığının belirlenmesi ve sitotoksisite analizleri için L-929 hücreleri kullanılarak, 3-[4,5- Dimetiltiyazol-2-il]1-2,5-difeniltetrazolyum bromit (XTT) metodu uygulandı.

ABS-34 ve ABS-40 maddelerinin, L-929 hücre hattına karşı sitotoksik etkisi 96 kuyucuklu kültür kaplarında test edildi. Kuyucuklara $5x10^3$ hücre ekildikten sonra, 37°C etüvde hücrelerin ortam koşullarına alışabilmesi için inkübe edildi. Hücrelerin yeterli yoğunluğa ulaşmasından sonra ABS-34 ve ABS-40 maddeleri yüksek dozdan (1500 μM) düşük doza (10 μM) yatay olarak seyreltilerek hücrelerin bulundukları kuyucuklara eklendi ve 24 saat etüvde inkübe edildi. İnkübasyon süresi tamamlandığında, her göze XTT solüsyonu eklenerek canlı hücrelerin oluşturduğu formazanın oluşması için 5 saat bekletildi. Hücre canlılığı, 460 nm dalga boyunda ELISA okuyu ile belirlendive IC_{50} (hücrelerin %50'sinin yaşadığı kimyasal konsantrasyonu) değerlerinin hesaplanması sağlandı (Maltaş, 2015; Zengin, 2015).

3.10 Nanopartikül Sentezi ve modifikasyonu

Manyetik özellik gösteren demir (Fe_3O_4) nanopartikülleri aşağıdaki şemada verildiği gibi APTS yüzeylerinde sırasıyla amin olacak şekilde modifiye edilmiştir

(Şekil 3.1). Bu amaçla nanopartiküllerin sentezinde daha önce gerçekleştirilmiş bir metot takip edilmiştir (Maltas, 2013). Kısaca, 2 mL 1 M $FeCl_3$ ve 0,5 mL 2 M $FeCl_2$ sulu çözeltileri (molar olarak 2:1 oranında) birlikte karıştırılır. Ardından 25 mL 1 M sulu amonyak çözeltisi karışıma hızlı bir şekilde eklendikten sonra koyu manyetik çökeltinin oluştuğu gözlenir. 30 dakikalık bir karıştırmanın ardından oluşan manyetik nanopartiküller bir mıknatıs ile toplandıktan sonra ultra saf su ile birkaç defa yıkanır. Yıkama suyunun pH'ı yaklaşık 7 olduğunda, manyetik nanopartiküller 70 °C'de etüvde kurutuldu. Ardından 3-aminopropyltriethoxysilane (APTS) ile modifiye edildi (Maltaş, 2013).



Şekil 3.1. Demir oksit nanopartiküllerin yüzey modifikasyonu

3.11. Nanopartiküllere DNA Bağlanması

Hazırlanan APTS modifiye SPIONs (süperparamanyetik demiroksit nanopartikülleri), önceki çalışmamıza göre APTES tarafından hazırlandı. APTES modifiye SPIONs'lar 20 mM Tris, pH 7,4 içinde 100 µL Calf thymus DNA (ds DNA) ile karıştırılmış ve 5 saat boyunca 4 °C'de 5 mg partikül /mL tampon konsantrasyonunda çalkalanmıştır. Bu nanopartiküller pH 7,4 olan 20 mM' lık Tris

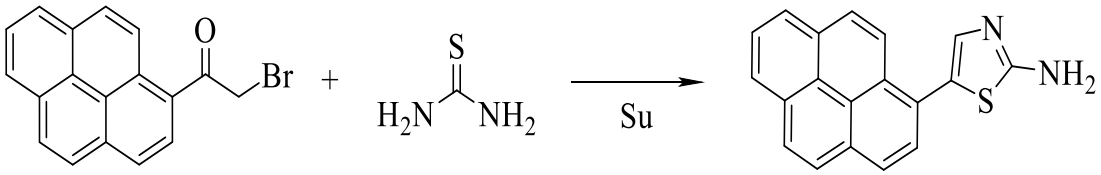
tamponu ile yıkanmıştır. Daha sonra manyetik nanopartiküller DNA çözeltisinden manyetik olarak ayrıldı. DNA'nın etkileşim miktarı, µ damla sistemi (Thermo Fisher Scientific Inc.) ile donatılmış Thermo Scientific Multiscan Go UV-Vis spektrofotometre kullanılarak geriye kalan DNA çözeltisinden ölçülmüştür (Maltas, 2013).

3.12. Floresans etiketleme

Amin modifiye nanopartikül yüzeyinde bulanan Calf-tymus DNA'yı floresent olarak etiketleme yapmak üzere DNA immobilize edildi ve nanopartiküllere 10 µM ABS-34 ve ABS-40 ligandlarından eklenmiş 1 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Sonra saf su ile yıkanan nanopartiküllerden alınan kesitler, Laser Confocal Microscope (A1R + / A1 +, Nikon Instruments, Inc. Tokyo, Japonya) altında 403.7, 488.0 ve 561.7 nm'lik uyarma dalga boylarında incelendi.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

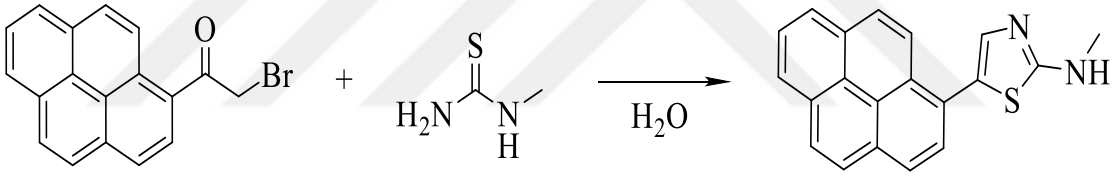
4.1. ABS-34'ün sentezi



Şekil 4.1. 2-amino-5-(piren-1-il)-tiyazolün (ABS-34) sentez reaksiyonu

Sentez mekanizması Şekil 4.1'de verilen ABS-34 molekülü, Bölüm 3.1' de verilen metoda uygun olarak sentezlendi.

4.2. ABS-40'ın sentezi



Şekil 4.2. 2-N-metilamino-5-(piren-1-il)-tiyazolün (ABS-40) sentez reaksiyonu

Sentez mekanizması Şekil 4.2'de verilen ABS-40 molekülü, Bölüm 3.2' de verilen metoda uygun olarak sentezlendi.

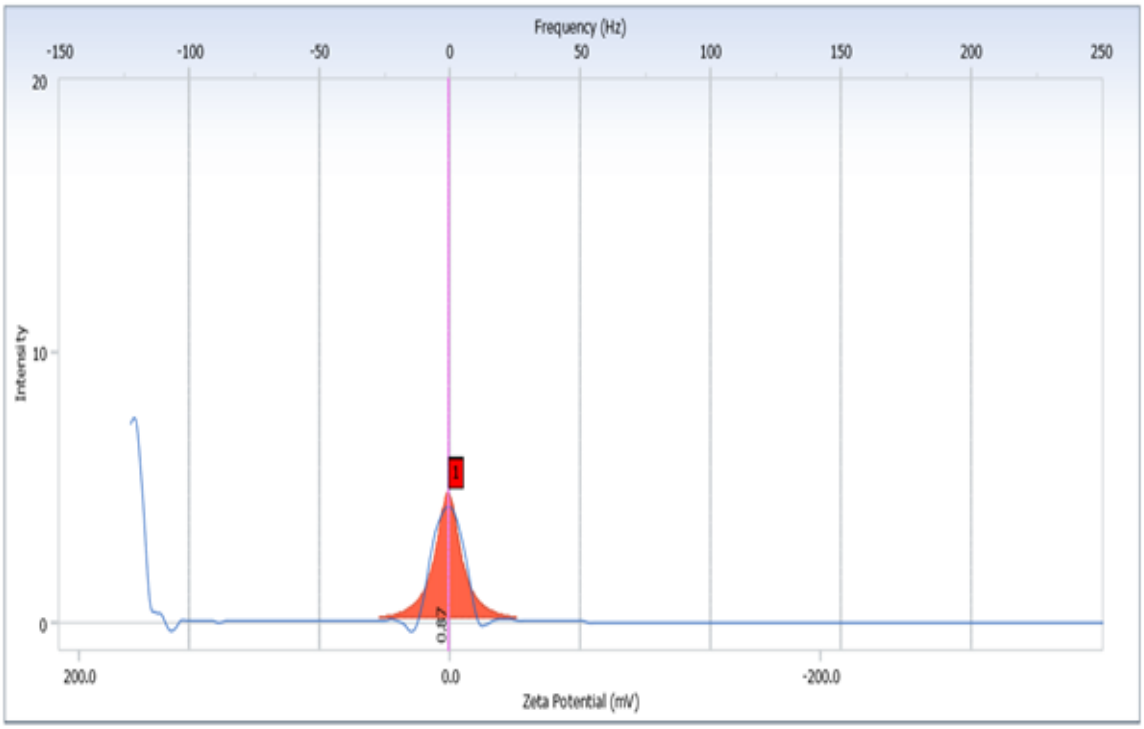
4.3. Zeta Potansiyel

Zeta potansiyelinin temeli dispersiyon halinde dağılan maddeler arasındaki elektrostatik dağılımı kontrol ederek itme veya çekme değerinin ölçülmesidir. Zeta potansiyel değerinin sıfırdan uzak değerde olması parçacıkların, ortam içine iyi dağıldığının göstergesidir. Bundan dolayı zeta potansiyeli sıfırdan uzak değerdeki maddelerin dispersiyonu durağan veya nispeten monodisperse kabul edilir, sıfıra yakın değerler ise zayıf monodispersite olarak kabul edilir.

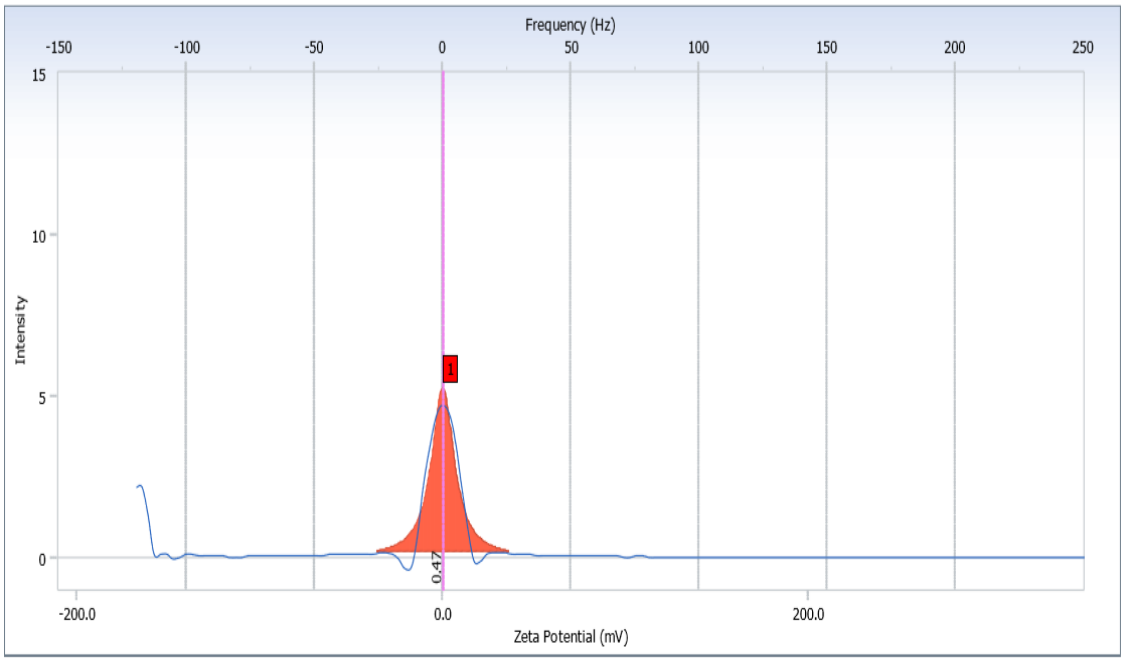
Asidik boyalar hücrelerde katyonik ve bazik bileşenlerle reaksiyon veren asidofilik özellikte boyalar, bazik boyalar ise anyonik ve asidik yapılarla reaksiyon veren basidolofilik boyalardır. Sitoplazmadaki yağ asitleri ve diğer bazik yapılar asidik boyalarla reaksiyon verirken (asidofilik), asidik yapılı olan nükleik asitler ise bazofiliktir yani bazik boyalarla reaksiyon verir. Günümüzdeki mevcut boyalar ve kullanılan tekniklerle, belirli kimyasal gruplar ya da hücre-doku içindeki yapılar seçici olarak boyanabilmektedir. Özellikle apoptotik hücreleri (programlanmış hücre ölümleri) belirlemede boyama amaçlı kullanılan 3 standart histokimyasal boya sistemleri; Hematoksilin ve eozin (H & E), kresil menekşe (CV) ve tionin mavisidir (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (Martin ve Chatterjee, 2003). Histolojide, sıklıkla hemotoksilen ve eosin boyalarını içeren Hemotoksilen ve Eosin boya sistemi kullanılmaktadır (Doeberitz ve Wentzensen, 2008). Eosin bazik yapıları kırmızı, pembe ve turuncu renk olarak boyar. Hematoksilin asidik yapıları mor renge yakın bir mavi olarak boyar (Patton, 2011; Martin ve Chatterjee 2003).

ABS-34 ve ABS-40 moleküllerinin yapılarında bulunan tiyazol halkaları zayıf bazik karakterlidir (pKa= 2.52). Her iki madde 2-aminotiyazol halkası içerdiğinden güçlü bazik özellik göstermektedirler (pKa=5.25). ABS-40 maddesi taşıdığı amin grubundan dolayı ABS-34'e göre daha baziktir. Yapılarındaki piren halkaları aromatik ve heteroatom içermediği için asitliğe katkı sağlamaz. 2-aminotiyazol halkası protonlanırsa halkadaki azot üzerinden hidrojen alır ve daha asidik ortamda amin grubu da protonlanabilir.

Hücre görüntüleme çalışmalarında DNA ve RNA'yı etkili bir şekilde boyamak için pozitif yüklü boyalar kullanılır. Ticari olarak kullanılan boyaların çoğunluğu pozitif yüklüdür. Bu nedenle maddelerimizin zeta potansiyelini belirlemek için ölçümleri alınmıştır. Elde edilen zeta potansiyel (Tablo 3.1-3.2 ve Şekil 4.3-4.4) profillerine göre; ABS-34'ün zeta potansiyeli 0,87 ve ABS-40'ın zeta potansiyeli 0,47 değerleri ile pozitif yüklü bulunmuştur (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4).

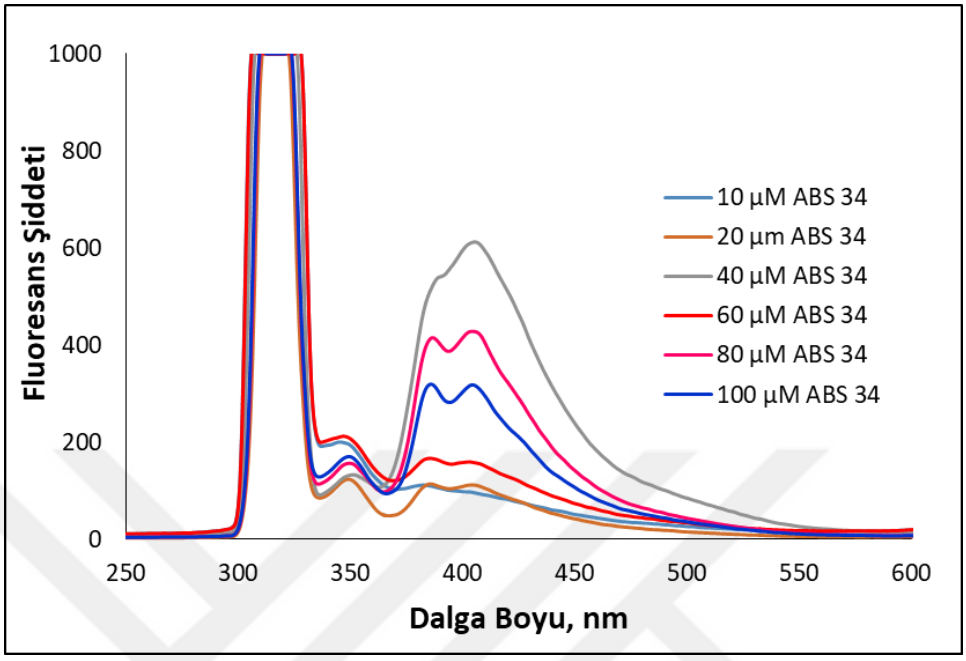


Şekil 4.3. ABS-34 maddesinin zeta potansiyel hareketlilik dağılım grafiği

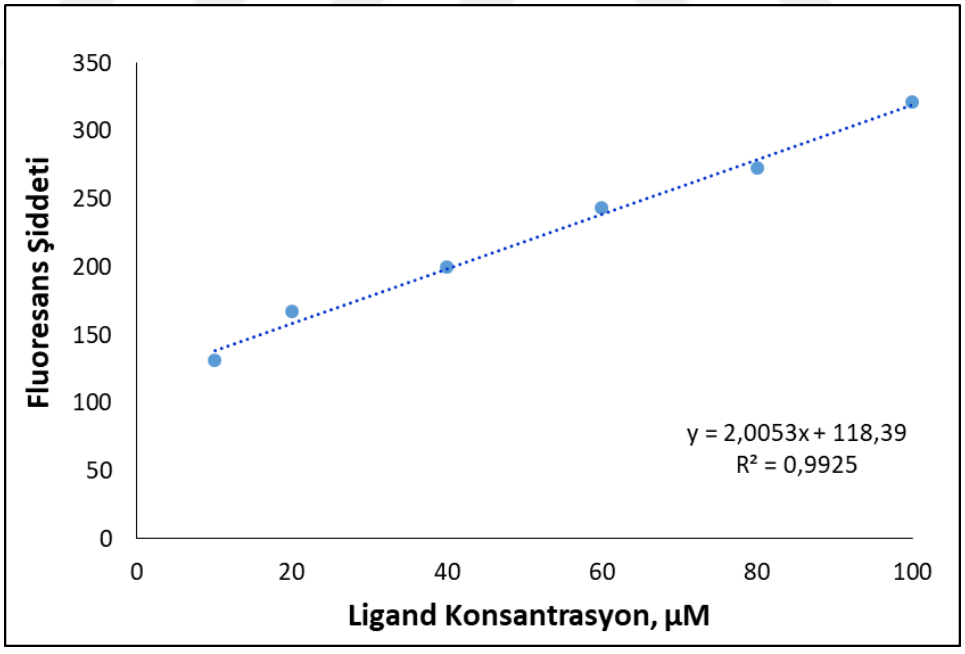


Şekil 4.4. ABS-34 maddesinin zeta potansiyel hareketlilik dağılım grafiği

4.4. ABS-34'ün Floresans Analizi



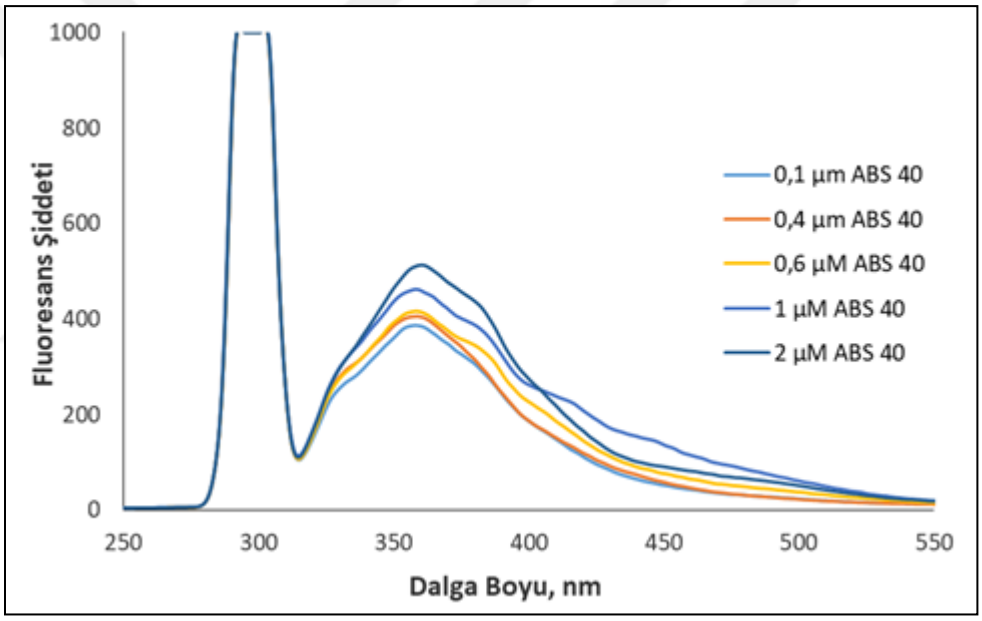
Şekil 4.5. ABS-34'ün 320 nm uyarma ve 409 nm yayılma dalga boylarındaki fluoresans spektrumları



Şekil 4.6. ABS-34'ün kalibrasyon grafiği

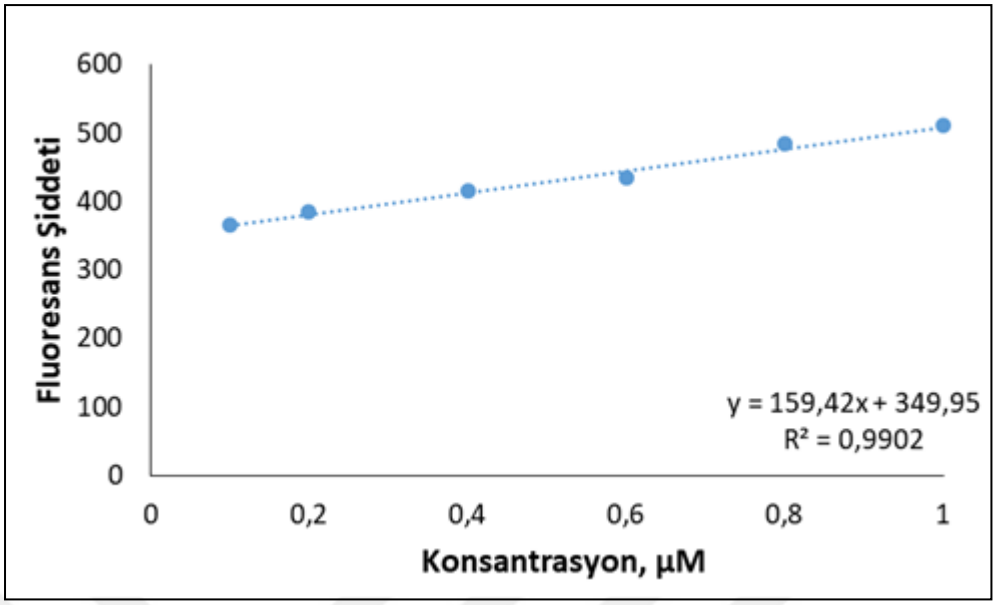
ABS-34 molekülünün spektrofluorometrik analizinde elde edilen sonuçlara göre molekülün fluoresent olduğu, 320 nm uyarma ve 409 nm yayılma dalga boylarında maksimum fluoresans şiddeti verdiği tespit edilmiştir. 10 µM-100 µM konsatrasyon aralığında % 1 DMF-su ortamında hazırlanan çözeltilerin belirlenen uyarma ve yayılma dalga boylarında spektrumu alınarak molariteye karşı fluoresans şiddetleri grafiğe çizilmiştir (Şekil 4.5). Verilen konsantrasyon aralığında kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (Şekil 4.6). Elde edilen kalibrasyon eğrisinin denklemi y= 2,0053x + 118,39 ve regrasyon sabiti (R^2) 0,9925 olarak bulunmuştur.

4.5. ABS-40'ın Floresans Analizi



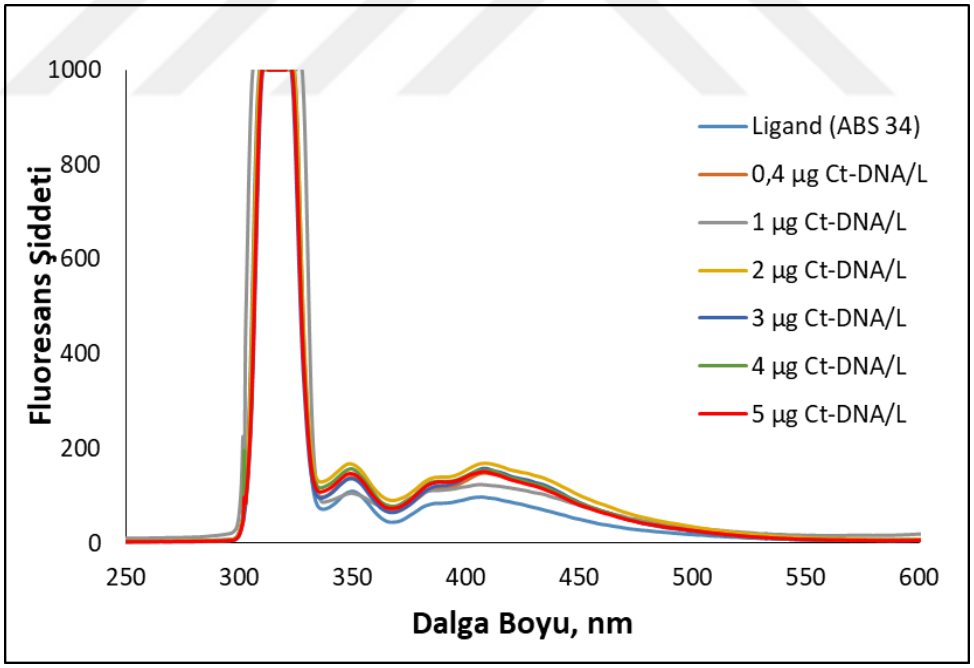
Şekil 4.7. ABS-40'ün 350 nm uyarma ve 400 nm yayılma dalga boylarındaki floresans spektrumları

ABS-40 molekülünün spektrofluorometrik analizinde elde edilen sonuçlara göre molekülün floresent olduğu, 350 nm uyarma ve 400 nm yayılma dalga boylarında maksimum floresans şiddeti verdiği tespit edilmiştir. 0,1 µM-2 µM konsantrasyon aralığında % 1 DMF-su ortamında hazırlanan çözeltilerin, belirlenen uyarma ve yayılma dalga boylarında spektrumu alınarak molariteye karşı floresans şiddetleri grafiğe çizilmiştir (Şekil 4.7). Verilen konsantrasyon aralığında kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (Şekil 4.8). Elde edilen kalibrasyon eğrisinin denklemi y= 159,42x + 349,95 ve regrasyon sabiti (R^2) 0.9902 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.8. ABS-40'ün ait kalibrasyon grafiği

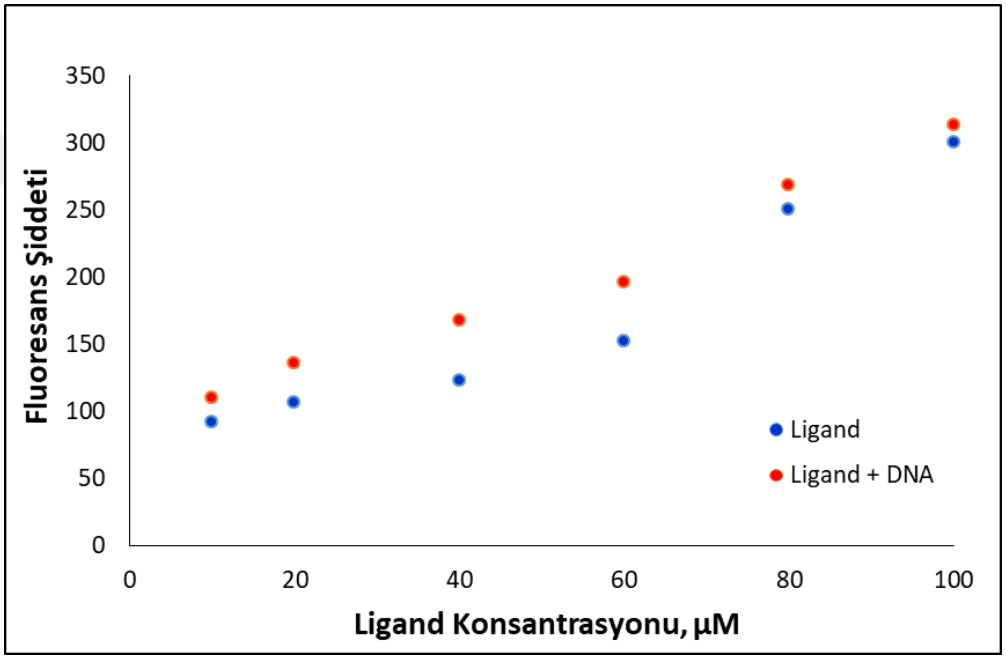
4.6. ABS-34 ile DNA Etkileşimi



Şekil 4.9. ABS-34'ün farklı konsantrasyonlardaki Ct-DNA ilavesi sonrası 320 nm uyarma ve 409 nm yayılma dalga boylarındaki floresans spektrumları

0,1 µM ABS-34 molekülüne %1 DMF-su ortamında 0,4 - 5 µg konsantrasyon aralığında Ct-DNA ilave edilerek 1 saat boyunca karıştırıldı ve ABS-34'ün spesifik

dalga boyları olan 320 nm uyarma ve 409 nm yayılma dalga boylarındaki fluoresans spektrumları alınmıştır (Şekil 4.9). Elde edilen flüoresans spektrumlarına göre; 2 µg Ct-DNA ilavesi ABS-34'ün floresans şiddetini artırmıştır. Ancak 2 µg Ct-DNA'dan sonra artan DNA miktarı ligandın fluoresans şiddetini düşürmüştür (Şekil 4.10). Ligand, bağlayabildiği DNA'yı bağlayarak doygunluğa ulaştığından, geride bağlanmadan kalan DNA molekülleri ile Ligand-DNA kompleksi arasında etkileşimden kaynaklanan iç dönüşüm sonucu Ligand-DNA kompleksinin floresans şiddetinin azaldığı düşünülmektedir (Maltas, 2016).



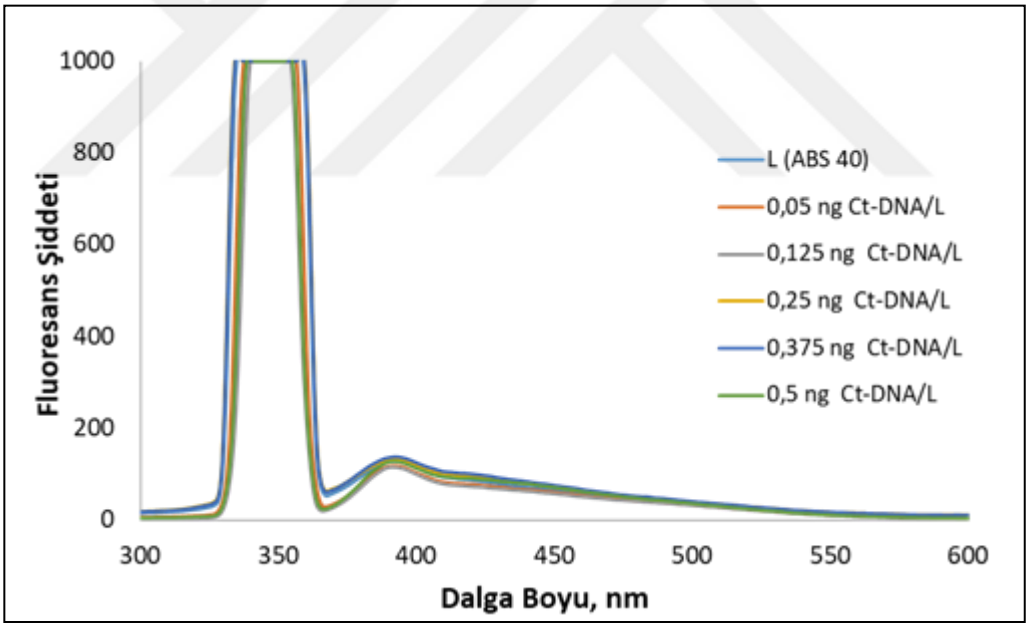
Şekil 4.10. %1 DMF-su ortamında sabit Ct-DNA konsatrasyonunda (0.8 mg), değişen ligand konsantrasyonuna (10-100 µM) bağlı olarak 320 nm uyarma ve 409 nm yayılma dalga boyundaki floresans değişim grafiği

Şekil 4.10'da sabit Ct-DNA konsatrasyonunda (0,8 mg) değişen ligand konsantrasyonuna (10-100 µM) bağlı olarak floresans değişim grafiği verilmiştir. Bu grafiğe göre her bir ligand konsantrasyonunda, ligandın floresans şiddeti DNA-ligand kompleksinden düşüktür. Sonuç olarak belli bir DNA konsantrasyonunda, Ct-DNA-ABS-34 kompleksinin oluşumu ile birlikte ABS-34'ün floresans şiddetini artırdığı, böylece ABS-34'ün DNA ile etkileştiği görülmüştür.

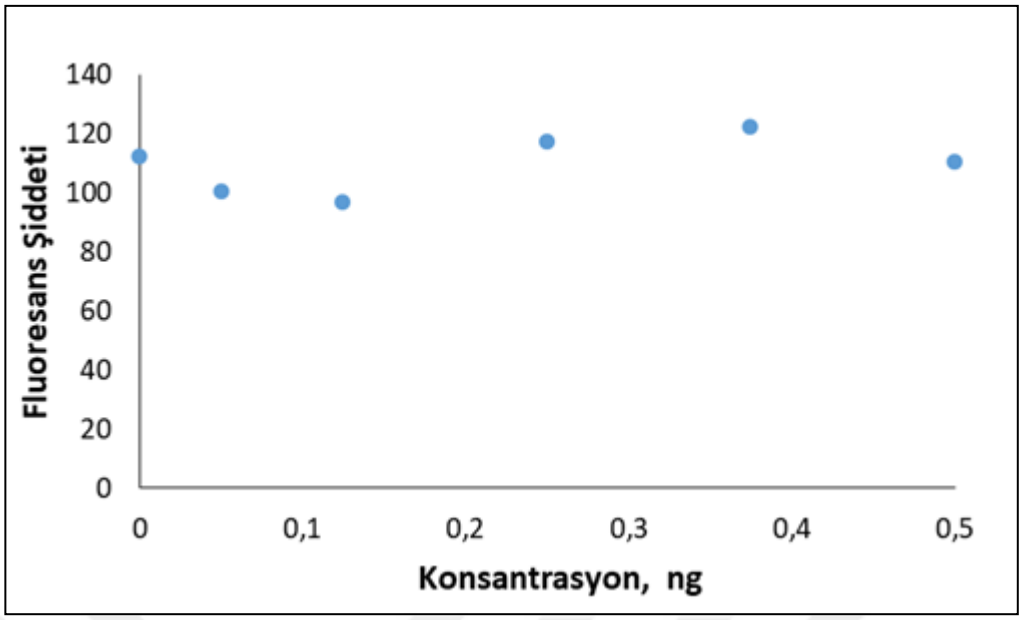
Deneyde kontrol değişkeni, 0,8 mg DNA, bağımsız değişken, Ligand konsantrasyonu ve bağımlı değişken; bağlanma miktarı olarak belirlenmiştir.

4.7. ABS-40 ile DNA Etkileşimi

1 µM ABS-40 molekülüne %1 DMF-su ortamında 0,05 ng–0,5 ng konsantrasyon aralığında Ct-DNA ilave edilerek 1 saat karıştırıldı ve ABS-40'ın spesifik dalga boyları olan 350 nm uyarma ve 400 nm yayılma dalga boylarındaki floresans spektrumları alınmıştır. Elde edilen floresans spektrumlarına göre; 0,375 µg Ct-DNA ilavesi ABS-40'ın flüoresans şiddetini artırmıştır. Ancak 0,375 ng Ct-DNA'dan sonra artan DNA miktarı ligandın fluoresans şiddetini düşürmüştür (Şekil 4.11). Ligand bağlayabildiği DNA'yı bağlayarak doygunluğa ulaştığı için geride bağlanmadan kalan serbest DNA molekülleri ile Ligand-DNA arasında etkileşimden kaynaklanan iç dönüşüm sonucu Ligand-DNA kompleksinin floresans şiddetinin azaldığı düşünülmektedir (Maltas, 2016).



Şekil 4.11. ABS-40'ın farklı konsantrasyonlardaki Ct-DNA ilavesi sonrası 350 nm uyarma ve 400 nm yayılma dalga boylarındaki fluoresans spektrumları



Şekil 4.12. Sabit Ct-DNA (1 mg) konsatrasyonunda değişen ABS-40 konsantrasyonuna (0,1-0,5 µM) bağlı floresans değişim grafiği

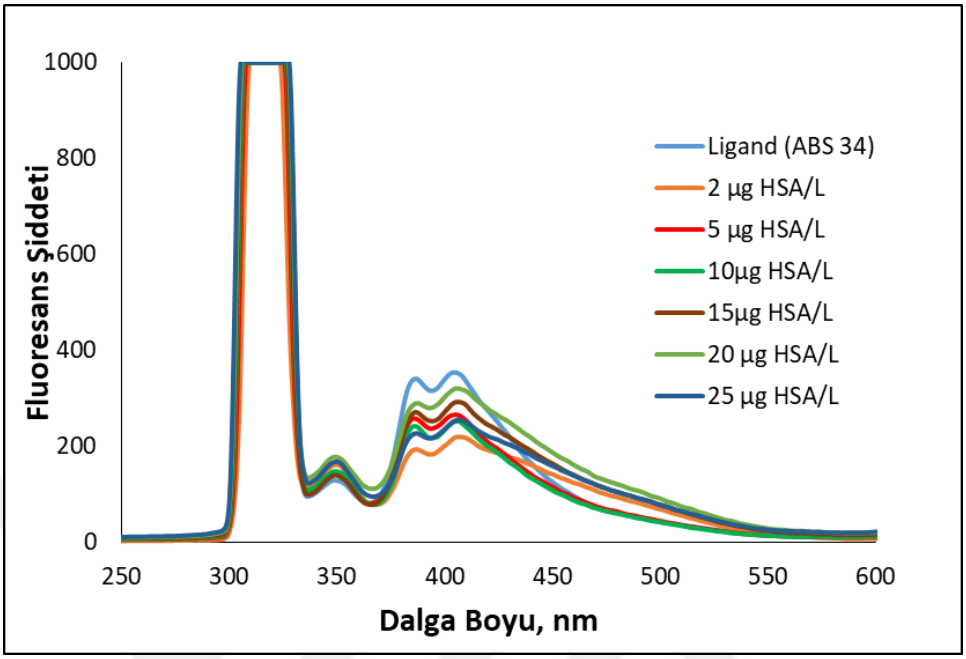
Şekil 4.12'de sabit HSA konsantrasyonunda değişen ligand konsantrasyonlarına (0,1-0,5 ng) bağlı floresans değişim grafiği verilmiştir. Bu grafiğe göre 0,15 µg'a kadar konsantrasyon artışı ile floresans şiddetinde azalma olduğu, 0,15 µg'dan sonra artan konsantrasyonla floresans şiddetinin arttığı belirlenmiştir.

Deneyde kontrol değişkeni; 1 mg Ct-DNA, bağımsız değişken; Ligand konsantrasyonu (0,1-0,5 µM) ve bağımlı değişken; bağlanma miktarı olarak belirlenmiştir.

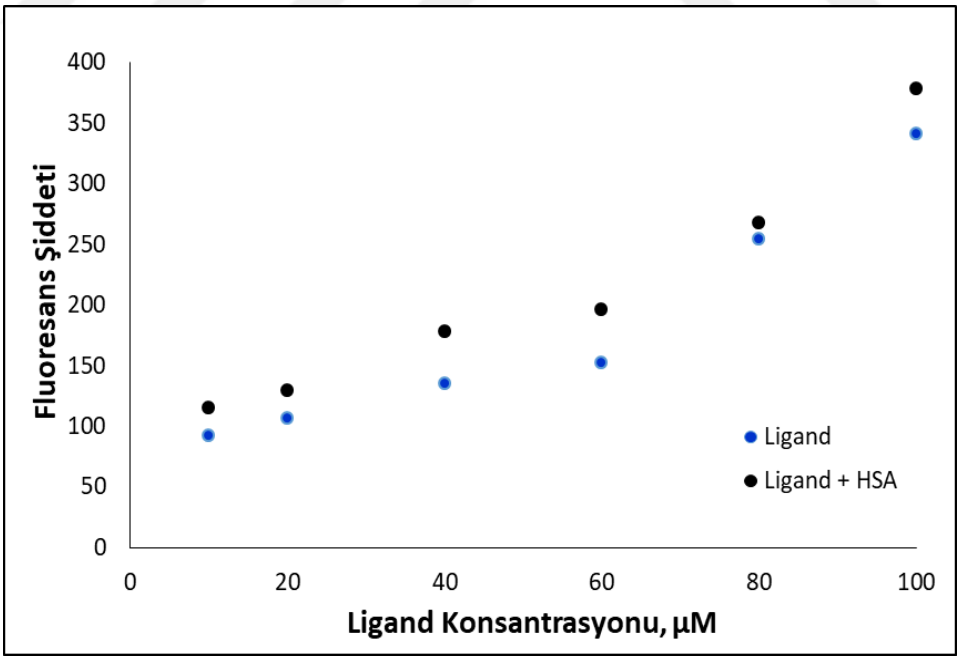
4.8. ABS-34 ile Protein Etkileşimi

0.1 µM ABS-34 molekülüne %1 DMF-su ortamında 2 µg- 25 µg konsantrasyon aralığında insan serum albümini (HSA) ilave edilerek 1 saat karıştırıldı. ABS-34'ün spesifik dalga boyları olan 320 nm uyarma ve 409 nm yayılma dalga boylarındaki fluoresans spektrumları alınmıştır (Şekil 4.13). Elde edilen floresans spektrumlarına göre; HSA ilavesi ABS-34'ın floresans şiddetini azaltmıştır. İnsan serum albüminin metabolik olarak büyük molekül ağırlıklı olması ve üç boyutlu konformasyonu nedeniyle kandaki görevi vitamin, ilaç gibi organik- inorganik molekülleri H bağı, elektrostatik etkileşim, van der waals veya hidrofobik etkileşimlerle bağlamaktadır (bir başka ifadeyle hapsetmektedir). Böylece hedef dokulara bu molekülleri taşımaktadır. Bu

noktadan hareketle, HSA'nın ABS-34'ü kimyasal olmayan etkileşimlerle içerisine hapsederek ligandın floresans şiddetini düşürdüğü düşünülmektedir (Maltas, 2016).



Şekil 4.13. ABS-34'ün farklı konsantrasyonlarda HSA ilavesi sonrası 320 nm uyarma ve 409 nm yayılma dalga boylarındaki fluoresans spektrumları



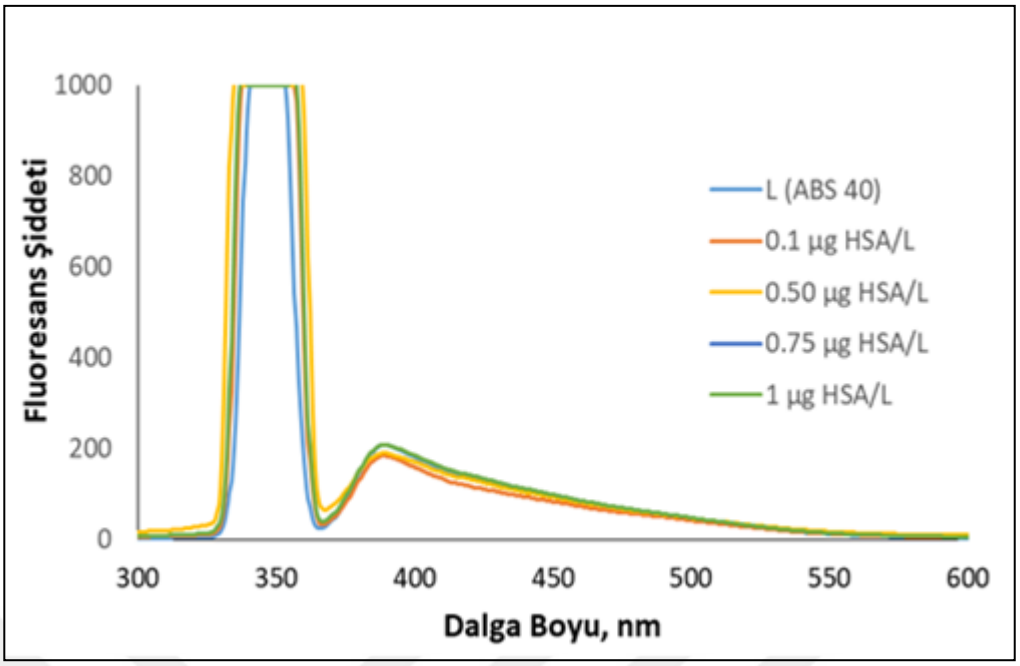
Şekil 4.14. ABS-34'ün ve ABS-34-HSA komplekslerinde ligand konsantrasyonuna karşı 320 nm uyarma ve 409 nm yayılma dalga boylarındaki floresans şiddetine grafiği

Şekil 4.14'de sabit HSA konsantrasyonunda (2,5 mg) değişen ligand konsantrasyonuna (10-100 µM) bağlı floresans değişim grafiği verilmiştir. Bu grafiğe

göre her bir ligand konsantrasyonunda ligandın floresans şiddeti, HSA-ligand kompleksinden düşüktür. Bu grafikte ligand konsantrasyonu oldukça yüksektir. HSA konsantrasyonu ise sabittir. Buna göre her bir ligand konsantrasyonunda ortamda HSA'ya bağlanmadan kalan bir miktar ligand bulunmaktadır. Buna göre ligand konsantrasyonunun artıştıyla bu serbest ligand miktarı artmaktadır. Bununla birlikte ligand-HSA ve ligand'ın toplam floresansı ligandın floresans şiddetinden yüksektir. Aynı zamanda bu sonuç ligandla albümin arasında bir etkileşim olduğunu da göstermektedir. Deneylerde kontrol değişkeni; 2,5 mg HSA miktarı, bağımsız değişken; Ligand konsantrasyonu ve bağımlı değişken; bağlanma miktarı olarak belirlenmiştir.

4.9. ABS-40 ile Protein Etkileşimi

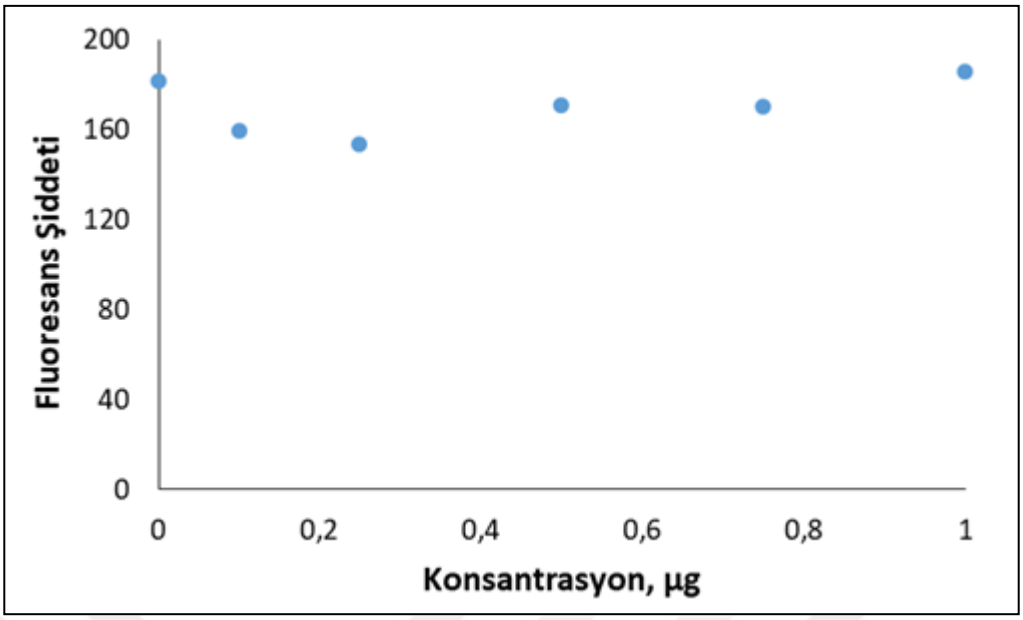
1 µM ABS-40 molekülüne %1 DMF-su ortamında 0,1 µg-1 µg konsantrasyon aralığında insan serum albümini (HSA) ilave edilerek 1 saat karıştırıldı. ABS-40'ın spesifik dalga boyları olan 350 nm uyarma ve 400 nm yayılma dalga boylarındaki floresans spektrumları alınmıştır (Şekil 4.15). Elde edilen sonuçlara göre ligandın floresansı 0,25 µg konsantrasyon değerine kadar azalma 0,25 µg-1 µg kadar ise artış göstermiştir.



Şekil 4.15. ABS-40'ın farklı konsantrasyonlarda HSA ilavesi sonrası 350 nm uyarma ve 400 nm yayılma dalga boylarındaki fluoresans spektrumları

Şekil 4.16'da sabit HSA konsantrasyonunda değişen ligand konsantrasyonlarına bağlı floresans değişim grafiği verilmiştir. Bu grafiğe göre 0,25 µg'a kadar konsantrasyon artışı ile floresans şiddetinde azalma olduğu, 0,25 µg'dan sonra artan konsantrasyonla floresans şiddetinin arttığı belirlenmiştir (Maltas, 2016).

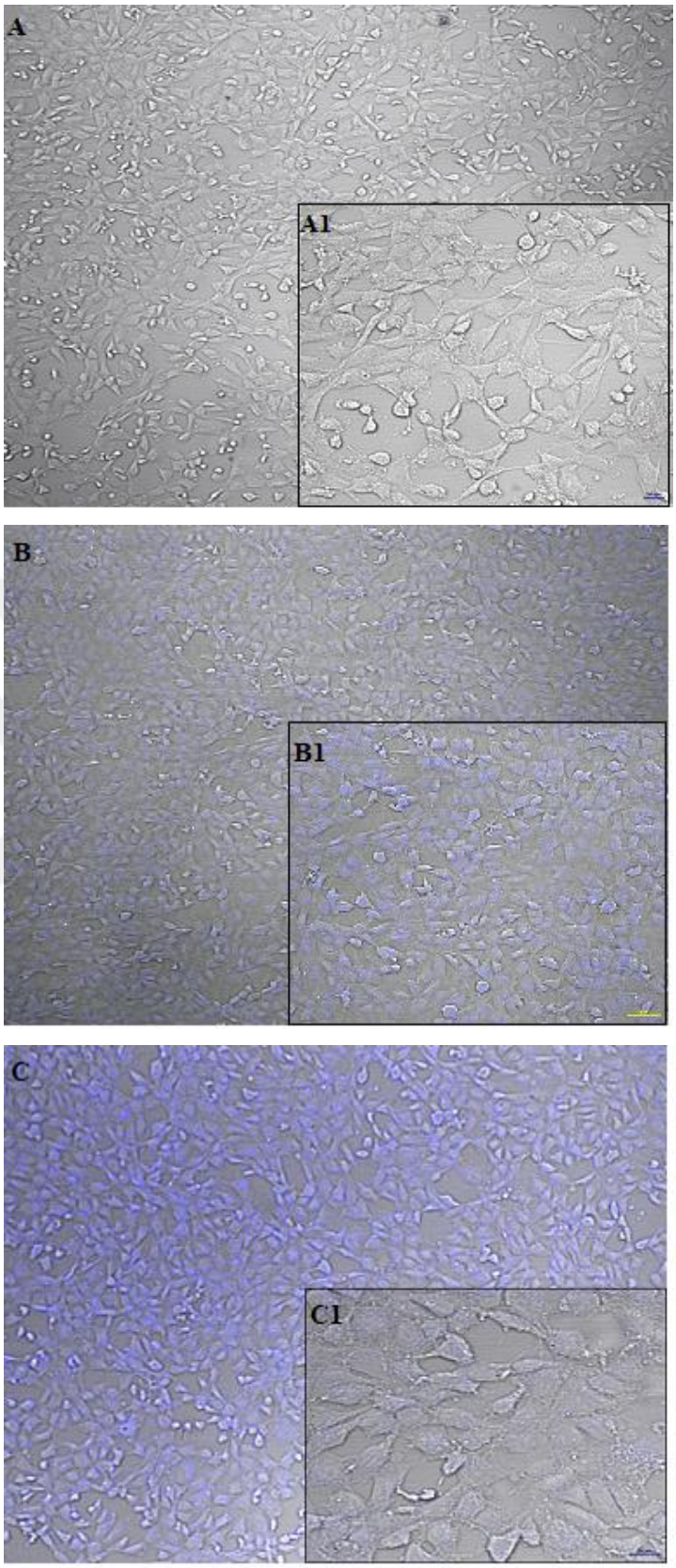
Deneyde kontrol değişkeni; HSA miktarı, bağımsız değişken; Ligand konsantrasyon miktarları ve bağımlı değişken; bağlanma miktarı olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.16. ABS-40'ın 350 nm uyarma ve 400 nm yayılma dalga boylarındaki değişen ligand konsantrasyonlarına karşı konsantrasyon grafiği

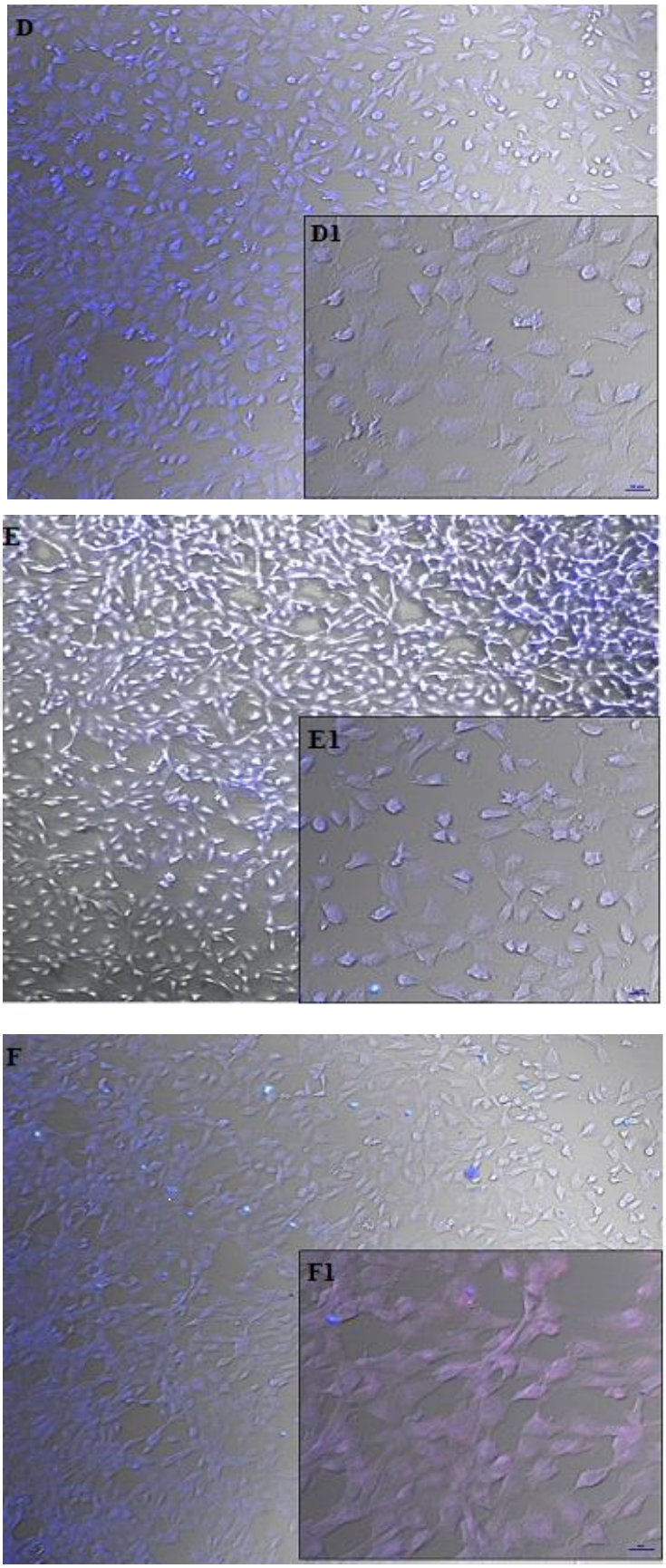
4.10. Hücre Görüntüleme Çalışmaları

L-929 hücrelerine, ABS-34 için, 6,66; 33,3; 166,6; 333,2 µM ve ABS-40 için 6,36; 31,8; 159; 318 µM olmak üzere dört farklı konsantrasyonlarda eklenen moleküllerin konfokal mikroskobuyla çekilmiş iki farklı büyüklükteki görüntüleri verilmiştir. Kontrol amacıyla L-929 hücresi DAPI ile boyandı. Konfokal mikroskobunda 403.7 nm uyarma dalga boyunda alınan boyanmış hücre görüntüleri ABS-34 için, Şekil 4.17 ve Şekil 4.18'de, ABS-40 için, Şekil 19 ve Şekil 20'de verilmiştir (Maltaş, 2015).

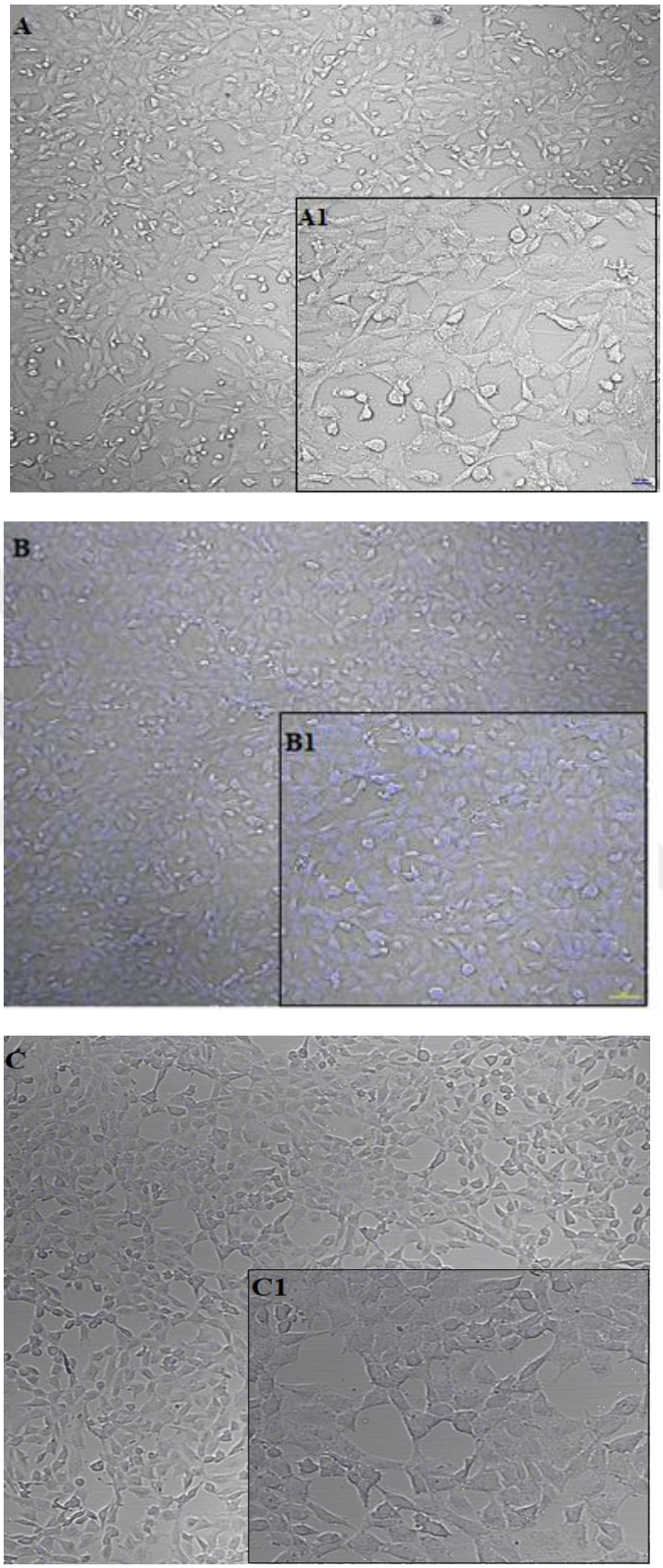


Şekil 4.17. ABS-34'ün (A) negatif kontrol, (A1), Nyquest; (B) DAPI, (B1) Nyquest; (C) 6.66 µM, (C1) Nyquest, Büyütme (A-B-C) ,(10x10)X; (A1-B1-C1), Nyquest; konfokal görüntüleri; DAPI (λex: 403.7 ve λem: 425–475 nm) kanalında.

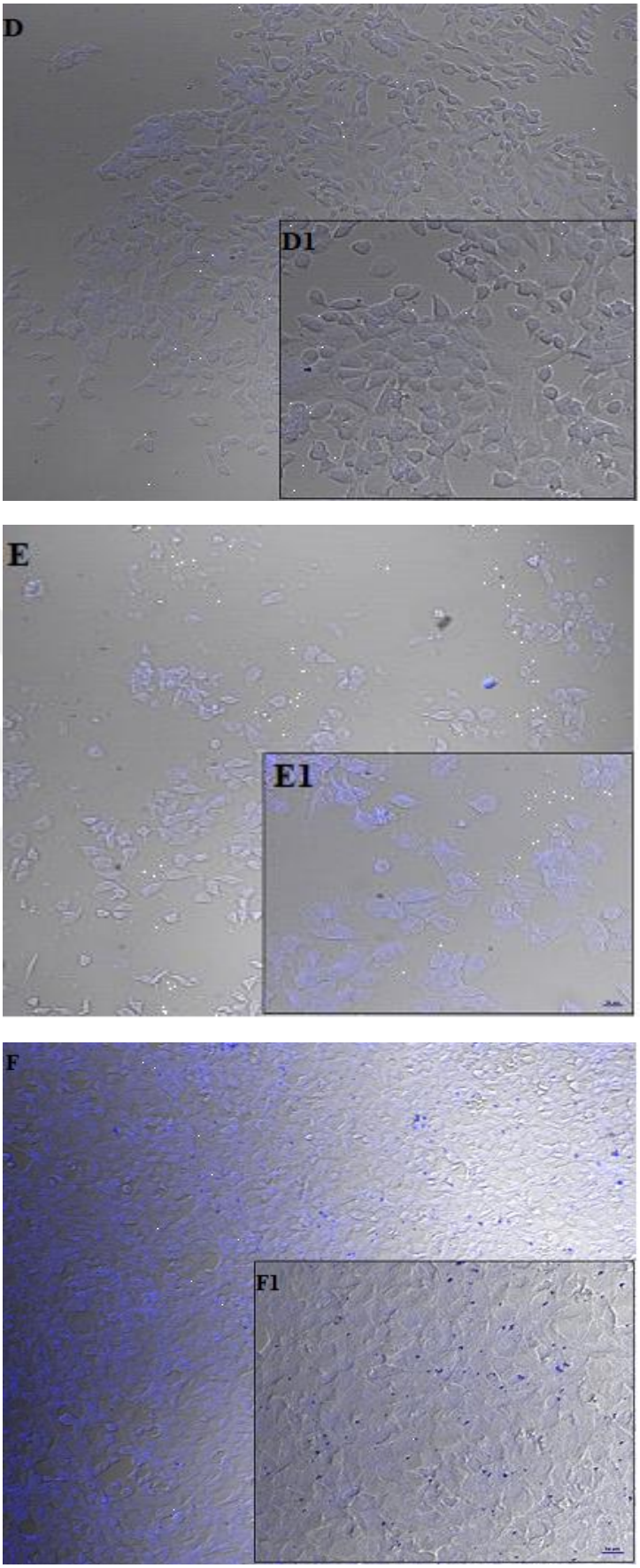
.



Şekil 4.18. ABS-34'ün (D) 33,3 µM, (D1), Nyquest; (E) 166,6 µM, (E1) Nyquest; (F) 333,2 µM, (F1) Nygquest; Büyütme (A-B-C) (10x10)X; (A1-B1-C1), Nyquest; konfokal görüntüleri; DAPI (λex: 403.7 ve λem: 425–475 nm) kanalında.



Şekil 4.19. ABS-40'In (A) negatif kontrol, (A1), Nyquest; (B) DAPI, (B1) Nyquest; (C) 6.36 µM, (C1) Nyquest, Büyütme (A-B-C) ,(10x10)X; (A1-B1-C1), Nyquest; konfokal görüntüleri; DAPI (λex: 403.7 ve λem: 425–475 nm) kanalında



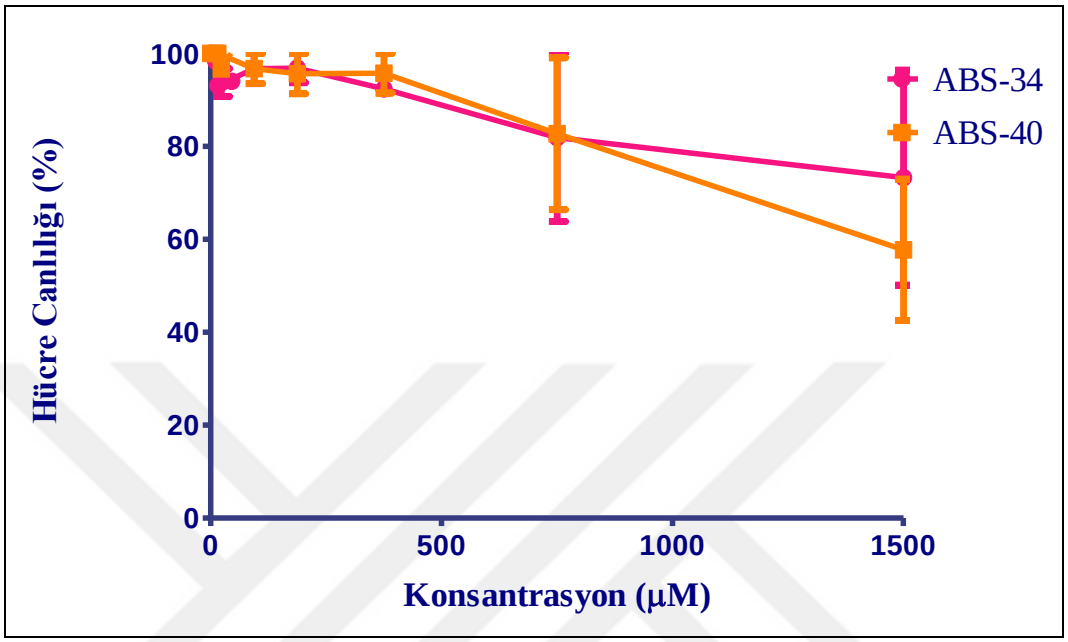
Şekil 4.20. ABS-40'In (D) 31.8 µM, (D1), Nyquest; (E) 159 µM, (E1) Nyquest; (F) 318 µM, (F1) Nyquest, Büyütme (A-B-C) ,(10x10)X; (A1-B1-C1), Nyquest; konfokal görüntüleri; DAPI (λex: 403.7 ve λem: 425–475 nm) kanalında

ABS-34 ve ABS-40 moleküllerinin floresent olduğu, HSA ve DNA ile in vitro ortamda etkileştiği Bölüm 4.1-4.6'da ispatlanmıştır. Bu nedenle ligandların in vitro testleri L-929 hücre kültürü ortamında denenmesi aşamasına geçilmiştir. Bu aşamada, fare fibroblast hücrelerinin bu ligandlarla immunohistokimyasal boyamasının yapılması amaçlanmıştır. ABS-34 ve ABS-40 molekülleri, sırasıyla 6.66- 333,2 μM ve 6.36- 318 μM konsantrasyon aralığında besiyeri ortamına ilave edilerek hücre kültürü yapıldı ve 24 saat sonra hücrelerin konfokal mikroskobunda görüntüleri alındı. Aynı konsantrasyon aralığında hücre görüntülemede standart bir boya olan DAPI (2-(4-amidinofenil)-1H-indole-6-karboksamidin) ile L-929 hücreleri kontrol amacıyla boyanarak aynı şartlarda konfokal mikroskop görüntüleri alındı. Bu amaçla, ticari boyalara alternatif olabilirliği araştırıldığından ve hücre ortamında ligandların protein ve DNA dışındaki diğer biyomoleküllere bağlanma ihtimali olduğu için, görüntülemede ligandların spesifik uyarma dalga boyları olan 400-409 nm aralığna tekabül eden konfokal mikroskobunun otomatik ayarlanmış filtresine (kanal) karşılık gelen DAPI (λex: 403.7 ve λem: 425–475 nm) filtresinin yanında floresan izotiyosiyanat (FITC, λex: 488 nm ve λem: 500-550 nm) ve tetrametil rodamin izosiyanat (TRITC, λex: 561.7 ve λem: 570–620 nm) filtreleri kullanılarak da görüntüleri alınmıştır. Ancak hem ABS-34 hem de ABS-40 DAPI filtresinde mavi görüntü vermiştir. Diğer filtrelerde herhangi bir görüntü alınamamıştır. Bu da hücre içerisnde hücre dışında olduğu gibi ligandların biyomoleküllerle oluşturduğu komplekslerin yayılma dalga boylarının fazla değişmediğini, daha uzun dalga boylarına (kırmızıya) kaymadığını ortaya çıkarmıştır.

Sitotoksitite deneylerinde ABS-34 ve ABS-40 maddelerinin her birinin yüksek konsantrasyonlarda toksik etki verip-vermediği incelenmiştir. Bu moleküller, 1500 mikromol gibi yüksek konsantrasyonlara kadar herhangi bir toksik etkisi gözlemlenmemiştir. Boyaların yüksek miktarı daha etkili olmasına rağmen, çözücü olarak 1000/1 oranında DMSO kullanıldığı için, daha yüksek konsantrasyonları kullanılamamıştır. Çünkü DMSO fikse olmuş hücrelerin, hücre zarı seçici geçirgenliğini geri dönüşümsüz olarak bozmaktadır. Hücreler fikse edildikten sonra aktif taşıma yapamadıkları için, ölümcül dozda kullanmadığımız halde DMSO hücre zarına zarar vermiştir. Normalde sitotoksitite testlerinde, yüksek konsantrasyonlarda dahi toksik olmayan ABS-34 ve ABS-40 molekülleri çözücüden kaynaklı olarak yüksek konsantrasyonlarda toksik etki göstermiştir.

Farklı konsantrasyonlarda yapılan denemelerde de konsantrasyona bağlı bir dalga boyu değişimi gözlenmemiştir. Ancak ABS-34; 33.3 μM ve ABS-40; 159 μM'da

en iyi konfokal görüntüsünü vererek optimum boya konsantrasyonları olarak bu değerler kabul edilmiştir. Bununla birlikte ABS-34 molekülü daha düşük konsantrasyonda L-929 hücrelerini boyamıştır (Şekil 4.18 ve Şekil 4.20).



Şekil 4.21. ABS-34 ve ABS-40 Maddelerinin L-929 Hücrelerinin Canlılığı üzerine etkileri (24 saat)

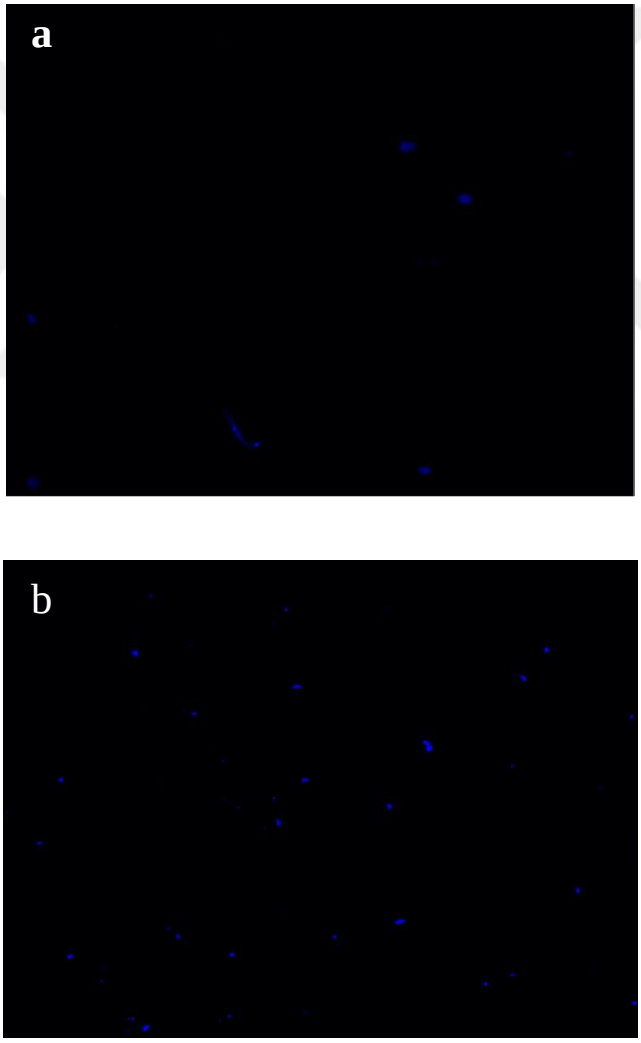
Şekil 4.21'da görüldüğü gibi ABS-34 ve ABS-40 moleküllerinin XTT analizi sonucunda kullanılan maximum doz olan 1500 µM'da dahi L-929 hücrelerinin canlılığı %50'nin altına düşmemiştir. Ancak, 750 ve 1500 µM dozlarında hücre canlılıklarının hızlı bir şekilde azalmaya başlamış olduğu görülmüştür. (sırasıyla ortalama % 65 ve % 55).

ABS-34 ve ABS-40 moleküllerinin L-929 hücrelerinin üzerindeki doza bağlı etkileri karşılaştırıldığında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Bu sonuçlar değerlendirildikten sonra konfokal mikroskop analizleri için belirlenen dozlar, 2 ve 10 µM'dır (Maltaş, 2015).

4.11. Floresans Etiketleme

ABS-34 ve ABS-40 moleküllerinin nanobiyoteknolojik uygulamalarda kullanılması için Bölüm 3.10'da anlatılan metotdaki gibi öncelikle demir oksit nanopartikülleri sentezlenmiş ve DNA'nın etkileşmesine izin vermesi için yüzeyinde

amin olacak şekilde modifiye edilmiştir. Bölüm 3.11'de verilen deneysel işlemlere göre 5 mg nanopartiküle Ct-DNA etkileşmiş ve etkileşme miktarları Multiskan Go Cihazı ile DNA'nın spesifik dalga boyu olan 280 nm de absorbansları ölçülerek otomatik olarak hesaplanmıştır. Buna göre 5 mg amin modifiye nanopartikül yüzeyine 12.8 µg Ct-DNA etkileştiği görülmüştür. Ardından 5'er mg'lık Ct-DNA bağlı amin modifiye demir nanopartiküllerine, ABS-34 ve ABS-40 molekülleri (%1-99 DMSO, su) ilave edilerek, 1 saat oda sıcaklığında karşıştırılmış ve moleküllerin yüzeyle etkileşme miktarları her bir molekülün Bölüm 3.4 verilen spesifik uyarma ve yayılma dalga boylarında elde edilen kalibrasyon eğrilerinin denklemleri kullanılarak hesaplandı.



Şekil 4.22. a) ABS-40 etiketli DNA-SPIONs b) ABS-34 etiketli DNA-SPIONs nanopartiküllerinin 403.7 nm (mavi)'deki konfokal mikroskop görüntüleri

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Hücrelerin büyük çoğunluğu saydam ve renksiz olmasından dolayı, hücre görüntülemede belirgin hale getirmek için hücreye uygun, toksik olmayan boyalarla işaretlenmesi gerekmektedir. Hücre görüntülemede kullanılan, konfokal mikroskopu, flow sitometresi, Real time PCR gibi DNA ve hücre boyama tekniklerinin işlevsel olabilmesi için özel ticari boyalara ihtiyaç vardır. Hücre boyama ya da etiketleme işlemi genellikle belirli boyalar (DAPI, YOYO, SYBEER green, PicoGreen, FTIC vb.) kullanılarak yapılmaktadır. Günümüzdeki mevcut boyalar ve kullanılan tekniklerle, belirli kimyasal gruplar ya da hücre-doku içindeki yapılar seçici olarak boyanabilmektedir (Martin ve Chatterjee, 2003). DAPI, YOYO, PicoGreen, FTIC vb). Bu ticari pahalı boyaların yerine alternatif olarak ekonomik ve biyobozunur boyaların sentezi önemlidir. Yeni alternatif boyaların senteziyle beraber daha düşük maliyette ve düşük toksiteye sahip boyaların üretimi amaçlanmaktadır.

Hücre görüntülemede hayati öneme sahip olan floresent maddelerin sayısı çok olmakla beraber, sağlık alanında kulanılabilecek olanların sayısı sınırlıdır. Floresent maddenin tıpta tanı- tedavi amaçlı kullanılabilmesi için belirli özellikleri bulundurması gerekir. Sadece floresans özellikte olması yeterli değildir. Bundan dolayı, hücre görüntüleme laboratuvarlarında kullanılabilen düşük toksisite, biyouyumluluk, düşük maliyet, etkili floresans vb. özelliklerinden dolayı hala en çok ihtiyaç duyulan materyallerdir. Boyaların ekonomik şekilde hücre görüntülemede kullanılması tam olarak nanobiyoteknoloji gibi multidisipliner bir alan sayesinde başarılabilir (Wang, 2018). Hücre kültürü zahmetli ve maliyeti yüksek bir teknolojidir. Hücre kültürü yapmadan, moleküllerin görüntüleme amaçlı kullanılabilir boyalar olup olmadığının tespitinde nanobiyoteknoloji kullanılabilir bir metod olarak değerlendirilebilir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, Hücre kültüründe hücrelerin yüzeye fiksasyonundan sonra konfokal mikroskobunda alınan görüntüler ile yine sabit bir yüzey olan nanopartikül yüzeyinde alınan görüntülerin dalga boyları biribirine benzerdir.

Nanopartiküllerle çalışma teranostik çalışma alanına imkan tanımaktadır. Bundan dolayı ABS-34 ve ABS-40 molekülleri, teranostik çalışma için kanserli hücrelerde denenebilir. Eğer moleküller terapi özelliği gösteriyorsa bu amaç dogrulltusunda kullanılabilir ama terapi özelliği göstermiyorsa, kullanılacak kemoterapik ajanla birleştirilerek etkin hale getirilebilir.

Hücre görüntüleme için yeni alternatif ticari boya sentezi yapılmak istendiğinde, sentezlenecek madde farklı bir çözelti ortamına ihtiyaç olmadan, suda çözünme özelliğinde olması hedeflenmelidir. Sentezlenecek maddenin suda çözünmesi, çözeltiden gelecek herhangi bir toksik etkinin engellenmesini sağlayarak, yüksek konsantrasyonlarda çalışmaya imkan sunacak ve çözücüden kaynaklanabilecek etkilerin önüne geçilebilecektir. Günümüzde ticari olarak kullanılan boyaların çoğu pozitif yüklü ve çözücüleri sudur. ABS-34 ve ABS-40 maddelerini sülfatlaştırılarak suda çözünür hale gelmesi sağlandığı takdirde yüksek konsantrasyonları da etkili bir şekilde kullanılabilecektir.

KAYNAKLAR

Ada Ü. G, 2009, Nanobiyoteknolojik yaklaşımlarla hazırlanmış modifiye altın nanopartiküllrin hücre kültürüne dayalı meme kanseri araştırmalarında kullanılması ve biyoafinitelerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bornova-İzmir

Adams F, Barbante C, 2015, Chapter 7- Chemical Imaging Analysis, Comprehensive Analytical Chemistry, 69; 269-313

Akdoğan N, 2013, Yeni bir sınıf (2-(-Stirilsilopentil)benzo[d]Tiyazol) türevlerinin sentezi ve in vitro antikanser (antiproliferatif) aktivitelerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Tokat

Amelian A, Wasilewskaa K, Megias D, Winnicka K, 2017, Application of standard cell cultures and 3D in vitro tissue models as an effective tool in drug design and development, Pharmacological Reports, 69; 861-870

Anonim, Biyologlar.com, Faz Kontrast Mikroskobu ve Görüntüleme Sistemleri, http://www.biyologlar.com/faz-kontrast-mikroskobu-ve-goruntuleme-sistemleri (Ziyaret Tarihi: 3 Ağustos 2018)

Anonim, 2011, Moleküler Fluoresans Spektroskopisi- Kavramlar, http://biyokure.org/molekuler-floresans-spektroskopisi-2/5318/ , Ziyare Tarihi : (15.10.2018)

Anonim, What is H&E, https://www.histology.leeds.ac.uk/what-is-histology/H_and_E.php, (Ziyaret Tarihi: 4 Aralık 2018)

Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Isolating cells and growing them in culture, Walter P. (Eds.), Molecular Biology of the Cell, New York Garland Science, 2002; 32-50.

Alshora D.H.,İbrahim M.H.,Alanazi F.K., 2016, Nanotechnology from particle size reduction to enhancing aqueous solubility, Chapter 6, Surface Chemistry of Nanobiomaterials, Applications of Nanobiomaterials, 3: 163-191

Asif, M, Ali, Zafar A, Farhan M, Khanam, H, Hadi, S. M.,Shamsuzzaman,2017, Microwave-assisted one pot synthesis, characterization, biological evaluation and molecular docking studies of steroidal thiazoles." Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology 166: 104-115.

Baş S.Z, Maltas E, Sennik B, Yılmaz F, Vural H.C, (2014). Design of a probe based on poly(glycidyl methacrylate-co-vinylferrocene)-coated Pt electrode for electrochemical detection of PTEN
gene in PCR amplified samples from prostate tissues. Journal of Applied Polymer Science, 131(16), 1-9

Belder A, 2012, Bazı yeni tiyazol ve tiyodiazol halkası içeren bileşiklerin sentezi ve karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Karabük Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Karabük, 13

Brabazon D, 2012, Chapter 18- Nanocharacterization Techniques for Dental Implant Development, Emerging Nanotechnologies in Dentistry, Processes, Materials and Applications, Micro and Nano Technologies, 307-331

Canefe K., Duman G.,1994, Selective Drug Delivery and Targeting, Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi

Corradini M.G., McClements D.J., 2017, Food, Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering,

Cüce E.M., 2012, Bakteri yüzey potansiyelinde çok düşük frekanslı elektromanyetik alanların ve katyonik peptidlerin meydana getirdiği değişimlerin malvern zetasizer ve floresans spektroskopisi ile saptanması, Marmara Üniversitesi, Sağlık bilimleri Enstitüsü, İstanbul

Duran M, 2006, Biyolojik aktif ve ilaç öncüsü olan bazı tiyazol türevlerinin sentezi yapı- etki ilişkilerinin deneysel ve teori incelenmesi, Doktora Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsüi, Eskişehir, 18

Doeberitz M.K, Wentzensen N, 2008, CHAPTER 1 - The Cell: Basic Structure and Function, Comprehensive Cytopathology (Third Edition), 3-22

Elçin M, KİM 458, Biyoteknolojinin Temelleri,

(https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/7205/mod_resource/content/0/14.%20Haft

a.pdf), (Ziyaret Tarihi : 10 Temmuz 2018)

El-Sabbgah, O. E., Baraka, M. M., Ibrahim, S. M., Pannecouque, C., Andrei, G., Snoeck, R., Balzarini, J. and Rashed, A. A,2009, "Synthesis and antiviral activity of new pyrazole and thiazole derivatives", European Journal of Medicinal Chemistry, 44: 3746-3753

Eskier U, 2017, Spektroskopi nedir? (Özellikleri, çeşitleri),

https://www.makaleler.com/spektroskopi-nedir ,(Ziyaret Tarihi: 15 Temmuz 2018)

Frey S, Castro A, Arsiwala A., Kane R. S., 2018, Bionanotechnology for vaccine design, Current Opinion in Biotechnology, 52:80-88

Fortina P., Kricka J. L., Surrey S., Grodzinski, 2005, Nanobiotechnology: the promise and reality of new approaches to molecular recognition, TRENDS in Biotechnology, Vol.23 No.4 April

Ghasemi B, Sanjarani G, Sanjarani Z, Majidiani H, 2015, Evaluation of anti-bacterial effects of some novel thiazole and imidazole derivatives against some pathogenic bacteria. Iranian Journal of Microbiology, 7(5):281-286.

Ghosh A, Karedla N, Thiele J.C., Gregor I, Enderlein J, 2018, Fluorescence lifetime correlation spectroscopy: Basics and applications, Methods, 140-141; 32-39

Gichner T, Mukherjee A, Velemínský J, 2006, DNA staining with the fluorochromes EtBr, DAPI and YOYO-1 in the comet assay with tobacco plants after treatment with ethyl methanesulphonate, hyperthermia and DNase-I, 605;17-21

Gilmartin N, O'Kennedy R, 2011, Nanobiotechnologies for the detection and reduction of pathogens, Enzyme and Microbial Technology, 50:87-95

Gregoriadis G, Swain C, Wills E, Tavill A.,1974, Drug-carrier potential of liposomes in cancer chemotherapy. The Lancet ;303:1313-6.

Gupta, R. R., Kumar, M., Gupta, V., 1999, Heterocyclic Chemistry, Springer Verlag, Berlin Heidelberg, New York, 638 p.

Gürbüz H, 2018, Akıllı ilaç teknolojisinde fiziksel ve aktif hedeflendirme stratejileri, Bitirme Tezi, Necmettin Erbakan Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoteknoloji Bölümü, Konya

Hassan FA, 2012, Synthesis, Characterization, Anti-inflammatory, and Antioxidant Activities of Some New Thiazole Derivatives. International Journal of Applied Science and Technology, 2 (7): 180-187

Hao J, Sun D, Xu Y, Zhang X, 2018, Magnification enhancement for an integral imaging microscope system, Optik, 156; 929-937

Herman B.,1998, Fluorecence microscopy, New York, Berlin, Heidelberg: Springer Verlag,

Hills A.E, 2017, Spectroscopy in Biotechnology Research and Development, Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Third Edition), 198-202

Hristozov D., 2013, Benefits of Nanotechnology for the Environment. Nanotechnology and Human Health, 129.

Inkson B.J., 2016, Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) for materials characterization, Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods, 17-43

İkizler, A.,1985, "Heterohalkalı bileşikler", Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Genel Yayın No: 84, Fakülte Yayın No: 38, Trabzon, 225231, 243-245

İşçi C, 2008, Cisimleri nasıl ve ne kadar ayrıntılı görebiliriz? Resim ve görmede çözünürlük. Journal of Yasar University, London, 3(11); 467-477

Jain K.K, 2011, Nanobiotechnology, Comprehensive Biotechnology, 1: 599-614

Joshi P, Datar A, Yu K-N., Kang S-Y, Lee M-Y, 2018, High-content imaging assays on a miniaturized 3D cell culture platform,Toxıcology in Vitro, 50; 147-159

Karakoç Z, Ketani M.A., Ketani Ş, 2016, Mikroskopların Çalışma Mekanizması ve Çeşitleri, Derleme, Dicle Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 1(1); 1-6

Kargozar S., Mozafari M.,2018, Nanotechnology and Nanomedicine: Start small, think big, Materials Today: Proceedings 5, 15492–15500

Khalil, A. M.,Berghot, M. A. and Gouda, M. A., 2009,"Synthesis and antibacterial activity of some new thiazole and thiophene derivatives", European Journal of Medicinal Chemistry, 44: 4434-4440

Kuzu B., 2016, pH duyarlı ve solvatokromik özelliğe sahip sensörlerin geliştirilmesi ve hücre görüntülemedeki uygulamaları, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Van

Kumar Teli M, Mutalik S, Rajanikant G.,2010, Nanotechnology and nanomedicine: going small means aiming big, Current pharmaceutical design 16:1882-92

Łączkowski K. Z., Świtalska M, Baranowska-Łączkowska A, Plech T, Paneth A, Misiura K, Wietrzy J, Czaplińska B, Mrozek-Wilczkiewiczf A, Malarz K, Musioł r, Grela I, 2016, Thiazole-based nitrogen mustards: Design, synthesis, spectroscopic studies, DFT calculation, molecular docking, and antiproliferative activity against selected human cancer cell lines, Vol: 1119, 139-150

Lee J.H, Wang J-H, Chen J, Li, F, Edwards T.L, Hewitt A.W, Liu G-S, 2018, Gene therapy for visual loss: Opportunities and concerns, Progress in Retinal and Eye Research,

Lesyk R, Vladzimirska O, Holota S, Zaprutko L, Gzella A, 2007, New 5-substituted thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazol-6-ones: Synthesis and anticancer evaluation. European Journal of Medicinal Chemistry, 42: 641-648.

Lesyk R, Zimenkovsky B, Atamanyuk D, Jensen F, KiećKononowicz K, Gzella A, 2006, Anticancer thiopyrano[2,3-d] [1,3]thiazol-2-ones with norbornane moiety. Synthesis, cytotoxicity, physico-chemical properties, and computational studies. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 14: 5230–5240.

Lynn D.E., 2009, Cell Culture, U.S Deparment of Agriculture, Encyclopedia of Insects (Second Edition), Chapter 39, 144-145

Maltaş E, Fındık M, Yıldız S, Özcan E, 2013, DNA labeling of vitamin D receptor gene by using schiff base. 16th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC), 19(1), 371-371, (Poster)

Maltaş E, Malkondu S, Uyar P, Özmen M, 2015, Fluorescent labelling of DNA on superparamagnetic nanoparticles by a perylene bisimide derivative for cell imaging, vol: 48; 86,93

Maltaş E, Özmen M, Vural H.C, 2013 Interaction of L-myc Oncogene in Breast Cancer with Irinotecan onto Functionalized Magnetic Nanoparticles" Materials Letters 106, 8–10.

Maltaş E, Özmen M, Ucan H.İ., 2016, Development of New Fluorescent Dyes by Using Amine Modified Nanoparticles for Immunostaining,

Manikandamathavan V.M., .Thangaraj M, Weyhermuller T, Parameswari R.P., .Punitha V, Murthy N.N., Balachandran U.N., 2017, Novel mononuclear Cu (II) terpyridine complexes: Impact of fused ring thiophene and thiazole head groups towards DNA/BSA interaction, cleavage and antiproliferative activity on HepG2 and triple negative CAL-51 cell line, Vol:135, 434-446

Martin S.F, Chatterjee S, 2003, Glycosphingolipid-Induced Cell Signaling: Apoptosis, Methods in Enzymology 363; 284-299

Mathieu J, Ruohola-Baker H, 2013, Regulation of stem cell populations by microRNAs, 786: 329-351

McKee C, Chaudhry G.R., 2017, Advances and challenges in stem cell culture, Colloids and Surface B: Biointerfaces, 159: 62-77, USA

Murthy N.S., 2011, Surface Modification of Biomaterials Methods Analysis and Applications, Techniques for analyzing biomaterial surface structure, morphology and topography

NanoComposix, 2012, Zeta Potential Analysis Of Nanoparticles, 4878 RONSON CT STE K, SAN DIEGO, CA 92111, 858 - 565 - 4227

Nikolova K, Kaloyanova S, Mihaylova N, Stoitsova S, Chausheva S, Vasilev A, Lesev N, Dimitrova P, Deligeorgiev T, Tchorbanov A, 2013, New florogenic dyes for analysis of cellular processes by flow cytometry and confocal microscopy, 5;129:125-34

Nilghaz A, Hoo S., Shen W, Lu X, Chan P.P.Y, 2018, Multilayer cell culture system supported by thread, Sensors and Actuators B: Chemical, 257: 650-657

Nuovo G.J, 2013, The Basics of In Situ Hybridization, In Situ Molecular Pathology and Co-Expression Analyses, 81; 131

Özel D. A., Durmuş Z, Yılmaz İ, Çukurovalı A, Kılıç E, 2006, Bazı tiyazol türevlerinin elektrokimyasal davranışlarının incelenmesi, XX. Ulusal Kimya Kongresi, Erciyes Üniversitesi, Kayseri

Özkan Ö, 2007, BSA-Dekstran sülfat komplekslerinin oluşumu ve karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul

Paddock S, 1998,. Confocal microscopy .Methods in molecuar biology, Humana Press, 122

Page H, Flood P, Reynaud E.G., 2013, Three-dimensional tissue cultures: current trends and beyond, 352; 123-131

Paik S.Y.R, Kim J.S., Shin S.J., Ko S., 2015, Characterization, Quantification, and Determination of the Toxicity of Iron Oxide Nanoparticles to the Bone Marrow Cells, 16, 22243-22257

Patton E.E., Mathers M.E., Schartl M., 2011, Generating and Analyzing Fish Models of Melanoma, Methods in Cell Biology, 105; 339-366

Polat B, 2012, Tiyamin ve tiyamin pirofosfatın doksorubisin ile oluşturulan deneysel kardiyotoksisiteye etkilerinin biyokimyasal ve histopatolojik olarak incelenmesi, Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum

Puralı N., 2004, Fonsiyonel Hücre Görüntüleme Teknikleri, Derleme, Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakütesi, Hacettepe Tıp Dergisi, 35;107-113

Rettig W, Strehmel B., Schrader S, Seifert H., 2012, Kimya, Biyoloji ve Tıpta Uygulamalı Floresans, Springer Science & Business Media,

Rhodes D.G., Bossio R.E., Laue T.M., 2009, Chapter 39 Determination of Size, Molecular Weight, and Presence of Subunits, Methods in Enzymology, 463; 691-723

Skoog A, West, M, Holler J Crouch R (2004). Fundamentals of Analytical Chemistry, 8. Baskı, 739

Solomons, T.W.G. and Fryhle,C. B, 2002, "Organik kimya", Çeviri Editörleri: Okay, G. ve Yıldırır, Y., Literatür Yayınları, 7. Basım, 84: 844

Svanvik N, Westman G, Wang D, Kubista M, 2000, Light-Up Probes: Thiazole Orange-Conjugated Peptide Nucleic Acid for Detection of Target Nucleic Acid in Homogeneous Solution, Vol: 281, 26-35

Şen F, 2018,4-(3-metil-3-fenilsiklobütil)-2-(2-(piridin-4-ylmetilen)hidrazinil) tiyazol'un Sentezi, Karakterizasyonu, Kristalografik Yapısı ve Hirshfeld Yüzeyinin İncelenmesi, Araştırma Makalesi, Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitü Dergisi, 8(1): 157-168

Takahashi K, Yamanaka S, 2015, A development framework for induced pluripotency, 142: 3274-3285

Tashiro, T., Osada, K., Mori, K., 2008, Syntheses of 2-Isopropyl-4,5-dihydrothiazole and 6-Hydroxy-6- methyl-3-heptanone, Pheromone Components of the Male Mouse, Mus Musculus. 72(9), 2398-2402.

T.C. Milli Eğitim Bakanlığı, 2011, Biyomedikal cihaz teknolojileri, Mikroskoplar, 523EO0239, Ankara

Türkan Y, 2015, Nanoteknoloji yatırımları ve yatırım modelleri, Bingöl Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi, cilt;5 sayı,10

Tiryaki M.K., 2010, Hücre Kültürü Uygulamalarında Temel Prensipler, Bitirme Tezi, Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Kayseri

Tomlinson, E., Livingstone, C, 1989, Selective Drug Delivery and Targeting, Pharm. J., November (1), 619-621

Valeur B., 2001, Molecular Fluorescence Principles and Applications, Wiley-VCH, USA.

Wang S, Larina I.V.,2017, High-resolution imaging techniques in tissue engineering, Monitoring and Evaluation of Biomaterials and their Performance In Vivo, 151-180

Wardencki W, Bielawska M, 2016, Chapter 14- Particulate Material Analysis in Air, Comprehensive Analytical Chemistry, 73;343-367

Wang F, Wei J, Xia H, Yan N, Song J, Zhang X, Gao L, Song L, Yan L, 2018, Synthesis, characterization and cell imaging of a new polythiophene derivative, Dyes and Pigments, 158; 362-367

William, B. L., David, R. K., Brandon, V. S., and Peppas N. A., 2010, Polymers for Drug Delivery Systems, Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering, 1,149-173.

Woodford C,2018, Electron microscopes, EXPLAINTHATSTUFF (https://www.explainthatstuff.com/electronmicroscopes.html), (Ziyaret Tarihi: 2 Ağustos 2018)

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	**:**	Havva Nur GÜRBÜZ
Uyruğu	**:**	Türkiye (T.C)
Doğum Yeri ve Tarihi	**:**	Selçuklu, 12.10.1993
Telefon	**:**	0544 914 84 03
Faks	**:**	
e-mail	**:**	hgurbuz431@gmail.com

EĞİTİM	**:** Nanoteknoloji ve İleri Malzemeler Selçuk Üniversitesi/ Konya
Yüksek Lisans	Tez Başlığı: Hücre görüntülemede alternatif boya olarak tiyazol türevlerinin kullanımı ve nanobiyo-teknoloji alanında uygulanabilirliğinin araştırılması
Lisans-2	Biyoteknoloji Bölümü (2018) Konya Necmettin Erbakan Üniversitesi Tez Başlığı: Akıllı ilaç teknolojisinde fiziksel ve aktif hedeflendirme stratejileri
Lisans-1	Fen Bilgisi Öğretmenliği (2015) Konya Necmettin Erbakan Üniversitesi Mezuniyet Notu: 3.23/4- Onur Belgesi
Lise	Cemil Keleşoğlu Lisesi (2011) Mezuniyet : 81,62/100

Uluslararası Kongreler

- Gurbuz H., Yagcılar Y.,Maltas Cagıl E., Ozcan F., Yıldız S., 7th International Molecular Biology and Biiotechnology Congress in Konya **2018,** 25-27 Nisan**, Productıon of Polylactic acid nanofiber as drug carrier, Sözlü Sunum**

- Gurbuz H., Sarıguney A. B .,Coskun A., Maltas Cagıl E. 4th International TURK-PAK Conference on Chemical Sciences, in Konya **2017**, Ekim 26-28, Özet, **Interactıon of a new thıazol derivative with human serum albumin and Ct – DNA, Poster**

- Gurbuz H., Kocabas E., Coskun A., Maltas Cagıl E., 5th International Bahçeşehir University (BAU) Drug Design Congress, in İstanbul **2017**, Ekim 19-21, Özet, **Interactıon of a New Thıazol Derıvatıve wıth Bıomolecule, Poster**

- Gurbuz H., Ertekin B., Maltas E, 2th Congress of Life Sciences Abdullah Gül Unıversity (AGÜ), in Kayseri , **2017,** Şubat 23-25, Özet, **Albumin-iron system in Donepezil transport, Poster**

Ulusal Konferans/ Çalıştay

İlaç ve Aşı Çalıştayı, 2017, Selçuk Üniversitesi, Konya, 3-4 Aralık, Rehber

Kök Hücre Günü,2016, Hacettepe Üniversitesi, Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi PEDİ-STEM, Ankara, 22 Kasım, Katılımcı

Deneyimler

Selçuk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik ve Genel Kimya Laboratuvarı, Öğrenci Asistanlığı, 2018

Konya Model Koleji, 2018, Fen Bilimleri Öğretmenliği

Selçuk Üniversitesi Biyokimya Laboratuvarı, Konya
3-20 Temmuz, 2017, Staj

Selçuk Üniversitesi İleri Teknolojileri Araştırma ve Geliştirme Merkezi (İL-TEK)
20-28 Temmuz, 2017, Staj

TÜBİTAK- Konya Bilim Merkezi
Robotsan robot tanıtım standı
25-27 Nisan, 2014, rehber

TÜBA- Konya, Bilim Sevgisi
9-11 Temmuz, 2014, Sunucu ve Sunum

Sertifikalar

Kariyer Sokağı Konya

Motivasyon Teknikleri	25 Ekim-2014
Takım yönetimi	25 Ekim-2014
İkna Teknikleri	25 Ekim-2014
Liderlik	25 Ekim-2014

İlgi Alanları

Fotoğraf çekmek,
Araştırma-deney yapmak,
Sunum, video, film hazırlamak

İstendiği takdirde referans verilebilir