

Biyolojik Terör Saldırılarına Karşı Yeni Yöntem

Prof. Dr. Adil Dentzi, Doç. Dr. Handan Yavuz
Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü

Minik plastik baskılar ve biyolojik moleküllerin taklitleri, diğer uygulamalarının yanı sıra ilaç geliştirilmesi, biyoterör saldırılarına karşı uyan ve çevreden zehirli maddelerin uzaklaştırılması alanındaki çalışmalar hızlandırmıştır.

Otuz yıl önce Mosbach ve arkadaşları İsveç, Lund Üniversitesinde nanometre ölçeğindeki yapıları yakalamak için bir tür "balık ağı" geliştirdiler. Geliştirilen bu ağlar önce hücreleri, sonra enzim gibi daha küçük biyolojik yapıları yakalayabiliyordu. Bu tuzaklar uygun koşullar altında canlı organizmanın dışına da aylarca işlevlerini sürdürebiliyorlardı. Bu yaklaşım birçok uygulama için oldukça çekiciydi. Örneğin, *Escherichia coli* hücrelerini içeren plastik ağlar bugün çok sayıda ilacın hazırlanmasında önemli bir girdi olan aspartik asit üretiminde kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde, özel bir enzim bulunduran plastik, glukozu daha tatlı olan fruktoza dönüştürmektedir. Bu tuzaklar için olası uygulamalar, tıp dahil, giderek artmaktadır. Özellikle, ağlarda tutulan hücreler, şeker hastaları için insülin üretiminde gerekli olan ölü ya da kusurlu hücrelerle değiştirilebilir. Ancak, plastik ağı bu yeni teknolojilerin sadece ilk aşamasıydı. Bugün dünya çapında 1000'den fazla araştırmacı Mosbach'ın öncülüğünü yaptığı bir teknolojinin, moleküler baskılama ve uygulamaları üzerinde çalışmaktadır. Bu teknoloji günümüzde mantar zehirleri ve aflatoksinler gibi zararlı maddelerin uzaklaştırılması amacıyla gıda endüstrisinde uygulama olanağı bulmuştur. Tıp alanında da ilaç geliştirme sürecinin ilk aşamalarını hızlandıracak (malyeti azaltacağı çözümler), ilaç saflaştırılması için kullanılacak yeni yöntemler ortaya çıkmaya başlamıştır. Ayrıca tıbbi teşhis ve tedavi araçlarının gelişimine de önemli katkılar söz konusudur.

Kaçak Araştırmalar...

Enzim ve hücrelerin immobilizasyonu çalışırken orijinal "balık ağı" teknolojisini kullanıp, ağı ilgililenen moleküllerin kendisinin etrafında oluşturup daha sonra yapıdan söküp ağıda kalıcı "moleküler oyuklar" ya da "boşluklar" oluşturulması ne olur diye bir düşünce ortaya çıktı. Bu "baskılar" acaba bu boşluklarda aynı tür moleküllerle yakalayabilirler miydi? Eğer böyleyse baskılar, sadece uygun geometrik şekil ve kimyasal gruba sahip olanlar boşluklara yerleşebileceği için, belirli bileşikler karışımlarından ayırmak için kullanılabilirlerdi. 20 yıldan daha fazla süre bu ikinci teknolojinin geliştirilmesi için çalışmalar yürütüldü. Bu çalışmalar "kaçak araştırmalar" olarak adlandırıldı çünkü başlangıçta herhangi bir bütçesi olmaksızın bu fikirler doğrulanmak zorundaydı. Bu süreç içerisinde potansiyel finansörler çalışmaların gerçekten çok uzak ve çok hayali olarak değerlendiriyorlardı. Yaklaşık olarak 20 yıl, bütçe olmaksızın moleküllerin plastik baskılan oluşturmaya çalışıldı. Aynı zamanda yöntemin basit olması da başlıca, yüzlerce, binlerce baskılanmış küre ya da ince film şeklindeki yapıların hazırlanması sadece birkaç gün alıyordu.

**Moleküler Baskılama ile
Biyolojik Terör saldırılarına
karşı alınacak tedbirler
çalışmalarında
önemli ilerlemeler
kaydediliyor.**

Peki bu baskılanmış yapılar nasıl hazırlanıyor? İlk önce, ilgililenen molekül- kalıp- seçilen plastiğin yapı taşları ile karıştırılır. Bu birimler, yani monomerler, her bir kalıbın etrafında plastik bir ağı oluşturur. Çözücü daha sonra kalıbı çözer ve geride orijinal biyomoleküle uygun yük dağılımına ve "hafızaya" sahip plastik kaplı boşluklar kalır. Plastik baskılar, yani moleküler baskılanmış polimerler- bazı ligi çekici özelliklere sahiptirler. Hazırlanmaları için nispeten az zaman gerektirdiklerinden ve plastik monomerler ucuz olduklarından maliyetleri düşüktür ve sert koşullarda bile uzun süre kararlı kalabilmektedirler. Bazı yapılar birkaç yıl süreyle işlevini koruyabilmektedir. Moleküler baskılanmış polimerlerin çok sayıdaki muhtemel kullanım alanından birisi de kandan is-

tenmeyen maddelerin uzaklaştırılmasıdır. Sorun olan maddelerin baskılan tüplere doldurulmuş plastik üzerine işlenir. Sözgelimi böbrek hastasının kanı vücut dışına alınıp bir kolondan geçirilerek zararlı maddelerden arındırılmaktadır. Hastanın kanı kolondan geçerken, kolondaki küreler seçilen maddeyi tutacak ve temizlenen kan tekrar hastaya geri verilecektir. Bu tür bir tedavi teorik olarak sürekli tekrarlanan hemodiyalize gereksinimi azaltacaktır. İstenmeyen maddeyle dolan kolon daha sonra yenisiyle değiştirilebilir. Baskılanmış araçlar istenmeyen maddelerin, sindirim sistemi gibi vücutun diğer bölgelerinden uzaklaştırılmasında da kullanılabilirler. Örneğin, kolesterol baskılanmış polimerler, kandaki kolesterolü uzaklaştırılması için kullanılabilirler.

Moleküler baskılanmış polimerler daha saf ilaç elde etmek için ilaç endüstrisinde de kullanılabilir. Bu tür bir safılık, özellikle ilaç molekülünün, birisi yararlı diğeri zararlı özellikte birbirinin ayna görüntüsü iki şekli olduğunda önemlidir. Thalidomide bu duruma klasik bir örnektir. İlacın yararlı şeklinin yanında zararlı bir şeklinin de bulunduğu farkedilene kadar, her iki şekli de içeren ilaçlar 1950 ve 1960'larda tedavi amacıyla kadınlara verildi. Trajik olarak, gebelik süresince kadınların bu ilacı alması sonucu muhtemelen 10.000 bebek ciddi özürlerle dünyaya geldi. İlaç üreticileri genellikle birbirinin ayna-görüntüsü moleküllerin ayrı olarak sentezlerler. Ancak üretim yöntemleri genellikle az da olsa istenmeyen moleküler şeklin de üretimiyle sonuçlanır. Tipik ticari yöntemlerle karşılaştırıldığında, moleküler baskılanmış polimerlere dayalı yöntemler istenmeyen molekülleri teşhis etmek ve uzaklaştırmak için daha etkindir. Çünkü her bir şekil sadece kendisine uygun boşluğa oturacaktır. Moleküler baskılanmış polimerlerin bu teşhis yeteneği sayesinde, terör ve önceden bilinmeyen hastalıklarla ilgilenen bazı şirketler ve kamu kuruluşları toksin ve patojenlerin (hastalık yapıcı ajanlar) teşhisi için sensör bileşenleri geliştirilmesi için bunları izlemektedir. Günümüzde sensörler bu teşhis işini biyolojik moleküllerle yapmalarına karşın bazı durumlarda laboratuvar koşullarından daha sert koşullarda çalışabilecek kadar dayanıklı değillerdir. Moleküler baskılanmış polimerlerin teşhisinde denendiği zararlı bileşikler arasında bir herbisit olan atrazin bulunmaktadır. Plastik oyuklar biyoterör silahı olarak kullanılan sinir gazı sarin'i de tanımlayabilmiştir (1990'ların ortasında sarin gazı Japonya'da iki kez terör saldırısında kullanıldı ve bu gaz 19 kişinin ölümüne ve binlerce insanın zehirlenmesine neden oldu). Moleküler baskılanmış polimerler ayrıca 2001 yılında ABD de bazı memurlara ve medya çalışanlarına gönderilen mektüplere konulmuş ünlü antrax sporlarını teşhis etmek için de kullanılmıştır. Daha da çarpıcı olan, çeşitli tip moleküler baskılanmış polimerlerle donatılmış sensör birimiyle belirli bir örnekte tek seferde birkaç bileşimin tayini yapılabilir. Bu tür çok işlevli sensör, bir elektronik çip üzerine yerleştirildiğinde, hedef maddelerden biri teşhis edildiğinde alıcıya ortamda bulunduğu dair bir sinyal gönderecektir. Böylece çok sayıda moleküler baskılanmış polimerlere sahip ayrı bölmeler istenmeyen maddeleri uzaklaştırmaya da yarayacaktır. Kamu ve endüstri bu anlamda, göllerin, dere ve toprakların temizlenmesi için moleküler baskılanmış polimerlere artan bir ilgi göstermektedir.

Şekil Eşittir İşlev...

Moleküler baskılanmış polimerlerin bir kısım uygulaması belirli bir boşluğa uyan mikroorganizma ya da moleküllerin yakalanmasına dayalıyken, diğer uygulamaları, örneğin antibadiler gibi, doğal bir molekülü taklit eden plastik yapıların oluşturulmasıdır. Vücudun bağışıklık sistemi, bir şekilde vücuda giren virüs ya da bakteri gibi yabancı organizmalara ait özel yapıları, ya da antijenleri algıladığında, doğal olarak antibadileri üretir. Antibadi molekülleri çok yüksek özgülüğe sahiptirler ve pek çok molekül arasından, bir anahtarın kilide uyması gibi sadece bir tanesini tanıyabilirler. Bu nedenle, teşhis kitlelerinde araştırmacılar bunlardan fazlasıyla faydalanmışlardır. Örneğin, kan ile etkileştirildiğinde, bazı antibadiler eğer ortamda bulunuyorsa bakterilere bağlanacak ve o kişinin enfekte olduğunu gösterecektir. Bazı antibadiler kanda çeşitli proteinlerin miktarını belirlemek için de kullanılabilir. Teşhis kitleleri için gerekli olan antibadiler yabancı protein ya da maddeler keçi ya da bir başka hayvana enjekte edilir. Daha sonra kandan bunlara karşı oluşan antibadileri saflaştırılarak temin edilirler. Ancak antibadilerin uzun ömürlü taklitleri özgül bir antijen plastik kalıplanarak da yapılabilir; sonuç olarak elde edilen moleküler baskılanmış polimerler ilgili antibadi ile hemen hemen eşdeğer antijen bağlama bölgesine sahip olacaktır. Bu tür "plastibadiler" potansiyel olarak pek çok testte antibadilerin yerini alabilir. Dolayısıyla hayvanlara olan artan gereksinim azaltılabilir. Moleküler baskılanmış polimerler ayrıca endüstriyel enzimler için uzun süre elki eden alternatifleri olarak da kullanılabilir. Doğada her organizma herbin özgül bir biyokimyasal reaksiyonu katalizleyen binlerce enzim üretirler. Normalde, enzimin işlevi substrat, enzim üzerinde aktif bölge olarak adlandırılan yere bağlandığında gerçekleşir. Yapay enzim, ya da "plastizim", yapmak için ilk önce substratın belirli konformasyonları için plastik oyuklar oluşturulmaya çalışılmıştır. Monomerler ve dolayısıyla oluşan plastizimler, doğal enzimlerdeki benzer kimyasal gruplara sahiptirler. Bu kapsamdaki ilk denemeler bazı enzimatik aktiviteler için sonuç vermiştir. Ancak moleküler baskılanmış polimerlerin daha etkin çalışması için farklı yaklaşımlara ihtiyaç vardır. Plastizimlerin, bazı maddelerin parçalanarak detoksifiye edilmesi gibi, doğal enzimlerin gerçekleştiremediği reaksiyonları da gerçekleştirmesi olasıdır.



Moleküler Baskılanmış Polimerler Nasıl Hazırlanıyor...

Moleküler baskılama yöntemi temel olarak üç basamaktan oluşmaktadır:

Basamak 1: Ön-kompleksleşme

Fonksiyonel gruplar içeren polimerleşebilen uygun monomerler, kalıp ya da başka bir deyişle hedef moleküle kovalent ya da non-kovalent etkileşimlerle bağlanarak kompleks oluşturur. Bu basamakta kalıp etrafında fonksiyonel monomerin bağlandığı bir yapı oluşumu söz konusudur. Bu etkileşimde hedef molekülün üç boyutlu yapısı ve kimyasal özellikleri önemli bir yer tutar.

Basamak 2: Polimerizasyon

Monomer-kalıp kompleksi, uygun bir çapraz

bağlayıcının da kullanılmasıyla fonksiyonel monomer üzerinden polimerleştirilir.

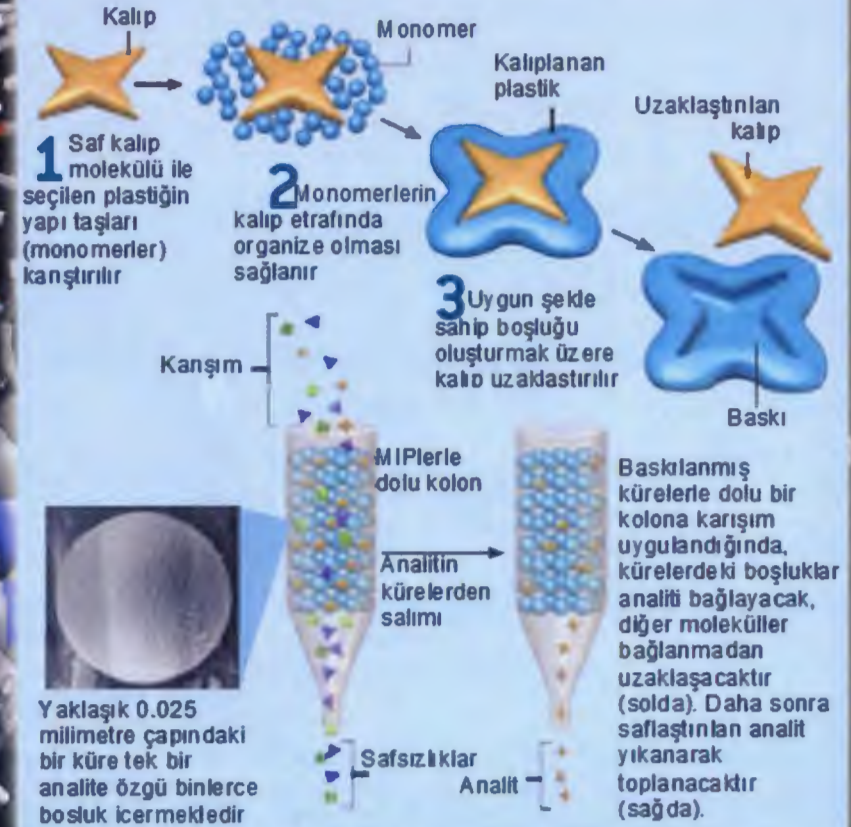
Basamak 3: Kalıp (hedef) molekülün uzaklaştırılması

Yapıda hedef molekülün yerini alacak boşlukların oluşturulması amacıyla, kalıp molekülü polimerden uzaklaştırılır. Uygun koşullar altında, bu boşluklar kalıp molekülün üç boyutlu yapısını ve fizikokimyasal özelliklerini tanıır, seçici ve etkin olarak kalıp molekülü bağlar.

Moleküler baskılanmış polimerler, kolay hazırlanabilir, kararlı, ucuz ve moleküler tanıma yeteneğine sahip olmaları gibi çekici özellikleriyle, yeni bir tür destek maddesi olarak araştırmacıların gözdesi olmuştur.

MIPLER NASIL YAPILIR

Moleküler baskılanmış polimerler, veya MIPLer, ilaçlardan safsızlıkların uzaklaştırılması gibi birçok uygulamaya sahiptir. Bu amaçla MIP yapmak için takip edilen basamaklar aşağıdadır.



Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarlarında moleküler baskılama temeline dayalı Hepatit B teşhisine yönelik çalışmalar yapılıyor.



Gelecek Jenerasyon...

Bugün moleküler baskılama teknolojisinin çok çeşitli uzantıları ortaya çıkmıştır. Bunlardan bir tanesi orjinal molekülün kopyasını oluşturmayı sağlayan işlem. Daha açık anlatılırsa, bu işlemde orjinalle aynı üç boyutlu yapıya ve aynı işleve sahip bileşikler oluşturulur; işlevsellik fonksiyonel grupların orjinaliyle birebir aynı şekilde ve yönlere dizilmesinden kaynaklanır. Bu teknoloji "ikili baskılama" olarak adlandırıldı. Çünkü bir baskıdan yeni bir baskının yapılmasını içeren, aslında baskının baskısıydı. İlk baskılamadan sonra oluşan boşluk küçük bir kalıp, ya da nanokap, haline gelir ve plastik polimerlerin öncülleri ya da moleküller bu nanokaplara doldurulur. Daha sonra bu bileşenlerin kabın şeklini alacak şekilde tek bir yapı oluşturmak üzere birleşmeleri sağlanır. Bu yöntem ilaç firmalarının mevcut ilaçlarla kararlılık ya da maliyet bakımından rekabet eden alternatif ilaç üretmelerini sağlayabilir. Moleküler baskılanmanın uzantısı olan diğer bir teknoloji doğrudan kalıplama olarak isimlendirilebilir. Bu yöntemde nanokap doğal biyolojik molekülün belirli bir bölümüdür. Bu yaklaşımla örneğin belirli enzimleri inhibe edecek ajanların geliştirilmesi hızlandırılabilir.

Piyasadaki ilaçların kabaca üçte biri enzim inhibitörleridir. Bu anlamda daha etkili yöntemler geliştirmek önemlidir. Örneğin bir ilaç şirketinin tümörlerin yayılmasını katalizleyen enzimlerden birini durdurmak istediğini düşünelim. Enzimin aktif bölgesinin substratı ile etkileşmesini önleyecek bir tıpa bu iş için uygun bir çözümdür. Araştırmacılar bunun için olası tüm bileşik türlerini, aktif bölgeyi kapatması umuduyla deneme yanılma yöntemleriyle denener. Diğer bir yaklaşım da ikili baskılama yönteminde olduğu gibi aktif bölgeye küçük kimyasal maddeler doldurularak buranın şeklini alması sağlanabilir. Oluşan yapı bu bölgeyi tıkayacak bir kopyası olacaktır ve sonrasında canlı bir hücrede etkinliği denebilir. Tüm yeni teknolojilerde olduğu gibi moleküler baskılanmış polimerler için de bazı üretim sorunları söz konusudur. Ölçek büyütmenin nasıl yapılacağı, her yapılan baskının bir diğeriyle aynı olmasının sağlanması bunlardan bazılarıdır. Ayrıca kalıptan yapıdan uzaklaştırılması için etkili yöntemler gereklidir. Bu alanda çalışan araştırmacılar bu sorunların çözümü ve yeni uygulamalara kapılar açmak için sürekli yeni yollar geliştirmektedirler.

Teşhis Amaçlı Moleküler Baskılama: Hepatit B Teşhisi

Viral hepatit, dünya çapında yüz milyonlarca insanı etkileyen bir sağlık sorunudur. Viral hepatit, hem akut enfeksiyonlara hem de kronikleşerek ölümlere yol açmaktadır. Hepatit B (HBV) ve hepatit C virüsü (HCV) ile enfekte olunduğunda, kronik hepatit, siroz ve karaciğer kanserine sebep olan karaciğer hastalıkları ortaya çıkabilmektedir.

Hepatit virüsleri, bulaşma yollarından ya da virüde ortaya çıkan klinik sorunlardan ilaha çok kopyalama temeline göre adlandırılmıştır. İnsanlarda beş farklı virüs (Hepatit A, E, C, D, E) tanımlanmıştır. Bu virüsler çok iyi karakterize edilmiş olup yaklaşık yüzde 90'ı akut ve yüzde 10'ü kronik viral hepatitle neden olmaktadır.

Hepatit A, B ve C ve neden olan virüsün tanımlanması amaçlı ile virüslerde bulunan antijenlere karşı vücudun bağışıklık sisteminin oluşturduğu antikorların tanınmasına yönelik bazı testler geliştirilmiştir. En yaygın olarak kullanılanlar Radyo immüno test (RIA), Enzim immüno testi (EIA) ve Enzim bağı immünoasorbent testi (ELISA) ölçüm yöntemleridir. Bu ölçüm yöntemleri yüksek derimde özgüdür. RIA yönteminde radyo izotopların kullanımı, bu yöntemlerde kullanılan antikorların kimyasal ve fiziksel kararlılıklarının düşük olması, kilitlerin raf ömrünün kısa olması araştırmacıları farklı teşhis yöntemlerinin araştırılmasına yöneltmiştir.

Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarlarında moleküler baskılama temeline dayalı Hepatit B teşhisine yönelik yüzey plazmon rezonansı (SPR) temelli immün teşhis kiti hazırlanmıştır.

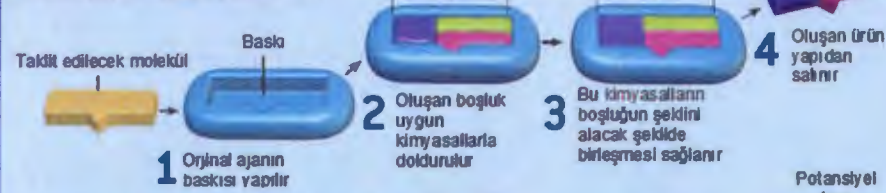
SPR'nin teorik enerji taşıyan ışık fotonunun metalele elektronları ve birleşmesi ya da enerji aktarımı ile ilgili olarak dayanmaktadır. Birleşimin (ya da enerji aktarımının) gerçekleştiği ışığın gelme açısı her metal ve metal yüzeyi çevresine göre değişmektedir. Işık fotonları ve metal yüzeyindeki elektronlar arasında bir eşleşme ya da rezonans yakalandığında enerji aktarımı gerçekleşir. Enerji aktarımı, metal filmin alt yüzeyinden yansıyan ışığın miktarını ölçülmesiyle belirlenebilir. Her ışık farklı açılarda yansıyarak, ışığın bir kısmı rezonans açısında absorbe olmaktadır.

Yüzey plazmon rezonansın analitik bir araç olarak kullanılması, plazmon alanı arasındaki yaygın kimyasal bileşimindeki değişimin sebep olduğu ışığın rezonans açısında kaymanın ölçülmesine dayanmaktadır. Kimyasal bileşimlerdeki değişim absorplanan ışığın gelme açısında kaymaya sebep olmaktadır. Açık kaymasının büyüklüğü miktar olarak kimyasal değişimle ilişkilidir. Bir teşhis kitinde, ince metal film üzerine substrat bağlanmış bir prizma (genel olarak cam ve plastik) üzerine uygulanır. Daha sonra özel bir analite (hormon, ilaç, tümör belirteci vs.) özgün antikorlar metal film üzerine non-spesifik olarak adsorplanır. Sensöre analit içeren örnek uygulanıldığında; antibodi ve analit bağlanması, gelen ışığın rezonans açısındaki kaymanın ölçüldüğü metal yüzeyde değişime sebep olur. Rezonans açısındaki kaymanın boyutu, örnek içersindeki analitik miktar ile orantılıdır. Antibodi ve analit arasındaki ilişki oldukça spesifik olduğu için diğer moleküler sensör taraflarından ölçülmezler.

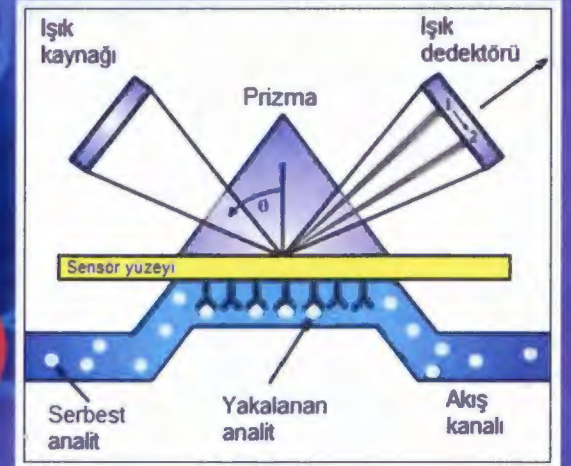
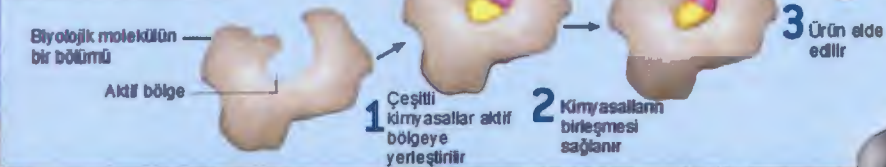
MIP'LERİN ÖTESİNDE: NEGA TİFTEN POZİTİF YAPMAK

İki yeni teknoloji, MIPlerdeki boşluktan faydalı bileşiklerin yapımında kullanılmaktadır. İkili baskılama işleminde, kalıp seçilen maddenin plastik taklidi. Doğrudan kalıplamada boşluk biyolojik bir molekülün bir kısmıdır, doğaldır.

İKİLİ BASKILAMA. Bu yaklaşım mevcut bir ilacın üç boyutlu yapısı ve işlevine sahip ama kararlılığın artırılması gibi daha gelişmiş özelliktedir.



DOĞRUDAN KALIPLAMA Bu yöntemde bir enzim veya başka bir biyolojik molekülün aktif bölgesi uygun kimyasallarla doldurularak, sonrasında bu molekülün istenmeyen raksyoniyan gerçekleşmesini önleyecek binaları üretimine olanak verir.



Gelenek Kayıt: SPR Çiplerinin Hazırlanması, Teşhis Amaçlı Moleküler Baskılama, Talat Özalp, Hacı Fazıl Özalp, Deniz Ünalp, İstanbul