

ALYUVARLARLA İLAÇ NAKLI

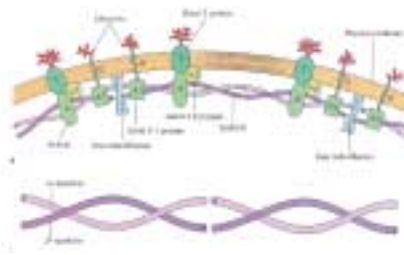
Organizmadaki hücrelerin işlevlerine en uygun yapısal ve şekilsel özellikleri kazanmaları kuralına uygun olarak çekirdeklerini kaybetmiş ve bikonkav (iki yanı da çukur) biçim kazanmış olan alyuvarlar, oksijen taşımak üzere özelleşmiş hücreler. Son yıllarda, olağanüstü elastik bir zara sahip olan bu hücrelerin birçok biyoteknolojik uygulamada kullanılmaları amacıyla yoğun çalışmalar yapılmakta. Bu alanlardan biri de ilaçların vücutta hedeflenen dokulara ulaştırılması.

Son derece yüksek biçim değiştirebilme ve deforme olabilme kapasitelerine bağlı olarak alyuvarların hücre zarları, çeşitli tekniklerin uygulanmasıyla küçük ve iri organik moleküllerin hücre içine girebilecekleri geçici delikçiklerin (porların) oluşturulabilmesi için oldukça uygun. (Giriş resmi, şekil 2). Söz konusu porlar, organik maddenin hücre içine yerleştirilmesinden sonra yeniden kapatılabilir ve hücreler tekrar alındıkları kişiye ya da uygun bir alıcıya verilebilir. İşlem uygulanan hücreler normal biyokimyasal ve hücresel kimliklerini kaybetmezler. Hatta ek ve özel işlemler uygulanmadığında normal yaşam sürelerini ve oksijen taşıma kapasitelerini de korurlar.

Günümüzde herhangi bir uygun ajanın (maddenin) alyuvarlar içine yerleştirilmesinde (buna enkapsülasyon yani kapsülleme de denir) uygulanabilen çok sayıda başarılı yöntem bulunuyor. En yaygın, hücrelerin tuz içeriği düşük (hipotonik) bir ortamda tutularak su almalarının ve bu sayede zarlarındaki delikçiklerin (porların) açılmasının sağlanması, açılan porlardan istenen maddenin

(çoğunlukla bu bir ilaç etken maddesidir) hücre içine sokulması ve porların, tuz içeriği hücreninki ile aynı olan (izotonik) sıvı içine alınması yoluyla kapatılması ve zarın eski halinin kazandırılması aşamalarını kapsar. Bu amaçla, kandan alyuvarlar ayrılır ve takiben düşük tuz içerikli sıvı ortamda su olarak şişmeleri sağlanır ki, bu sayede alyuvar zarındaki porlar açılır. Kapsülenecek olan madde bu aşamada ortama eklenerek hücre içine girmesi sağlanır ve ardından hücreler izotonik ortama alınarak porların yeniden kapanması sağlanır. Kapsülleme işleminden sonra alyuvarlar, fizyolojik sıcaklık (37 °C) koşullarında ortamlara hücrenin gereksinim duyduğu maddeler (genellikle glukoz, fosfat, inozin, piruvat ve adenin) de ilave edilerek, şekillerinin ve metabolik işlevlerinin normale dönmesi sağlanır. Son aşamadaysa hücreler yıkanır ve kişiye ya da uygun alıcıya yeniden verilir (şekil 3).

İnsan ve memeli hayvan türlerinde, dolaşım kanındaki olgun alyuvarlar çekirdek ve mitokondriyonlardan yoksundurlar ki bunun sonucunda da metabo-

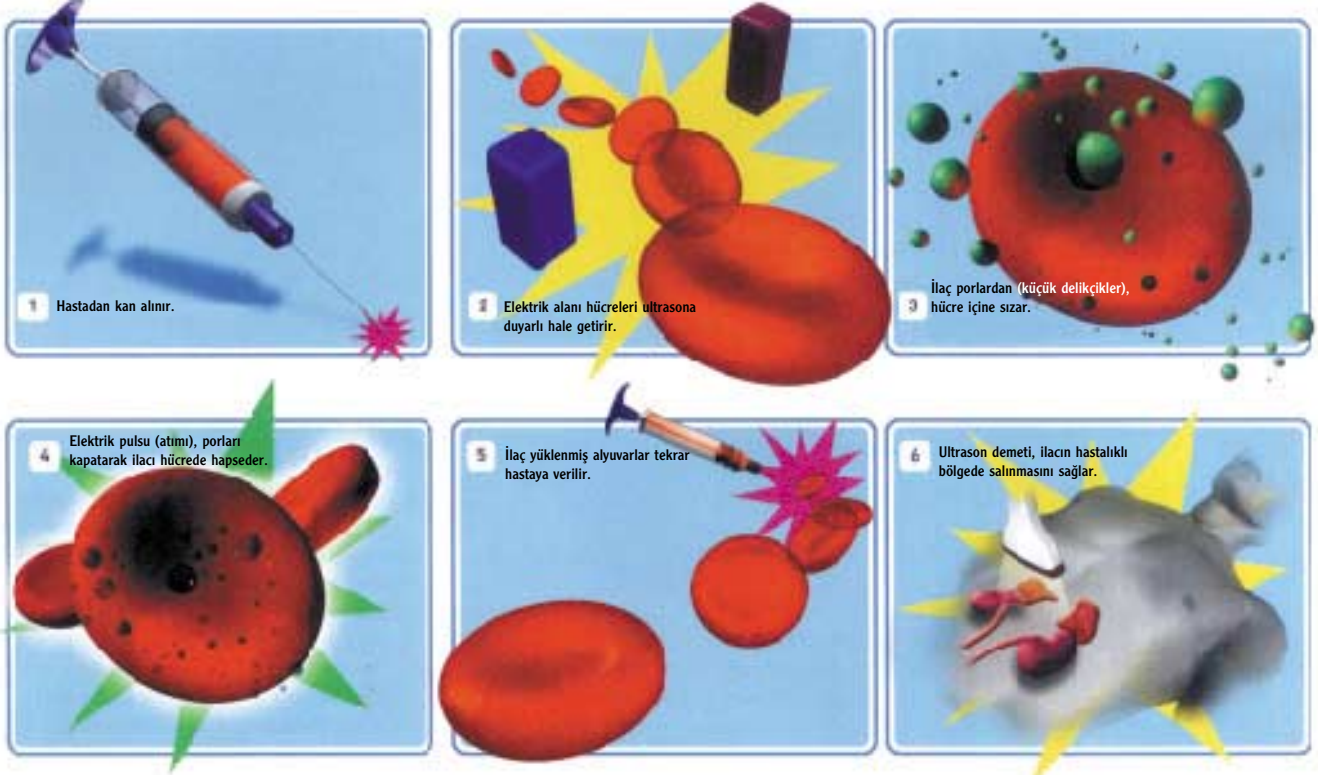


Şekil 2- Alyuvar zarı altındaki hücre iskeleti ağı-Mikrofilamanlardan olan spekirin, band 4.1 ve band 4.2 proteinleri, anyon taşıyıcı protein ve glikoferinin oluşturdukları bağlanma bölgeleri zarın yapısını güçlendirirler.

lik aktiviteleri sınırlıdır. Bu nedenle olgun alyuvarlar oksijen gerektirmeyen çok basit bir mekanizmayla enerjilerini sentezleyebiliyorlar ve az sayıda enzim içeriyorlar. Bu kadar sınırlı metabolik yeteneklerine rağmen, alyuvarlar dolaşımında 120 gün kalıp, dokulara oksijen taşıyorlar. Alyuvarların bu sınırlı metabolik özellikleri, bazı enzimlerin bu hücrelerde kapsüllemeyle geliştirilebiliyor. Yapılan bilimsel çalışma sonuçlarının da gösterdiği gibi insan ve fare alyuvarlarının glukoz kullanma kapasiteleri ile fenilalanin, ürik asit, asetaldehid, asparagin, metil alkol ve siyanür gibi zehirli maddeleri (toksin) yıkımlama kapasiteleri artırılabilir; bu yolla da hücreler, dolaşım kanında serbestçe dolaşan ve toksinlerin etkinliklerini ortadan kaldırma işlevini (detoksikasyon) gören gezici detoksikasyon biyoreaktörleri haline getirilebiliyorlar. Yukarıdaki bilgiler dikkate alındığında, alyuvarlara çeşitli enzimlerin yerleştirilebilmesi sonucu belirli bir hücrenin metabolik özelliğinin kazandırılabilirdiği ve söz konusu enzimin etkilediği maddelerin alyuvarın sitoplazmasına kolayca girdiği de dikkate alındığında, bu hücrelerin hücresel biyoreaktörler olarak geniş bir biyomedikal uygulama alanlarının olduğu görülüyor.

İlaç Taşıyan Alyuvarlar

Alyuvarların ilaçların vücut içinde taşınmasında kullanılmasının, pratikte kullanılmakta olan lipozomlar (hücre içinde yağ depolayan yapılar), nanopartiküller (metrenin milyarda bir ölçeğinde parçacıklar) ve polimerik miseller gibi diğer



İlaçların, Ulster Üniversitesi araştırmacısı Tony McHale tarafından keşfedilen “elektrikle hassaslaştırma” yöntemiyle hedefe yönlendirilmesi. Merkezi Kuzey İrlanda’da Coleraine kentinde bulunan Gendel firmasının geliştirilmekte olan yöntemle hastadan 20 ml kan bir aygıtla alınacak. Burada kan bir elektrik alanına tâbi tutularak ultrasona duyarlı hale getirilecek. İkinci aşamada, alyuvarlarda porlar açılmaya zorlanıp ilacın içeri sızması sağlanacak. Daha sonra yeniden kapanan porlar, hücreler ultrasona tâbi tutuluncaya kadar ilacı içeride hapsedecek. Hücreler hazır olunca, kan tekrar dolaşım sisemine konulacak ve burada 4 ay süreyle dolanacak. İstendiğinde hastanın derisine yaklaşık 1 megahertz frekansında ultrason uygulanarak, enerji kazanan alyuvarların patlayıp ilaç yükünü boşaltmaları sağlanacak. İlaç yüklenmemiş alyuvarlara ultrasondan etkilenmeyecek (New Scientist, 30 Haziran 2001).

sistemlere göre önemli avantajları, bu taşıyıcı sistemin kendine özgü eşsiz özellikleriyle ilişkili.

Alyuvarlar çok büyük bir ilaç miktarının kapsüllemesine olanak sağlıyorlar, biyolojik yollarla parçalanabiliyorlar ve dolaşım kanında aylarca kalabiliyorlar. Daha da önemlisi, alyuvarlar aktif ilaç taşıyıcı sistem olarak da kullanılabilirler; çünkü bu hücrelerin biyokimyasal özelliklerinin daha detaylı biçimde aydınlatılması, alyuvarlara aktif olmayan formda kapsüllenebilecek ve dokudaki ya da yine alyuvarlarda kapsüllenen bir enzimin etkisiyle aktif forma dönüşecek olan yeni moleküllerin tasarlanmasına olanak sağlayacaktır. İlke olarak hemen her ilaç alyuvarlarda kapsüllenebilir. Bununla birlikte, bazı moleküller alyuvar zarından

hızla geri sızabilirler, zarı hasara uğratarlar ya da kendi özellikleri değişir ki bunların kapsüllemesi pratik değildir.

Alyuvarlarda kapsüllendikleri halde kana sızan ilaçlar için en uygun yöntem, zardan sızmayan öncül etken maddelerin (pro-drug) geliştirilmesi ve kapsüllemesidir. Son yıllarda birkaç başarılı ön çalışma gerçekleştirilmiş olup; bunlarda temel mekanizma, zardan sızabilen ilaçlara, uygun bir fosfat ester grubunun eklenmesiyle sızıntının önüne geçilmesi. Örneğin, kanser tedavisinde kullanılan bir ilaç olan fludarabin alyuvarlara yerleştirildiğinde üç de fosfat bağı eklenir ve ilaç bu haliyle hücre zarından sızamaz. Ancak bu fosfat bağları yıkıldıkça ilaç azar azar alyuvar dışına sızabilir ve böylelikle ilaç dolaşım kanında uzun sü-

re varlığını koruyabilir. Bazı durumlarda ise öncül ilaç, alyuvar enzimlerince molekülün trifosfat türevine de dönüştürülebilir.

Hedefe Yönlendirme

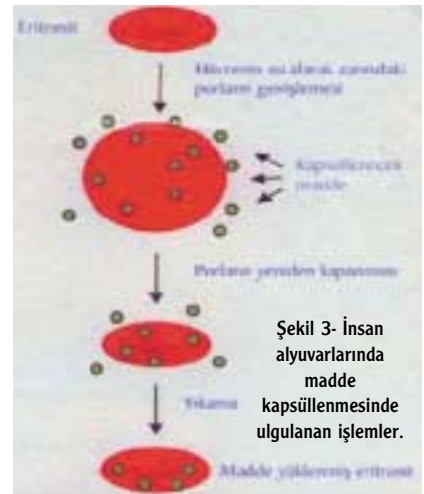
Günümüzde pek çok hastalığın ve özellikle de kanserlerin tedavisinde ortaya çıkan sorunlardan biri, sadece hedeflenen hücre üzerinde özgül etkisi olan ilaçların bulunmaması ve bu hücreleri etkileyecek olan etken madde yoğunluklarına ulaşamaması. Çünkü tedavide kullanılan kimyasal maddelerin etki mekanizması, hücrelerin belirli fonksiyonlarının durdurulmasına ya da bozulmasına dayanır. Bu durumda ise sağlıklı hücrelerin de ilaçtan etkilenmesi söz konusu

Antijen Dağıtımını İçin Alyuvarlar

Dolaşımdaki yaşlı alyuvarlar daha önce de değinildiği gibi; fizyolojik etkinliğin bir parçası olarak bu konuda profesyonel olan ve antijen sunan hücreler olarak da isimlendirilen makrofajlar tarafından kandan ayıklanır. Yakın zamanda makrofajların bu fonksiyonlarına dayanılarak vücutta 2 antijen dağıtım yöntemi geliştirilmeye çalışılmış bulunuyor. Bunlardan biri, daha önce sözü edilen ve ilaçların dağıtımında ve hedef hücrelere ulaştırılmasında yararlı olan yöntemin benzeri olan antijen kapsülleme yöntemi. Ötekiyse, antijeni alyuvar hücre zarının dış yüzüne bağlamak ve böylece vücutta bağışıklık tepkisi oluşturmak. İkincisi, kısaca antijeni avidin ve biyotin

molekülleriyle bağlayarak çok güçlü bir bağışıklık tepkisi oluşturmak.

Fare ve kedi alyuvarlarının antijenler için mükemmel taşıyıcı oldukları ve bu sayede hem hücresel ve hem de antikor yanıtının oluşturulabileceği gösterilmiş bulunuyor. Daha da önemlisi, alyuvarların antijen taşıyıcısı olarak kullanılmaları, adjuvant (destek maddesi) kullanımından kaçınılması gibi önemli bir avantaja sahip. Bu, rekombinant proteinlerin veya küçük peptidlerin antijen olarak kullanılmasında bile adjuvant kullanımını gerektirmiyor. Adjuvantların arzu edilememesinin nedeni, vücutta istenmeyen tepkilere yol açabilmeleri olasılığı.



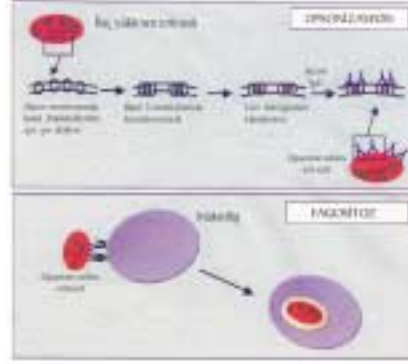
Şekil 3- İnsan alyuvarlarında madde kapsüllemesinde uygulanan işlemler.

olmakta ve bazen ilacın bu yan etkileri tedavi değerini ortadan kaldırmaktadır.

Son yıllarda araştırmacılar, yalnızca hastalıklı hücrelerdeki mekanizmalara etkiyen ilaçların geliştirilmesinden çok, hedef hücre ve dokularda daha yüksek ilaç yoğunluğu elde etme yöntemlerini geliştirmeye yöneldiler. Bu amaçla lipozomlar, nanopartiküllere emdirme ve polimerik miseller içine ilaçların kapsül lenmesi gibi yöntemler denendiği gibi, alyuvarların da bu amaçla kullanılması için biyomedikal mühendisliğinde hala yoğun çalışmalar sürdürülmekte.

İnsan alyuvarları dolaşımında 120 gün kadar kalabilirler. Bu süre sonunda yaşlı hücreler, makrofaj adı verilen hücreler tarafından ayıklanır. İlaç enkapsülasyonu yapılan alyuvarlar dolaşımında normal bir yaşam döngüsü gerçekleştirirler ve yine dolaşımdaki yaşlı hücreleri gençlerden ayıran mekanizma ile dolaşımdan uzaklaştırılırlar. Burada vurgulanması gereken nokta, makrofajların yaşlı alyuvarları yutmalarından yararlanılarak, alyuvarlarda enkapsüle edilen ilaçların, seçici biçimde makrofajlara ulaştırıldığıdır. Makrofajlar ise vücutta yabancı olarak tanıdıkları herşeye saldırdıklarından, ilaç bu şekilde yerine ulaştırılmış olur.

Mekanizma oldukça basit olmakla birlikte, çoğu durumda, alyuvarlarda kapsüllenen ilaç, hücre içinde uzun süreli kararlılığa sahip değildir ve bu yüz-



Şekil 4- Makrofajların hedef olarak seçilen ilaç yüklü alyuvarlara yönlendirilmesi.

den de alyuvarların yaşam döngüsü ve yaşlanmasının da düzenlenmesinin gerekliliği de, tasarlanan ilaç tedavisinde aranan ilaç hedefleme kinetiklerine ulaşılabilmesinde gözden uzak tutulmamalıdır.

Magnani adlı araştırmacı, makrofajlara ulaştırılmayı amaçladığı ilaçları alyuvarlarda kapsülledikten sonra alyuvar zarında ufak tefek değişiklikler yaparak, bu alyuvarların makrofajlarca (yutulması gereken) yaşlı hücreler olarak algılanmasını sağladı(Şekil 4).

İlaçların vücutta kontrollü biçimde dağıtılarak belirlenen hedeflere ulaştırılması yöntemi, hem canlı hayvanların organizmalarında (in vivo), hem de bunlardan alınan hücreler üzerinde deneysel ortamda (in vitro) başarılı oldu. Yöntemin diğer bir ilginç yönü de sadece alyu-

varların hedef hücrelere ulaştırabileceği yeni moleküllerin tasarımına olanak sağlaması. Örneğin, AIDS tedavisinde kullanılan bir ilaç olan iki AZT molekülü, bir trifosfat zinciriyle birbirlerine bağlanarak alyuvar içinde uzun süre yaşayabilecek (dolayısıyla da uzun süre salınabilecek) hale getirilebiliyor.

Sonuçlar

İnsan alyuvarları steril koşullar altında ilaçların, enzimlerin ve immün (bağışıklık) sistemi üzerinde etkin olan ilaçların kapsül lenmesinde ve bazı biyomedikal uygulamalarda kullanılabilenekte. İnsan vücuduna verildiklerinde işlem gören bu hücreler normal biyokimyasal ve immunolojik özellikler göstermekte ve normal yaşam süresine sahip olmakta. Ayrıca alyuvar zarı, yaşlı olanların makrofajlar tarafından tanınabilmelerinin sağlanması için değiştirilebilir ve bu sayede ilaç makrofajlara yönlendirilebilir. Bu tekniğin uygulama aşamaları, tıbbi uygulamalar öncesinde mutlaka yapılması gereken çalışmalar evresine kadar getirilmiş bulunuyor. Elde edilen sonuçlar bu teknolojinin çok sayıda patolojik koşulda biyomedikal uygulama alanı bulacağı umudunu veriyor. Özellikle dolaşımda ilaçların yavaş biçimde saliverilmesi, bazı hastalıkların tedavisinde yaşamsal önemi olan, oldukça sabit ilaç konsantrasyon düzeyinin birkaç gün süreyle sürdürülmesinin gerekli olduğu durumlarda veya ilacın özellikle makrofajlara ulaştırılmasının istendiği durumlarda alyuvarlarda kapsülleme uygun bir yöntem. Yarı otomatik tekniklerin geliştirilmesi alyuvarların bu şekilde işlenmeleri ve değişime uğratılmaları, hem hastaların ve hem de doktorların ortak ilgilerini çekmesi bakımından önemli ilerlemeler sağlayacaktır. Bu teknikler öylesine umutlandırıcı ki, günümüzde "alyuvar mühendisliği" deyimi sıkça kullanılır hale gelmiş bulunuyor.

Arş.Gör.Yasemin Özkan

Prof.Dr. İlhami Çelik

Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı

Alyuvarların Biyomedikal Kullanımı

Bu yöntemler (özellikle ilaç taşıyıcı ve biyoreaktör amaçlı kullanımları) çoğunlukla vücut dışında gerçekleştirilen, laboratuvar çalışmalarında oldukça başarılı sonuçlar vermekte. Bununla birlikte, uygun hayvan modellerinde ve insan deneklerle de klinik öncesi çalışmalar gerçekleştirilmiş bulunuyor.

Alyuvarların Antiretroviral İlaçların Hedef Hücrelere Ulaştırılmalarında Kullanılmaları: Fare, kedi ve insan alyuvarlarının, AIDS virüsünün de üyesi olduğu retro virüslere karşı kullanılan antiretroviral ilaçların makrofajlara ulaştırılmasında kullanılması amacıyla bazı çalışmalar yapılmış bulunuyor. Laboratuvar çalışmalarında hemen hemen tümüyle (LP-BM5, FIV ve HIV-1'e karşı) koruma sağlanabilmiş durumda. Bunun da ötesinde fare ve kedilerde yapılan araştırma sonuçları ümit verici. Özellikle de tedavi süreçleri lenfositleri de korumayı hedef alan bileşik tedavi yöntemlerinde başarı şansı artmakta.

Alyuvarların, Kortikosteroid Benzeri İlaçların Hedeflenen Hücrelere Ulaştırılmalarında Kullanılmaları: İnsan alyuvarları deksametazon 21-fosfatı deksametazona (sentetik bir steroid hormonu) dönüştürülebilir. Bu yüzden Mauro Magnoni ve arka-

daşları, bir kortikosteroidin fosforilat aralığını kapsülleyip gönüllü deneklere yada kronik obstrüktif akciğer hastalığı (nefes darlığı) ya da kistik fibrozisli hastalara vermişler. Her iki grupta da Faz I/II (3) çalışmalarının sonuçları yöntemin güvenli olduğunu göstermekte. İlaç yüklü hücreler yaklaşık 2 haftalık sürede deksametazon salıvermekte ve uygulama hastalar için oldukça yararlı olmaktadır.

Diğer Biyomedikal Uygulamalar:

İnsan alyuvarları, lizozomlardaki (hücrede enzimlerin fazla olan kısımlarının depolandığı kesecikler)enzim depolama bozukluklarından ileri gelen hastalıkların tedavisinde, söz konusu enzimlerin bu hücrelere yüklenmesi yoluyla ya da kanser tedavilerinde asparaginaz yüklemek suretiyle in vivo değerlendirmeler yapılabilmesi amacıyla kullanılmış bulunuyor. Hatta az sayıda çalışmada insan alyuvarları, inozitol heksafosfat gibi etkin maddelerin kapsül lenmesi yoluyla fazla miktarda oksijen salınımı için geliştirilmiş bulunuyorlar. Yukarıdaki durumlarda uygulanan yöntemin kan bankası koşullarına dahi uygun olduğu, hastalar için güvenli olduğu ve klinik anlamda yararlı olduğu belirlenmiş durumdur.

Kaynaklar

- Diker KS (1998). Komplement Sistemi, İmmunoloji, 125-131, Medisan Yayın Serisi, Ankara.
Kayaalp SO (1989). Yeni İlaçların Geliştirilmesi ve Değerlendirilmesi, Genel Farmakoloji, Toksikoloji ve Farmakokinetik, 451-472, Ankara.
Leeson TS, Leeson CR ve Paparo AA (1988). Erythrocytes, In "Text/Atlas of Histology", 196-199, West Washington Square Philadelphia.
Magnani M. (2000). Erythrocyte Engineering for Drug Delivery and Targeting, Biotech Journal International, Vol.5, 5, 12-13.