

**FONKSİYONEL GRUP TAŞIYAN MONODİSPERS
POLİ(GLİSİDİL METAKRİLAT) MİKROKÜRELERİ İLE
SIÇAN KANINDA *in vitro* FAGOSİTİK AKTİVİTENİN
ÖLÇÜLMESİ**

**MEASUREMENT OF *in vitro* PHAGOCYTIC ACTIVITY
BY USING FUNCTIONAL GROUP CARRYING
MONODISPERSE POLY(GLYCIDYL METHACRYLATE)
MICROSPHERES IN RAT BLOOD**

123354

**AYŞE GÜMRÜKÇÜOĞLU
A0015445**

Hacettepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Biyoloji Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

**TC YATSAK YAZAR KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

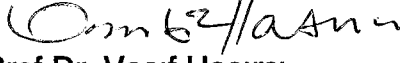
2002

123354


Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI'nda BİLİM UZMANLIĞI TEZİ** olarak kabul edilmiştir.


Başkan


:Prof.Dr. Vasif Hasırcı


Üye (Danışman)


:Yard. Doç. Dr. Mehmet Ali Onur


Üye


:Prof.Dr. Aşkın Tümer

Üye


:Prof.Dr. Süleyman Ali Tuncel

Üye


:Yard.Doç.Dr. Hakan Ayhan

ONAY

Bu tez/...../..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

...../...../.....


Prof.Dr.Seyfi Kulaksız

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

FONKSİYONEL GRUP TAŞIYAN MONODİSPERS POLİ(GLİSİDİL METAKRİLAT) MİKROKÜRELERİ İLE SIÇAN KANINDA *in vitro* FAGOSİTİK AKTİVİTENİN ÖLÇÜLMESİ

Ayşe Gümrükçüoğlu

Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZ

Bu çalışmada, sıçan kanındaki monosit ve nötrofil lökositlerin monodispers poli(glisidil metakrilat) [poli(GMA)] mikrokürelerine karşı fagositik aktiviteleri araştırılmıştır. Monosit ve nötrofil lökositlerin düz poli(GMA), yüklü poli(GMA) [poli(GMA)-OH ve poli(GMA)-NH₂] ve biyomodifiye poli(GMA) [poli(GMA)-albumin ve opsonize poli(GMA)] mikroküreleri ile olan etkileşimleri inkübasyon süresine karşı incelenmiştir. Bu inceleme fagositoz yapan hücrelerin ve hücre içine alınan tanecik sayısının mikroskop altında gözlenmesi ile yapılmıştır. İnceleme sonucunda üzerinde fonksiyonel grup bulunduran mikrokürelerin düz olanlara göre daha fazla tercih edildikleri tespit edilmiştir. En yüksek fagositik aktiviteye opsonize mikrokürelerde rastlanmıştır ($p < 0.05$). Pozitif ve negatif yüklü poli(GMA) mikrokürelerinin fagositik aktivite sonuçları arasında ise anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Anahtar Kelimeler: Fagositoz, poli(glisidil metakrilat), fagositik aktivite, monosit, nötrofil lökosit.

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Mehmet Ali ONUR, Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji Anabilim Dalı

MEASUREMENT OF *in vitro* PHAGOCYtic ACTIVITY BY USING FUNCTIONAL GROUP CARRYING MONODISPERSE POLY(GLYCIDYL METHACRYLATE) MICROSPHERES IN RAT BLOOD

Ayşe Gümrükçüoğlu

Hacettepe University, Department of Biology, General Biology Section

ABSTRACT

In this study, phagocytic activity of monocyte and neutrophil leukocytes in rat blood was investigated for monodisperse poly(glycidyl methacrylate) [poly(GMA)] microspheres. Interactions of monocyte and neutrophil leukocytes with plain poly(GMA), charged poly(GMA) [poly(GMA)-OH and poly(GMA)-NH₂] and biomodified poly(GMA) [poly(GMA)-albumin and opsonized poly(GMA)] was studied against the incubation time. This study was carried out by determination of phagocytosis rate of cells and internalised particle amount. Phagocytes showed higher phagocytic activity for functional group carrying poly(GMA) microspheres than the plain poly(GMA) particles, for opsonized poly(GMA) microspheres phagocytic activity was the highest ($p < 0.05$). No significant difference in phagocytic activity results was found between positively and negatively charged poly(GMA) microspheres.

Keywords: Phagocytosis, poly(glycidyl methacrylate), phagocytic activity, monocyte, neutrophil leukocyte.

Advisor: Assoc.Prof.Dr. Mehmet Ali ONUR, Hacettepe University, Department of Biology, General Biology Section

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında bilimsel ve manevi yardım ve desteklerini esirgemeyen hocam Yrd. Doç. Dr. Mehmet Ali Onur'a,

Tez konusunun belirlenmesinden başlayıp tezin tüm aşamalarında yardımları ve yönlendirmeleri ile sonuna kadar destek olan ve laboratuvarlarından yararlanmamı sağlayan Prof. Dr. Süleyman Ali Tuncel'e,

Çalışmalarımda kullanılan polimerik materyallerin sentezindeki tüm aşamalarda yanımda bulunan Arş. Gör. Gamze Yalçın ve sentez sırasında büyük yardım sağlayan Arş. Gör. Tolga Çamlı'ya,

Kan preparatlarının hazırlanmasında destek olan Arş. Gör. Zeynep Taş ve yüksek lisans öğrencisi Gaye Çetinkaya'ya,

Sıçanların kan parametrelerinin okunmasında yardım eden özel çalışma öğrencileri Burak Kunduz, Emel Sağlar, Aysun Sezgin ve Ayşegül Aktaş'a,

Çalışmaların istatistiklerinin yapılmasındaki yardımları için Prof. Dr. Mahir Ulusoy ve Dr. A. Murat Aytekin'e teşekkür etmeyi borç bilirim.

Bu çalışma *Hücre Kültürü ve Transgenik Hayvan Laboratuvarı Kurulması* isimli Hacettepe Üniversitesi Araştırma Fonu Gündümlü projesi, 09.02.2001, 2001/5 ile desteklenmiştir.

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 10.07.2002 tarihli 2002/12 no'lu toplantısının 2002/38 no'lu dosya ve 2002/38-2 no'lu kararı ile onaylanmıştır.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZ.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ	1
2. TEMEL BİLGİLER.....	4
2.1. Fagositoz.....	4
2.1.1. Lökositler.....	4
2.1.2. Lökosit göçü	7
2.2. Fagositozun Hücre Biyolojisi	8
2.2.1. Fagositik hedefin tanınması	8
2.2.1.1. Nonopsonik tanıma.....	8
2.2.1.2. Opsonin reseptörleri	9
2.2.2. Fagositozda fermuar hipotezi	10
2.3. Fagositoz Bozuklukları	11
2.4. Fagositoz Aktivitesinin Ölçülmesi	14
2.5. Poli(GMA).....	16
3. YÖNTEM VE GEREÇLER	18
3.1. Poli(glisidil metakrilat) Mikrokürelerinin Sentezlenmesi	18
3.1.1. Poli(GMA) mikrokürelerinin hidrosillenmesi	18
3.1.2. Poli(GMA) mikrokürelerinin aminlenmesi	19
3.1.3. Glutaraldehit aktivasyonu	19
3.1.4. Poli(GMA) mikrokürelerinin albuminlenmesi.....	19
3.1.5. Poli(GMA) mikrokürelerinin opsonizasyonu.....	19
3.1.6. Mikrokürelerin sayılması ve büyüklüklerinin ölçülmesi	20
3.2. in vitro Fagositoz Aktivitesinin Ölçülmesi.....	20
4. SONUÇLAR ve Tartışma	22
4.1. Fagositozun Gözlenmesi.....	22
4.2. Poli(GMA) mikrokürelerine ait görüntüleri vermektedir.	22
4.2. Poli(GMA) Mikrokürelerinde Fagositik Kapasite ve Fagositik İndeks	

Sonuçları	25
KAYNAKLAR.....	45
ÖZGEÇMİŞ	49



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Fagositozun dört aşaması.....	7
Şekil 2.2. Griffin ve Silverstein'in klasik deneyinin şematik gösterimi.....	11
Şekil 2.3. Fermuar tipli ve çok katmanlı psödopodların yaptığı fagositozun karşılaştırılması.....	12
Şekil 2.4. Poli (GMA)'nın formülü.....	16
Şekil 4.1. Poli(GMA) mikrokürelerinin tarama elektron mikrografı.....	22
Şekil 4.2. Poli(GMA) mikrokürelerinin x1000 büyütmedeki görünüşleri.....	23
Şekil 4.3. Nötrofil lökositin fagosite ettiği poli(GMA)-albumin (asetat) mikroküreleri.....	23
Şekil 4.4. Monosit ve nötrofil lökositlerin poli(GMA) mikrokürelerini fagositozu.....	24
Şekil 4.5. 60 dakika inkübasyon sonunda elde edilen fagositik kapasite sonuçları.....	26
Şekil 4.6. 60 dakika inkübasyondan sonra elde edilen fagositik indeks sonuçları.....	26
Şekil 4.7. Poli(GMA)-OH mikrokürelerinin kümeler halinde toplanması.....	27
Şekil 4.8. Monosit ve nötrofil lökositlerin düz poli(GMA) mikroküreleri ile etkileşimleri sonucu zamana karşı verdikleri fagositik kapasite sonuçları.....	29
Şekil 4.9. Monosit ve nötrofil lökositlerin poli(GMA)-OH mikroküreleri ile etkileşimleri sonucu zamana karşı verdikleri fagositik kapasite sonuçları.....	29
Şekil 4.10. Monosit ve nötrofil lökositlerin poli(GMA)-NH ₂ mikroküreleri ile etkileşimleri sonucu zamana karşı verdikleri fagositik kapasite sonuçları.....	30
Şekil 4.11. Monosit ve nötrofil lökositlerin fosfat tamponunda hazırlanmış poli(GMA)-albumin mikroküreleri ile etkileşimleri sonucu zamana karşı verdikleri fagositik kapasite sonuçları.....	30
Şekil 4.12. Monosit ve nötrofil lökositlerin asetat tamponunda hazırlanan poli(GMA)-albumin mikroküreleri ile etkileşimleri sonucu zamana karşı verdikleri fagositik kapasite sonuçları.....	31
Şekil 4.13. Monosit ve nötrofil lökositlerin opsonize poli(GMA) ile etkileşimleri sonucu zamana karşı verdikleri fagositik kapasite sonuçları.....	31
Şekil 4.14. Monosit ve nötrofil lökositlerin düz poli(GMA) mikroküreleri ile etkileşimleri sonucu zamana karşı verdikleri fagositik indeks sonuçları.....	33

- Şekil 4.15. Monosit ve nötrofil lökositlerin poli(GMA)-OH mikroküreleri ile etkileşimleri sonucu zamana karşı verdikleri fagositik indeks sonuçları.....33
- Şekil 4.16. Monosit ve nötrofil lökositlerin poli(GMA)-NH₂ mikroküreleri ile etkileşimleri sonucu zamana karşı verdikleri fagositik indeks sonuçları.....34
- Şekil 4.17. Monosit ve nötrofil lökositlerin fosfat tamponunda hazırlanan poli(GMA)-albumin mikroküreleri ile etkileşimleri sonucu zamana karşı verdikleri fagositik indeks sonuçları..... 34
- Şekil 4.18. Monosit ve nötrofil lökositlerin asetat tamponunda hazırlanan poli(GMA)-albumin mikroküreleri ile etkileşimleri sonucu zamana karşı verdikleri fagositik indeks sonuçları.....35
- Şekil 4.19. Monosit ve nötrofil lökositlerin opsonize poli(GMA) ile etkileşimleri sonucu zamana karşı verdikleri fagositik indeks sonuçları..... 35



ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Fagosit reseptörlerince direkt olarak tanınan hedefler.....	9
Çizelge 2.2. Yabancı maddeler ya da apoptotik hücreler için kullanılan bazı opsoninler.....	10
Çizelge 2.3. Fagosit hastalıkları.....	13
Çizelge 4.1. Altı ayrı mikroküre için ölçülen fagositik kapasite sonuçları.....	28
Çizelge 4.2. Altı ayrı mikroküre için ölçülen fagositik indeks sonuçları.....	32



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Poli(GMA)	Poli(glisidil metakrilat)
PBS	Fizyolojik fosfat tamponu (<i>phosphate buffered saline</i>)
PMN / (PMNL)	Polimorfonükleer lökosit
ECM	Ekstraselüler matriks (<i>extracellular matrix</i>)
LAD	Lökosit adezyon bozukluğu (<i>leukocyte adhesion deficiency syndrome</i>)
OD	Otozomal dominant
OR	Otozomal resesif
CGD	Kronik granülomatus hastalığı (<i>chronic granulomatous disease</i>)
IFN	İnterferon
Ig	İmmunoglobulin
LFA	Lökosit faktör antijeni
MBP	Mannoz bağlayan proteini (<i>mannose binding protein</i>)
MPO	Myeloperoksidaz
AIBN	Azobisizobütironitril
PAA	Poliakrilik asit

1. GİRİŞ

Her canlı kendini diğer canlıların verebilecekleri zararlardan korumak için bazı yöntemler geliştirmiştir. Bu yöntemler canlının organizasyonu arttıkça daha karmaşık sistemlere dönüşmekle birlikte temel olarak aynı amaca yöneliktir. En ilkel tek hücreliden en karmaşık çok hücrelilere kadar en temel savunma sistemini fagositoz oluşturmaktadır. Bu savunma sistemleri cansız partiküllerden çok canlılara yönelik olarak gelişmiştir.

Fagositoz, günümüzde mekanizması halen tam olarak aydınlatılmamış fagositik hücrelerin vücut savunması için geliştirdikleri özel bir yöntemdir. Türden türe farklılıklar gösterebildiği gibi bireyden bireye de bazı farklılıklar gösterebilen bu savunma yöntemi, vücudun sağlıklı yaşayabilmesi için önemlidir.

Fagositozun sağlıklı olması, serum opsoninlerinin fagositlere edilecek partiküllerin yüzeyine bağlanabilmesi ile yakından ilgilidir. Düşük serum opsonik aktivitesi çok ciddi enfeksiyonlara neden olabilmektedir (Lehmann et al., 2000). Bu bireylerde fagositik aktivitenin ölçülmesi *in vitro* koşullarda gerçekleştirilmektedir. Bu sayede fagositik aktivitede bir bozukluk olup olmadığı tespit edilebilmektedir. Örneğin, hücre yüzeyinde fagositozun gerçekleşmesini sağlayan reseptörlerin eksikliği fagositik aktivitenin düşük olmasına neden olur. Hangi reseptörün eksik olduğu ise biyokimyasal testlerle anlaşılabilir.

Fagositik aktivitenin ölçülmesi için kullanılan yöntemler daha çok bakteri ve fungusların *in vitro* koşullarda test edilecek kanla karıştırılması ile gerçekleştirilmektedir (Lehmann et al., 2000). Bu yöntemde çoğunlukla ticari şekilleri bulunan floresan işaretli mikroorganizmaların lökosit ya da makrofaj kültürü ile inkübe edilmesi ve "flow cytometry" yöntemleriyle hücre içine alınan partiküllerin yüzde olarak belirlenmesi sağlanmaktadır (Esteban et al., 1998). Ayrıca tıp alanında lateks/polistiren partiküller kullanılarak da fagositik aktivite

ölçülmektedir (Lehmann et al., 2000). Bu yöntemler yalnızca fagositik aktiviteyi ölçebilmekte fakat fagositik aktivitenin bozukluğunu ortaya koyamamaktadır.

Fagositik aktivitenin ölçülmesi bazı bağışıklık sistemi bozukluklarının tespit edilmesinde olduğu kadar fagositik mekanizmanın ve hücrelerin fagositik tercihlerinin belirlenmesinde de önem kazanmaktadır. Çünkü fagositoz günümüzde ilaç salınımı (Fontana et al., 2001), gen terapisi (Walter et al., 2001; Howard et al., 2000), aşı ve bağışıklık geliştirme gibi (Wang et al., 1999) biyoteknolojik yöntemler için de kullanılmaktadır.

Polimerik materyallerin biyomedikal alanda kullanılması uzun bir zamandan beri devam etmekte olup teknolojilerinin artmasına ve daha yoğun araştırma yapılıyor olmasına bağlı olarak giderek ivmelenmektedir. Bunun en önemli nedeni pek çok uygulamaya ucuz ve pratik alternatifler getiriyor olmalarıdır. Buna bağlı olarak, fagositik aktivitenin tespit edilmesinde polimerik materyallerin kullanımının araştırılması doğaldır. Üretimlerinin kolay olmasının yanı sıra kolay işlenebiliyor olmaları, fagositik aktivitenin ölçülmesi için uygun olmalarını getirmektedir. Çünkü partiküllerin yüzeyine takılacak çeşitli -opsonik ya da non-opsonik- fagositozu sağlayan proteinler ile hem fagositik aktivitenin ölçülmesi sağlanabilir hem de fagositik mekanizmada nasıl bir eksiklik olduğu tespit edilebilir. Ayrıca fagositoz yapan hücrelerin çeşitli fonksiyonel gruplara olan eğilimlerinin ve tercihlerinin belirlenmesinde kullanılabilir.

Poli(glisidil metacrilate) [poly(glycidyl methacrylate), poli(GMA)] kimyasal yapısı nedeniyle pek çok fonksiyonel grubun kolaylıkla takılabileceği bir polimerdir. Sentezlenme aşamasının özelliklerinden dolayı mikrokürelerin eşit büyüklükte olması fagositik aktivitenin ölçülmesi sırasında standardizasyon sağlamaktadır.

Bu çalışmada, farklı fonksiyonel gruplar içeren monodispers özelliğe sahip poli(glisidil metakrilat) [poli(GMA)] mikrokürelerinin sıçan kanındaki fagositik özelliğe sahip monosit ve nötrofillerin fagositik aktiviteleri üzerine etkileri

incelenecektir. Bu mikrokürelerin üzerine takılan farklı fonksiyonel grupların serumlu ortamda fagositozu nasıl etkiledikleri ve kanda bulunan monosit ve nötrofillerin mikrokürelerle etkileşimleri araştırılacaktır. Bu çalışma, zamana karşı fagositik aktivitelerin farklı hücre ve farklı mikroküre grupları arasındaki değişiminin araştırılmasını amaçlamaktadır. Bu sayede, fagositik aktivitenin ölçülmesine yönelik bir standartın oluşturulması hedeflenmektedir. Ayrıca, bu çalışmadan elde edilen sonuçların, fagositoz aktivitesinden yararlanarak yapılmakta olan biyoteknolojik araştırmalar için de ışık tutucu olması beklenmektedir.



2. TEMEL BİLGİLER

2.1. Fagositoz

Fagositoz vücuda giren yabancı partiküllerin, ölü hücre ve dokuların yok edilmesi için vücudun savunma sistemi olan bağışıklık sistemi tarafından geliştirilmiş bir mekanizmadır. Fagositoz, pek çok hücre ve molekülün ortak çalışması ile gerçekleştirilen karmaşık bir mekanizmadır. Bu mekanizmanın temel elemanları vücudun savunmadan sorumlu olan hücreleri olan lökositler (akyuvarlar)'dir.

2.1.1. Lökositler

Normal insan kanı mililitrede 4000-10,000 kadar lökosit içerir. Bu hücrelerden yaklaşık %40'ı nötrofil, %20-45'i lenfosit, %2-10'u monosit, %1-6'sı eosinofil ve %1'den azı da bazofildir (Berne ve Levy, 1993).

Sitoplazmalarında granül içerdikleri için nötrofiller, eosinofiller ve bazofiller granülosit olarak bilinir. Bu hücreler 12-15 µm çapındadırlar ve küçük, çok loblu çekirdekleri vardır (Berne ve Levy, 1993). Bu lökositlere aynı zamanda çekirdek yapılarının özelliklerinden dolayı polimorfonükleer lökosit (PMN) de denir.

Nötrofiller çok loblu çekirdek içerirler ve Giemsa boyası ile boyandıklarında bu çekirdekleri koyu mor boyanır. Periferal kandaki bazı nötrofiller lobsuz, çubuk şeklinde çekirdek de içerebilirler. Nötrofillerin granüllerinin küçük bir kısmını oluşturan primer granüller bakteri duvarlarını yıkan çeşitli enzimler içerirler. Nötrofil granüllerinin sayıca daha çok olan ve sekonder granül olarak adlandırılan diğer kısmı ise demir bağlayan laktoferrin proteini, katyonik bakteri proteini ve B₁₂ bağlayan proteinleri içerir (Berne ve Levy, 1993).

Nötrofillerin organizmanın savunmasında önemli rolleri vardır. Bunlar doku zedelenmesi olan her yere aniden ve makrofajlardan çok daha hızlı bir şekilde

ulaşarak savunmayı gerçekleştirirler (Bilgehan, 1999).

Kemik iliğinde oluşturulduktan sonra 12 saat içinde nötrofiller kan dolaşımına, oradan da damar dışı dokulara geçerler ve 4-5 gün burada faaliyet gösterirler. Burada mikroorganizmalarca salgılanan kemotaktik ajanların etkisiyle hasarlı dokulara diğer granülosit, makrofaj, pıhtılaşma sisteminin elemanları ve komplementer sistem elemanlarıyla birlikte ulaşırlar. Nötrofiller bakteri enfeksiyonlarına karşı, bakterilerin tutulup yok edildikleri temel savunmayı gerçekleştirirler.

Bakterileri parçalama mekanizmasının işleyişi bakterilerin nötrofil yüzeyine tutunmasıyla başlar. Bu işlem bir adezyon proteini olan fibronektin ile antikor ve komplement opsoninlerinin bakteri yüzeyine yapışması ile sağlanır. Nötrofillerden çıkan yalancı ayaklar ile yüzeye tutunmuş bakteri hücre içine alınarak fagositik vakuol (fagozomlar)'da hapsedilir (Noyan, 1998). Bakteri bu fagozomlar içinde nötrofil granüllerinden salınan enzimler ile parçalanır. Bu enzimlerden olan lizozimler bakteri membranını parçalar. Fagositik aktivite nedeniyle nötrofilin metabolik işlevlerinde ani bir yükselme gerçekleşir. Bu metabolik reaksiyonlar hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit anyonları (O_2^-) ve hidroksil radikalleri ($\cdot OH$) gibi bakteriyi parçalayacak serbest radikallerin oluşumuna neden olur (Berne ve Levy, 1993).

Eosinofiller çoğunlukla iki loblu çekirdek içeren ve Giemsa ile boyanmış preparatlarda sitoplazmalarında granülleri büyük pembe görünen lökositlerdir. Çapları genelde 10-12 μm kadardır (Noyan, 1998). Bir kez kan akımına katıldıklarında 30 dakika içinde damar dışı dokulara geçerek haftalarca orada iş görürler. Nötrofiller gibi eosinofiller de kemotaktik ajanların etkisiyle hareket ederler. Eosinofiller de nötrofillere benzer ama aynı olmayan yöntemlerle fagositoz yapar ve organizmaları parçalarlar (Berne ve Levy, 1993). Sayıları daha çok paraziter enfeksiyonlarda artar (Noyan, 1998). Ayrıca alerji ve hipersensitivite durumlarında da sayıları artar (Berne ve Levy, 1993).

Bazofiller çok loblu çekirdek içeren ve Giemsa ile mor boyanan granülleri

olan lökositlerdir. Diğer granüositler gibi bazofiller de fagositik özelliklere sahip hareketli hücrelerdir. Fagositöz özelliklerinin yanı sıra bol miktarda heparin taşıyan ve mast hücrelerine benzeyen parçalı çekirdekli lökositlerdir (Noyan, 1998). Bazofiller damar dışı dokulara göç ederek, antijen-antikor kompleksleri gibi kimyasal uyarılara göre hareket ederler. Bu kompleksler bazofillerin yüzeyindeki immunoglobulin reseptörlerine bağlanırlar. Uyarı alan hücreler etraflarındaki dokulara granüllerinden histamin salar. Bu, o bölgede lokal bir cevabın oluşumunu başlatır.

Lökositlerin dördüncü sınıfı olan monositler, diğer lökositlere göre daha büyüktür ve ortalama 15-20 µm çapa sahiptirler (Berne ve Levy, 1993). Giemsa ile boyanmış preparatlarda mor ve genelde böbrek şeklindeki çekirdekleri ile tanınırlar. Monositler kemik iliğinden kana verilir ve burada olgunlaşırlar. Olgunlaşan monositler bir-iki gün içinde, belki de yıllarca kalacakları dokulara göç ederek yerleşirler. Buralarda retikuloendotelial sistemin makrofajlarını oluştururlar.

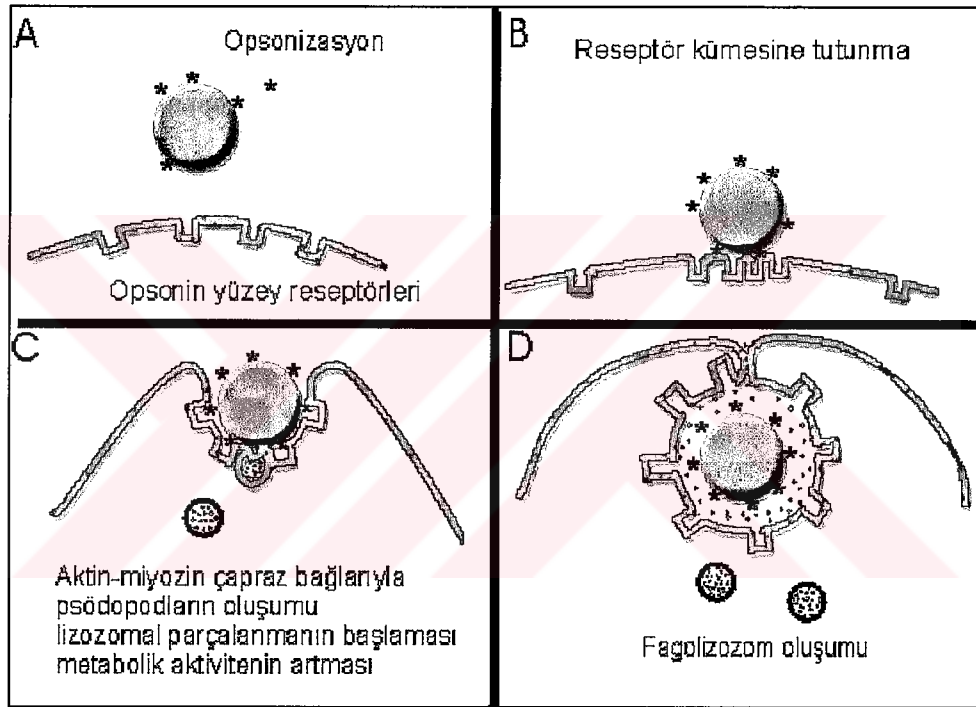
Makrofajlar ve monositler, hareketli ve fagositik olarak aktif hücrelerdir. Mikroorganizmalar, denatüre proteinler ve ölü hücreler gibi çeşitli partikülleri fagosit ederler. Mikroorganizmaların öldürülmesi ise nötrofillere benzer bir mekanizma ile gerçekleştirilir.

Monositler aynı zamanda bağışıklık cevabının oluşumunda da görev alırlar. Bu işi, T ve B lenfositler ile tepkimeye girerek yaparlar. Monositlerin doku tromboplastininin oluşturulmasını sağlamak, plasminojenin, proteolitik enzimlerin ve diğer biyolojik olarak aktif ajanların aktive edilmelerini sağlamak gibi pek çok başka görevleri de vardır.

Lenfositler büyük bir çekirdeğe sahip oldukça heterojen bir hücre grubudur. 6 ve 20 µm arasında değişiklik gösteren çapları vardır ve sitoplazma miktarı hücrenin büyüklüğüne göre değişir. Öldürücü T hücreleri dışında lenfositlerin sitoplazmalarında granül bulunmaz (Berne ve Levy, 1993).

2.1.2. Lökosit göçü

Tüm polimorfonükleer lökositler ve makrofajların çok büyük bir çoğunluğu kandan yangı ya da enfeksiyon bölgesine geçmek için endotel tabakasını aşarak kan damarının duvarından geçip, ekstraselüler matriks boyunca ilerlemek zorundadır. Enfeksiyon bölgesine doğru yapılan bu göç fagositin enfeksiyon bölgesinin tanınmasını, kan damarının endotel tabakasına ve diğer tabakalarına tutunup geçmesine ve uyarıya neden olan hücreye doğru hareket ederek onu yok etmesi ile gerçekleşir.



Şekil 2.1. Fagositozun dört aşaması. (A) tanıma aşaması. Bu aşama direkt olabileceği gibi opsonizasyon aracılığıyla da olabilir. (B) Fagositozun yapılabilmesi için fagosite edilecek partikül fagosite tutunmak zorundadır. Bunun için hücre membranındaki reseptörler membranın fagositoz yapacak olan kısmına toplanırlar. (C) partikülün içeri alınması hücre membranının değişmesi ile başlar. Bu aşamada partikülün parçalanması için hazırlık yapılır ve hücrenin metabolik aktivitesi artar. (D) Fagositozun son aşaması partikülün içeri alınarak fagozomun oluşturulmasıdır (Paul, 1999'dan değiştirilerek).

2.2. Fagositozun Hücre Biyolojisi

Fagositoz dört temel aşamada incelenebilir (Şekil 2.1.). İlk aşama hedefin fagositik hücre tarafından tanınmasıdır. Fagositozun gerçekleşebilmesi için fagosite edilecek partikülün fagosit tarafından tutulması gerekir. Tanıma işlemi direkt hücrenin hedef üzerindeki yabancı olarak algıladığı bir reseptörü tanınması ile olabileceği gibi opsonizasyon ile de olabilir. Opsonizasyon, organizmaya ait proteinlerin patojen organizmalarla, apoptotik hücrelerle ya da hücre enkazlarıyla etkileşmesi ile gerçekleşir. Fagositozdaki diğer bir aşama reseptör-ligand etkileşiminin oluşturduğu özel hücresel cevaplardır. Bu cevaplar membranda ve sitoplazmada değişikliklerin yapılması için gereklidir. Bu değişiklikler tutunma, degranülasyon, enzim sekresyonu ve hücre içi metabolik aktivitenin artması için gerekli olan değişikliklerdir. Üçüncü aşama ise hücre içine alınacak olan partikülün ekstraselüler bölgeden alınarak hücre içindeki vesiküler ağa verilmesidir. Son aşama olarak, içeri alınan partikül parçalanacağı fagositin lizozomal sistemine ulaşır (Paul, 1999).

2.2.1. Fagositik hedefin tanınması

Fagositlerin yabancı bir partikülü hücre içine alabilmeleri için önce o partiküle tutunabilmeleri gerekir. Genelde yüzeyleri pürüzlü ve pozitif yüklü partiküller hücre yüzeyine kolay tutunabildikleri için kolay fagosite edilirler (Noyan, 1998). Ancak tek başına bu kriterler fagositoz için yeterli değildir. Zira, farklı yüklere sahip partiküllerle yapılan çalışmalar pozitif ve negatif yüklü partiküllerin fagositozu arasında anlamlı bir fark olmadığını ortaya koymuştur (Ahsan et al., 2002). Fagositoz sırasında partikülün hücre yüzeyine tutunması çoğunlukla fagositoz yapacak olan hücrenin yabancı partikülü tanınması ile gerçekleşir.

2.2.1.1. Nonopsonik tanıma

Gerçek fagosit membranlarında yabancı partiküllerin tanınması için özelleşmiş

reseptörler bulunur. Bu reseptörlerden bazıları normal hücre ya da dokuları fagosite edilecek partiküllerden ayırdetmeye özelleşmiştir. Nonopsonik fagosit reseptörleri Çizelge 2.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Fagosit reseptörlerince direkt olarak tanınan hedefler (Paul, 1999).

Fagositik hedef üzerindeki ligand	Fagosit reseptörü	Reseptör ailesi
Lipopolisakkarit	CD14	GPI-bağlayan
Fosfatidilserin	CD11/CD18	integrin
Peptidoglikan	pek çok reseptör	ölü hücre tutan reseptörler
Karbonhidrat	mannoz reseptörü	C-tipi lektin

Pek çok bakteri hücre yüzeylerinde lektinler taşır. Nonopsonik fagosit reseptörleri de genelde bu molekülleri tanırlar. Mannoz, galaktoz, L-fukoz, N-Asetilglukozamin, N-Asetilgalaktozamin gibi birçok şeker birçok bakterinin yüzeyinde bulunur (Sharon, 1987).

Ancak bu moleküllere ait reseptörler genelde patojen mikroorganizmaları tanımakta başarısızdırlar, çünkü pek çok zararlı virus ya da bakteri bu reseptörleri atlatmanın yollarını geliştirmişlerdir. Ancak, sonuç olarak nonopsonik tanıma zararlı partikülleri yakalamanın ilk aşamasıdır ve mikroorganizmalar basit tanıma yöntemlerini atlatacak şekilde gelişirken konak organizma da daha karmaşık mekanizmaları geliştirecek şekilde geliştirmiştir (Paul, 1999).

2.2.1.2. Opsonin reseptörleri

Yüzey moleküllerini tanıyamadığı partiküller için vücudun geliştirdiği yöntem opsonizasyondur. Opsonizasyon bir seri çözünebilir proteinin yabancı partiküllerin ya da hasarlı dokuların etrafını sarmasıyla gerçekleşen bir mekanizmadır. Fagositik hücrelerde bu proteinleri tanıyan reseptörler bulunur

(Çizelge 2.2.) Plasmanın temel opsoninleri çeşitli immunoglobulinler ve komplementleridir (Paul, 1999).

Çizelge 2.2. Yabancı maddeler ya da apoptotik hücreler için kullanılan bazı opsoninler (Paul, 1999).

Opsonin	Fagosit reseptörü
Antikor	IgG Fc
Komplement	
C3 fragmanları	CR1, CR3, CR4
C1q	C1qR
Lektinler	
Mannoz bağlayan protein	?C1qR
C-reaktif protein	?
Fibrinojen	Bazı integrinler
Fibronektin	Bazı integrinler
Trombospondin	α V β 3, CD36, CD47

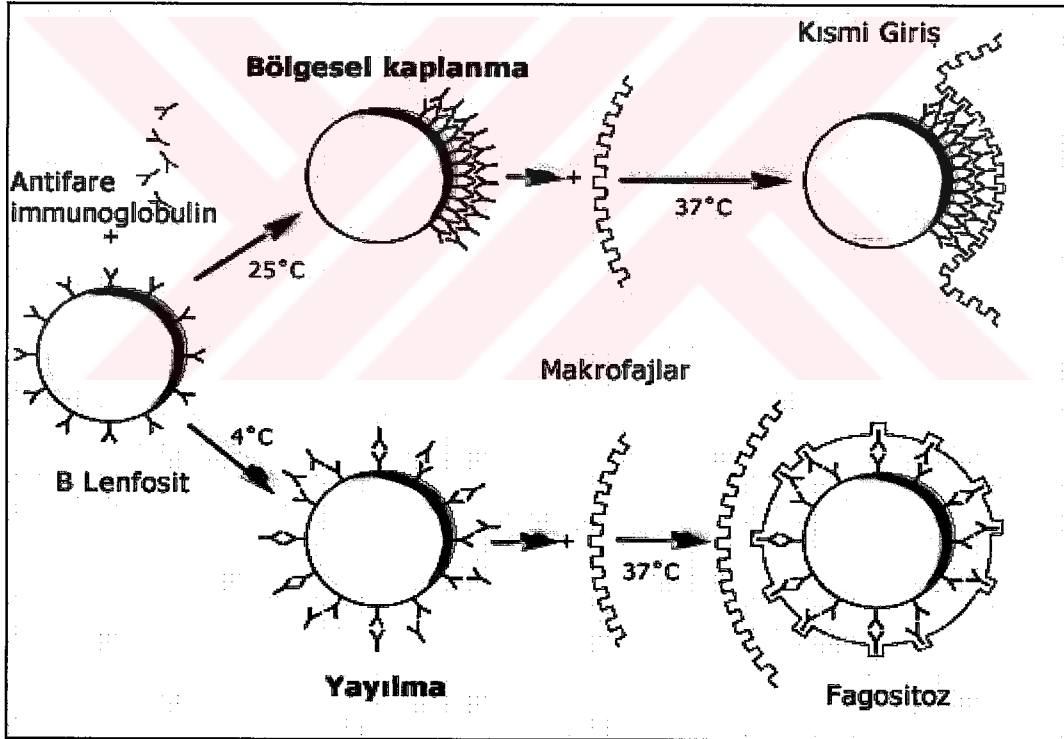
2.2.2. Fagositozda fermuar hipotezi

Yaklaşık 20 yıl önce Silverstein et al. fagositoz ile ilgili bir model önerdi. Bu model, fagositozda hedef partikül ve fagositik hücre üzerindeki reseptör ligandlarının, tekrarlayan etkileşimler gerektirdiğini ve yeni etkileşimlerin oluşumunun durdurulduğu noktada partikülün içeri alındığını savunan bir modeldi (Şekil 2.2.). Bu model fermuar hipotezi olarak isimlendirildi. Bu modele göre, fagositik hücre hedef partikülün üstünde fermuar gibi ilerlemektedir. Plazma membranı ve fagositik hücre arasındaki etkileşim fermuarın başında yakın ama fagositik kabın tabanında uzaktır. Aktin mikrofamanları fermuarın önünde polimerize olup düzenli zincirler oluştururken, fagositik kabın tabanındaki aktinler daha az organizedir (Paul, 1999).

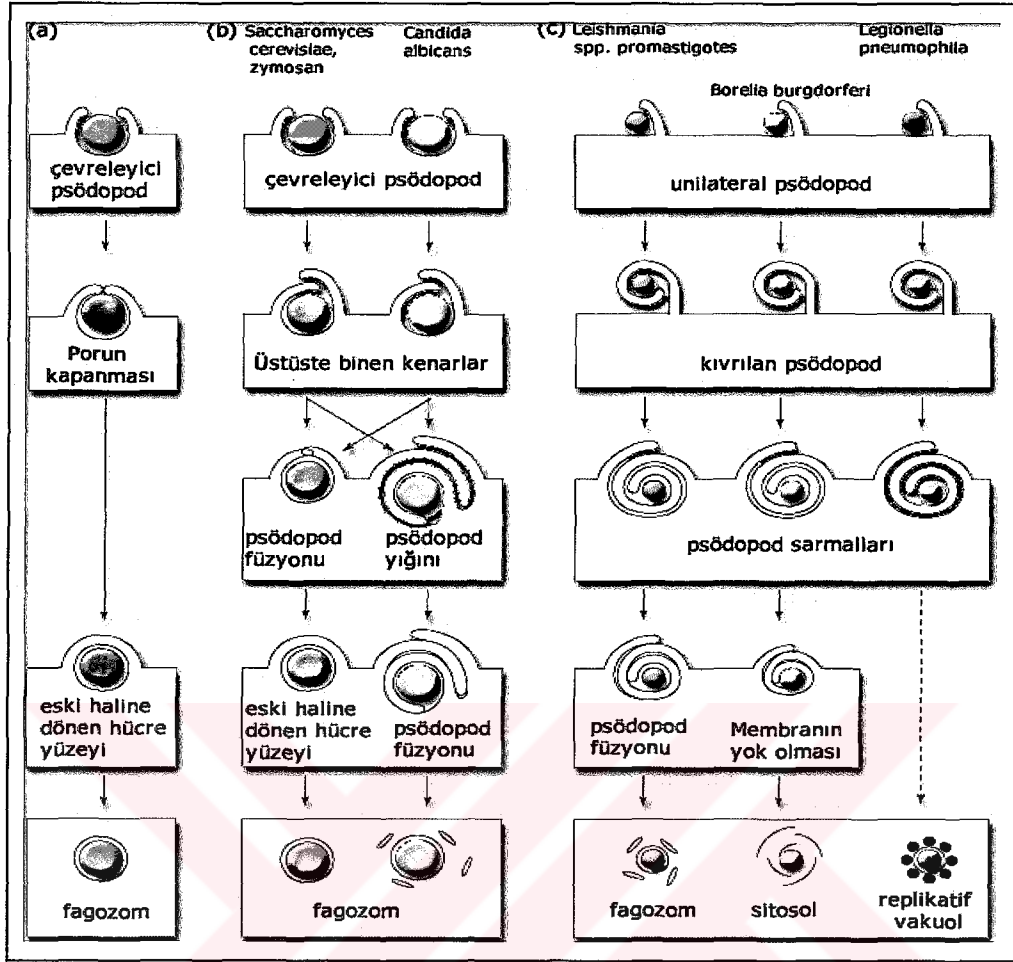
Fagositoz sırasında partikülün içeri alınmasını fermuar hipotezi açıklayabildiği halde fermuar hipotezinin açıklayamadığı bazı özel mekanizmalar vardır. Ancak deneysel sonuçlar ve elektron mikroskop görüntüleri ile partiküllerin farklı mekanizmalar ile de içeri alınabileceği gösterilmiştir (Rittig et al, 1999, Rittig et al, 1998) (Şekil 2.3.).

2.3. Fagositoz Bozuklukları

Fagosit hastalıklarına ne sıklıkla rastlandığı resmi olarak bilinmiyor olmasına rağmen, her 1/100.000'den daha fazla bir sıklıkla görüldüğü tahmin edilmektedir. Fagosit bozukluklarının teşhis edilmesi, özel tedavilerin uygulanabilmesi (ör: profilaktik antibiyotikler ve interferon γ) ve uygun tavsiyelerin verilebilmesi, diğer uzmanların (ör: diş hekimi) uyarılması ve kemik iliği implantasyonları (ör: lökosit adezyon bozukluğu için) için erken karar verilebilmesi bakımından önemlidir. Belki daha da önemlisi, çeşitli hastalıkların işaret ettiği özel fagosit bozukluklarının tanımlanması ve uygun ampirik tedaviye karar verilebilmesidir (Austen et al., 2001). Fagositoz ile ilgili bazı bozukluklar Çizelge 2.3.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Griffin ve Silverstein'in klasik deneyinin şematik gösterimi. Fermuar hipotezine göre fagosit ile hedef arasında peş peşe etkileşimler olur. Hedefin tüm yüzeyi opsonize olduğunda fagositoz tam olarak gerçekleşebilir. Ancak hedef bölgesel olarak opsonize olursa hücre içine alınamaz (Paul, 1999'dan değiştirilerek).



Şekil 2.3. Fermuar tipli ve çok katmanlı psödopodların yaptığı fagositozun karşılaştırılması; (a) klasik fermuar hipotezi; (b) mantar ya da zimosan partiküllerin hücre içine alınışı sırasında %2'lik bir kısımda membran kapanmaz ve psödopod kenarları üst üste biner. Burada psödopodlar birleşebilir ya da fagozom duvarına ulaşmadan önce bir yığın oluşturabilirler; (c) fagosite edilen *Leishmania* %80'i, *Borella burgdorferi*'lerin %60'ı ve *Legionella pneumophila*'ların %100'ünde gerçekleşen fagositozda ise unilateral psödopod oluşumu ve membranın kıvrılması ile partikülün içeri alınması görülür. *Leshmania*'larda oluşan psödopod sarmal oluşturarak fagozoma doğru ilerler. *B. burgdorferi*'lerde içeri alınan membranın yok olması bakterinin sitosolde kalmasına neden olur. *L. pneumophila* fagositozu her nasılsa replikatif bir vakuolde son bulur, ancak bunun mekanizması daha hala anlaşılmalıdır (Rittig et al., 1998'den değiştirilerek).

Çizelge 2.3. Fagosit hastalıkları. OD, otozomal dominant; OR, Otozomal resesif; CGD, kronik granülomatosus hastalığı (chronic granulomatous disease); IFN, interferon; Ig-E, immunoglobulin E; IL, interlökin; LAD, lökosit adezyon bozukluğu (leukocyte adhesion disorder); LFA, lökosit faktör antijeni; MBP, mannoz bağlama proteini (mannose binding protein); MPO, myeloperoksidaz (Austen, 2001).

Hastalık	Gen ürünü	Kalıtım	Fonksiyonel defekt
Siklik nötropenia	Nötrofil elastaz (ELA2)	OD	Tekrarlayan, şiddetli nötropenia
Chediak-Higashi sendromu	Lizozomal transport regülatörü (LYST)	OR	Dev granüller, öldürücü lökositlerin bozukluğu, kemotaksis bozukluğu
LAD-1	CD-18 CD-11a (LFA-1) CD-11b (Mo-1, Mac-1) CD-11c (p150,95)	OR	Mac-1, LFA-1, p150,95 eksikliği
LAD-2	Sialyl-Lewis X (CD15s)	OR	CD15s eksikliği, anormal fukoz metabolizması, Bombay fenotipi
LAD-3	E-selektin (CD15s)	OR	E-selektin eksikliği ve efektif olmayan epitel bağlantısı
LAD-4	Rac2	OD	İnhibe edici rac2, anormal bağlanma, hücre içi oksidatif reaksiyon patlaması
Nötrofil -spesifik granül eksikliği	C/EBPε	OR	Miyeloidtranskripsiyon faktörü defekti, bazı granüllerin eksikliği, defensins
MPO eksikliği	MPO	OR	MPO eksikliği
CDG X-linked	gp91 ^{phox}	OR	Süperoksit eksikliği, granüloma oluşumu
AR/233690	p22 ^{phox}	OR	Süperoksit eksikliği, granüloma oluşumu
AR/233700	p47 ^{phox}	OR	Süperoksit eksikliği
AR/233710	p67 ^{phox}	OR	Süperoksit eksikliği
Hiper-IgE enfeksiyonu (Job's sendrom)	bilinmiyor	OD	Yüksek IgE, yüzde ve kemikte anormallikler, primer dişlerin tutulması
IFN-γ reseptör 1 eksikliği	FN-γR1	OR	Tekrarlayan non tüberküloz ağır myobacteria enfeksiyonu
IFN-γ reseptör 1 eksikliği	IFN-γR1	OD	Tekrarlayan non tüberküloz ağır myobacteria enfeksiyonu ve myobacterial osteomyelitis
IFN-γ reseptör 2 eksikliği	IFN-γR2	OR	Tekrarlayan non tüberküloz ağır myobacteria enfeksiyonu
IL-12 eksikliği	p40 IL-12 p40	OR	Tekrarlayan non tüberküloz ağır myobacteria, salmonella enfeksiyonu
IL-12 eksikliği	Rβ1 IL-12 Rβ1	OR	Tekrarlayan non tüberküloz ağır myobacteria, salmonella enfeksiyonu
CD16 eksikliği	CD16 (FcγRIII)	OR	CD16 eksikliği, anormal ADCC, NK aktivitesi, izoimmün nötropenia
MBP eksikliği	MBP	OR	Tekrarlayan bakteriyel enfeksiyonlar, otoimmünitenin artışı

2.4. Fagositoz Aktivitesinin Ölçülmesi

Fagositik aktivitenin günümüzde kullanılan ölçüm teknikleri fagositoz ile ilgili bazı bozuklukların tespiti için geliştirilmiştir. Fagositoz kullanılarak yapılan ilaç salımı (Fontana et al., 2001), gen terapisi (Walter, 2001; et al., Howard et al., 2000), aşı ve bağışıklık geliştirme gibi (Wang et al., 1999) biyoteknolojik yöntemlerin verimliliğini arttırmak için yapılan araştırmalarda da bu teknikler kullanılmaktadır.

Fagositoz ile ilgili bozuklukların tespiti, bu bozuklukların varlığının aslında görüldüğünden daha fazla olmasının anlaşılması üzerine daha büyük önem kazanmaktadır. Her ne kadar, bu tip bozuklukların temel bir takım tespit yöntemleri var ise de, bu yöntemlerin her yerde uygulanamıyor olması fagositik bozuklukların tespitini ve tam sayısının bilinmesini engellemektedir.

Genelde bu tip hastalıklar ile ilgili oluşan şüpheler enfeksiyonlara karşı aşırı hassasiyet ve dayanıksızlıktan kaynaklanmaktadır. Bu durumda ilk olarak nötrofil sayısındaki bir bozukluktan şüphelenmek doğal olanıdır (Eeden et al., 1999). Daha sonra daha kompleks tanı yöntemlerine başvurulmalıdır. Bu tanı yöntemleri genelde *in vitro* koşullarda fagositik aktivitenin ölçülmesine dayanır.

Fagositoz aktivitesinin ölçülmesinde ilk işlem fagositozun tespitidir. Günümüze kadar fagositoz aktivitesinin ölçülmesinde bakteri, mantar, zimosan ya da polimerik partiküller kullanılmıştır (Lehmann et al., 2000). Bu partiküllerin fagositozunun tespitinde ise çok çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Mikroskopik inceleme ya da flow cytometry yöntemi sıklıkla kullanılan yöntemlerin başında gelmektedir. Bunların yanı sıra, deneylerde canlı partiküller kullanılmışsa çeşitli mikrobiyolojik çalışmalarla da fagositoz saptanabilir. Bu yöntemlerin hepsinin de kendine göre çeşitli avantajları ve dezavantajları vardır.

Mikroskopik yöntemin en büyük avantajı araştıracının fagositozu direkt olarak görmesidir. Ancak bakteri gibi küçük partiküllerin fagositozunun görülmesi bu yöntemle zordur. Elektron mikroskopisi bu sorunu ortadan kaldırırsa da rutin testler için uygun olmaması bir dezavantajdır.

Flow cytometry yönteminin en büyük avantajı çalışmaya hız ve kolaylık katıyor olmasıdır. Ancak canlı partiküllerle çalışıldığı takdirde replikasyon nedeniyle floresan işaretin giderek azalması söz konusudur. Ayrıca hücre içine alınan partiküllerin floresan işareti oksidasyon nedeniyle bozulabilmektedir (Hampton ve Winterbourn, 1999).

Fagositozun tespit edilmesinden sonraki aşama fagositik aktivitenin hesaplanması aşamasıdır. Fagositik aktivitenin hesaplanmasında iki ayrı kavram devreye girer (Silva ve Peck, 1999). Fagositik kapasite ve fagositik indeks adını alan bu hesaplama yöntemlerinde, fagositik kapasite; fagositoz yapmış hücrelerin tüm hücrelere oranını içermektedir. Burada içeri alınan partikül sayısı önemli değildir. İçeri alınan partikül sayısı fagositik indekste önem kazanır. Fagositik indeks; fagositoz yapan hücrelerin içindeki ortalama partikül sayısını vermektedir (Eş. 2.1. ve 2.2.). Fagositoz miktarının düşük olduğu çalışmalarda fagositik kapasite katsayısının kullanılması daha doğru olur. Fagositik indeks genelde fagositoz miktarının çok yüksek olduğu çalışmalarda daha büyük önem ve anlam kazanır (Leiro et al., 1995).

$$\text{Fagositik kapasite} = \frac{\text{Fagositoz yapan hücre sayısı}}{\text{Sayılan toplam hücre}} \quad (2.1.)$$

$$\text{Fagositik indeks} = \frac{\text{Fagosite edilen partikül sayısı}}{\text{Fagositoz yapmış hücre sayısı}} \quad (2.2.)$$

Farklı özellikte poli(GMA) mikroküreleri kullanılarak kromatografi uygulamaları başta olmak üzere çeşitli biyomedikal çalışmalar yapılmıştır (Zhang et al., 2002). Çok reaktif olması poli(GMA) mikrokürelerin seçilmesinin en temel nedenidir. Burada, poli(GMA) partikülleri hem reaktif olmalarından hem de monodispers özelliğe sahip olmalarından dolayı fagositik aktivitenin ölçülmesi için tercih edilmiştir.



3. YÖNTEM VE GEREÇLER

3.1. Poli(glisidil metakrilat) Mikrokürelerinin Sentezlenmesi

Poli(glisidil metakrilat) mikrokürelerinin sentezlenmesinde Horak ve Shapoval'ın (2000) dispersiyon polimerizasyonu tekniği modifiye edilerek kullanılmıştır. Polimerizasyonda başlatıcı olarak AIBN (azobisizobütironitril) (BDH Chemicals Ltd., U.K.), stabilizatör olarak PAA (poliakrilik asit) (M_r:12,000) ve dağıtma ortamı olarak da etanol (Birpa Ltd, Türkiye) kullanılmıştır.

Polimerizasyon işlemi için kullanılan reaktörde su etanol ile uzaklaştırılmış ve tamamen kuru ve polar bir ortamda reaksiyonun gerçekleşmesi sağlanmıştır. 100 ml'lik reaktörde önce 30 ml etanol içinde 0.45 g PAA, 45 dakika süreyle çözülmüş, PAA tamamen çözüldükten sonra 3 ml glisidil metakrilat monomeri (Aldrich Chem. Corp., WI, U.S.A.) eklenmiştir. Başlatıcı olarak 0.06 g AIBN reaktöre eklendikten sonra ortamda oksijen kalmaması için 2 dakika süre ile N₂ gazı geçirilmiştir. Reaksiyon çalkalayıcılı su banyosunda (Memmert, Almanya) 8 karıştırma hızında, 70 °C'ta 24 saat sürdürülmüştür.

Karıştırma sonunda ortamda oluşan mikroküreler etanolde saklanmış, fonksiyonel grup takılacak olanlar ise santrifüjde (Nüve A.Ş., Türkiye) 5000 dev/dak'da çöktürülüp süpernatantı uzaklaştırılarak distile su ile yıkanmıştır. Bu yıkama işlemi etanolün tamamen uzaklaşması için beş defa tekrar edilmiştir.

3.1.1. Poli(GMA) mikrokürelerinin hidroksillenmesi

Mikrokürelerin hidroksillenmesi işlemi için 0,5 g poli(GMA) 20 mL %10'luk NaOH ile etkileştirilerek 80 °C'ta karıştırma hızı 8'de 24 saat reaksiyona sokulmuş, reaksiyon sonrasında santrifüjde 5000 dev/dak'da mikroküreler çöktürülerek distile su ile yıkanmıştır. Bu işlem pH:7 olana kadar sürdürülmüştür. Yıkanan mikroküreler 4 °C'ta PBS'te saklanmıştır.

3.1.2. Poli(GMA) mikrokürelerinin aminlenmesi

Aminleme işlemi için 1 g poli(GMA) 10 mL %25'lik NH₃ çözeltisi ile çalkalayıcıda 10 saat 50 °C'de reaksiyona sokulmuştur. Reaksiyon tamamlandıktan sonra santrifüjde mikroküreler çöktürülmüş ve distile su ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi süpernatant pH'ı 7 oluncaya kadar tekrarlanmıştır. Yıkanan mikroküreler 4 °C'ta PBS'te saklanmıştır.

3.1.3. Glutaraldehit aktivasyonu

Poli(GMA) mikrokürelerine protein tutturmak için önce partiküllerin glutaraldehitlenmesi gerekmektedir. Bu işlem için 0,1 g aminli mikroküre 10 mL pH: 8.5 borat tamponunda çözeltide %2 glutaraldehit olacak şekilde etkileştirilmiştir. Reaksiyon oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda 250 dev/dak'da 30 dakika sürdürülmüştür. Reaksiyon sonunda elde edilen mikroküreler 10 mL distile su ile beş defa yıkanmıştır.

3.1.4. Poli(GMA) mikrokürelerinin albuminlenmesi

Glutaraldehit aktivasyonu yapılmış olan mikrokürelere albuminin takılması için 0.1 g partikül 10 mL tampon çözeltisinde 50 mg albumin varlığında reaksiyona sokulmuştur. Reaksiyon iki farklı tampon çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Bunlar pH:7.4 fosfat tamponu ve pH:5 asetat tamponudur. Reaksiyonlar 24 saat 4 °C'ta 250 dev/dak karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir. Her iki mikroküre grubu da santrifüjde çöktürülmüş ve beş defa yıkanmıştır. Yıkanan mikroküreler 4 °C'ta PBS'te saklanmıştır.

3.1.5. Poli(GMA) mikrokürelerinin opsonizasyonu

Mikrokürelerin opsonizasyonu Prior ve arkadaşlarının (2002) yöntemi modifiye edilerek gerçekleştirildi. Çalışmalarda bu yöntemden farklı olarak fare serumu yerine sıçan serumu kullanıldı.

Opsonizasyon, glutaraldehit aktivasyonu yapılmış 0.1 g poli(GMA) mikrokürenin, 10 mL, %2'lik serum ile 4°C'ta 24 saat 250 dev/dak'da karıştırılması ile sağlanmıştır. Reaksiyon sonunda santrifüjde opsonize mikroküreler 5000 dev/dak'da santrifüj ile çöktürülmüş ve fosfat tamponu ile beş defa yıkanmıştır. Daha sonra partiküller 4°C'ta PBS çözeltisinde saklanmıştır.

3.1.6. Mikrokürelerin sayılması ve büyüklüklerinin ölçülmesi

Hazırlanan altı farklı özelliğe sahip poli(GMA) mikroküreler kan ile etkileştirilmeden önce PBS içinde mm³ başına düşen partikül sayısını tespit edilmesi için ışık mikroskobu altında Thoma lamı ile sayılmıştır. Elde edilen partiküllerin büyüklükleri Prior marka mikroskopta 1000x büyütme altında Jena marka oküler mikrometresi ile ölçülmüştür.

3.2. *in vitro* Fagositoz Aktivitesinin Ölçülmesi

Mikrokürelerin fagositik aktivitelerinin ölçülmesi için 200-250 g ağırlığında altı adet dişi Wistar albino sıçan (*Rattus norvegicus*) kullanıldı. Her bir sıçanın sağlıklı olup olmadığının tespiti için makroskopik gözlemin yanı sıra lökosit sayıları da ölçüldü. Lökosit sayıları 5000-7000/mm³ olan sıçanlar deney için kullanıldı. Bu sayım sağlık kontrolünün yanı sıra lökosit başına düşen mikroküre sayısının standardizasyonu için de gereklidir.

Deneylerde kullanılacak kan 90/10 oranında Ketalar® (50 mg/mL ketamin, Parke Davis) ve Rompun (%2 ksilazin, Bayer) anestezisi altındaki sıçanların sol ventrikülünden heparinlenmiş enjektör ile toplandı. Her hayvanın kanı ile altı farklı mikroküre grubu etkileştirilerek her birinde farklı mikroküre olan altı deney grubu elde edildi. Mikroküreler 1 mm³ kanda 200.000 adet partikül olacak şekilde kanla karıştırılarak 37°C'ta su banyosunda inkübe edildi. 5., 10., 20., 30. ve 60. dakikalarda deney gruplarından örnek alınarak yayma kan preparatı (froti) hazırlandı. Hazırlanan yayma kan preparatları havada kurutulduktan sonra 4 dakika metil alkol ile fikse edildi ve Giemsa çözeltisi ile

30 dakika boyanarak distile su ile yıkandı (Terziođlu et al., 1982, Benson et al., 1988).

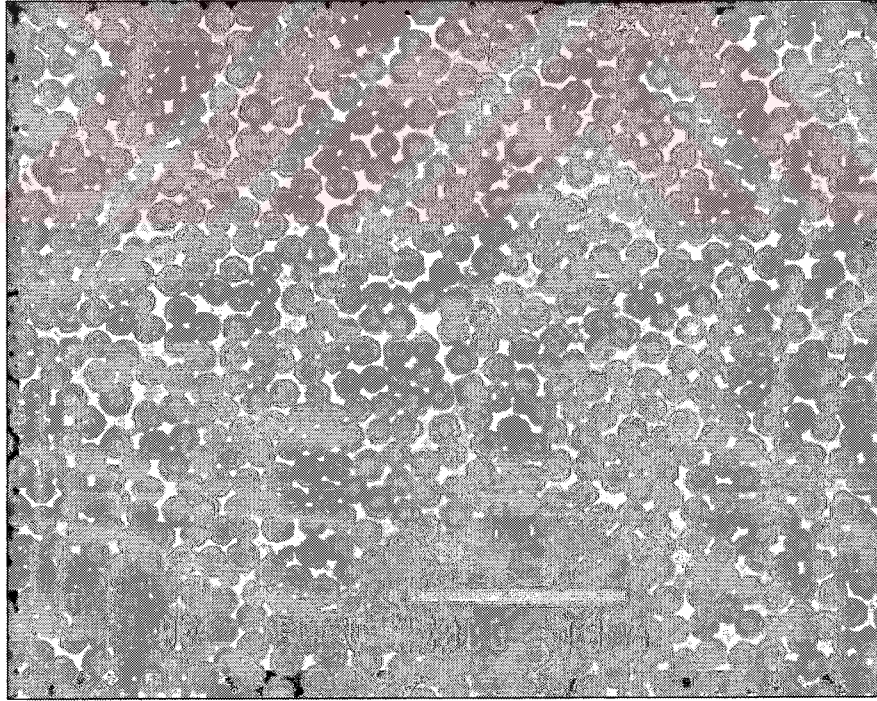
Boyama sonrası preparatlar Prior marka optik mikroskopta 1000x büyütmede incelenerek fagositoz yapan hücre ve içlerine aldıkları mikroküreler sayıldı. Sayım sırasında sadece nötrofil lökositler ve monositlerin yaptıkları fagositoz dikkate alındı. Sayım sırasında monosit ve nötrofiller çekirdek yapılarında göre ayırıldı. Tek parça ve genelde böbrek şeklini andıran, Giemsa ile mor boyanmış çekirdeğe sahip olan lökositler monosit, genelde çok parçalı ve polimorfonükleer karaktere sahip olan ve yine Giemsa ile mor boyanmış çekirdeğe sahip olan lökositler de nötrofil olarak belirlendi (Ayhan et al., 1995, Benson et al., 1988, Noyan, 1998).

Sayım sırasında tespit edilen fagositoz yapan hücrelerin sayısı ve fagositik edilen mikroküre sayısı fagositik kapasite ve fagositik indeks değerlerinin hesaplanmasında kullanıldı (Silva ve Peck, 1999). Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analizi ve Tukey testi kullanıldı.

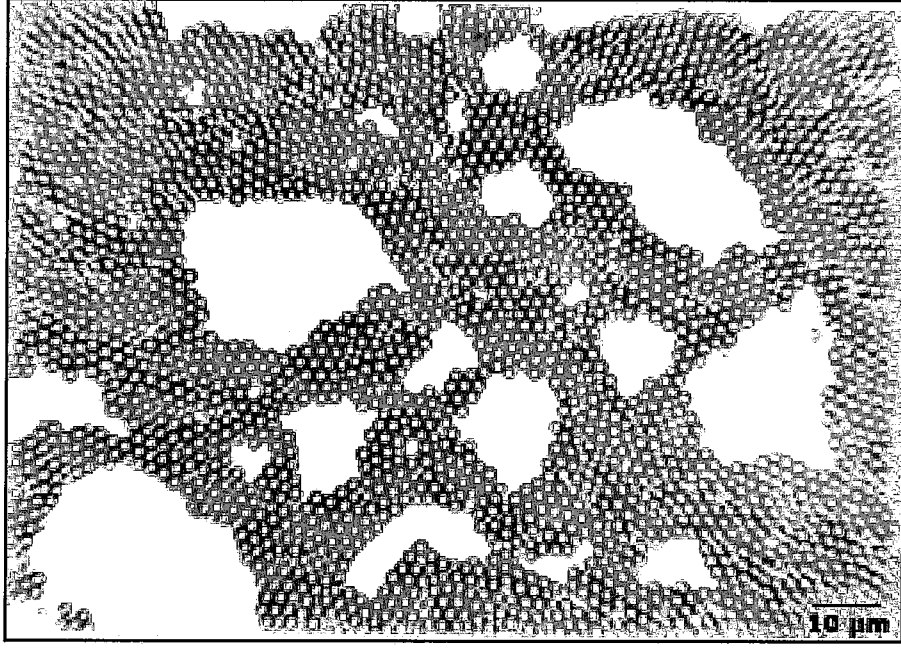
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

4.1. Fagositozun Gözlenmesi

Yapılan çalışmada, elde edilen partiküllerin büyüklükleri oküler mikrometresinde $2 \pm 0.2 \mu\text{m}$ olarak ölçülmüş ve hazırlanan farklı fonksiyonel gruplar içeren poli(GMA) mikroküreler sayılarak kandaki monosit ve nötrofil lökositlerin yaptıkları fagositoz gözlenmiştir (Şekil 4.3., 4.4.). Fagositozun varlığı, mikroskop altında çekirdek ve mikrokürelerin aynı anda netleşmesi ve çekirdekte mikrokürelerin itmesi sonucu oluşan kromatin yoğunluktan kaynaklanan koyu renk ile kontrol edilmiştir. Bu gözlemler sonucu elde edilen sonuçlar aşağıda sunulmuştur. Şekil 4.1. ve 4.2. Poli(GMA) mikrokürelerine ait görüntüleri vermektedir.



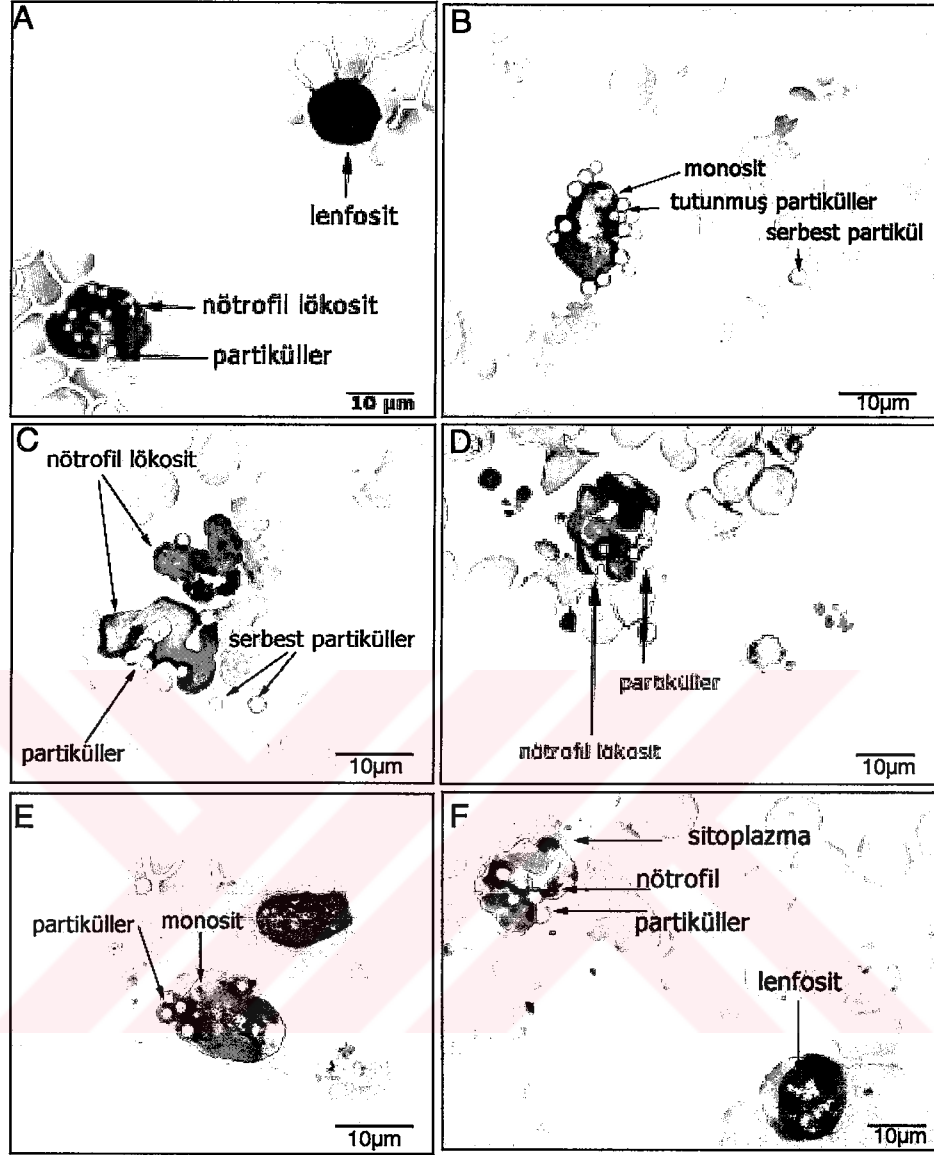
Şekil 4.1. Poli(GMA) mikrokürelerinin tarama elektron mikrografı.



Şekil 4.2. Poli(GMA) mikrokürelerinin x1000 büyütmedeki görünüşleri.



Şekil 4.3. Nötrofil lökositin fagosite ettiği poli(GMA)-albumin (asetat) mikroküreleri.



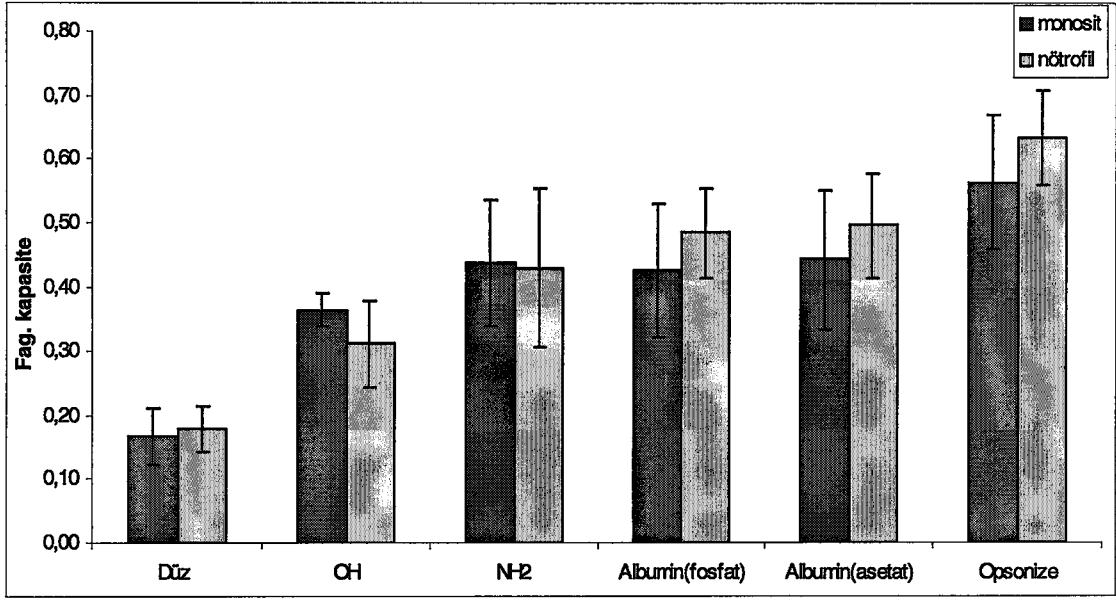
Şekil 4.4. Monosit ve nötrofil lökositlerin poli(GMA) mikrokürelerini fagositozu (1000x). (A ve D) nötrofil lökosit tarafından fagosite edilen albuminli partiküller, (B) monosit tarafından fagosite edilen opsonize partiküller, (C) iki nötrofil lökosit tarafından fagosite edilmiş hidroksilli partiküller, (E) monosite tutunmuş opsonize partiküller ve (F) nötrofil lökosit tarafından fagosite edilmiş beş poli(GMA)-OH partikülleri.

4.2. Poli(GMA) Mikrokürelerinde Fagositik Kapasite ve Fagositik İndeks Sonuçları

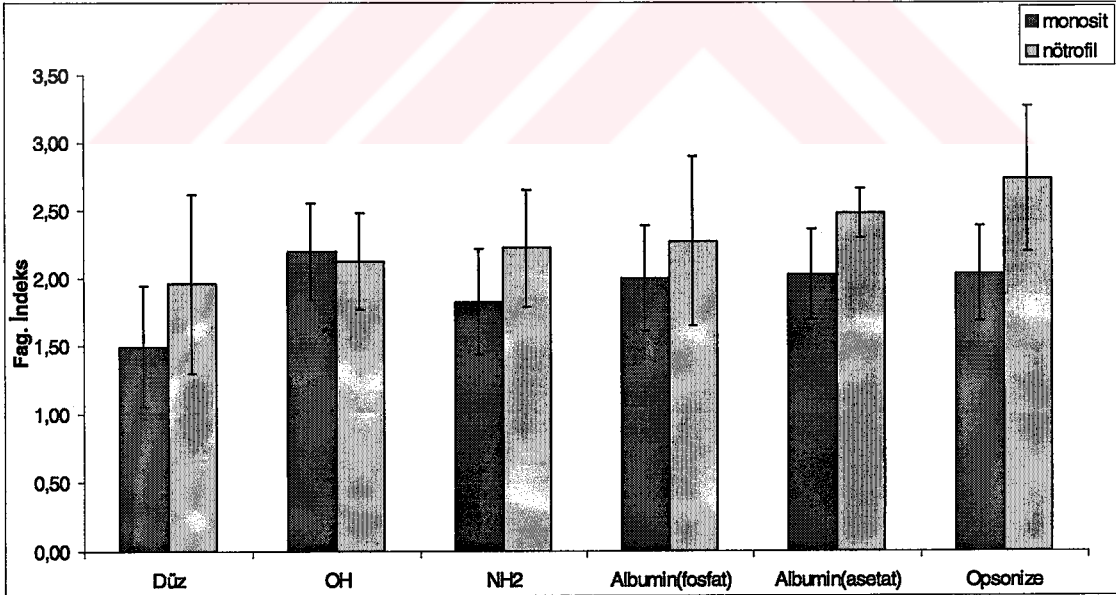
Kandaki monosit ve nötrofil lökositlerin partiküller ile olan etkileşimleri ışık mikroskobu altında incelenmiş, monosit ve nötrofil lökositler tespit edilip fagositoz yapan hücre sayısı ve içlerine aldıkları partikül sayıları sayılmıştır. Altı ayrı deney grubu ile yapılan ölçümlerin sonuçları fagositik kapasite ve fagositik indeks olarak hesaplanmış ve bu hesaplama her mikroküre grubu için tekrarlanmıştır. Aşağıda 60 dakika inkübasyon sonucunda ölçülen fagositik kapasite (Şekil 4.5.) ve fagositik indeks (Şekil 4.6.) sonuçları verilmiştir.

Buna göre 60 dakika inkübasyon sonunda düz poli(GMA) mikrokürelerin fagositik kapasite değeri monositler için $0,17 \pm 0,04$, nötrofiller için $0,18 \pm 0,04$ bulunmuştur. Bu değerler poli(GMA)-OH için sırasıyla $0,36 \pm 0,02$ ve $0,31 \pm 0,07$, poli(GMA)-NH₂ için $0,44 \pm 0,10$ ve $0,43 \pm 0,12$, poli(GMA)-albumin (fosfat) için $0,43 \pm 0,10$ ve $0,48 \pm 0,07$, poli(GMA)-albumin (asetat) için $0,44 \pm 0,11$ ve $0,50 \pm 0,08$, opsonize poli(GMA)'lar için ise $0,56 \pm 0,11$ ve $0,63 \pm 0,07$ olarak bulunmuştur.

Fagositik indeks değerleri düz poli(GMA) mikroküreleri için monositler için $1,50 \pm 0,44$, nötrofil lökositleri için ise $1,96 \pm 0,66$ bulunmuştur. Fagositik indeks değerleri sırasıyla poli(GMA)-OH için $2,20 \pm 0,36$ ve $2,13 \pm 0,36$, poli(GMA)-NH₂ için $1,83 \pm 0,39$ ve $2,22 \pm 0,43$, poli(GMA)-albumin (fosfat) için $2,00 \pm 0,38$ ve $2,27 \pm 0,62$, poli(GMA)-albumin (asetat) için $0,03 \pm 0,34$ ve $2,48 \pm 0,19$ ve opsonize poli(GMA) için $2,03 \pm 0,35$ ve $2,73 \pm 0,53$ bulunmuştur.

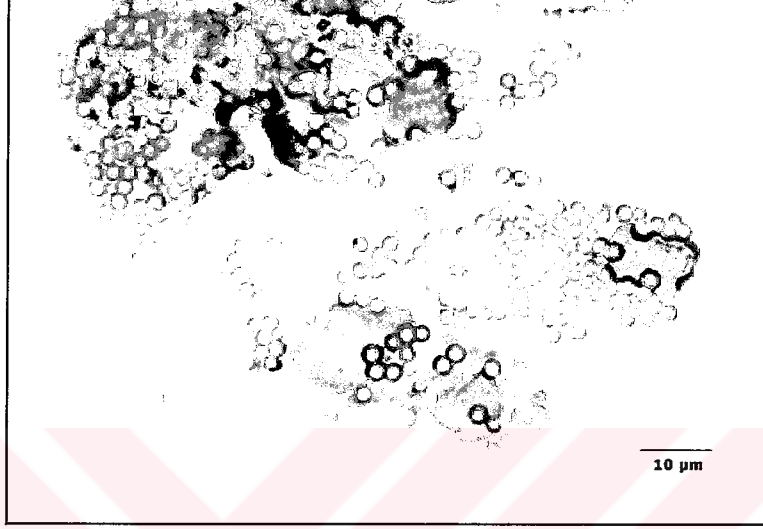


Şekil 4.5. 60 dakika inkübasyon sonunda elde edilen fagositik kapasite sonuçları (n=6).



Şekil 4.6. 60 dakika inkübasyondan sonra elde edilen fagositik indeks sonuçları (n=6).

Işık mikroskobu ile yapılan ölçümler sırasında poli(GMA)-OH ve poli(GMA)-NH₂ mikrokürelerinin kümeler halinde toplanma eğilimlerinin olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle partiküllerin hücre içine alınmalarının homojen olmadığı görülmüştür (Şekil 4.7.).

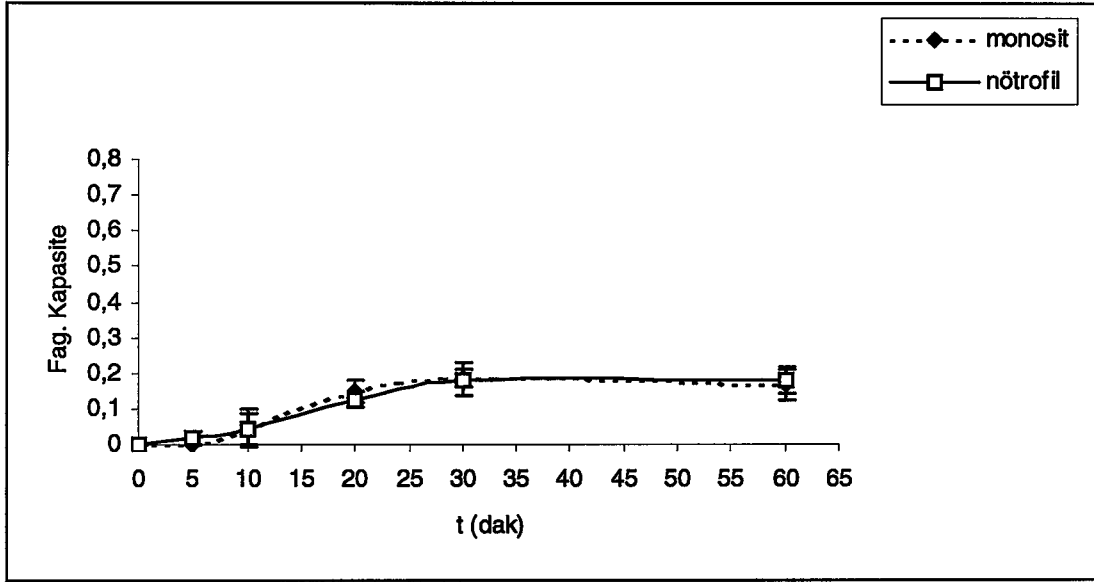


Şekil 4.7. Poli(GMA)-OH mikrokürelerinin kümeler halinde toplanması.

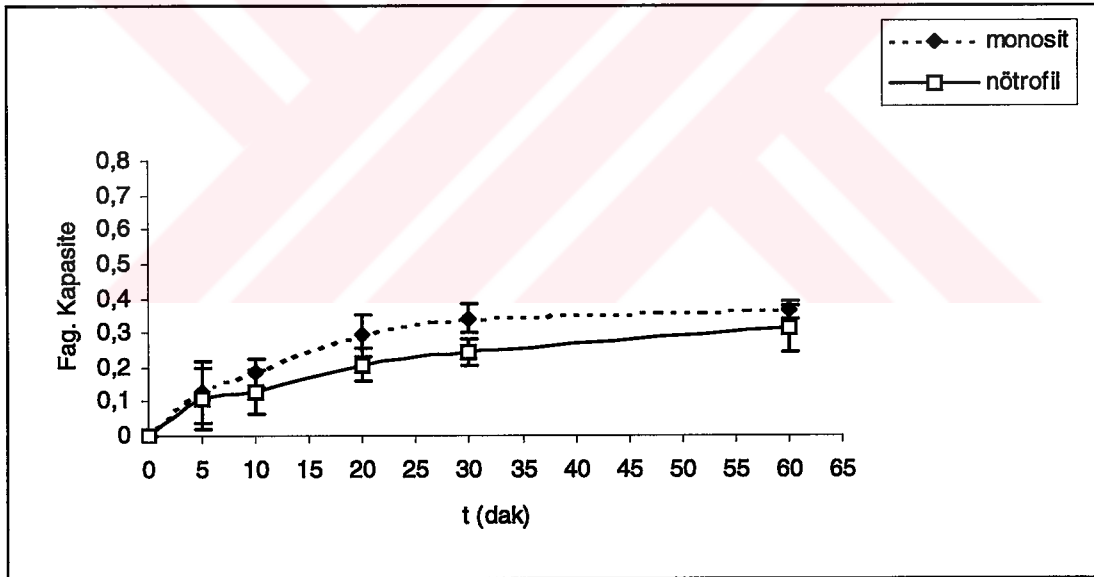
Çalışmada farklı fonksiyonel gruplar taşıyan poli(GMA) mikrokürelerinin zamana karşı monosit ve nötrofiller tarafından fagosite edilmeleri de incelenmiştir. Buna göre üzerinde fonksiyonel gruplar taşıyan poli(GMA) mikrokürelerinin fagositoz hızları daha yüksektir. Zamana karşı monosit ve nötrofil lökositlerin verdikleri fagositik kapasite sonuçları Çizelge 4.1.'de verilmiş olup grafiksel gösterimleri monosit ve nötrofil lökositlerin zaman karşı verdikleri fagositik kapasite sonuçları Şekil 4.8.-13.'da verilmiştir. Zamana karşı monosit ve nötrofil lökositlerin gösterdikleri fagositik indeks sonuçları ise Çizelge 4.2.'de toplanmış olup, monosit ve nötrofil lökositlerin farklı poli(GMA) mikrokürelerinin varlığında verdikleri fagositik indeks sonuçları Şekil 4. 14.-19'te grafiksel olarak gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Altı ayrı mikroküre için ölçülen fagositik kapasite sonuçları.

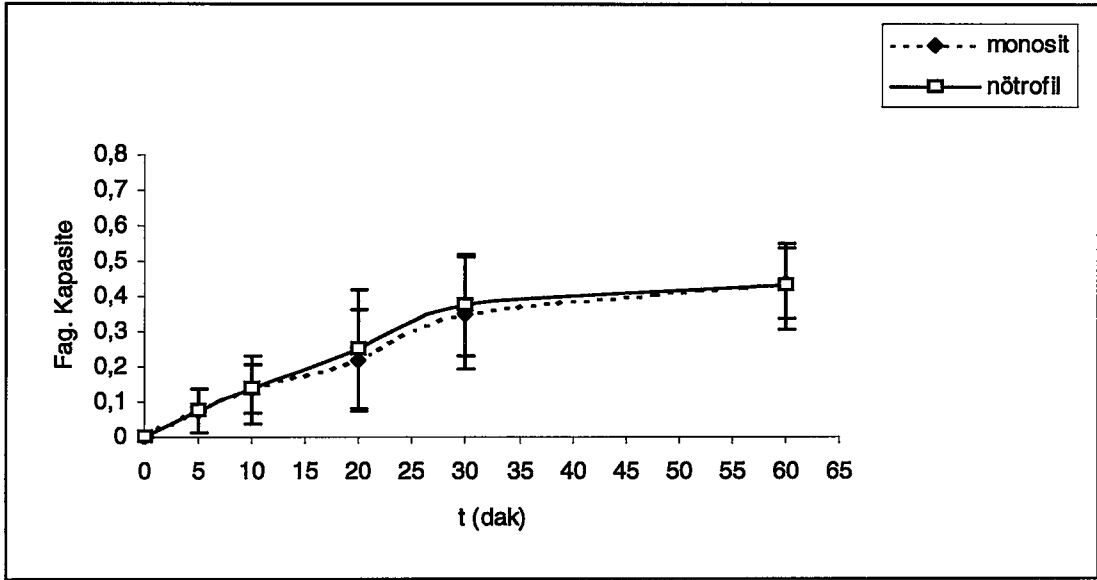
	1.deney		2.deney		3.deney		4.deney		5.deney		6.deney		ortalama		st.sp.	
	monosit	nötrofil	monosit	nötrofil	monosit	nötrofil	monosit	nötrofil	monosit	nötrofil	monosit	nötrofil	monosit	nötrofil	monosit	nötrofil
Düz	5.dak	0,0000	0,0000	0,0233	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0400	0,0000	0,0323	0,0000	0,0159	0,0000	0,0182
	10.dak	0,0000	0,0000	0,0741	0,0000	0,0000	0,0323	0,0000	0,0323	0,0870	0,1111	0,1154	0,0454	0,0407	0,0511	0,0438
	20.dak.	0,1765	0,1429	0,1154	0,1034	0,1364	0,1212	0,1500	0,1515	0,1875	0,1200	0,1471	0,1476	0,1269	0,0295	0,0239
	30.dak.	0,1667	0,1591	0,2083	0,1000	0,1818	0,1818	0,1600	0,2069	0,1765	0,2174	0,2353	0,1851	0,1805	0,0230	0,0469
	60.dak	0,2500	0,2424	0,1304	0,1667	0,1429	0,1628	0,1429	0,1600	0,1667	0,1429	0,2000	0,1666	0,1791	0,0433	0,0362
	5.dak	0,0000	0,0000	0,1724	0,1860	0,2258	0,2222	0,0417	0,0313	0,1500	0,0714	0,1739	0,1273	0,1081	0,0871	0,0882
10.dak	0,1111	0,0476	0,2273	0,0800	0,2105	0,2083	0,1724	0,1500	0,1765	0,0833	0,2000	0,1830	0,1271	0,0408	0,0663	
20.dak.	0,2222	0,1591	0,3750	0,2647	0,2667	0,1905	0,2500	0,1600	0,3500	0,2083	0,2857	0,2916	0,2074	0,0593	0,0472	
30.dak.	0,2917	0,2059	0,2857	0,1842	0,3600	0,2564	0,3889	0,2857	0,3636	0,2424	0,3611	0,2826	0,3418	0,2429	0,0426	0,0410
60.dak	0,3182	0,3143	0,3889	0,2105	0,3636	0,3261	0,3750	0,2593	0,3636	0,3600	0,3750	0,3947	0,3641	0,3108	0,0243	0,0670
NH ₂	5.dak	0,0000	0,0000	0,1429	0,1628	0,1250	0,0714	0,0000	0,0303	0,0952	0,0952	0,1429	0,0764	0,0758	0,0619	0,0643
	10.dak	0,0000	0,0000	0,1905	0,2500	0,1667	0,1143	0,1579	0,1034	0,1739	0,1304	0,2500	0,1366	0,1360	0,0698	0,0974
	20.dak.	0,0000	0,0000	0,1739	0,1321	0,2500	0,2857	0,4211	0,3200	0,1905	0,2857	0,5000	0,2202	0,2480	0,1393	0,1703
	30.dak.	0,1250	0,1304	0,5517	0,4000	0,3030	0,3500	0,2857	0,4483	0,3182	0,5217	0,5588	0,3509	0,3752	0,1601	0,1417
	60.dak	0,3500	0,2683	0,5882	0,5000	0,3684	0,4211	0,3548	0,3824	0,4400	0,5200	0,6286	0,4369	0,4286	0,0988	0,1235
	5.dak	0,1200	0,0930	0,0690	0,0789	0,0000	0,0930	0,1111	0,0870	0,1667	0,1786	0,1154	0,1190	0,0970	0,1083	0,0568
10.dak	0,1935	0,1400	0,1379	0,1961	0,1667	0,1515	0,2222	0,2381	0,3333	0,4333	0,1379	0,1633	0,1986	0,2204	0,0736	0,1102
20.dak.	0,2800	0,2500	0,2609	0,3056	0,2800	0,2500	0,2500	0,2571	0,3571	0,4138	0,2800	0,4483	0,2847	0,3208	0,0376	0,0886
30.dak.	0,4483	0,6338	0,4643	0,4286	0,3793	0,3438	0,3929	0,3333	0,3600	0,4286	0,4167	0,6667	0,4102	0,4724	0,0405	0,1439
60.dak	0,4615	0,4792	0,4783	0,5227	0,2657	0,4211	0,3200	0,3939	0,4500	0,5000	0,5600	0,5854	0,4259	0,4837	0,1034	0,0695
Albumin(asetat)	5.dak	0,0000	0,0000	0,1053	0,1176	0,1000	0,0682	0,0500	0,1538	0,0588	0,1250	0,1429	0,0699	0,1013	0,0420	0,0578
	10.dak	0,0385	0,0556	0,0800	0,1220	0,1875	0,1333	0,1905	0,3429	0,0588	0,0833	0,2500	0,1064	0,1883	0,0660	0,1041
	20.dak.	0,1111	0,1111	0,4000	0,3158	0,2500	0,2692	0,2083	0,2632	0,3158	0,4063	0,3824	0,2618	0,2913	0,0983	0,1057
	30.dak.	0,3636	0,4500	0,3548	0,4359	0,3636	0,4400	0,3913	0,5000	0,3889	0,4839	0,5238	0,3977	0,4664	0,0635	0,0276
	60.dak	0,4074	0,4750	0,5333	0,5000	0,4615	0,5500	0,2500	0,3529	0,4545	0,5000	0,5946	0,4428	0,4954	0,1083	0,0819
	5.dak	0,0000	0,0345	0,1000	0,1515	0,1053	0,1842	0,1667	0,2222	0,0870	0,1613	0,1111	0,1739	0,0950	0,1546	0,0541
10.dak	0,0741	0,1136	0,2222	0,1500	0,2500	0,1951	0,2857	0,3871	0,1429	0,3043	0,1818	0,1852	0,1928	0,2226	0,0768	0,1030
20.dak.	0,1786	0,1923	0,3704	0,2973	0,2667	0,3023	0,2857	0,3548	0,2941	0,4737	0,3200	0,4211	0,2859	0,3403	0,0636	0,0997
30.dak.	0,4783	0,4286	0,6818	0,5357	0,6774	0,6563	0,3750	0,4483	0,3333	0,4194	0,5600	0,6579	0,5176	0,5243	0,1484	0,1108
60.dak	0,5714	0,5556	0,4688	0,6364	0,6667	0,7419	0,4118	0,5652	0,5833	0,6071	0,6786	0,6970	0,5634	0,6339	0,1062	0,0738



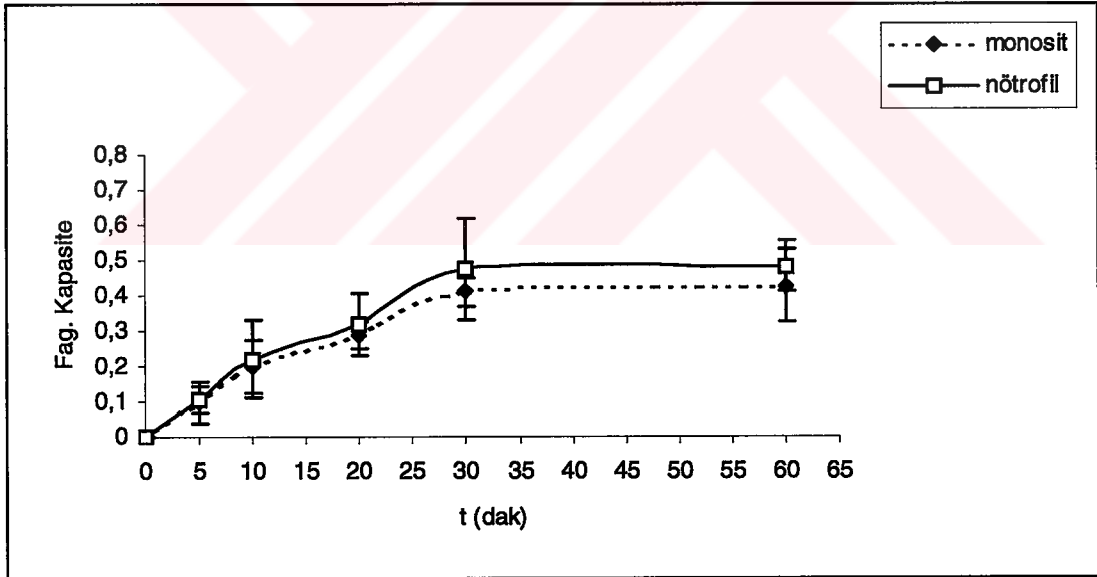
Şekil 4.8. Monosit ve nötrofil lökositlerin düz poli(GMA) mikrokürelere ile etkileşimleri sonucu zamana karşı verdikleri fagositik kapasite sonuçları.



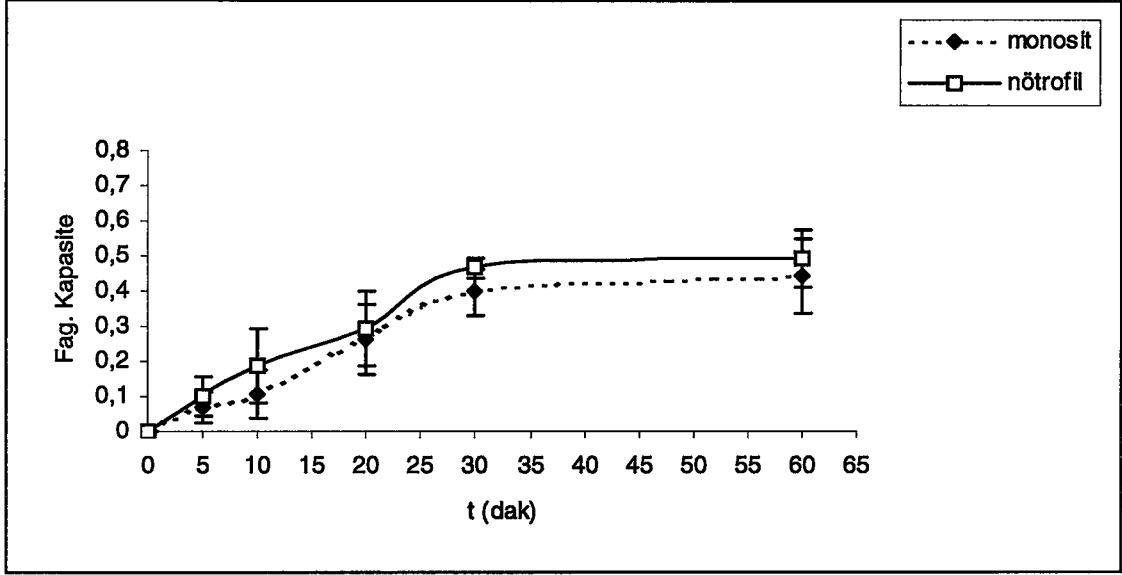
Şekil 4.9. Monosit ve nötrofil lökositlerin poli(GMA)-OH mikrokürelere ile etkileşimleri sonucu zamana karşı verdikleri fagositik kapasite sonuçları.



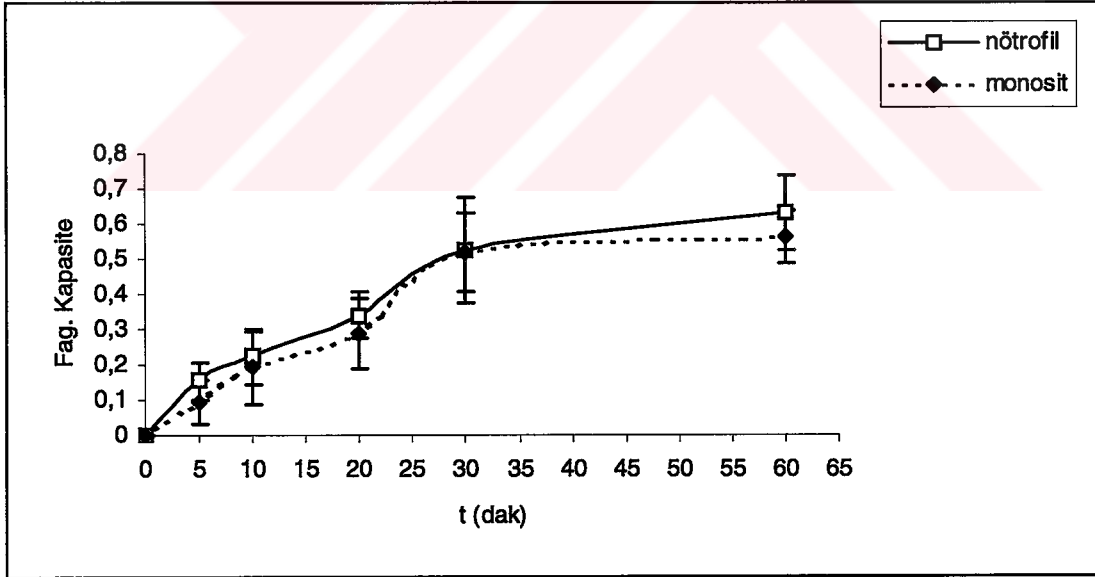
Şekil 4.10. Monosit ve nötrofil lökositlerin poli(GMA)-NH₂ mikroküreleri ile etkileşimleri sonucu zamana karşı verdikleri fagositik kapasite sonuçları.



Şekil 4.11. Monosit ve nötrofil lökositlerin fosfat tamponunda hazırlanmış poli(GMA)-albumin mikroküreleri ile etkileşimleri sonucu zamana karşı verdikleri fagositik kapasite sonuçları.



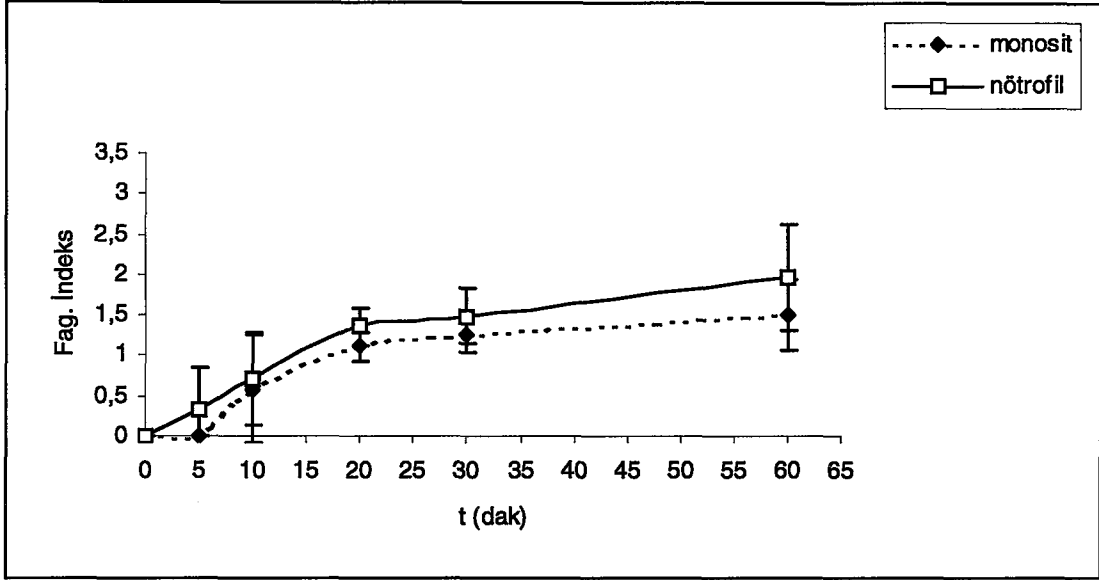
Şekil 4.12. Monosit ve nötrofil lökositlerin asetat tamponunda hazırlanan poli(GMA)-albumin mikroküreleri ile etkileşimleri sonucu zamana karşı verdikleri fagositik kapasite sonuçları.



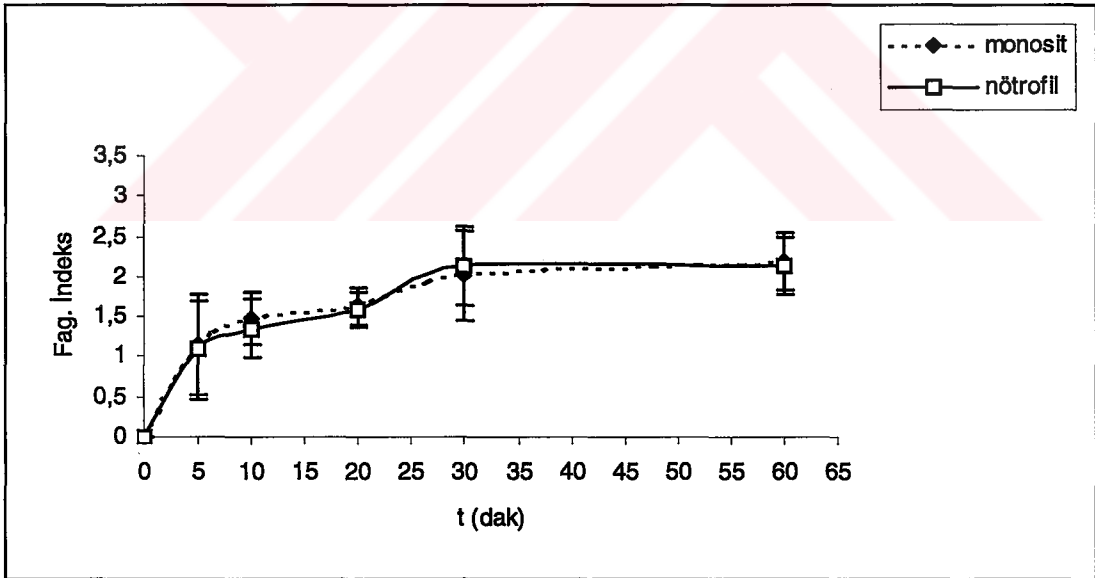
Şekil 4.13. Monosit ve nötrofil lökositlerin opsonize poli(GMA) ile etkileşimleri sonucu zamana karşı verdikleri fagositik kapasite sonuçları.

Çizelge 4.2. Altı ayrı mikroküre için ölçülen fagositik indeks sonuçları.

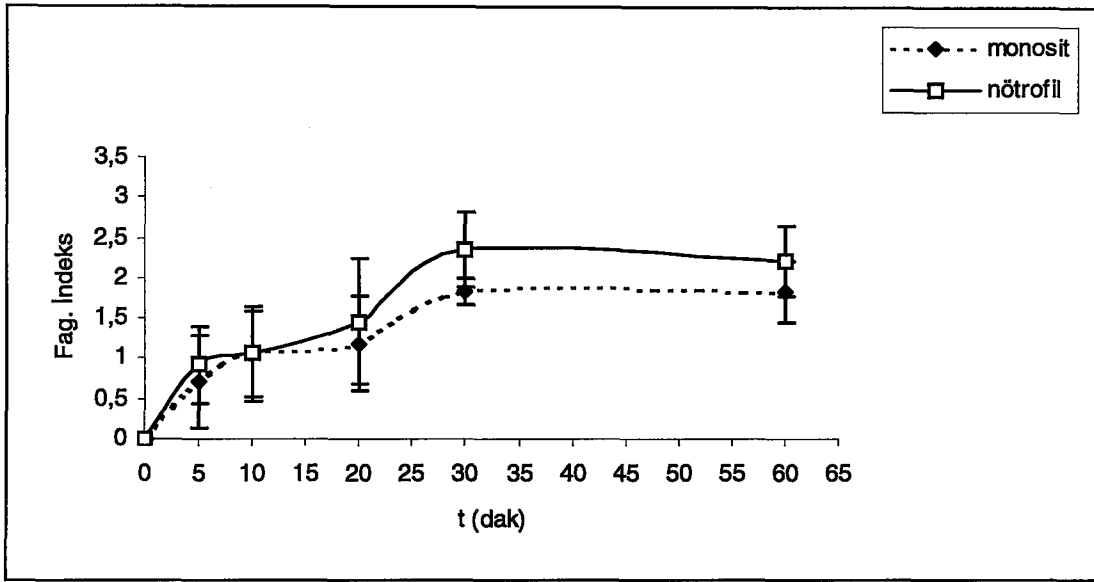
	1.deney		2.deney		3.deney		4.deney		5.deney		6.deney		ortalama		st.sp.		
	monosit	nötrofil	monosit	nötrofil	monosit	nötrofil	monosit	nötrofil	monosit	nötrofil	monosit	nötrofil	monosit	nötrofil	monosit	nötrofil	
Düz	5.dak	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,333	0,000	0,333	0,000	0,516
	10.dak	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	1,000	0,000	1,000	1,500	1,000	1,333	0,722	0,583	0,665	0,574	
	20.dak	1,000	1,000	1,000	1,333	1,000	1,500	1,333	1,200	1,333	1,500	1,600	1,111	1,356	0,172	0,225	
	30.dak	1,000	1,000	1,600	1,333	1,000	1,500	1,250	1,333	1,333	1,750	1,400	1,264	1,486	0,235	0,351	
	60.dak	1,333	2,875	1,333	1,333	2,400	2,571	1,333	1,750	1,333	1,250	2,000	1,497	1,963	0,444	0,656	
		0,000	0,000	1,600	1,500	1,714	1,250	1,000	1,000	1,333	1,000	1,250	1,750	1,150	1,083	0,618	0,606
OH	5.dak	1,000	1,000	1,800	1,250	1,750	2,000	1,333	1,000	1,667	1,000	1,400	1,469	1,347	0,324	0,374	
	10.dak	1,833	1,714	1,444	1,778	2,000	1,625	1,600	1,500	1,429	1,200	1,727	1,634	1,591	0,233	0,215	
	20.dak	1,429	2,143	1,875	1,857	2,111	1,600	1,571	1,750	3,000	2,625	2,077	2,011	2,137	0,556	0,502	
	30.dak	2,571	1,909	1,571	2,000	2,167	1,600	2,111	2,429	2,250	2,556	2,500	2,195	2,127	0,356	0,356	
		0,000	0,000	1,333	1,143	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,400	0,722	0,924	0,479	0,479
		0,000	0,000	1,750	1,250	1,250	1,250	1,333	1,000	1,000	1,400	1,000	1,444	1,056	1,057	0,586	0,541
NH ₂	5.dak	0,000	0,000	1,500	1,714	1,500	2,250	1,250	1,375	1,500	1,571	1,857	1,188	1,461	0,590	0,774	
	10.dak	2,000	2,500	1,813	2,071	1,800	1,857	2,000	2,154	1,571	2,333	1,750	1,822	2,354	0,162	0,474	
	20.dak	1,286	2,727	2,200	2,056	2,143	2,063	1,545	2,154	1,636	1,615	2,154	1,827	2,224	0,388	0,433	
		1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	1,000	1,000	1,500	1,000	1,400	1,333	1,600	0,889	1,250	0,455	0,281
		1,000	1,000	1,250	1,400	1,000	1,400	1,250	1,400	1,500	1,538	1,250	1,750	1,208	1,415	0,188	0,245
		1,143	2,111	1,333	1,455	1,286	2,000	1,200	1,333	1,400	1,583	2,143	1,615	1,417	1,683	0,367	0,307
Albumin(fosfat)	5.dak	1,615	2,222	1,923	2,600	1,273	1,909	1,364	1,667	1,556	2,250	2,000	1,622	2,236	0,292	0,412	
	10.dak	1,917	2,174	2,364	2,087	1,600	1,625	1,625	2,000	2,556	2,286	1,929	1,998	2,272	0,388	0,624	
		0,000	0,000	1,250	1,833	1,500	1,000	1,000	1,250	1,000	1,000	1,000	0,958	1,056	0,510	0,600	
		1,000	1,000	1,000	1,200	1,333	1,500	1,750	1,333	1,000	1,571	1,500	1,264	1,451	0,318	0,379	
		1,000	1,333	1,786	1,667	1,200	1,429	1,800	1,400	1,333	2,000	1,625	2,077	1,457	0,330	0,322	
		1,875	1,500	1,273	1,706	1,750	2,091	1,556	1,643	1,714	1,933	2,273	1,740	2,003	0,333	0,597	
Albumin(asetat)	5.dak	2,455	2,526	2,125	2,667	1,750	2,500	1,667	2,167	1,800	2,375	2,364	2,027	2,479	0,336	0,185	
		0,000	1,000	1,000	1,600	1,000	1,143	1,000	1,167	1,000	1,400	1,000	0,833	1,343	0,408	0,291	
		1,000	1,200	1,000	1,667	1,000	1,500	1,667	1,750	1,000	1,429	1,250	1,153	1,524	0,271	0,196	
		1,400	2,000	1,400	1,818	1,500	1,231	1,333	1,727	1,600	1,889	2,375	1,601	1,871	0,390	0,431	
		1,636	1,667	2,400	1,767	2,095	2,524	1,500	2,077	2,333	2,923	2,214	2,030	2,473	0,375	0,836	
		1,875	2,900	2,200	2,524	2,643	3,043	1,857	2,000	2,000	2,412	1,632	2,034	2,733	0,352	0,535	



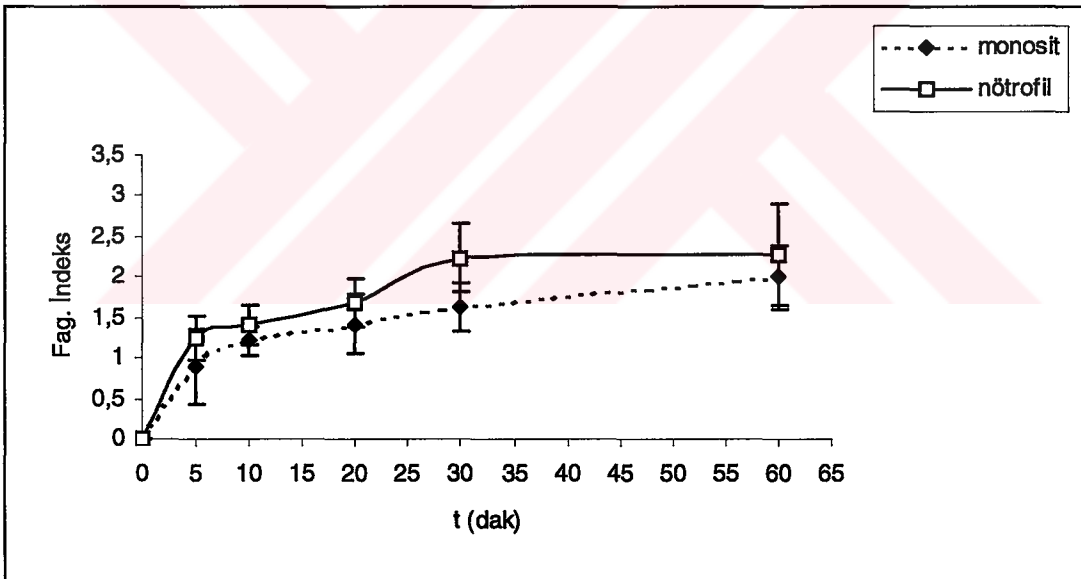
Şekil 4.14. Monosit ve nötrofil lökositlerin düz poli(GMA) mikrokürelere ile etkileşimleri sonucu zamana karşı verdikleri fagositik indeks sonuçları.



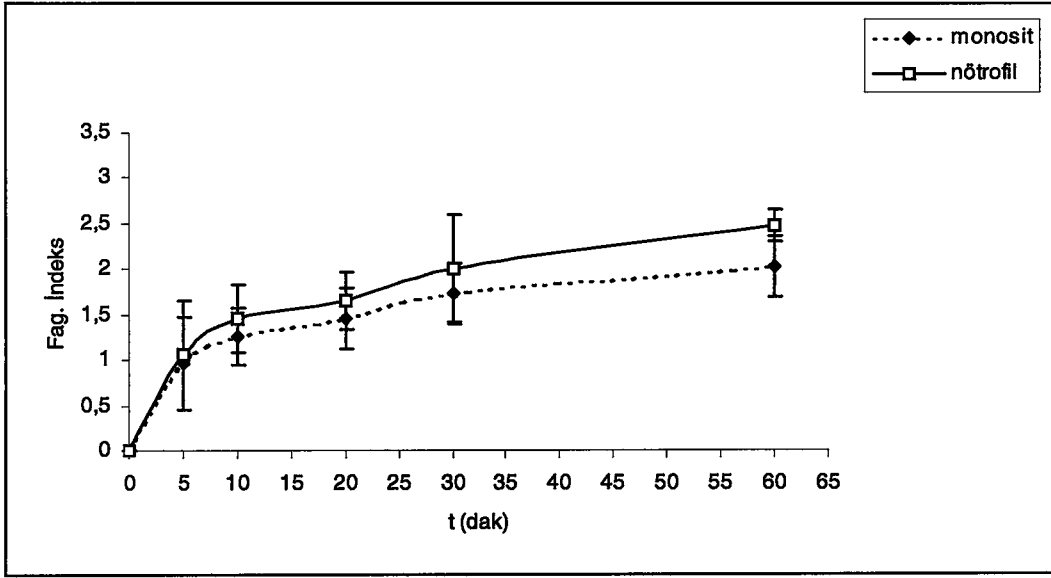
Şekil 4.15. Monosit ve nötrofil lökositlerin poli(GMA)-OH mikrokürelere ile etkileşimleri sonucu zamana karşı verdikleri fagositik indeks sonuçları.



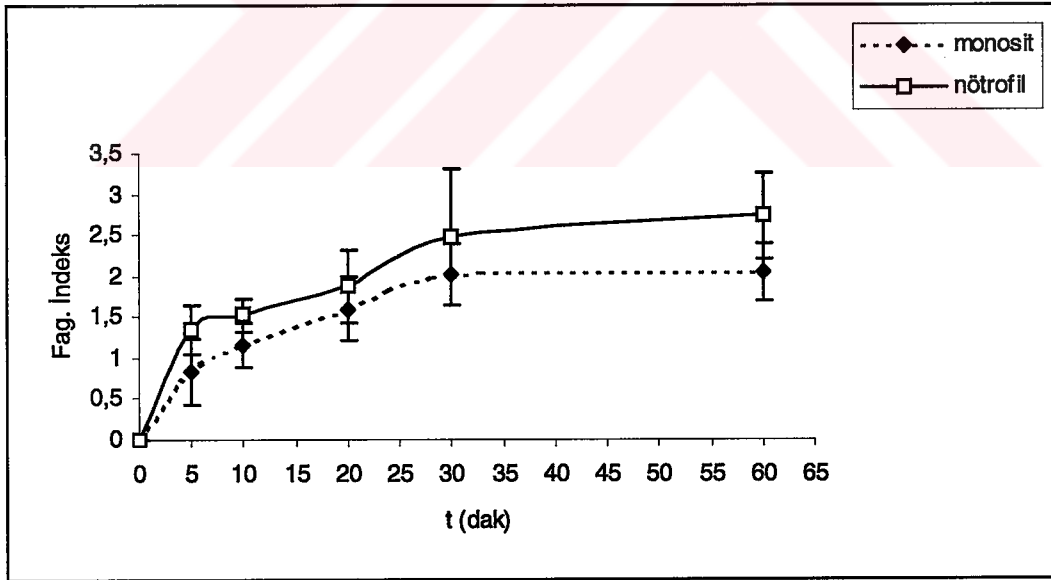
Şekil 4.16. Monosit ve nötrofil lökositlerin poli(GMA)-NH₂ mikrokürelere ile etkileşimleri sonucu zamana karşı verdikleri fagositik indeks sonuçları.



Şekil 4.17. Monosit ve nötrofil lökositlerin fosfat tamponunda hazırlanan poli(GMA)-albumin mikrokürelere ile etkileşimleri sonucu zamana karşı verdikleri fagositik indeks sonuçları.



Şekil 4.18. Monosit ve nötrofil lökositlerin asetat tamponunda hazırlanan poli(GMA)-albumin mikroküreleri ile etkileşimleri sonucu zamana karşı verdikleri fagositik indeks sonuçları.



Şekil 4.19. Monosit ve nötrofil lökositlerin opsonize poli(GMA) ile etkileşimleri sonucu zamana karşı verdikleri fagositik indeks sonuçları.

Düz mikrokürelerin monosit ve nötrofiller tarafından fagositoz edilebilmeleri, üzerine fonksiyonel grup ya da protein takılmış olan partiküllere göre daha zor olmaktadır. Düz poli(GMA) mikrokürelerinin hem monositler hem de nötrofil lökositler tarafından fagosite edilme oranları %20'nin altındadır. Zira, düz mikrokürelerin fagositik kapasite sonuçları anlamlı bir biçimde diğer beş mikroküre grubunun fagositik kapasite sonuçlarından düşük çıkmıştır ($p < 0.05$). Yalnız düz poli(GMA) ve poli(GMA)-OH'ların nötrofil lökositler tarafından fagosite edilmeleri arasındaki fark düşük olup istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Vücudun pozitif yüklü mikroküreleri daha kolay tanıyabildiği konusundaki literatür bilgisine rağmen (Noyan, 1998), poli(GMA)-OH ve poli(GMA)-NH₂ mikroküreleri arasında ne fagositik kapasite ne de fagositik indeks sonuçları arasında anlamlı bir sonuç bulunmuştur. Poli(GMA)-OH partikülleri monositler tarafından daha fazla fagosite edilmektedirler. Bu nedenle monositlerce yapılan poli(GMA)-OH fagositozu albumin takılmış poli(GMA)'ların fagositoz miktarına yakındır. Ancak albuminli poli(GMA)'ların nötrofil lökositlerce yapılan fagositozu poli(GMA)-OH'lara göre daha yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$).

Albuminli poli(GMA) mikrokürelerin fagositik kapasite sonuçları incelendiğinde pH:7.4 fosfat tamponunda albuminlenen mikroküreler pH:5 asetat tamponunda albuminlenen mikrokürelere göre daha az bulunmuştur. Bu sonuç albuminin izoelektrik noktasının pH:5 olması nedeniyle daha fazla albuminin poli(GMA) mikrokürelere tutunmasına bağlıdır. Ancak aradaki fark 60. dakika için kayda değer değildir. Bunun yanında, nötrofil lökositlerin pH:7.4 fosfat tamponunda hazırlanan albuminli mikroküreleri opsonize poli(GMA)'lara göre daha az tercih ettikleri tespit edilmiştir ($p < 0.05$). Asetat tamponunda hazırlanan poli (GMA)-albumin'lerin opsonize olanlarla arasında hiçbir fark bulunamamıştır.

Monosit ve nötrofil lökositlerin poli(GMA)-NH₂ ve poli(GMA)-albumin (pH:5, pH:7.4) arasında önemli bir fark olmamasına rağmen nötrofil lökositlerin opsonize mikroküreleri aminli mikrokürelere tercih etmeleri anlamlı

bulunmuştur ($p<0.05$).

Nötrofil lökosit ve monositlerin opsonize poli(GMA) mikrokürelerini fagositozu %50'nin üzerinde bulunmuştur. Özellikle, nötrofil lökositlerin düz, hidroksilli, aminli ve pH:7.4'te hazırlanmış poli(GMA)-albumine göre opsonize mikroküreleri daha fazla tercih ettikleri belirlenmiştir ($p<0.05$). Monositlerin ise 60. dakikanın sonunda aminli, albuminli ve opsonize mikroküreler arasında anlamlı bir tercih yapmadıkları görülmüştür.

Hücrelerin içine alınan ortalama partikül sayıları (fagositik indeks) düz poli(GMA) mikrokürelerinde oldukça düşük bulunmuştur. Diğer gruplarda sonuçlar birbirine yakın olmakla birlikte düz mikrokürelerle arasında anlamlı bir fagositik indeks sonucu bulunan tek mikroküre grubu poli(GMA)-OH olmuştur ($p<0.05$).

Poli(GMA) mikrokürelerinin fagositozları incelendiğinde hem fagositik kapasite hem de fagositik indeks değeri olarak nötrofil lökositlerin yaptığı fagositoz monositlere göre daha yüksek bulunmuştur. Yalnız OH grubu içeren poli(GMA) mikrokürelerinde hem fagositik kapasite hem de fagositik indeks monositlerde daha yüksek bulunmuştur. Ancak nötrofil lökositlerin poli(GMA)-OH mikrokürelerini monositlere göre daha az tercih etmeleri ile ilgili elde edilen sonuç istatistiksel olarak değerlendirildiğinde aralarındaki farkın anlamlılığının düşük olduğu görülmüştür ($p<0.1$).

Poli(GMA) mikrokürelerinin kana karışması ile başlayan fagositik cevap, 5. dakikanın sonunda monositlerde diğer mikrokürelerle karşılaştırıldığında poli(GMA)-OH için çok hızlı bir cevabın oluşması ve 10. dakikaya kadar düz poli(GMA) mikroküreleriyle arasında anlamlı bir farkın oluşması ile devam etmektedir ($p<0.05$). Bu artış poli(GMA)-albumin (fosfat) ve opsonize poli(GMA) için de yüksek olmasına karşın 5.dakikanın sonundaki istatistiksel anlamlılığı daha düşük bulunmuştur ($p<0.1$), ancak bu fark 10. dakikada $p<0.05$ anlamlılığa ulaşmaktadır. 20. dakikaya gelindiğinde mikrokürelerin fagositik aktiviteleri hepsinde hızla artmakta ve hiç bir mikrokürenin fagositik

değerleri arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemektedir. 30. dakika mikrokürelerin fagositozunun artık platoya ulaştığı ve nihai fagositik kapasite farklılıklarının belirmeye başladığı zamandır.

Monositlerin altı mikroküre için gösterdikleri fagositik kapasite hızları ile ilgili olarak bu bilgilerin ışığında poli(GMA)-OH mikrokürelerinin fagosite edilme hızının düz mikrokürelere göre yüksek olduğunu ve bunu poli(GMA)-albumin (fosfat) ve opsonize poli(GMA) mikrokürelerinin izlediği söylenebilir.

Nötrofillere ait fagositik kapasite hızları ise opsonize mikrokürelere en yüksektir. 5. dakikadan başlayarak 60. dakikaya kadar düz mikroküreler arasında fark bulunmaktadır ($p < 0.05$). Poli(GMA)-albumin(fosfat) mikroküreleri de hızlı bir fagositik kapasite oluşturmakta ve 10. dakikadan başlayarak 60. dakikanın sonuna kadar düz mikroküreler ile arasında istatistiksel bir fark gözlenmektedir ($p < 0.05$). Poli(GMA)-albumin (fosfat) mikrokürelerinin hücre içine hızla alınmaya başlamasına karşın 30. dakikadan sonra bu hızın yavaşlaması ve 60. dakikada opsonize mikroküreler ile aralarındaki farkın anlamlı bir biçimde açılması nötrofillerin bu mikroküreleri iki farklı tanıma yöntemi ile algılıyor olmalarıyla açıklanabilir. pH:5'in albuminin izoelektrik noktası olması nedeniyle asetat tamponunda albuminlenmiş mikrokürelerin daha fazla albumin içermesi beklenir (Shirakama et al., 1989). Aynı zamanda fosfat tamponunda albuminlenmiş mikrokürelere daha fazla açık glutaraldehit ucu olacağından kanda hızlı bir biçimde opsonize olmaları ve hızla fagosite edilmeleri beklenir. Bunun nedeni aldehitlerin vücutta pek çok biyomoleküllerin yapısında bulunan amin grupları ile kolay reaksiyona girmesidir (Rembaum et al., 1979). Poli(GMA)-albumin (asetat) mikrokürelerinin ise yüzeyinde daha fazla yabancı protein olacağından fagositozun yavaş devam etmesine rağmen sonuçta daha fazla fagosite edileceklerdir.

Monositlerin altı mikroküre ile yaptıkları fagositik aktiviteye ait fagositik indeks değerleri ise 5 dakikada poli(GMA)-NH₂'nin dışındaki tüm mikroküreler ile düz mikroküreler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkı göstermektedir

($p < 0.05$). Ancak bu fark 10 ve 20 dakikalarda azalmakta, sadece poli(GMA)-OH mikroküreleri bu farkı 60 dakikaya kadar sürdürmektedir.

Nötrofillerde fagositik indeks, opsonize mikrokürelere ve poli(GMA)-albumin (fosfat) mikrokürelere ait ilk 5 dakikadaki hızlı yükselişleri ile artmaya başlamaktadır. Nötrofillerdeki fagositik kapasite sonuçlarına benzer nedenlerden dolayı poli(GMA)-albumin (fosfat) mikrokürelere hızlı bir başlangıca rağmen ilerleyen dakikalarda aynı yükselişi gösterememektedir. 10. dakikada poli(GMA)-albumin (asetat) mikrokürelere ait fagositik indeks değerleri ile düz mikrokürelere arasındaki fark anlamlı hale gelmektedir ve opsonize mikrokürelere ait değerler yine aynı şekilde düz mikrokürelere göre farklıdır ($p < 0.05$). 30. dakikaya kadar opsonize mikrokürelere ile düz mikrokürelere arasında anlamlı bir fark bulunmasına rağmen 60. dakikada bu fark kaybolmaktadır.

Sonuç olarak partiküllerin nötrofiller ve monositler tarafından fagosite edilmelerinde fonksiyonel grupların varlığı fagositozu arttırmaktadır. Önceden opsonize edilmiş mikrokürelere fagositozu opsonizasyon için ekstra bir zaman gerektirmediği için diğer mikrokürelere göre hızla içeri alınmaya başlamakta ve çok yüksek fagositoza neden olmaktadır. Poli(GMA)-OH ve poli(GMA)-NH₂ mikrokürelere fagositoz hızı düz mikrokürelere göre fazla olmasına rağmen aradaki fark da fazla kayda değer değildir.

Poli(GMA)-albumin mikrokürelere hazırlanması sırasında kullanılan farklı tamponlar mikrokürelere fagositoz özelliklerini değiştirmektedir. Asetat tamponunda albuminlenen mikrokürelere daha fazla albumin tutunduğu ve fosfat tamponunda albuminlenen mikrokürelere daha fazla açık glutaraldehit ucu kaldığı için poli(GMA)-albumin (fosfat) mikrokürelere önce hızlı bir biçimde opsonize olmakta ve hızlı bir fagositik aktiviteyi başlatmaktadır. Ancak 60. dakikanın sonunda partiküllere ait fagositik aktiviteler arasındaki fark kapanmakta, hatta poli(GMA)-albumin (asetat)'lar daha fazla fagosite edilmektedir.

Elde edilen sonuçlara göre üzerinde grup taşımayan partiküllerin taşıyanlara göre fagositozları daha yavaş ve daha az gerçekleşmektedir. Bunun nedeni partikülün alınabilmesi için önce opsonize olması gerekliliğidir. Partikül fagositlerin yüzeyine tutunmadan hücre içine alınamayacaktır. Yapılan çalışmada fagositik aktivitenin ölçülmesi serumlu ortamda gerçekleştiği için mikroküreler opsonize olabilmektedir.

Hazırlanan mikroküreler canlı materyaller içermedikleri için hücre yüzeyinde bu partikülleri tutabilecek reseptörler yoktur. Bu nedenle, düz mikrokürelerin öncelikle kanda opsonize olmaları gerekmektedir. Bu da belli bir zaman alacaktır. Daha önceden opsonize edilmiş mikroküreler ile düz poli(GMA) mikroküreleri karşılaştırılacak olunursa, daha önceden opsonize edilen mikrokürelerin fagositik kapasite ve indeks değerlerinin hızla yükseldiği görülmektedir. Düz mikrokürelerin fagositoz değerleri ise yavaş yükselmekte olup çok uzun bir zaman sonra önceden opsonize edilen mikrokürelerle yakın bir sonuca ulaşması beklenir. Ancak unutulmamalıdır ki opsonizasyonun daha kolay gerçekleşmesi için opsonize mikroküreler sentezlenirken önce glutaraldehit aktivasyonu yapılmıştır.

Hidroksilli poli(GMA) ve aminlenmiş poli(GMA) arasında fark gözlenmemiş olması da büyük ihtimalle her ikisinin de yüklü gruplar olmalarından dolayı kolay fagosite edilebilmelerinden kaynaklanmaktadır. Poli(GMA)-OH partiküllerinin fagositozu sırasında ilginç olan bir diğer unsur monositlerin poli (GMA)-OH mikrokürelerini nötrofillere göre daha fazla tercih ediyor olmalarıdır.

Günümüzde, fagositlerin yüklü partikülleri daha kolay fagosite edilebildiği konusundaki bilgilere rağmen fizikokimyasal özelliklerin fagositozu nasıl kolaylaştırdığı henüz tamamen aydınlatılabilmemiş değildir (Ahsan et al., 2002). Bunun nedeni yüklü partiküllerin bir reseptör olmadan nasıl fagosite edilebildiklerinin fermuar hipotezine göre açıklanamıyor olmasıdır. Ancak, poli(GMA)-OH ve poli(GMA)-NH₂ ile yapılan deneylerde fagositik kapasite sonuçlarının diğer fonksiyonel grup taşıyan mikrokürelere göre düşük

çıkmasına rağmen fagositik indeks sonuçlarının yakın hatta daha yüksek olmasını fizikokimyasal özelliklere bağlamak mümkündür. Çünkü hazırlanan preparatlarda yüklü mikrokürelerin kümeler oluşturma eğilimlerinin olduğu gözlenmiştir. Bu eğilim fagositoz yapan hücrelerin azlığına rağmen, fagositoz yapan hücrelerin çok partikül almasına neden olmaktadır. Bunun nedeni mikroküreyle karşılaşan hücrelerin tek değil, çok sayıda partikülle karşılaşması ve fagositoz yapan hücrenin fagosite ettiği mikroküreye yapışık olan diğer partikülleri de fagosite etmesi olarak yorumlanmıştır.

Poli (GMA)-albumin mikrokürelerinin her ikisinin de fagositler tarafından yüksek oranda fagosite ediliyor olması sıçan hücrelerinin sığır albuminini yabancı madde olarak algılıyor olmalarından kaynaklanmaktadır. Poli (GMA)-albumin mikrokürelerinin hazırlanmasında kullanılan BSA'nın sıçan hücreleri tarafından yabancı protein olarak tanınması oldukça ilginçtir. Çünkü normalde albumin, kanda en fazla bulunan proteinlerden biridir ve vücudun bağışıklık sistemi tarafından algılanmaz. Hatta albumin ile kaplanmış implantların vücudun savunma sistemi tarafından yakalanmaması beklenir. Daha önceden albumin takılmış polistiren bazlı mikrokürelerin fagositik aktivitelerinin takılmamış mikrokürelere göre daha az olduğu bulunmuştur (Ayhan et al., 1995).

Poli(GMA) mikroküreler monodispers bir dağılıma sahiptir. Bundan dolayı sonuçlarda hücreler arasında aynı grup mikroküreler karşılaştırıldığı zaman fagositoz miktarının standart sapmasının düşük olduğu görülmektedir. Bağışıklık cevabının kriterlerinden biri olan fagositoz hızının veya miktarının standardize edilmeye çalışıldığı böylesine bir yöntemde bu önemli bir kriter olmaktadır.

Vücudun patojen canlılara karşı korunması ve hayatta kalabilmesi için bağışıklık sisteminin sağlıklı çalışıyor olması gerekir. AIDS hastalığı örneğinde olduğu gibi bağışıklık sisteminin çalışmasının aksaması insanın basit bir enfeksiyondan bile ölebilmesine neden olmaktadır.

Yakın zamana kadar bağışıklık sistemi ile ilgili çok az sorunun varlığı biliniyordu ve bunların büyük bir kısmı halen aydınlatılabilmemiş değildir. İnsanın tüm gen haritasının çıkartıldığı bu zamanda, bazı insanların hastalıklara neden daha duyarlı olduğunun anlaşılammış olması büyük bir eksikliklerdir.

Günümüzde fagositoz bozuklukları ile ilgili bazı hastalıklar bilinmesine rağmen bu bozukluklarının tespitinde kullanılan yöntemlerin çoğu hastanelerde uygulanmamaktadır. Bu, testlerin pahalı ve yorumunun zor olmasından kaynaklanmaktadır. Bu testlerin daha sık yapılabilmesini sağlamak amacıyla geliştirilmekte olan yöntemler polimerik biyomateryallerin kullanımına yönelik olmaktadır. Özellikle lateks/polistiren partiküllerin fagositoz aktivitesinin tespit edilmesinde kullanılması literatürde yer bulmaktadır (Lehmann et al., 1997).

Fagositik aktivite ile ilgili çalışmalar günümüzde hala bakteri ve maya gibi canlı organizmalarla yapılmaktadır. Ancak bu organizmaların boyutlarının küçük olması nedeniyle mikroskopta gözlenmeleri zor olmaktadır. Bu çalışma ancak fluoresan işaretli mikroorganizmalar ile yapılabilmektedir. Bu ise fagositik aktivitenin ölçülmesinin pahalı olmasına yol açmaktadır. Daha ucuz bir yöntem olan lateks/polistiren partiküller ise eş boyutlu olmadıkları için ölçülen fagositik aktivitenin standart sapması yüksek olmaktadır.

Araştırmaya yönelik olarak kullanılan tüm fagositik aktivite ölçüm metodları farklı partiküller kullanılarak yapıldığı için araştırmaların birbirleriyle karşılaştırılması zorlaşmaktadır. Farklı büyüklüklerde partiküller kullanıldığı için hücrelerle etkileştirilecek partikül sayısının da bir standardizasyonu olamamaktadır. Fagositik aktivitenin kontrollü olarak ölçülebilmesi için fagosite edilecek partikülün büyüklüğünün, yüzey özelliklerinin ve fagositozun ölçüm metodunun standardize edilmesi gerekir. Ancak bu şekilde fagositoz bozukluklarının tespiti her yerde pratik ve ucuz olarak yapılabilir ve karşılaştırılabilir. Böyle bir standardizasyon fagositoz kullanılarak yapılan biyoteknolojik araştırmaların da önünü açacaktır. Bu tip araştırma örnekleri literatürde vardır (Fontana et al., 2001, Walter et al., 2001; Howard et al., 2000, Wang et al., 1999).

Fagositoz ile ilacın istenilen hücreye ulaştırılması fagositik sistem hastalıklarının tedavisi için önemlidir ve özellikle antibiyotiklerin biyoparçalanır polimerlerle monositlere gönderilmesi başarılı bir biçimde gerçekleştirilmiştir (Prior et al., 2002). Ayrıca AIDS tedavisine yönelik anti-HIV oligonükleotitleri taşıyan fagositik partiküllerin makrofajlarca alınması ile ilgili çalışmalar da literatürde yerini almıştır (Akhtar et al., 1997).

Gen terapisine yönelik fagositoz çalışmaları, DNA'nın partiküller içinde serum nükleazlarından korunması nedeniyle fagositlere yönelik gen terapisi çalışmalarında tercih edilmektedir (Howard et al., 2000). Ayrıca *in vivo* uygulamalarının mümkün olması fagositoz yolu ile gen terapisinin tercih edilmesinin bir başka nedenidir.

Plazmid DNA'sı ile immünizasyon yeni ve etkili bir aşılama yöntemidir. Bu, antijenik proteinleri kodlayan plazmid DNA'sının hücre tarafından alınarak proteinin ifadesi ve immün cevabın artmasını sağlayan bir yöntemdir (Wang et al., 1999). Bu çeşit bir aşılama yönteminin diğer aşılarla göre daha avantajlı olmasını sağlayan, enfeksiyona yol açacak bir ajanın vücuda verilmiyor olması ve DNA'nın üretiminin kolay olmasıdır.

Tüm bunların yanı sıra fagositoz yapan hücrelerin tercihlerinin belirlenmesi fagositoz kullanılarak yapılan çeşitli biyoteknolojik araştırmalar için de destek niteliği taşıyacaktır. Çünkü günümüzde fagositoz pek çok biyoteknolojik araştırmada bir araç olarak kullanılmaktadır.

Bu biyoteknolojik yöntemlerde hücre içerisine istenilen maddenin gönderilmesi esastır. Hücrenin istenilen maddeyi yeterli düzeyde alabilmesi için fagositoz miktarının yüksek olması gerekmektedir. Bazen de partikül tarafından taşınan maddenin hasara uğramadan hücreye ulaştırılabilmesi için fagositoz hızının yüksek olması önem kazanır. Bu teknikler için uygun özelliklere sahip taşıyıcı partikülün seçilebilmesi için fagositlerin hangi özelliklere sahip partikülleri tercih ettiklerinin iyi bilinmesi gerekir.

Bu tercihlerin daha iyi belirlenebilmesi için başka fonksiyonel grupların da tercihlerinin belirlenmesi, fagositoz aktivitesini ölçme amacıyla ya da biyoteknolojik çalışmaların veriminin artırılması amacıyla partiküllerin hücre içine gönderilmesi çalışmalarının gelişmesini sağlayacaktır. Bu fonksiyonel gruplar hücre üzerindeki reseptörlerin varlığının tespit edilmesi amacıyla çeşitli karbonhidrat grupları olabileceği gibi, fibronektin gibi çeşitli opsonik ajanlar da olabilir.

Mikrokürelerin üzerine, fagositik çalışma amacıyla takılabilecek opsonik ajanların dışında, çeşitli hastalıkların tedavisi amacıyla nükleotit, protein gibi pek çok başka moleküller de vardır. Örneğin, otoimmün hastalıklarda vücudun kendi dokularına karşı geliştirdiği reaksiyonu baskılamak, hatta yok etmek fagositoz mekanizmasının daha iyi anlaşılması ile mümkün olabilir. Ayrıca fagositoz yolu ile yapılan gen terapi çalışmalarında değişikliğe uğrayan hücre sayısının artırılması için en fazla tercih edilen partiküllerin kullanılması yine fagositoz mekanizmasının iyi bilinmesine bağlıdır.

Benzer çalışmaların sadece monositler ve nötrofillerle değil, vücudun diğer bölgelerinde bulunan makrofajlarla da yapılması fagositoz ile ilgili çalışmalara daha fazla destek sağlayacaktır. Bunun yanında, farklı yüzey özelliklerine ve fizikokimyasal özelliklere sahip başka polimerik partiküllerin kullanılması ve biyoteknolojik çalışmalara yönelik olarak biyoparçalanır polimerlerin denenmesi, gelecek çalışmalarda fagositozun kullanıldığı araştırmalara destek niteliğinde olacaktır.

KAYNAKLAR

- Ahsan, F., Rivas, I. P., Khan, M. A., Suarez A. I. T., 2002, Targeting to macrophages: role of physicochemical properties of particulate carriers—liposomes and microspheres—on the phagocytosis by macrophages, *Journal of Controlled Release*, 79, 29–40.
- Austen, K. F., Frank, M. M., Atkinson, John, P., Cantor, H., 2001, *Samter's Immunologic Diseases*, Lippincott Williams & Wilkins, San Fransisco, CA, cpt 29.
- Ayhan, H., Tuncel, A., Bor, N., Pişkin, E., 1995, Phagocytosis of monosize polystyrene-based microspheres having different size and surface properties, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, Vol. 7, No. 4, pp. 329-342.
- Berne, RM. and Levy, M.N. 1993, *Physiology*, Mosby-Year Book, Inc., Missouri, 330-332 pp.
- Benson, H. J., Gunstream, S. E., Talaro, A., Talaro, K.P., 1988, *Complete Version Anatomy and Physiology Laboratory Text Book*, Wm. C. Brown Publishers, Iowa, 272, 273 pp.
- Bilgehan, H., 1999, *Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi (Uygulama Konuları İle)*, Fakülteler Yayınevi Barış Yayınları, İzmir, 338s.
- Celli, J.,and Finlay, B. B., 2002, Bacterial avoidance of phagocytosis, *Trends in Microbiology* Vol.10 No.5.
- Eeden, S. F. V., Klut, M.E., Walker, B. A.M.,. Hogg, J. C., 1999, The use of flow cytometry to measure neutrophil function, *Journal of Immunological Methods*, 232, 23–43.

- Esteban, M. A., Mulero, V., Muñoz, J., Meseguer J., 1998, Methodological aspects of assessing phagocytosis of *Vibrio anguillarum* by leukocytes of gilthead seabream (*Sparus aurata*L.) by flow cytometry and electron microscopy, *Cell Tissue Res*, 293:133-141.
- Fishelson, Z., Attali, G., Mevorach, D., 2001, Complement and apoptosis, *Molecular Immunology* 38, 207–219.
- Fontana, G., Licciardi, M., Mansueto, S., Schillaci, D., Giammona, G., 2001, Amoxicillin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles: Influence of PEG coating on the particle size, drug release rate and phagocytic uptake, *Biomaterials* 22, 2857-2865.
- Hampton, M. B. and Winterbourn, C. C., 1999, Methods for quantifying phagocytosis and bacterial killing by human neutrophils, *Journal of Immunological Methods* 232, 15–22.
- Horak, D., Shapoval, P., 2000, Reactive poly(glycidyl methacrylate) microspheres prepared by dispersion polymerization, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, Vol. 38, 3855-3863.
- Howard, K. A., Dash, P. R., Read, M. L., Ward, K., Tomkins, L.M., Nazarova, O., Ulbrich, K., Seymour, L. W., 2000, Influence of hydrophilicity of cationic polymers on the biophysical properties of polyelectrolyte complexes formed by self-assembly with DNA, *Biochimica et Biophysica Acta* 1475, 245-255.
- Lehmann, A. K., Sørnes, S., Halstensen, A., 2000, Phagocytosis: measurement by flow cytometry, *Journal of Immunological Methods*, 243, 229–242.
- Lehmann, A. K., Halstensen, A., Holstb, J., Bassøe, C. -F., 1997, Functional assays for evaluation of serogroup B meningococcal structures as mediators of human opsonophagocytosis, *Journal of Immunological Methods*, Vol. 200, 1-2, 55-68 pp.

- Leiro, J., Siso, M.I.G., Ortega, M., Santamarina, M.T., Sanmartin, M.L., 1995, A factorial experimental design for investigation of the effects of temperature, incubation time, and pathgen-to-phagocyte ratio on *in vitro* phagocytosis by turbot adherent cells, *Comp. Biochem. Phisol.*, Vol 112C, No. 2, pp. 215-220.
- Noyan, A., 1998, Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji, Meteksan A.Ş., Ankara, 704-705s.
- Paul, W. E., 1999, *Fundamental Immunology*, Lippincott–Raven Publishers, San Fransisco, CA, chp 30.
- Prior, S. , Gander, B., Blarer, N. , Merkl, H.P., Subira, M.L., Irache, J.M., Gamazo, C., 2002, *In vitro* phagocytosis and monocyte-macrophage activation with poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide) microspheres, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15, 197–207.
- Rembaum, A., Yen, S.P.S., Molday, R.S., 1979, Synthesis and reactions of hydrophilic functional microspheres for immunological studies, *J. Macromol. Sci. Chem. A* 13(5): 603-632.
- Rittig, M. G., Wilskea, B., Krauseb, A., 1999, Phagocytosis of microorganisms by means of overshooting pseudopods: where do we stand? *Microbes and Infection*, 1, 727-735.
- Rittig, M. G., Burmester, G. , Krause, A., 1998, Coiling phagocytosis: when the zipper jams, the cup is deformed, *Trends in Microbiology*, 384 vol. 6 No. 10.
- Sharon, N., 1987, Bacterial lectins, cell-cell recognition and infectious disease, *Federation of European Biochemical Societies Letters*, Volume 217, number 2,145-157pp.
- Shiho, H.and DeSimone, J.M., 2001, Dispersion Polymerization of Glycidyl Methacrylate in Supercritical Carbon Dioxide, *Macromolecules*, 34, 1198-1203.

Sirahama, H., Shikama, T., Suzama, T., 1989, Participation of electrolyte cations in albumin adsorption on to negatively charged polymer lattices, *Colloid & Polymer Science*, 267: 587-594.

Silva, J.R.M.C., Peck, L., 1999, Induced *in vitro* phagocytosis of the Antarctic starfish *Odontaster validus*(Koehler 1906) at 0°C, *Polar Biol*, 23: 225-230.

Terziođlu, M., akar, L., Yiđit, G., 1982, *Fizyoloji Pratik Kitabı*, İstanbul Üniversitesi Cerrahpařa Tıp Fakóltesi Yayınları, İstanbul, 90 s.

Walter, E., Dreher, D., Kok, M., Thiele, L., Kiama, S. G., Gehr, P., Merkle, H. P., 2001, Hydrophilic poly(DL-lactide-co-glycolide) microspheres for the delivery of DNA to human-derived macrophages and dendritic cells, *Journal of Controlled Release* 76, 149–168.

Wang, D., Robinson, D. R., Kwon, G. S., Samuel, J., 1999, Encapsulation of plasmid DNA in biodegradable poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres as a novel approach for immunogene delivery, *Journal of Controlled Release* 57, 9–18.

Zhang, S., Huang, X., Yao, N., Horvath, C., 2002, Preparation of monodisperse porous polymethacrylate microspheres and their application in the capillary electrochromatography of macrolide antibiotics, *Journal of Chromatography A*, 948, 193–201.

ÖZGEÇMİŞ

- Adı-Soyadı** : Ayşe Gümrükçüoğlu
- Dođum Yeri** : Ankara
- Dođum tarihi** : 13.08.1979
- Medeni durumu** : Bekar
- İş adresi** : Hacettepe Üniversitesi Fen Fakóltesi Biyoloji Bölümü Beytepe 06532 Ankara (tel: 297 64 40)
- E-Mail** : ayseg@hacettepe.edu.tr
- Web Site** : <http://yunus.hacettepe.edu.tr/~ayseg>
- Yabancı dili** : İngilizce
- Eğitim durumu** : 1995-1996: Ayrancı Lisesi, Ankara
1996-2000: Lisans, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakóltesi Biyoloji Bölümü.
2000- :Yüksek Lisans, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Görev durumu** : 2000- : Araştırma görevlisi, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakóltesi Genel Biyoloji Anabilim Dalı.
- Bilimsel araştırma tecrübesi** : Elektroantenogram (EAG) kaydı ile böceklerin kokulara verdikleri elektrofizyolojik tepkilerin araştırılması. Kimyasal maddelerin damar

kontraktilitesi ve sinir aksiyon potansiyeli üzerine etkilerinin kaydedilmesi. Fagositoz aktivitesinin ölçülmesi.

Bilimsel Çalışmaları : Uluslararası dergilerde yayınlanmış 5 adet, ulusal ve uluslararası sempozyumlarda sunulmuş 3 bildiri.

I. BİLİMSEL ÇALIŞMALARI ve YAYIN LİSTESİ

A. Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler :

1. Onur, M.A., Taşman, F., Çehreli, Z. C., **Gümrükçüoğlu, A.**, "Effect of a Fifth Generation Bonding Agent on Vascular Responses in Rats", *Journal of Endodontics*, 26, 7, 407-410 (2000)
2. Taşman, F., Çehreli, Z. C., Onur, M.A., **Gümrükçüoğlu, A.**, "Effect of Different Single-Bottle Dentin Adhesives on Vascular Responses in Rat Carotid Artery", *American Journal of Dentistry*, 13, 6, 289-348 (2000)
3. Onur, M.A., Çehreli, Z. C., Taşman, F., **Gümrükçüoğlu, A.**, "Neurotoxic Effects of Fifth Generation Dentin Adhesives on Rat Sciatic Nerve", *Journal of Endodontics* Nov;27,11:676-8 (2001)
4. Çehreli, Z. C., Onur, M.A., Taşman, F., **Gümrükçüoğlu, A.**, "Vascular Response of Current and Potential Dental Etchants", *Journal of Endodontics* 28 ,2,: 72-75 (2002)
5. Çehreli, Z. C., Onur, M.A., Taşman, F., **Gümrükçüoğlu, A.**, Artuner, H., "Effects of Current and Potential Dental Etchants on Compound Nerve Action Potentials", *Journal of Endodontics* 28, 3,149-151 (2002)

B. Ulusal ve uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiri ve posterler:

1. Onur, M. A., Çehreli, Z. C., Taşman, F., Gümrükçüoğlu, A., "Dentin adesivlerin pulpadaki bileşik sinir aksiyon potansiyelleri üzerine etkileri", *Türk Pedodonti Derneği XII. Ulusal Kongresi*, 23, Bodrum, 2001
2. Çehreli, Z. C., Onur, M. A., Taşman, F., Gümrükçüoğlu, A., "Dental Asitlerin Pulpa Ekspozuyla Gelişen Kanama Karşısındaki Hemostatik Etkilerinin İncelenmesi", *Türk Pedodonti Derneği XII. Ulusal Kongresi*, 43, Bodrum, 2001
3. Çehreli, Z. C., Onur, M. A., Taşman, F., Gümrükçüoğlu, A., and Alaoğlu, E. "Effect of self-etching primers on vascular responses in rat carotid artery", International Association of Dental Research/American Association of Dental Research 80th General Session 1809, San Diego, March 6-9, 2002

C. Projelerde Yaptığı Görevler

1. Drosophila Melanogaster'de Koku Alma İle İlgili Davranışların Genetik Analizi ve Fizyolojik Ölçümü, TÜBİTAK projesi, TBAG-1661 (197 T 095), **Yardımcı Araştırmacı**, 2000
2. *Hücre Kültürü ve Transgenik Hayvan Laboratuvarı Kurulması*;, Hacettepe Üniversitesi Araştırma Fonu Gündümlü projesi, 09.02.2001, 2001/5 **Yardımcı Araştırmacı**, çalışma devam etmektedir.
3. Buthus sp. Akrep Venomunun Saflaştırılması, Karakterizasyonu ve Fizyolojik Etkilerinin İncelenmesi, TÜBİTAK Projesi, TBAG-2095 (101 T 134), 2002, **Yardımcı Araştırmacı**, çalışma devam etmektedir.

D. Görev Aldığı Sempozyum ve Toplantılar :

1. XI. Uluslararası Biyoloji Olimpiyatı Öğrenci Rehberliği, Antalya, 2000
Temmuz

II. EĞİTİM-ÖĞRETİM FAALİYETLERİ

Görev Yaptığı Laboratuvarlar:

Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü:

1. Fizyoloji I (Ders kodu: BİO 305, Ders kredisi: 4, Ders statüsü: Lisans)
2000-2002 Güz s0mestiresi (4 saat pratik /hafta)
2. Fizyoloji II (Ders kodu: BİO 306, Ders kredisi: 4, Ders statüsü: Lisans)
2001-2002 Bahar s0mestiresi (4 saat pratik /hafta)
3. Deney Hayvanları (Ders kodu: BİO 334, Ders kredisi:2, Ders statüsü:
Lisans)
2001-2002 Bahar s0mestiresi (3 saat pratik /hafta)

III. KATILDIĞI DİĞER ORGANİZASYONLAR

1. 1996-1999 Hacettepe Üniversitesi, Dağcılık ve Doğa Sporları Kulübü
Üyeliđi
2. 2000 Eylül, Fransız Dili ve Edebiyatı Bölümü ve Fransız Kültür
Derneği'nin düzenlediđi "Quand le scién rejoint l'art" adlı serginin
bilimsel çevirmenliđi
3. 2001-...Hacettepe Üniversitesi Dađ Bisikleti Kulübü Akademik
Danışmanlığı