

**POLİGLİSİDİL METAKRİLAT MİKROKÜRELERE ANTİ
C-REAKTİF PROTEİN İMMOBİLİZASYONU VE TANI
AMAÇLI KULLANIMI**

**ANTI C-REACTIVE PROTEIN IMMOBILIZATION ONTO
POLYGLYCIDIL METHACRYLATE MICROSPHERES AND
IT'S USE FOR DIAGNOSIS**

ERİNÇ OZAN

Hacettepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK MÜHENDİSLİK TEZİ
Olarak hazırlanmıştır.

2005

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI 'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan :.....

Prof. Dr. Süleyman Ali Tuncel

Üye :.....

Doç. Dr. Mehmet Ali Onur

Üye (Danışman) :.....

Doç. Dr. Hakan Ayhan

ONAY

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

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

Prof.Dr. Ahmet R. ÖZDURAL
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

POLİGLİSİDİL METAKRİLAT MİKROKÜRELERE ANTİ C-REAKTİF PROTEİN İMMOBİLİZASYONU VE TANI AMAÇLI KULLANIMI

Erinç OZAN

ÖZ

Sunulan bu çalışmanın amacı; ticari örneklerine alternatif olmak üzere c-reaktif proteinin tanısında kullanılacak, polimerik taşıyıcı bazlı bir diagnostik test kitinin geliştirilmesidir. Çalışmanın ilk bölümünde monodispers PGMA (poliglisisidilmetakrilat) partikülleri; GMA (glisidilmetakrilat) monomerinin etanol dağıtma ortamında başlatıcı olarak AIBN (azobisisobutironitril) ve stabilizör olarak PAA (poliakrilikasit) varlığında dispersiyon polimerizasyonu ile sentezlenmiştir. Sentezlenen PGMA mikrokürelerin boy ve boy dağılımlarının saptanması için taramalı elektron mikroskopu (SEM) kullanılmış, elde edilen fotoğraflardan mikroküreler sayılarak sayıca ortalama çap (D_n) 1,166 μm , ağırlıkça ortalama çap (D_w) 1,166 μm , ve polidispersite indeksi (PDI) 1.000 olarak hesaplanmıştır. Gravimetrik yöntemle tayin edilen %88,67 (%ağırlık) değeri ise toplam monomer dönüşüm oranının yeterince yüksek olduğunu göstermektedir. Karakterizasyon sonuçlarına göre polimerizasyon reçetesinin başarıyla kullanılabileceği öngörülmüştür. Çalışmanın ikinci bölümünde, karakterizasyonu yapılan mikroküreler, C-reaktif protein tanısında, anti-human C-reaktif protein immobilizasyonunda taşıyıcı partikül olarak kullanılmıştır. Immobilizasyonda, taşıyıcıya bağlama yönteminin adsorpsiyon ve kovalent bağlama metotları denenmiştir. Kovalent bağlanma metodunda uzatma kolu (spacer-arm) olarak çift fonksiyonel bir reaktif olan glutaraldehit kullanılmıştır. Modifiye Lowry toplam protein tayini ile elde edilen “immobilize antijen miktarları” ve hasta serumu ile yapılan çökeltme testleri sonuçlarına göre adsorpsiyon yönteminin tamamıyla kullanışsız, bunun yanında kovalent bağlama metodunun glutaraldehit varlığında daha uygun olduğu saptanmıştır. Mikrokürelere bağlanacak antijenin immobilizasyon çalışmaları sonucunda optimum koşullar; başlangıç glutaraldehit derişimi %2, immobilizasyon pH'ı 7.4, immobilizasyon sıcaklığı 25°C, immobilizasyon süresi 90 dak. ve başlangıç antijen derişimi 1 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. Çalışmanın son aşamasında ise, hazırlanan anti-human C-reaktif protein immobilize mikroküreler, hasta serumlarından alınan örneklerle in-vitro ortamda etkileştirilerek çökeltme deneyleri yapılmıştır. Bu çalışmalar sonunda çökeltme şiddetlerine göre en yüksek skorlara sahip kitler belirlenerek seçilmiştir. Bu seçilen kitler ve ticari CRP tanı kitleri, seri olarak seyreltilerek hazırlanan hasta serumları ile etkileştirilerek kıyaslanmıştır. Bu kıyaslama sonuçlarına göre hazırlanan kitlerin performansları saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: CRP, polimerik mikroküreler, antijen immobilizasyonu, tanı kitleri.

Danışman: Doç.Dr. Hakan AYHAN, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Kimyasal Teknolojiler ABD.

ANTI C-REACTIVE PROTEIN IMMOBILIZATION ONTO POLYGLYSIDIL METHACRYLATE MICROSPHERES AND IT'S USE FOR DIAGNOSIS

Erinç OZAN

ABSTRACT

The aim of this study is to develop a test kit for diagnose of C-reactive protein (CRP) as an alternative to commercial kits. The diagnostic test kit to be developed is propped as an polymeric carrier based test kit. In the first step of the submitted study, PGMA (polyglysidilmetacrylate) particles were synthesized by dispersion polymerization method from the GMA (glysidilmethacrylate) monomer, dissolved in an ethanol medium, by using AIBN (asobisisobutyronitrile) as initiator and PAA (polyacrylicacid) as stabilizer. Size and size distribution of the synthesized microspheres were determined by SEM (scanning electron microscope). By counting the particles from the obtained photographs the following results were calculated: average diameter by number (D_n); 1,166 μ m, average diameter by weight (D_w); 1,166 μ m, polydispersity index (PDI); 1,000. The calculated monomer transformation value (%88,67 by weight), which was determined by gravimetric methods, indicates that the total monomer transformation rate is satisfactory. The obtained characterization results supported that the formulation could be used succesfully. In the second step of the study, the characterized particles were used as micro-carriers for the immobilization of the anti-human CRP aiming the diagnosis of CRP. For the immobilization process, adsorption and the covalent binding methods of the binding onto a carrier technique has been applied. Glutaraldehyde, a bifunctional reactive, has been used as the spacer arm in the covalent binding method. The "immobilized antigen amount" results obtained from The Modified Lowry total protein analysis and the agglutination results obtained from the patient serums stated that the adsorption method is totally useless however with the presence of glutaraldehyde, the covalent binding method seems to be favorable. The optimum conditions found at the end of the experiments for the antigen to be immobilized onto the surface-modified microspheres are: inital glutaraldehyde concentration; %2, immobilization pH; 7.4, temperature of immobilization medium; 25°C, immobilization time 90 min. And initial antigen concentration; 1 μ g/ml. For the last step of this study, agglutination tests have been done under in-vitro conditions with the anti-human CRP immobilized microspheres and the samples from patient serums. By referring to the agglutination intensity scores, the kits resulting the most intense agglutination have been chosen. These chosen kits were compared with the commercial CRP diagnostic kits used widespreadly by reacting with patient serums preparede by serial dilution. The performances of the synthesized kits were determined by these comparison tests.

Keywords: CRP, polymeric microspheres, antigen immobilization, diagnostic kits.

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Hakan AYHAN, Hacettepe University, Chemical Eng. Dept., Chemical Technology Division.

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden her fırsatta yararlanmama olanak sağlayan değerli hocam danışmanım sayın Doç. Dr. Hakan Ayhan'a; tezimin yürütülmesindeki desteklerinden ve dostane yaklaşımlarından ötürü derin saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamdaki değerli katkılarından dolayı Prof. Dr. Süleyman Tuncel'e,

Tez çalışmalarımın belirli bir kısmında bilgi ve imkanlarından yararlandığım Ar. Gör. Begüm Elmas'a ,

Yardım ve tecrübesi ile laboratuvar çalışmalarımı kolaylaştıran arkadaşım Murat Demirbilek'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca yardımını hiçbir zaman esirgemeyen arkadaşım Ar. Gör. Osman Okur'a,

Hayatımın bu aşamasında, gücümü kaybettiğim anlarda sevgi ve dostluklarını her zaman hissettiren arkadaşlarım Esra Özdemir'e, Sezin Ertan'a, Ceren Topçular'a ve Ayşegül Arslan'a,

Tez çalışmamda emeği geçen bütün Kimya Mühendisliği hocaları, öğrencileri ve çalışanlarına,

Tezimin gerçekleştirilmesinde benimle birlikte tüm sıkıntılara katlanarak büyük destek ve sabır gösteren Didem Erdoğan'a,

Beni her zaman ve her koşulda özveriyle, güvenle destekleyip, bu duruma gelmemi sağlayan sevgili annem ve babama,

en içten minnet ve şükran duygularımla sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ VE ARAŞTIRMANIN AMACI.....	1
2. TEMEL BİLGİLER.....	3
2.1 Antijen ve İmmunojenler.....	3
2.1.1 Antijenik Determinantlar: Epitoplar.....	3
2.1.2 Antikor Molekülü.....	4
2.1.2.1 Antikor Afinitesi ve Aviditesi.....	4
2.1.3 Antikor-Antijen Etkileşimi.....	6
2.1.3.1 Sterik Yerleşme.....	7
2.1.3.2 Antikor-Antijen Etkileşimlerindeki Kuvvetler.....	7
2.1.3.3 Katı-faz reaksiyonlarında Antikor Afinitesinin Rolü.....	9
2.2 ELISA.....	9
2.3 İmmunoesseyler.....	10
2.3.1 Radio-işaretleyiciler Kullanan İmmunoesseyler.....	11
2.3.2 İmmuno-floresans Yöntemleri.....	12
2.3.3 İmmuno-peroksidaz Yöntemleri.....	13
2.3.4 Kemiluminesans İmmunoessey.....	14
2.4 Polimerizasyon Prosesleri.....	15
2.5 Polimerik Taşıyıcıların Biyomedikal Alanda Kullanımı.....	19
2.5.1 Uygulamam Alanları.....	20
2.5.2 Mikroküreler.....	21
2.6 C-Reaktif Protein.....	22
3. DENEYSEL YÖNTEMLER.....	24
3.1 PGMA Partiküllerin Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu.....	24
3.2 PGMA Partiküllere Antijen İmmobilizasyonu.....	26
3.2.1 Yüzey Modifikasyonu.....	27
3.3. Optimum Koşulların Tayini.....	28
3.3.1 Gluteraldehit Derişiminin Etkisi.....	28
3.3.2 pH Etkisi.....	29

3.3.3 Sürenin Etkisi.....	29
3.3.4 Sıcaklık Etkisi.....	30
3.3.5 Başlangıç Antijen Derişiminin Etkisi.....	30
3.4 Antijen İmmobilize Partiküllerin Hasta Serumı ve Pozitif Kontrol İle Testleri...	31
3.5 Modifiye Lowry Toplam Protein Tayin Yöntemi.....	33
4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞILMASI.....	36
4.1 PGMA Partiküllerin Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu.....	36
4.2 PGMA Partiküllere Antijen İmmobilizasyonu.....	38
4.2.1 Yüzey Modifikasyonu.....	40
4.2.1.1 Amin Modifiye Partiküllere İmmobilizasyon.....	40
4.2.1.2 Gluteraldehit Modifiye Partiküllere İmmobilizasyon.....	40
4.3 Optimum İmmobilizasyon Koşulları.....	42
4.3.1 Gluteraldehit Derişiminin Etkisi.....	42
4.3.2 pH Etkisi.....	44
4.3.3 İmmobilizasyon Süresinin Etkisi.....	45
4.3.4 Sıcaklık Etkisi.....	46
4.3.5 Başlangıç Antijen Derişiminin Etkisi.....	47
4.4 Antijen İmmobilize Partiküllerin Hasta Serumı ve Pozitif Kontrol İle Testleri...	49
5. SONUÇLAR.....	55
6. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	57
ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Antikor affinitesi ve aviditesi.....	5
Şekil 2.2. Antijen-antikor birleşmelerinde yer alan tamamlayıcı grupların dağılımı ve sterik yerleşmeyi etkileyen faktörlerin şematik gösterimi.....	7
Şekil 2.3. Özgül sorbentlerin hazırlanması.....	20
Şekil 2.4. CRP'nin 5 farklı bağlanma bölgesi.....	23
Şekil 3.1. Kullanılan PAA stabilizörünün kimyasal yapısı.....	24
Şekil 3.2. Kullanılan başlatıcı AIBN kimyasal yapısı.....	25
Şekil 3.3. Kalibrasyon grafiği.....	35
Şekil 4.1. GMA monomerinin kimyasal yapısı ve aktivasyon reaksiyonları.....	37
Şekil 4.2. AIBN-PAA sisteminde elde edilen PGMA partiküllere ait SEM fotoğrafı.....	38
Şekil 4.3. Yüzeyi gluteraldehit modifiye taşıyıcı miktarı ile immobilizasyon yüzdesi değişimi.....	41
Şekil 4.4. Gluteraldehit derişiminin immobilizasyon verimine etkisi.....	43
Şekil 4.5. Ortam pH'ının immobilizasyon verimine etkisi.....	44
Şekil 4.6. İmmobilizasyon süresinin immobilizasyon verimine etkisi.....	46
Şekil 4.7. Ortam sıcaklığının immobilizasyon verimine etkisi.....	47
Şekil 4.8. Başlangıç antijen derişiminin immobilizasyon verimine etkisi.....	49
Şekil 4.9. Tanı amaçlı çökelme reaksiyonunun gerçekleştiği slayt kartın optik fotoğrafı.....	50
Şekil 4.10. Gerçekleştirilen çökelme reaksiyonunun optik fotoğrafı.....	51
Şekil 4.11. 3-4 kodlu kitin 9,2 mg/L CRP konsantrasyonundaki serum ile etkileşiminin optik fotoğrafı.....	51
Şekil 4.12. Sentezlenen 3-4 kodlu kit ve ticari CRP kitinin konsantrasyonu 9,2 mg/l CRP olan hasta serumu ile etkileşiminin optik fotoğrafı.....	52

SİMGELER VE KISALTMALAR

CRP	C-Reaktif Protein
PC	Fosfokolin
BSA	Bovin Serum Albumin
IgG	İmmunoglobülin G
IgM	İmmunoglobülin M
IgA	İmmunoglobülin A
Ab	Antikor
Ag	Antijen
AbAg	Antikor Antijen Kompleksi
k_a	Oluşum reaksiyonu hız sabiti
k_b	Bozunma reaksiyonu hız sabiti
K	Denge sabiti
ELISA	Enzim Bağlı İmmunosorbent Essey
IRMA	İmmunoradiometrik Essey
RIA	Radioimmunoessay
HRP	Horseradish Peroksidaz
DAB	Diaminobenzidin
μm	Mikrometre
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
PHEMA	Poli(2-hidroksietil)metakrilat
SAP	Serum Amiloid P
GMA	Glisidil Metakrilat
PGMA	Poliglisidilmetakrilat
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopu
PAA	Poliakrilik asit
AIBN	Azobisisobutyronitril
cpm	Dakikadaki Vuruş Sayısı
GA	Glutaraldehit
RF	Rheomatoid Faktör
CTC	Bakır Tartarat Karbonat
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
DOC	Sodyum Deoksikolat
TCA	Trikloro Asetik Asit

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Biyo-malzemelerin uygulamaları.....	20
Çizelge 3.1. Reaktif monodispers PGMA partiküllerin dispersiyon polimerizasyon koşulları.....	25
Çizelge 3.2. Serum ve pozitif kontroller ile yapılan deneylerde kullanılan partiküllerin tanımları.....	32
Çizelge 3.3. Serum ve pozitif kontroller ile yapılan deneylerde kullanılan skorlama tanımları.....	33
Çizelge 4.1. Reaktif monodispers PGMA partiküllerin dispersiyon polimerizasyon sonuçları.....	38
Çizelge 4.2. Sentezlenen kitlerin Hasta Serumu ve pozitif kontroller ile etkileşim sonuçları.....	53

1. GİRİŞ ve ARAŞTIRMANIN AMACI

Hastalıkların teşhis, tedavi ve izlenmelerinde kullanılan rutin metotlar içerisinde immunokimyasal reaksiyonlar önemli yer tutmaktadır. İmmunokimyasal metotlarda antijen veya antikor bağlı partiküllerle onların eşleniği olan antikor veya antijen arasındaki reaksiyon izlenir (Newman et al. 1992).

Birçok inert partikül; örneğin eritrositler, bakteriler veya polimerik lateksler destek malzemesi olarak kullanılmaktadır (Singer ve Plotz 1956). Partikül esaslı testlerde slayt, kart, tüp veya mikrotitreli plaklar kullanılmaktadır. Slayt ve kart testleri birkaç dakika içerisinde gerçekleşirken, tüp veya mikrotitreli plaklarda sonuç birkaç saat içinde alınmaktadır. (Grundy et al. 1993)

Enzim immunoassay kitlerinden 20 kez daha az hassas olmasına rağmen (Gosling 1990, Lim et al. 1989, Nilsson 1990) kart bazlı aglütinasyon testleri hızlı, basit ve maliyeti az (Galvin 1983, Greenberg 1995) olduğu için rutinde kullanılan ve gittikçe popülerliği artan metotlardır.

C-Reaktif protein (CRP) klasik bir akut faz proteinidir. Yetişkin ve sağlıklı bireyler için normal serum değeri 6 mg/l'dir. Benzer akut faz proteinlerinden farkı herhangi bir akut faz stimülasyonuna çok daha kısa sürede ani ve şiddetli tepki verebildiği için çok daha hassas ve güvenilirdir.

Tillet ve Francis ilk kez 1930 yılında akut pneumococcus enfeksiyonu geçiren bir hastadan C-Reaktif Protein'i (CRP) izole etmişlerdir (Gewurz et al. 1982). C-reaktif protein, enfeksiyon veya doku iltihaplanmasında serum konsantrasyonu artan hepatik orjindeki heterojen protein gruplarına sahiptir (Agrawal et al. 1992).

CRP'nin en önemli metabolik fonksiyonu; yabancı hücrelere yapısındaki kalsiyum ve aracı olarak da fosfokolin (PC) yardımıyla tutunması ve klasik yöntemle bu yabancı hücrelerden kurtulmasıdır. PC'nin patojenlerin yapılarının önemli maddelerinden biri olması CRP'nin geniş bir patojenik hedef topluluğunun bulunmasını sağlar.

C-Reaktif protein teşhisinde, anti-human C-Reaktif protein antikor bağlı partiküller ile C-Reaktif protein antijen arasındaki immunolojik reaksiyondan faydalanılır. Bu reaksiyon sonucunda immunoprotein kaplı polimer partiküllerin çökmesi beklenir.

Literatürde de belirtildiği gibi daha önce yapılmış benzer çalışmalarda C-reaktif proteinin tayininde enzim bazlı veya mikroküre bazlı yöntemler kullanılmıştır. Enzim bazlı tayin yönteminde CRP, Bovin Serum Albumin (BSA)'ya bağlı

fosfokolin veya $F(ab')_2$, mikroküre bazlı tayin yönteminde ise polimerik taşıyıcıya bağlı BSA, IgG veya $F(ab')_2$ kullanılmıştır. Mikroküre bazlı tayin yöntemlerinde yüzey modifikasyonu tamamlanmış polistiren mikroküreler kullanılmıştır (Alvarez et al., 1997, Doyle et al., 2002). Taşıyıcı olarak glutaraldehit ile aktifleştirilmiş aljinat-kitosan mikrokürelere anti-hapten IgG immobilize edilerek C-reaktif protein tayini için kullanılmıştır (Albarghouthi et al., 2000).

IgG veya $F(ab')_2$ kaplı polistiren mikroküreler immunoessay kullanımlarında yeterince kararlı kalamamaktadırlar. Bunu önlemek için immobilizasyon öncesi yüzey aktif maddelerle modifikasyon denenmesi önerilmiştir ancak bu tür bir modifikasyon daha sonra immobilize edilen proteinlerin desorpsiyonuna neden olmaktadır (Molina-Bolivar et al., 1997).

Bu bağlamda sunulan araştırmanın temel hedefi; CRP teşhisinde ticari örneklerine alternatif olmak üzere, anti human C-Reaktif proteininin sentezlenen monodispers poli(glisidilmetakrilat) (PGMA) mikrokürelere immobilizasyonu ve bu immobilizasyonun optimizasyonu ile tanı amaçlı kullanımıdır.

Bu amaçla dispersiyon polimerizasyonu yöntemi kullanılarak sentezlenen monodispers poli(glisidilmetakrilat) PGMA partikülleri tanısı yapılacak C-Reaktif proteinin antijeni olan anti-human C-Reaktif proteini için mikrot taşıyıcı olarak kullanılmıştır. Immobilize edilecek antijen olarak anti-human CRP seçilmiş ve immobilizasyon koşullarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Son adımda ise, mikrokürelere antijen immobilizasyonu ile üretilen kitler hastalardan alınan serum örnekleri ile etkileştirilerek sentezlenen kitin performansı test edilmiştir.

2. TEMEL BİLGİLER

2.1. Antijen ve İmmunojenler

Antijenin geleneksel anlamı; spesifik bağışıklık sistemi tepkisi yaratan her moleküldür. Bu tepki antikor üretimi, hücresel bağışıklık sistemi tepkisi ya da toleransı olabilir. Aynı zamanda mikroorganizmaların ya da hücrelerin immunoessaylerde antikor için kompleks hedef olarak kullanıldıklarında yaygın olarak bu şekilde isimlendirilirler. Antikor üretimine neden olan moleküllerle antikorlar için hedef olan molekülleri ayırt etmek için ilkinde immunojen ikinci türe de antijen denilmektedir.

Bir molekülün immunojen olabilmesi için belirli bir derecede yapısal kompleksliğe sahip olması gerekir. Doğal immunojenler genellikle protein veya karbonhidrat içeren ve molekül ağırlıkları 1000'den fazla ve genellikle 5000'in üzerinde olan makro moleküllerdir. Yüksek derecede immunojenik moleküllerin ağırlıkları 100000'dir. Sentetik polipeptidler ve diğer copolimerler bahsedilen özellikleri karşılayabildiklerinde immunojen olabilirler. Aromatik gruplar, steroidler ve peptidler öncelikle daha büyük taşıyıcı moleküllere bağlanırsa buralarda spesifik bağışıklık tepkisine neden olabilirler. İmmunojen etkisi aynı zamanda molekülün bağışıklık tepkisi yaratan sisteme ilgisi ya da yabancılık derecesi ile ilgilidir. Sistemle yakın ilgisi olan doğal moleküllere daha düşük derecede tepki verilir.

2.1.1. Antijenik Determinantlar: Epitoplar

Bunlar antijenler ve immunojenler üzerindeki 3-boyutlu bölgelerdir. Bağışıklık sisteminin tepkisi ortaya çıktığında limfositin affinite gösterdiği ve antikorların bağlanma gruplarının spesifik olarak tutundukları bölgelerdir. Bir anti serum içinde poliklonal etki neticesinde bulunabilecek birden fazla antikor çeşidine karşılık kompleks antijenler bir grup değişken antijen determinantlara sahiptir. Her bir determinant boyutu yaklaşık 4-6 aminoasit büyüklüğündedir, ancak determinantlar tarafından oluşabilecek şekil ve yük dağılımı kombinasyonları çok fazladır. Oluşan bu determinant kombinasyonlarına karşılık antikor tepkisi de çok değişken olabilmektedir. Yalnızca tek bir determinant seviyesinde bile bir araya gelen antikor klonları değişken affinitelere sahip heterojen bir karışım oluştururlar.

2.1.2. Antikor Molekülü

Antikor molekülü, karşısındaki antijenle birleşebilen çok seçici özellikte bir protein molekülüdür. Dolaşımdaki antikorlar globulin halindedir (immunoglobulin)

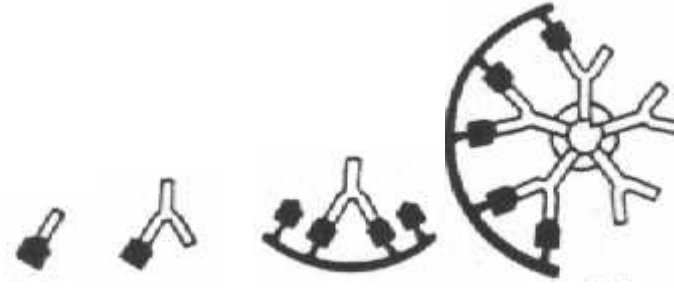
ve geniş bir elektroforetik hareketlilikleri vardır. IgG, IgM, IgA diye tanımlanabilecek genel sınıflara ayrılırlar. En fazla çalışılan antikor molekülleri 6S γ -globulin türüdür (IgG immunoglobülin) ve bu moleküller 150,000-160,000 dalton ağırlığındadır. Molekül benzer görünen 2 parçadan oluşur. Her bir yarım parçayı 2 polipeptid zinciri oluşturmaktadır. Bunlar 55,000-60,000 dalton molekül ağırlığındaki “ağır zincir” ve diğeri de 20,000-24,000 dalton molekül ağırlığındaki “hafif zincir”. Zincirler disülfid bağları ve kovalent olmayan etkileşimlerle birarada tutunmaktadırlar.

6S antikor molekülünde antijenik gruplarla birleşebilen 2 bölge vardır. Her iki birleşim bölgesi de aynı antijenik gruplara doğru yönelmiş durumdadır. Molekül, serbest haldeyken daha yoğun durumda ve büyük bir antijen molekülü ile birleştiğinde ise genişletilmiş yapıdadır.

2.1.2.1. Antikor Afinitesi ve Aviditesi

Antikor afinitesi, tek bir antikorun üzerindeki bağlayıcı bölge ile buna karşı gelen antijenik determinant veya epitop arasındaki birincil etkileşimin kuvvetini belirtir. Bu durum termodinamik olarak açıklanırsa; algılayıcı (bağlanma bölgesi) ile ligandın (determinant) yakın mesafedeki kovalent olmayan etkileşimlerinin kuvvetidir (enerji). Matematik alanında, afinite ($K, l/mol$) şeklinde belirtilebilecek bir sabit katsayı olarak tanımlanabilir. Bu katsayının hesaplanabilmesi için ligandın homojen bir bağlanma bölgesi kaynağı ile geri dönüşümlü etkileşiminin dengeye ulaşması gerekmektedir. Çoğu antikor uygulamalarının afinitesi tek bir antijen determinantına karşılık heterojen olduğundan, türetilen bağlanma sabiti ortalama bir değeri temsil etmektedir. Antijen üzerindeki birçok determinanta karşılık spesifiklik afinite olarak tanımlanamaz. Ancak, bu spesifiklik karşılaştırılarak belirli bir tür antijene karşılık genel bağlanma karakteristiği tanımlanabilir. Seçilen kontrol sistemindeki “toplam reaksiyon kuvveti” olan bu karakteristik özellik antikorların aviditesini belirtir. Avidite terimi ise henüz termodinamik olarak kesin bir şekilde tanımlanamamıştır ve birçok değişik anlam yüklenmiştir. Avidite, belirli bir testteki antikorların performansını tanımlayan son derece fonksiyonel bir terimdir. Bazı durumlarda afinite yerine kullanılmaktadır, ancak genelde antikorların antijenler ile kararlı kompleks oluşturabilme yeteneği olarak tanımlanır. Avidite, büyük oranda afinite ile belirlenir, ancak hem antikor hem de antijen değerliğine bağlı olduğu gibi, antikor heterojenliği, net yük ve esneklik gibi birincil bağlanma reaksiyonundan bağımsız özelliklerle de değişebilir. Bu yüzden *gerçek afinite* terimi tek bir antikor bağlayıcı bölge ile tek bir antijenik determinant arasındaki birincil etkileşimini, *fonksiyonel afinite* terimi ise bir esseyin tümündeki antikorlar ile antijenler arasındaki etkileşimi tanımlamak için kullanılabilir (Şekil 2.1). Çoklu

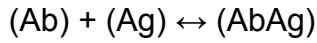
bağlanma, denge sabitinde tekli bağlanmaya göre bir artış sağlar. Örneğin; IgM antikorlarının bir antijenle çoklu bağlanabilme özelliğinden dolayı fonksiyonel affiniteleri yüksek olabilir, ancak gerçek affinitesi düşüktür.



ANTİKOR	Fab	IgG	IgG	IgM
Etkili antikor değeri	1	1	2	en fazla 10
Antijen değeri	1	1	n	n
Denge sabiti	10^4	10^4	10^7	10^{11}
Bağlanma tanımı	$\frac{\text{affinite}}{\text{gerçek affinite}}$		$\frac{\text{avidite}}{\text{fonksiyonel affinite}}$	

Şekil 2.1. Antikor affinitesi ve aviditesi.

Antikorla antijen etkileşimler geri dönüşümlü reaksiyonlardır.



Burada (Ab) antikor, (Ag) serbest antijen, (AbAg) antijen antikor kompleksi ve k_a ve k_d sırasıyla oluşum ve bozunma sabitleridir. Denge durumunda, kompleks oluşum hızı, bozunma hızıyla eşitlenecek ve bu durumda denge sabiti (K) kompleksin serbest reaktiflere oranı ile hesaplanabilecektir.

$$K = \frac{(AbAg)}{(Ab).(Ag)} = \frac{k_a}{k_d}$$

K, bu durumda affinitelerin miktarıdır ve kompleks oluşumu arttıkça artacaktır.

Üretilen antikorun immun cevabından itibaren giderek arttığı bilinmektedir. Ayrıca buna bağlı antikorun kalitesinde de zamanla değişiklik gözlenmektedir. Buna göre immun cevabın sonlarına doğru üretilen antikorların antijene daha hızlı bağlanması ve daha az bozunabilir kompleks oluşturması antikor affinitesinin (affinite olgunlaşması) zamanla artmasıyla açıklanabilir.

2.1.3. Antikor-Antijen Etkileşimi

Bir antijen molekülü antikor molekülü ile birleştğinde bu moleküllerin bir arada tutulması yeterli bağlanma enerjisinin bulunmasına bağlıdır. Birçok immunolojik reaksiyon koşullarında, pH 7-8, antikorlar negatif yüklüdür. Aynı

şekilde yaklaşık bütün protein antijenleri de negatif yüklüdür. Buna göre bağlanma enerjisi Coulomb kuvvetlerinin etkisini aşacak derecede yeterli olmalıdır.

Antikor molekülü ile antijen molekülü birleştiğinde moleküller arasında kovalent kimyasal bağ oluşmaz. Bunun yerine bağlanma enerjisi için 2 kaynak vardır. Birincisi, atom, iyon ve moleküller arasındaki nispeten zayıf spesifik olmayan çekim kuvvetleridir. İkincisi ise dışsal kuvvetlerden doğan ve solventin antikor ve antijeni iterek birbirlerine yakınlaştırdığı kuvvetlerdir. Oluşan kuvvetler; a) yük etkileşimleri, b) su-polar olmayan arayüz alanlarının azaltılması sonunda oluşan hidrofobik etkileşimler, c) Van der Waals etkileşimleri, d) hidrojen bağı oluşumları, e) dipol etkileşimleri ve f) yüklü alanlardan suyun sıyrılması ile ortaya çıkan entropi artışları sayesinde. Bu kuvvet türlerinin hangisinin daha fazla etkin olduğu araştırılan sistemin kendine has bir özelliğidir. Bir sistemde baskınlık yaratan kuvvet türü başka bir sistem için etkili olmayabilir. Bazı sistemlerde birden fazla kuvvet türü aynı oranda baskınlık gösterebilir.

Bahsedilen bu çekici kuvvetler yalnızca kısa mesafelerde etkindir. Antijen-antikor birleşmesinde bu kısa mesafe kuvvetlerinin etkin olabilmesi için antikor molekülünün bağlanma alanındaki atomlara karşılık gelen antijen molekülünün bağlanma alanındaki atomların arasındaki mesafe kısa olmalıdır. Aynı şekilde çözücü etkileşiminden doğan kuvvetlerin de etkin olabilmesi ancak kısa mesafede mümkündür. Antikorum bağlanma bölgesi, moleküllerin birlikte tutulabilmesi için gerekli bağlanma kuvvetini sağlayacak şekilde antijenin bağlanma bölgesine yaklaşmalıdır.

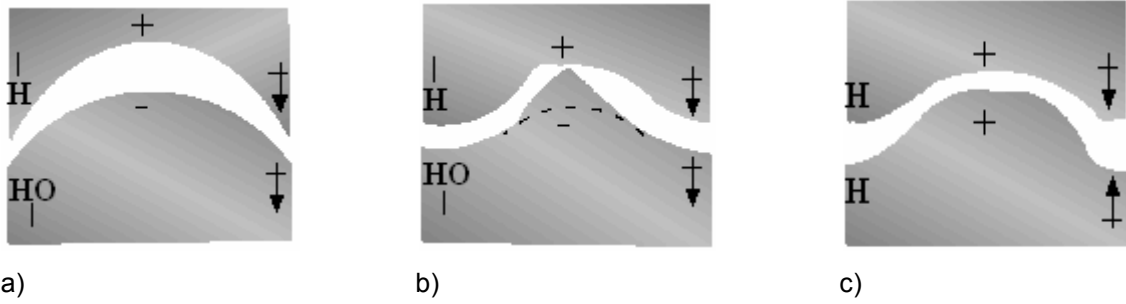
Bağlanma reaksiyonunun seçiciliği önemlidir. Seçicilik özelliğinin bir kısmı antikorum, antijenik grupla yakın sterik etkiye girmesi ile yakın mesafede etkin kuvvetlerin oluşturulabilmesi gerekliliğidir. Antijenik yapıdan çok farklı şekilde gruplanmalar bu yakınlaşmayı engelleyerek bağlanmayı zorlaştırır. Başka bir seçicilik özelliği de antikor üzerindeki grupların dağılımı ile ilgilidir. Bu dağılım karşısındaki antijen üzerindeki grupların dağılımına tam olarak karşılık gelmelidir ki bahsedilen yakın mesafede kuvvetleri etkin olabilsin. Aksi taktirde bu grup dağılımlarının uygun olmaması durumunda yine bağlanma söz konusu olamaz.

2.1.3.1. Sterik Yerleşme

Şekil 2.2a'da antijenik gruplarla antikor molekülünün bağlanma bölgesindeki gruplar gösterilmiştir. Grupların birbirlerini tamamlayıcı yapıları görülmektedir. Antijen üzerinde negatif yüklü grup, proton verici grup, bir dipol ve bir polar olmayan grup vardır. Antikor bu bölgeye tam olarak uyarak tamamlayıcı grupları olan pozitif yük, proton alıcısı, dipol ve polar olmayan grup ile antijene yaklaşır. Sonuç; iyi bir uygunluk ile başarılı bir bağlanmadır.

Şekil 2.2b’de sterik uygunluk derecesindeki değişimin reaksiyonun seçiciliğindeki etkisi görülmektedir. İlk şekildeki antijenin üzerindeki grupların değişmesi ile yeni yapı oluşmuştur. Görüldüğü gibi antijenin üzerindeki büyük bir aktif olmayan grup, antikorun tam olarak yaklaşıp sıkı bir bağ oluşturmasını engellemektedir. Bu halde etkin bir bağlanma söz konusu olamaz.

Şekil 2.2c’de antikorun bağlanmaya uygun tamamlayıcı şekle sahip bir madde ile etkileşimi görülmektedir. Şekil bağlanmaya uygun olmasına rağmen üzerindeki gruplar antikorun bağlanmasını engelleyecek hatta antikoru itecektir. Bu durumda yine etkin bir bağlanmadan bahsedilemez.



Şekil 2.2. Antijen-antikor birleşmelerinde yer alan tamamlayıcı grupların dağılımı ve sterik yerleşmeyi etkileyen faktörlerin şematik gösterimi. Şekillerde; üst bölüm antikoru, alt bölüm antijeni temsil etmektedir.

2.1.3.2. Antikor–Antijen Etkileşimlerindeki Kuvvetler

Yük Etkileşimleri: Yük etkileşimleri antijen üzerindeki yüklü grup ile antikor üzerindeki ve ters yükteki grup arasındaki etkileşimlerden doğmaktadır. Reaksiyon enerjisi yüklerin arasındaki mesafenin karesi ile ve ortamın dielektrik sabiti ile ters orantılıdır. Antikor protein yapısından olduğundan antikor üzerindeki negatif gruplar karboksilat ve pozitif gruplar da lizin, arjinin, histidin veya N-terminal amino grupları ile sınırlıdır. Ancak antikorun yönlendiği madde üzerindeki grup türlerinde bu şekilde bir sınırlama yoktur.

Hidrofobik Kuvvetler: Hidrofobik kuvvetler suyun yapısındaki çeşitli grupların etkisidir. Polar olmayan bir yüzey su ile etkileştiğinde, etrafındaki su molekülleri normal halde diğer su molekülleri ile çevrili olduğu durumdaki kadar düşük-enerji halinde değildir. Eğer polar olmayan yüzeylerin bir araya getirilmesi ile su-polar olmayan arayüzeyi azaltılırsa, su moleküllerinin polar olmayan yüzeyele kontağı kesilecek ve etrafları tamamen diğer su molekülleri ile çevrelenecektir. Polar olmayan iki yüzeyi bir araya getirebilmek için gerekli sürücü kuvvet, su polar olmayan yüzeylerden ayrıldığında oluşturduğu fazladan hidrojen bağlarından sağlanabilecektir. Araştırma sonuçlarına göre bu sürücü kuvvet, polar olmayan yüzey ile su molekülleri birbirlerinden uzaklaştığında ortaya çıkan entropiden

kaynaklanmaktadır. Hidrofobik gruplar, polar olmayan yüzeyle su kontağa girdiği anda su moleküllerine kararlı ve çok düzenli bir yapı sağlarlar. Bunu izleyen bir yapı değişmesinde su molekülleri hidrofobik gruplardan uzaklaştığında bu durum kalan hidrofobik grupların birleşebilmesi için gerekli entropiyi sağlayacak düzensizlikle sonuçlanır.

Van der Waals Çekim Kuvveti: Van der Waals çekim kuvveti büyük ölçüde iki atomun birbirine yaklaşmasıyla oluşan kutuplanmadan doğan London kuvvetlerine bağlıdır. Atomun çekirdeğinin etrafındaki elektron bulutunun dağıtılmasıyla pozitif çekirdek ile diğer atom arasında bir çekim kuvveti oluşturulur. Bu Van der Waals çekimi bütün atomlar arasında bulunmaktadır. Örneğin, gazların ideal gaz şartları dışındaki basınç hacim değişimlerinin nedeni bu Van der Waals kuvvetleridir. Değişik gruplar arasındaki maksimum kuvvetler kutuplaşmalarının bir ölçüsüdür.

Hidrojen Bağı Oluşumu: Hidrojen bağları, elektronegatif atoma (proton vericisine) bağlı bir hidrojen atomunun başka bir atomdaki paylaşılmamış elektronları çekimiyle oluşur. Buna göre, oksijen veya azot atomundaki proton başka bir oksijen, azot veya herhangi bir elektronegatif atomla etkileşecektir. Bunun yanında, reaksiyon suda gerçekleştiğinden antijen ve antikordaki atomlar zaten su ile hidrojen bağlarını kurmuşlardır. Bu su ile oluşturulan bağlar kırılmalıdır ki antijen ile antikor arasında bağlar oluşturulabilsin. Bir reaksiyonun genel olarak enerjisi, o reaksiyon sırasında oluşan ve kırılan bağların enerjilerine bağlıdır. Bir hidrojen bağının enerjisi, hangi yapılarla kurulduğuna bağlı olarak 0 ile 5 kcal/mol arasındadır.

Dipol Etkileşimleri: Dipol etkileşimleri moleküllerdeki dipol yapıları arasındaki çekim kuvvetidir. Değişik atomların değişik elektronegatiflikleri bulunduğundan bağ oluştuğunda elektronların eşit olmayan bir dağılımı söz konusudur. Bu durum, elektriksel bir dipol ile sonuçlanır ki bu yapı başka bir dipol tarafından çekilir.

Entropi Artışı: Antijen ile antikor arasında oluşabilecek diğer bir kuvvet de sudaki herhangi bir yüklü grubun bulunması ile bu gruba su moleküllerinin bağlanacağı durumdur. İki zıt yüklü grup etkileştiğinde bağlanan bu su moleküllerinin bir kısmı serbest kalır. Serbest kalan su molekülleri daha dağınık bir diziliş gerçekleştireceğinden sistemin serbest enerjisi azalacaktır. Bu dağınıklık entropi artışı demektir ve molekülleri bir arada tutan bir sürücü kuvvete neden olur.

2.1.3.3. Katı-faz Reaksiyonlarında Antikor Affinitesinin Rolü

Antikor, antijen ve biyolojik önemi olan diğer maddelerin hızlı, seçici ve hassas bir şekilde tayin edilebilmesi için birçok immunoessay geliştirilmiştir. Bunların içinden, katı faz esseyleri, özellikle enzime bağlı konjügelerin kullanıldığı essey bütün dünyadaki laboratuvarlarda geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Bu tür esseylerin mutlak antikor konsantrasyonlarını tayin edebilme yetenekleri sorgulanmış (Ahlstedt, Holmgren ve Hanson, 1974; Butler et al., 1978) ve kesinlikle antikor affinitesinin katı-faz ve diğer tür esseylerin sonuçlarını tetiklediği görülmüştür. Buna ek olarak, antikor cevapları genellikle konsantrasyon terimleri üzerinden ölçülse de antikor affinitesinin antikorların biyolojik kritik bir rol oynadığını belirtmekte fayda var (Steward ve Steensgard, 1983). Buna göre, antikor cevabını karakterize ederken yalnızca cevabın büyüklüğüne değil, antikor affinitesinin bir esseyi nasıl etkilediğini de gözönüne almak gerekmektedir.

2.2. ELİSA

Amonyum sülfat, polietilen glikol, triklorasetik asit gibi spesifik olmayan ajanlar veya alternatif olarak ikinci spesifik antikorlar antijen-antikor kompleksinin çökmesini geliştirmek için kullanılmaktaydı. Daha sonra kullanılan ikinci antikorun sephadex (Wide ve Porath, 1966), plastik (Catt ve Tregear, 1967), veya selüloz (Ceska ve Lundqvist, 1972) gibi bir katı faza immobilizasyonu ayırma işleminin etkinliğini ve hızını arttırdığı bulundu. İşaretlenmiş antijen yerine işaretlenmiş antikor kullanılan ve immunoradiometrik essey (IRMA) olarak bilinen, “sandviç-tipi” katı faz radioimmunoessayler, yukarıda belirtilen metottan geliştirilmiştir ve önceki radioimmunoessaylere göre bazı avantajlara sahiptir (Miles ve Hales, 1998).

Enzim bağlı immunosorbent esseyler (ELİSA) IRMA'ya göre bazı avantajlar sağlar. Öncelikle reaksiyon herhangi pahalı bir alete gerek kalmaksızın görsel olarak izlenebilir. Kullanılan reaktifler kararlı ve uzun bir süre aktivite kaybına uğramadan saklanabilir. ELİSA'nın potansiyel hassasiyeti tek bir moleküller birçok ürün molekülü oluşturduğundan radioimmunoessayden daha yüksektir (Ekins, 1980). Sonuç olarak ELİSA insan ve hayvan hastalıklarının tanısında ve immunolojide yaygın olarak kullanılmaktadır.

Kullanılacak essey türü amaca yönelik olarak dikkatlice tasarlanmalıdır. Herhangi bir antijen veya antikorun yüksek konsantrasyonda bulunabileceği bir sistemde bu molekülleri tayin etmek için yüksek hassasiyette bir essey kullanmak gereksizdir. Böyle bir durumda kullanılacak testin kolaylık, güvenilirlik ve

çoğaltılabilirlik özellikleri önem kazanır. Tayin edilecek analitin miktarı kullanılacak testin seçimi açısından önemlidir.

Antijenin tayin edileceği testlerde kullanılacak olan antikorlar için en önemli gereksinim katı faza tutturulduktan sonra ilgili antijen için yüksek bir bağlanma kapasitesine sahip olmasıdır. Eğer antijenin küçük bir miktarı bağlanırsa hem hassasiyet hem de çoğaltılabilirlik olumsuz olarak etkilenecek, essey koşullarındaki küçük değişiklikler tayin sonuçlarında büyük dalgalanmalara yol açacaktır. Özellikle monoklonal antikorlar kullanılırken, spesiflik tayin edilecek antijenlerdeki ortak epitoplara karşılık olmalıdır. Eğer kullanılacak antijen veya antikor tayin sistemi, ilgili analit için yüksek oranda spesiflik gösteriyorsa, ilgisiz antijenin düşük oranlardaki bağlanması ilk basamak olarak essey spesifliğinden feragat edilmeden tolere edilebilir.

Antikor olarak monoklonal veya poliklonal antikorlar kullanılabilir. Monoklonal antikorlar yüksek spesiflik özelliği ile potansiyeli yüksek bir tayin edicidir. Ancak poliklonal bağışıklık sistemi içerisinde tek tür antikoru temsil ettiklerinden değişik epitop spesifliği gösteren bir antikor karışımı kullanmak her zaman olmasa da gereklidir (Holmes ve Parnham, 1983; Soos ve Siddle, 1983; Thompson ve Jackson, 1984). Çoğu poliklonal antikorlar plastiğe aktivitelerinin çoğunu koruyarak iyi bir şekilde bağlanıyorlar. Monoklonal antikorların bağlanma problemleri; taşıyıcı yüzeyin pH'ının ayarlanması ile (Conradie, Goveneder ve Visser, 1983), bovin serum albumin ile (Papadea, Cleck ve Reimer, 1985) veya anti-fare antikoru kaplı yüzeyle etkileştirilerek (Mangili et al., 1987) giderilebilir. En uygun antikoru seçilmesi reaktivite ve immobilize edildiğinde antijene bağlanma etkinliğine bağlıdır. Bu özellikler de ancak deneme-yanılma yöntemiyle onaylanabilir.

2.3. İmmunesseyler

İlk kez 1950'lerin sonlarına doğru Berson ve Yalow (1950) ve Ekins (1960) tarafından ortaya çıkarılmasından itibaren immunessey metotları gelişerek insanların ve hayvanların kanlarındaki analitlerin tanısında ve ölçülmesinde kullanılmıştır. İmmunesseyler genellikle 2 amaçtan biri için kullanılabilir: ya örnek içinde belirli bir analitin miktarını ölçmek için ya da yine örnek içindeki iki farklı maddenin çapraz-reaktivite veya spesiflik çalışmaları ile karşılaştırılması için kullanılabilir. Klinik ve araştırma laboratuvarlarında kullanılan immunesseylerin çoğunun kullanım amacı, herhangi bir numunenin içindeki analitin konsantrasyonunun ve konsantrasyon değişiminin ölçülmesidir.

İmmunolojideki birçok rutin metod katı-sıvı ara yüzeyindeki immunokimyasal reaksiyonlara bağlıdır. En önemli metodlardan birisi, antijen-antikor reaksiyonunu

geliştirebilmek için kolloid parçacıklar kullanır. Biyolojik örneklerin içerdiği antikor veya antijenleri tayin etmek için bunların eşlenikleri olan antijen veya antikorların taşınmasında geniş bir yaygınlıkta lateks mikrüküreler kullanılır (Rembaum et al., 1976; Kitano et al., 1987; Stoll et al., 1993). Bu essey metodunun altında yatan temel prensip, antikor (ya da antijen) kaplı taşıyıcı partiküllerin eşlenikleri olan antijen (ya da antikor) ile karşılaştırıldıklarında çapraz bağlanarak çökmesidir. Böylece antijenin ortamda bulunması sistemde kolloid çökeltme yaratacaktır. Bu tür bir immunoessay beraberinde çifte avantaj getirmektedir. Yüksek hassasiyet özelliğini ucuz ve zararsız (radioimmunoessay metodu ile karşılaştırıldığında) kimyasal kullanımı ile birleştirmektedir. Bu tür immunoessaylerin hassasiyeti, yeniden kullanılabilirliği ve tayin limitleri çökelmiş parçacıkları tayin etmek için kullanılan tekniğe de bağlıdır.

2.3.1. Radio-işaretleyiciler Kullanan İmmunoessayler

Küçük moleküllerin immunolojik tanınmaları için radio-işaretlenmiş ligantların kullanımı yaklaşık olarak 40 yıl öncesine dayanmaktadır. Berson ve Yalow (Berson ve Yalow, 1958) tarafından gerçekleştirilen çalışmada eser miktarda radio-iyotlu insulinin antikorlara bağlanarak tanısında hiç ulaşılammış hassasiyette sonuçlar elde edilmiştir. Standart radio-işaretlenmiş antijenle birlikte yarışmalı inhibisyon prensipli çalışma mekanizması, sıvı faz doygunluk esseyleri (radioimmunoessay ya da RIA), hormon, ilaç ve diğer küçük moleküllerin değişen aralıklardaki tanısını gerçekleştirmektedir. Bu yöntem, yeni radio-işaretleyici yöntemleri ile ve küçük immunojen moleküllerin tanınması için antikorların büyük taşıyıcı proteinlere bağlanmaları prensibiyle çalışan yöntemlerle desteklenmektedir. RIA'nın teorisi ve denemeleri Parker tarafından (Parker, 1976) geniş bir biçimde araştırılmıştır.

RIA özellikle medikal servis laboratuvarlarında ticari olarak hazırlanmış tanı kitlerinin ve ekipmanlarının temelini oluşturmaktadır. Ancak yeni moleküllerin tanısı yeni esseylere ve belirli bir RIA standardize yol göstericilere ihtiyaç duyar.

RIA'nın ön hazırlık basamaklarından birisi işaretlenmiş antijenlere karşı antikor titrasyonudur. Burada antijen molekülleri büyüktür ve antikorlar da poliklonaldır. Çökelti, belirli bir aralıktaki antikor/antijen oranında gerçekleşir ve bu oranın en uygun değerinde ortamdaki bütün antikor molekülleri çöker. Bu noktada, kompleks immunoglobulin sayımı serumun antikor içeriğini belirler. Bu yöntem *kantitatif presipitin testi* denir. Presipitin testi aynı zamanda, çökeltme testlerinde antijen/antikor oranlarının temellerinin belirlenmesinde, çözünebilir immün komplekslerinin oluşturulmasında ve efektif antijen değerinin tahmininde kullanılır. Anti-karbohidrant-karbohidran (örneğin; saf bakteriyel polisakkaritler) antikor

miktarı maksimum protein çökelme noktasındaki toplam proteinden tayin edilebilir. Bu yöntem, ilk antikor saflaştırımının ve ölçümünün temelidir ve Heidelberger ve Kendall (Heidelberger ve Kendall, 1929) tarafından gerçekleştirilmiştir. Anti-protein antikorları için ise, testin modifikasyonu ile radio-iyotlu antijenin kullanılması gerekmiştir. Serum içindeki anti-albumin tayini bu yöntem için bir örnektir. Bu test, diğer tayin yöntemleri ile bulunması mümkün olmayan, serumdaki antikor miktarını tam olarak tayin ederek çok değerli bir standart prosedür sunar (Maurer ve Chase, 1971).

2.3.2. İmmuno-floresans Yöntemleri

Floresans işaretleyicilerin, antikor moleküllerine özelliklerini etkileyip kaybettirmeden bağlama çalışmaları ilk defa 1950'de Coons ve Kaplan tarafından denenmiştir (Coons ve Kaplan, 1950). Bu yöntemin geliştirdiği metod; immunolojik reaksiyonların hassasiyeti ve spesifikliğini mikroskopun topoğrafik kesinliği ile birleştirmektedir. Florokromlar, çok düşük konsantrasyonlarda bile uygun ekipmanlarla izlendiğinde görünür bölgede ışık saçarlar. Örnek olarak; bir antikorun hücre çekirdeğinin görüntülenebilmesi için hücre başına 10^{-15} g florokrom yeterlidir. Verimli floresans bileşiklerinin hazırlanmasında molar işaretleme oranı 3/1'dir. Bu seviyede, antikorun antijene spesifik bağlanmasında zayıflamalar meydana gelebilir.

İmmunofloresans metotlarını, alternatifleri olan ve enzimleri işaretleyici olarak kullanarak nispeten hassasiyet sağlayan immunohistokimyasal metotlarla karşılaştırarak immuno-floresans metotların avantajları görülebilir. Her iki teknikte de benzer işaretleme prosedürleri kullanılır. Ancak enzim kullanılan metod renkli reaksiyon ürünü elde edebilmek için fazladan bir uygulama basamağına ihtiyaç duyar. Bu durum standart bir mikroskopta incelenebilir ancak immuno-floresans metodu, floresans mikroskopu gibi ileri seviye bir optik sisteme ihtiyaç duyar. İki antikoru farklı boyayarak reaksiyon bölgesinde farklı renk vermelerini sağlamak her iki teknikte de mümkündür. Ancak, spesifik floresans filtreleme sistemlerinin gelişmesi ile, her iki antikorun da reaksiyona bağlı katkısı izlenebilmektedir. Bu yüzden "çakışan" reaktiviteleri, özellikle bir antikor daha baskınsa, gözlemleyebilmek için immuno-floresans tercih edilen yöntemdir.

İmmuno-floresans metotlarının daha önce bahsedilen eksikleri aşağıda belirtileceği üzere büyük ölçüde tamamlanmıştır ve alternatif işaretleme arayışı sonlanmıştır. Örneğin izlenmesi ve saklanması sırasında floresansın solmasını azaltmak için taşıyıcıya eklenen geciktirici ajanlar kullanılmaktadır.

İmmuno-floresans, uygun antikor sistemlerinin mevcut olduğu bütün biyolojik bilim alanlarında uygulama görmektedir. Kullanılan reaktiflerin uygun bir

şekilde karakterize edilmelerinin öneminin anlaşılması ile ticari konjügelere kalitesinde önemli oranda gelişme gözlenmiştir. Klinik immunolojide; standardizasyon ve oto-antikorların tanısında kullanılan testlerin kalite kontrolü gibi konseptlerin tanımlanması ile test sonuçlarına doğrudan etkisi bulunan değişkenlerin önemi artmıştır. İmmuno-floresans, büyük miktarlardaki örneklerin spesifik antikor aktivitelerinin görüntülenmesi için uygun metod sağlar. Bundan dolayı monoklonal antikorların geliştirilmesinde ve karakterizasyonunda geniş uygulama alanı bulur.

2.3.3. İmmuno–peroksidaz Yöntemleri

1950’de immuno-floresans metodunun ortaya çıkışı (Coons ve Kaplan, 1950) immunohistokimya alanında önemli bir gelişme olarak kabul edilse de, ilerleyen çalışmalarla bu tekniklerin bazı kısıtlamalarının olduğu görüldü. Öncelikle, sonuçların incelenmesinde floresans mikroskoplarının kullanımı gereklidir. Ayrıca, yeni geliştirilen tekniklerle florokrom boyaların zamanla silinmesi önlenirse de, son kullanımdaki hazırlıklar kalıcı değildir. Ancak, tekniklerin basit oluşu ve floresans işaretleyicilerin çok düşük konsantrasyonlarda bile net olarak görülebilmeleri bu tekniği halen popüler kılmaktadır.

Yukarıda bahsedilen avantajlara rağmen alternatif bir teknik arayışı sırasındaki araştırmalarda bazı enzimlerin, özellikle *horseradish* peroksidaz (Nakane ve Pierce, 1966), ideal bir substrat olacağı görülmüştür. Ayrıca alkaline fosfat ve en güncel olarak da glikoz oksidaz enzimlerinin de adları geçmektedir. Bu enzimler, histokimyasal olarak kullanılarak standart bir ışık mikroskopu ile görülebilen renkli ve kalıcı çöktürlerin oluşmasını sağlar.

İmmuno-floresansın krioostat bölümlerde, immuno-peroksidaz tekniklerin ise parafin bölümlerde kullanılması pratikten çok tarihsel bir alışkanlıktır. Buna karşın her iki yöntem de her iki malzeme üzerinde çalışmaya müsaittir (Curran ve Gregory, 1978).

İmmuno-enzim tekniklerinin en önemli dezavantajı; hassasiyeti arttırabilmek için floresans tekniklerine nazaran daha fazla uygulama basamağı gerektirmesidir. Örnek olarak; işaretlenmemiş antikor-enzim metotları, immunofloresans metodu 2 basamak gerektirirken, 3 basamağa ihtiyaç duyar. Bir teknikte ne kadar fazla basamak eklenirse, spesifik olmayan bağlanma ihtimali artar ve “ sinyale karşı ses” olarak adlandırılan *hedeflenen bağlanma oranı* azalır. İkinci dezavantaj, işaretleyici olarak *horseradish* peroksidaz kullanılan tekniklerde ortaya çıkar. Bu tür metotlarda endojen peroksidazın engellenmesi gerekmektedir. Üçüncü dezavantaj ise peroksidaz tekniklerinde en yaygın olarak kullanılan substrat olan diaminobenzidinle (DAB) ilgilidir. Bu kimyasalın kanserojen etkisinin olduğu

bilinmekteydi ancak son zamanlarda yayınlanan raporlara göre bu tür bir etkisi yoktur. DAB'ye alternatif olabilecek birçok kimyasal mevcuttur ancak bu kimyasalların kullanımı sonucu alkol tabanlı çöktürler meydana gelmektedir ki bu tür bir durumda su bazlı taşıyıcıların kullanılması gerekir. Ancak bu defa da hassas sonuçlar elde edilemez.

2.3.4. Kemiluminesans İmmunoessay

Günümüzde, geniş bir yelpazedeki analitlerin (özellikle biyolojik kökenli moleküllerin) tanısı için kullanılabilecek immunokimyasal tekniklerde bir bolluk söz konusudur. Bu tür teknikler kullanılarak yapılan ölçümlerde, analitlerin moleküler kompleksliği ve molar konsantrasyon yelpazesi çok geniş olabilmektedir. Şu andaki anlayışa göre, miktar tayininde kullanılacak immunokimyasal sistemin türü herhangi bir kısıtlamaya muhattap değildir. Örneğin; hem ferritin (M.A. > 650000) hem de dinitrobenzenin (M.A. = 168) yarışmalı radioimmunoessay (RIA) kullanılarak miktar tayini yapılabilir. Aynı şekilde, albumin de immunoelektroforesis veya ELİSA kullanılarak ölçülebilir. Bu tür durumlarda varolan metotların sağladığı doğruluk ve uygunluk önem kazanmaktadır.

İmmunoessay sistemlerinin seçiminde tanının duyarlılığı ve kesin olarak tanımlayabildiği miktar önemlidir.

Klinik laboratuvarlarda birçok analit için yüksek duyarlılığa ihtiyaç vardır. Polipeptid hormonları bu tür analitlere örnektir. Bu durumda ortaya çıkan diğer gereksinimler de gözönünde bulundurulmalıdır. Essay sağlamlığı, teknik basitlik, kalite güvencesi ve stabil, radioaktif olmayan kimyasalların tercihi başta gelmektedir. Bu noktada elde bulunan seçenekler azalır ve izotopik olmayan immunoessay sistemleri geliştirebilmek için yapılacak çalışmalar tetiklenir.

Buraya kadar bahsedilen sistemlerden yalnızca çok az bir kısmı klinik laboratuvarlarda rutin uygulamalar için kullanılabilir ve yalnızca enzim bazlı sistemler ile zamana dayalı floresans ve kemiluminesans essayler istenilen yüksek duyarlılık seviyesine ulaşırlar. Bu metotlar içinden de yalnızca belirli tür kemiluminesans immunoessayler kompleks aletlere ve kimyasal uygulamalara ihtiyaç duymadan istenilen performansı yakalarlar.

Kemiluminesans, birçok emisyonun zayıf ve gözle görülememesine rağmen fenomen olarak oldukça yaygındır. Buna karşılık, floresans ve fosforesans gibi diğer luminesans türleri ile karıştırılabilmektedir. Luminesansın bütün türlerinde bir üst enerji seviyesine çıkmış atom veya moleküllerin normal seviyeye inışı sırasında enerji foton olarak yayılır. Emisyonun dalga boyunun her zaman görünür bölge içinde olması söz konusu değildir. Kısaca kemiluminesans, bir kimyasal reaksiyon

sonucunda uyarılmış seviyede ürün elde edilmesi sonucundaki ışık emisyonudur. Üzerinde çalışılan ilk yapay kemiluminesant luminoldür. Daha sonra bis-akridinyum ve lusigenin birçok çalışmanın konusu olmuştur (Gleu ve Petsch, 1933).

Diğer izotopik olmayan immunoessay problemleri ile aynı şekilde kemiluminesant moleküller içinde bulundukları kimyasal ortama göre davranış gösterirler. Katı-faz tekniği ile çalışan immunoessayler için bu etki birçok yıkama basamağı ile ortadan kaldırılabilir. Homojen immunoessaylerde ise bu etkileşimlerin olması yüksek bir olasılıktır.

Luminol ve türevleri, bir katalizör varlığında şiddetli bir oksidasyon sistemi yaratarak yüksek şiddetle emisyon sağlarlar. Bazı moleküller “horseradish” peroksidazı katalizör olarak kullanarak ışık emisyonunu geliştirebilirler (Whitehead et al., 1983).

2.4. Polimerizasyon Prosesleri

Polimerizasyon reaksiyonları laboratuvar ölçüsünde ya da endüstriyel amaçlar için çeşitli koşullarda yapılabilir. Başlangıç karışımının homojen ya da heterojen oluşuna göre homojen ya da heterojen polimerizasyonlar incelenebilir. Bazı homojen sistemlerde, polimerizasyon reaksiyonunun ilerlemesi ile oluşan polimerin reaksiyon ortamında çözünmediği ve heterojen bir sistemin belirttiği görülür.

Yığın Polimerizasyonu: Yığın polimerizasyonunda, diğer metotlardan farklı olarak, reaktöre besleme çoğunlukla saf monomer veya monomerler şeklindedir. Yalnızca düşük miktarda başlatıcı ve diğer modifiye ajanları içerir. Polimerizasyon sisteminde oluşan polimer, monomerde çözünür (ya da monomer polimerde çözünür). Böylece reaksiyon boyunca sistem homojen olarak kalır. Bunun anlamı polimer genellikle non-kristalindir. Yığın polimerizasyonu genelde *yüksek saflık*, *optik berraklık* veya *çok yüksek molekül ağırlık* gibi özellikler istendiğinde kullanılır.

Basamaklı polimerizasyon sistemlerinde ise yığın polimerizasyonu oldukça kolay ve dolayısıyla tercih edilen bir yöntemdir. Bu reaksiyonlar kısmen ekzotermik olduğundan ısının uzaklaştırılması sorun değildir, hatta sistemi reaksiyon sıcaklığına ulaşıp bu sıcaklıkta tutmak için sisteme ısı verilmesi gereklidir. Karışımın viskozitesi, yüksek dönüşüme ulaşana kadar düşüktür. Böylece karıştırma, ısı transferi ve uçucu yan ürünlerin salımı kolaydır.

Zincir polimerizasyon sisteminde ise yığın polimerizasyonunun kontrolü çok daha zordur. Monomerin çift bağlarının tek bağlara dönüşümü sırasında mol başına 15-20 kcal. ısı açığa çıktığından proses yüksek derecede ekzotermiktir.

Reaksiyon hızı kabul edilebilir seviyelerde olsaydı, ısı transferi sorun olmaktan çıkabilirdi, ancak yaygın olan ısıyla bozulan başlatıcılar nedeniyle prosesin başlama hızı ve dolayısıyla genel polimerizasyon hızı yüksek oranda sıcaklığa bağlıdır. Buna ek olarak, çok kısa bir sürede yüksek yoğunluklu polimer oluştuğundan, reaksiyon ortamının viskozitesi henüz reaksiyonun başında çok artarak karıştırma ve ısı transferini zorlaştıracaktır.

Oto-ivmelenme: Metil akrilat ve metil metakrilat gibi bazı monomerler yığın polimerizasyonu ile polimer oluştururken, henüz reaksiyonun başında önemli derecede reaksiyon hızının ivme kazandığı görülür. Bu hızlı reaksiyon sonunda oluşan polimer, reaksiyon hızı etkilenmeden oluşan polimere göre daha yüksek molekül ağırlıklıdır. Bu konunun açıklaması polimer karışımının viskoz yapısındadır. Viskozite arttıkça, polimer radikallerinin hareketliliği azalır, buna bağlı olarak iki radikalın karşılaşarak zinciri kapatma olasılıkları da azalır. Büyüyen zincirin ortalama ömrü uzadığından, bununla beraber polimerizasyon hızı ve molekül ağırlığı da artar. Artan hız, daha yüksek ısıların birikmesine neden olur ve oluşan sıcaklık artışı polimerizasyon hızını daha da arttırarak oto-ivmelenmeyi sağlar. Bu fenomen genel olarak *Tromsdorff Etkisi* olarak bilinir .

Çözelti Polimerizasyonu: Polimerizasyona uğrayan monomer, reaksiyonlara katılmayan (*inert*) bir çözücü içinde polimerleştirilirse yığın polimerizasyonunun birçok sakıncalı önlenmiş olur. Çözücü, polimerizasyon ortamını seyrelttiği için viskozite düşer, karıştırma kolaylaşır ve daha etkin bir ısı transferi yapılabilir. Polimerizasyon sonucunda polimer genellikle çözücüde çözülmüş durumdadır. Uygun çöktürücüler ile polimer ortamdan ayrılarak saflaştırılır. Öte yandan, ortama katılan çözücü yeni bazı sorunlar getirir. Çözücüye zincir transferi en önemli sorundur. Ayrıca, saf polimerin elde edilmesinde çözücünün arıtılması güçlükle sağlanır. Çözücü olarak *zincir transfer sabiti* küçük maddeler seçilmelidir. Ayrıca, zincir transferi küçük çözücülerin bile polimerizasyon hızını ve elde edilen polimerin yapısını etkilediği durumlar bilinmektedir. Vinil asetat, akrilonitril ve akrilik asit esterleri çözelti polimerizasyonu yöntemi ile polimerleştirilir. N-Vinilpirrolidon ve akrilik asit gibi polar monomerler sulu çözeltelerde kolayca polimerleştirilir.

Süspansiyon Polimerizasyonu: Polar olmayan birçok monomerin polimerizasyonunda sulu bir dispersiyonda yapılan polimerizasyon, yığın ve çözelti polimerizasyonlarının önemli sakıncalarını önler. Monomer, sulu fazda 0.01-0.5 cm çapında damlacıklar halinde dağıtılır (süspansiyon). Stabilizör katılır ve mekanik karıştırma ile damlaların birleşmesi önlenerek stabilite sağlanır. Dağıtma ortamında çözülen süspansiyon stabilizörleri ile süspansiyonun stabilitesi desteklenir ve sisteme uygun bir sıcaklık programı uygulanarak monomer

damlacıklarının küresel polimer partikülleri haline dönüşmesi sağlanır. Bu sayede süspansiyon polimerizasyonunda polimer yığılması önlenir. Stabilizör olarak, jelatin, metil selüloz, poli(vinil alkol) gibi suda çözünür organik polimerler, elektrolitler, ya da kaolin, magnezyum silikatlar, alüminyum hidroksit gibi suda çözünmeyen inorganik bileşikler kullanılır.

Süspansiyon polimerizasyonunda polimerizasyon başlatıcısı monomer damlalarında çözünür. Her monomer damlası küçük bir yığın polimerizasyon sistemini andırır. Bu damlalarda yığın polimerizasyon kinetiği geçerlidir. Düşük ortam viskozitesi ve iyi karıştırma nedeniyle sıcaklık kontrolü mükemmeldir. Ancak, elde edilen polimer ürünün yıkanıp kurutulması ve ürün kirlenmesi nedeniyle katkı maddelerinden arıtılması gereklidir.

Süspansiyon polimerizasyonunda ceketli ve sızdırmaz reaktörler kullanılmaktadır. Bu reaktörler genellikle çok iyi parlatılmış iç yüzeye sahip paslanmaz çelik, daha iyisi cam kaplı paslanmaz çelik reaktörlerdir.

Stiren, metil metakrilat, vinil klorür, viniliden klorür, vinil asetat bu yöntemle polimerleştirilir. Elde edilen son ürüne bakılarak, bu tür polimerizasyona *inci* veya *tane* polimerizasyonu da denilir.

Emülsiyon Polimerizasyonu: Emülsiyon polimerizasyonu radikal zincir polimerizasyonları için önemli bir yöntem sağlar. Bunun için, suda çözünmeyen bir monomerin önce emülsiyon halinde dağılması gerekir. Burada polimerizasyon emülsiye edici maddelerin oluşturduğu miseller içinde yürür. Dağıtma ortamındaki monomer damlacıklarından miseller içine difüze olan monomer molekülleri, dağıtma ortamında çözülmüş ve sıcaklığın artırılmasıyla aktif duruma geçmiş ve misel içine girmiş başlatıcı moleküllerin etkisiyle polimerleşir. Polimerizasyon, monomer damlacıkları tamamen yok olana kadar devam eder, ürün yüzey aktif maddeler olan emülsiye ediciler tarafından yüzdürülen bir polimer lateksidir.

Emülsiye edici olarak ortama katılan maddeden gelen sakınca dışında, emülsiyon prosesinin diğer yöntemlerden belirgin üstünlükleri bulunur. Her şeyden önce emülsiyon sistemi kolayca denetlenebilir. Polimerizasyon ısısı kolayca ortamdan uzaklaştırılabilir. Ortamın viskozitesi yığın ve çözelti polimerizasyonlarına göre oldukça düşüktür. Emülsiyon polimerizasyonu ürünleri, başka bir ayırmaya uğratılmadan doğrudan doğruya, ya da gerekli bir karıştırma (*blending*) işlemi sonunda kullanılabilir.

Reaksiyon kinetiği bakımından emülsiyon polimerizasyonu diğer polimerizasyon yöntemleriyle karşılaştırıldığında en önemli farklılık polimerizasyon hızı ile molekül ağırlığı arasındaki bağlantıdır. Diğer bütün polimerizasyon proseslerinde polimerizasyon hızının artması ile polimerin molekül ağırlığı küçülmektedir. Emülsiyon polimerizasyonunda ise, polimerizasyon hızını

azaltmaksızın, elde edilen polimerin molekül ağırlığını büyütme olanağı bulunur. Bir başka deyişle, reaksiyon mekanizması farklı olduğundan, reaksiyonu hızlı tutarak, yüksek molekül ağırlıklı polimer elde edilebilir.

Dispersiyon Polimerizasyonu: Yığın veya çözelti polimerizasyonunda bir polimerin kendi monomerinde ya da herhangi bir monomer-çözücü karışımında çözünmediği düşünüldüğünde böyle bir durumda polimer oluşmakta iken çöker. Polimer küçük küreler halinde ayrılırken zincirin ucunda polimere gömülü aktif bir radikal bulunursa, iki zincir ucunun sonlanma reaksiyonu verme olasılığı çok azalacağı için polimerizasyon hızı büyür. Polimerizasyon yönteminde kullanılan başlatıcı, monomer faz içerisinde çözülme özelliğine sahiptir. Polimerizasyon sistemi başlangıçta tek fazlıyken katı partikül oluşumuyla birlikte polimer ve dağıtma ortamını içeren iki fazlı sıvı yapıya ulaşmaktadır. Bu tür polimerizasyon reaksiyonlarına dispersiyon polimerizasyonu (heterojen polimerizasyon) denir. Bu reaksiyonların kinetiği homojen yığın polimerizasyonlarından oldukça farklıdır. Bu yöntem ile 1-10 µm aralığında monodispers polimerik partiküllerin eldesi mümkündür.

Partiküllerin boy ve boy dağılımını, molekül ağırlığını ve monomer dönüşümünü etkileyen faktörler olarak başlatıcı derişimi, stabilizör derişimi, dağıtma ortamı türü ve derişimi, monomer/dağıtma ortamı oranı, polimerizasyon sıcaklığı ve karıştırma hızı bulunmuştur.

Başlatıcı derişiminin artması, polimerizasyonun daha yüksek monomer dönüşümü ile sonlanmasını sağlamaktadır. Başlatıcı derişiminin artması ile polimerizasyon hızında oluşan artış daha fazla serbest başlatıcı radikalın oluşması ile açıklanmaktadır. Elde edilen polimerin molekül ağırlığında ise artan başlatıcı miktarı ile belirgin bir azalma gözlenmiştir. Molekül ağırlığının azalması ise daha fazla serbest radikalın oluşması ile polimerizasyonun çok merkezli olarak başlaması ve ortalama zincir uzunluğunun kısılması ile açıklanmaktadır (Ober ve Hair, 1987; Tuncel ve Pişkin, 1993). Polimerin molekül ağırlığı da katalizör konsantrasyonuna ve dönüşme miktarına bağlı değildir. Bu olay, büyümekte olan radikallerin ölü polimere zincir transferi yaptığı varsayım ile açıklanabilir. Böylece, polimer taneciklerinin yüzeyinde uzun yaşantılı hareketsiz serbest radikaller oluşur.

Dağıtma ortamı türü ve bileşimi, dispersiyon polimerizasyonunda ortalama partikül boyu ve boy dağılımını etkileyen bir diğer önemli parametredir. Dispersiyon polimerizasyonunda temel amaç; olabildiğince dar boy dağılımına sahip partiküllerin sentezidir. Dağıtma ortamının polaritesi ve monomer çözünürlüğü ürünün boyutuna ve boy dağılımına etki eder. Sistemden beklenen,

monomer çözünürlüğünün yüksek, ürün polimer çözünürlüğünün ise düşük olmasıdır.

Dispersiyon polimerizasyonun sıcaklık özelliğine bakıldığında, 55-80°C aralığında polimerizasyon sıcaklığının artmasıyla ortalama partikül boyutu ve boy dağılımının da arttığı görülmüştür. Sıcaklık artışı, polimerin molekül ağırlığında önemli düşüşlere sebebiyet verir.

Dispersiyon polimerizasyon sisteminde genelde düşük karıştırma hızları ile çalışılır. Yüksek karıştırma hızlarında oluşabilecek şiddetli kayma gerilimi, partiküllerde monodispers özelliğin bozulmasına ve boy dağılımının oluşmasına neden olur.

Dispersiyon polimerizasyonu ile çok saf ürün elde edilebilir. Çünkü, ortamda çözücü, emülsiyeye ya da süspanse edici olarak katılan yabancı bir madde bulunmaz. Ancak şiddetli reaksiyonu denetleme olanağı bulunmadığı için bu yöntem endüstride yaygın olarak kullanılmaz.

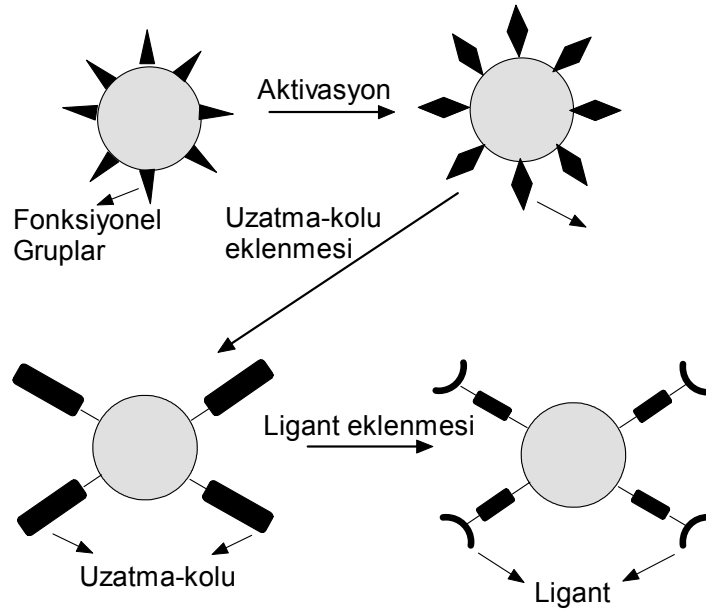
2.5. Polimerik Taşıyıcıların Biyomedikal Alanda Kullanımı

Biyo-malzemeler; doku, organ ya da vücut fonksiyonlarını tedavi ve yenileme amacıyla protez ve medikal cihaz olarak kullanılan maddelerdir. Malzeme bilimindeki ilerlemeler, eşsiz özelliklere ve medikal uygulamalara sahip sentetik malzemelerin geliştirilebilmesini sağlamıştır.

Sentetik polimerler biyo-malzemelerin en önemlilerindendir. Polimerik biyo-malzemeler, hem medikal hem de farmasötik alanlarında geniş bir yelpazede uygulama alanı bulmuştur. Bunun nedeni içerik ve özellikleri bakımından geniş bir çeşitliliğe sahip olmasıdır. İşlenerek kompleks şekillere sokularak kullanıldığı gibi, yüzey özellikleri de biyolojik uygulama alanına göre fiziksel, kimyasal ya da biyo-kimyasal yollardan modifiye edilebilir.

Biyo-malzemelerin yüzey özellikleri dikkat edilmesi gereken en önemli konulardan biridir. Hidrofobiklik ya da hidrofiliklik, ıslatılabilirlik (ıslatılabilir ya da ıslatılamaz), yüzey yükü (anyonik ya da katyonik), polarite (polar ya da apolar), reaktif kimyasal grupların dağılımındaki heterojenlik (muntazam ya da baskın yapı), yüzey enerjisi (yüksek ya da düşük enerji), tutulan suyun tipi (serbest, yönlü ya da yapıya katılmış), yüzey moleküllerinin hareketliliği ve yüzeyin pürüzsüzlüğü (pürüzsüz, pürüzlü ya da gözenekli) biyomalzemelerin önemli yüzey özelliklerindendir.

Polimerik mikroküreler, medikal alanda özgül terapi ve tanı amacıyla, biyo-spesifik sorbentlerin hazırlanmasında (Şekil 2.3) kullanılır.



Şekil 2.3. Özgül sorbentlerin hazırlanması.

2.5.1. Uygulama Alanları

Çizelge 2.1 biyo-malzemelerin çeşitli uygulamalarını listelemektedir. Bu uygulamalarda, biyo-malzemeler hasta ya da yaralanmış vücut bölgesinin (ya da organ) yerine kullanılabilir (yapay eklemler, yapay deri); iyileşmeye yardımcı olabilir (kemik plakaları, yanık örtüleri); işlevlere yardımcı olabilir (kalp kapakçıkları, kontakt lensler); tedaviye yardımcı olabilir (hemodiyalizler, kateterler, ilaç salım sistemleri) ve tanı sistemlerinde (biyosensörler ve klinik esseyler) kullanılabilirler.

Çizelge 2.1. Biyo-malzemelerin uygulamaları.

Ekstra-korperel aygıtlar	Yapay böbrek sistemleri, kalp-akciğer cihazları.
Sert doku implantları	Eklem, diş.
Yumuşak doku implantları	Yapay damar, protezler, kalp kapakçıkları.
Cihaz implantları	Kalp pili, ilaç salım pompaları.
Yardımcı sistemler	Dikişler, kemik plakaları ve vidaları, kontakt lensler, yanık örtüleri.
Tedavi sistemleri	İlaç salım sistemleri, immobilize enzim, hücre ve diğer biyolojik maddeler.
Tanı sistemleri	Biyosensörler, klinik esseyler, işaretleme ve görüntüleme formülleri.

2.5.2. Mikroküreler

Geniş bir boyut dağılımına sahip (mikron boyutundan birkaç milimetreye kadar) polimerik mikroküreler medikal ve biyolojik uygulamalarda taşıyıcı matris olarak kullanılmaktadır.

Endüstriyel uygulamalar için büyük miktarlarda polimerik mikrokürelerin üretimi için süspansiyon polimerizasyonu kullanılmaktadır. Bu teknikte, monomer faz çapı birkaç mikron olan damlalara parçalanır ve dispersiyon ortamında çözünmüş halde bulunan bir yüzey aktif maddeyle (polivinil alkol gibi) stabilize edilir. İçlerinde çözünmüş halde başlatıcı madde içeren bu damlacıklar uygun sıcaklık/karıştırma programı ile polimerleştirilir. Bu teknik genellikle 50-1000µm boyutundaki mikrokürelerin üretilmesinde kullanılır.

Emülsiyon polimerizasyonu endüstriyel seviyede polimer latekslerinin üretimi için kullanılan başka bir tekniktir. Bu yöntemde monomer bir dispersiyon ortamında büyük damlalar halinde süspanse edilir. Polimerizasyon emülsiyeye edici misellerin içinde başlatıcı yardımı ile yürür.

Tek boyutlu polimerik parçacık üretimi için kullanılan bir başka yöntem de dispersiyon (faz dönüşü) polimerizasyonudur. Bu teknikte bir solventte veya solvent karışımında bir sterik stabilize edici madde ile birlikte çözünmüş halde monomer bulunur. Uzayan polimer zincirleri belirli bir boya ulaştığında faz dönüşü gerçekleşir. Bu oligomer zincirleri çöker ve ortamdan polimer parçacıkları oluşturmak üzere ayrılır. Buna göre polimerizasyon sonucunda iki fazlı bir sistem (lateks) oluşur.

Solvent buharlaştırma teknikleri de özellikle aktif maddelerle yüklenmiş mikrokürelerin (ilaçlar gibi) hazırlanmasında kullanılmaktadır. Burada, polimer ve aktif madde uygun bir çözücüde çözünür ya da dispersiyon oluşturulur. Bu karışım sürekli karıştırılan ve polimer için çözücü olmayan bir dispersiyon ortamına bırakılır. Çözücü buharlaşır, aynı sırada polimer çökerek küresel parçacıkları oluşturur. Bu teknikte mikro-gözenekli parçacıklar üretilir. Hem vücut içine yerleştirilebilen hem de enjekte edilebilen biyo-bozunur ilaç salım mikroküreleri bu yöntemle geliştirilmiştir.

Alışlagelmiş (özellik olmayan) tutucu maddeler (aktif karbon, iyon-değiştirici reçine) kullanan hemoperfüzyon sistemleri çeşitli zehirlenme ve aşırı doz vakalarının tedavisinde geniş bir uygulama alanı bulmaktadır.

Mikrotaşıyıcılara immobilize edilen birincil hücreler ekstrakorperel sistemlerde melez yapay organ olarak kullanılmaktadır. Tedavi amaçlı hazırlanan sorbentler bir ekstrakorperel döngüde vücut sıvısıyla direk temas halinde bulunur. Bu tür sistemler "hemoperfüzyon" ya da plazma filtreleri ile birlikte kullanılmaktadır. Hemoperfüzyon sistemlerinde kullanılan özgül sorbentler geniş bir yelpazede çift fonksiyonlu molekül taşıyabilirler. Enzimler, antikorlar, antijenler, amino asitler,

peptid dizileri, DNA, RNA ve hatta canlı hücreler ekstrakorperel tedavilerde enzim bozuklukları, oto-immün hastalıkları ve kanser gibi birçok hastalığa karşı kullanılmaktadır.

Hemoperfüzyon için daha özgül tutucu maddeler biyo-affinite soğurması için kullanılan tekniklere ve malzemelere benzer şekilde hazırlanmaktadır. Bu yöntemler kompleks biyo-moleküllerin tanımlanması, saflaştırılması, ve ayrılması için kullanılmaktadır. Taşıyıcı matriks (genellikle mikroküreler ve fiberler) üzerindeki fonksiyonel gruplar aktive edilir. Daha sonra seçilen ligant kovalent bağlarla matriks üzerindeki aktif noktalara bağlanır. Hazırlanan sistemin özgülüğündeki en önemli nokta immobilize edilmiş ligantın ortamdan izole edilecek maddeyle olan etkileşimindeki özgülüğüdür. Taşıyıcı ile ligant arasına yerleştirilecek uzatma kolu, sterik engellemeyi ve ligant ile matriks arasında istenmeyen bir bağlanmayı azaltacak ve engelleyecektir.

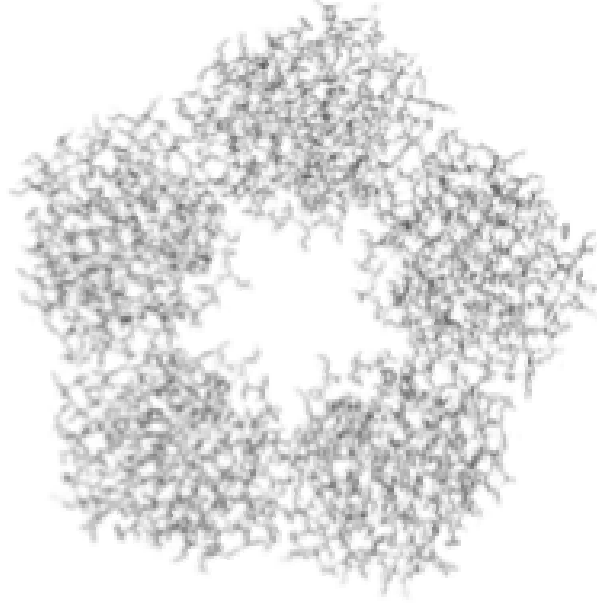
Poliglutaraldehit, poliakrilamit ve PHEMA tabanlı ve özgül biyo-molekül taşıyan magnetik mikroküreler, hücre izolasyonu için kullanılmaktadır (ör., lemfositlerin izolasyonu). Mikroküreler ayrıca çok yaygın olarak klinik immunolojide fagositoz çalışmak için kullanılmaktadır. Fagositoz; canlı sistemlerde yabancı maddelere (ör., virüs ve bakteriler) karşı en önemli savunma mekanizmalarından birisidir. 0.5-2µm aralığındaki eş boyutlu mikroküreler fagositozun kalitatif ve kantitatif araştırmalarında geniş bir şekilde uygulanmaktadır.

Tek-boyutlu mikrokürelerin immunoloji ve hücre biyolojisinde tanı kiti olarak kullanılması hızla gelişen alanlardan birisidir. Monoklonal antikorlar gibi özgül moleküller taşıyan mikroküreler hücre yüzeyi tanısında başarıyla kullanılmıştır.

2.6. C-Reaktif Protein (CRP)

İlk defa 1947 yılında kristallendirilerek elde edilmiştir (McCarty, 1947). Pneumococcal somatik C-polysaccharide ile birleştiğinden bu adı almıştır. C-reaktif protein konak bağışıklığında ve iltihaplanma durumlarında etkin olan bir akut-faz serum proteinidir (Steel ve Whitehead, 1994; Gewurz et al.,1995; Szalai et al., 1997). Akut faz tepkisinde, sitokine tepki olarak üretilen hepatosit sentezi sayesinde serum konsantrasyonu mililitrede bir ila birkaç yüz mikrograma yükselir. Bu yükselme o kadar hızlıdır ki klinikte bu artış hızı ölçülerek iltihaplanma derecesi saptanır. Deneysel veriler CRP'nin 2 önemli görevi olduğunu belirtiyor; birincisi enfeksiyonlara karşı bağışıklık sistemiyle verilen tepki (Mold ve ark., 1981;Szalai ve ark., 1995; Weiser ve ark., 1998) ve ikincisi de nekrotik hücrelerden hücre duvarının ve çekirdek materyallerinin uzaklaştırılması (Du Clos, 1996). CRP, pentraxin ailesinden bir proteindir. Alzheimer gibi birçok hastalığın

altında yatan neden olan amyloid proteinin önemli bir bileşeni olan serum amyloid P (SAP) komponenti de bu pentraxin proteinleri ailesindendir. Halkalı pentamerik yapıya ve kalsiyum temelli bağ yapısına sahiptir. CRP'nin bir yüzeyinde pneumococcal C-polysaccharide ve diğer birçok bakterideki fosfokolini tanıyan (Volanakis ve Kaplan, 1971) 5 adet kalsiyum temelli bağlanma bölgeleri bulunur (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 CRP'nin 5 farklı bağlanma bölgesi.

Her bir bağlanma bölgesinin diğer yüzeyinde ise yine bir molekül bağlanma bölgesi bulunur. Bu bölgeler C1q , Fc γ RI ve Fc γ RII proteinleri ile bağ oluşumu için aracılık ederler (Agrawal ve Volanakis, 1994; Marnell et al., 1995; Bharadwaj et al., 1999). CRP'nin biyolojik aktivitelerini sağlaması büyük oranda geniş bir ligand sınıfına bağlanabilmesiyle alakalıdır. Bu ligandlar şu şekilde sınıflandırılabilir: 1) fosfokolin ya da benzeri yapıları içeren ligandlar, 2) poly-L-lisin veya protamin sülfat gibi polikasyonik ligandlar, ve 3) D-galaktoz içeren karbohidratlar.

Son zamanlardaki araştırmalar CRP'nin bazı patojenik rollerinin de bulunduğunu göstermiştir. Öncelikle artan CRP seviyeleri özellikle miyokardiyal enfarktüs riskini arttırmaktadır. İkinci olarak da miokardiyal enfarktüsteki sonraki CRP seviyeleri de daha ileri komplikasyonların ve hatta ölüm durumunun bile tahmin edilebilmesini sağlar. Ayrıca fosfokolinin birçok patojenin hücrel yapılarının yanı sıra nekrotik ve hücre duvarları zarar görmüş hücrelerde de bulunması CRP'ye geniş bir hedef hücre aralığı sağlamaktadır.

3. DENEYSEL YÖNTEMLER

Sunulan çalışmanın birinci bölümünde monodispers poli(glisidilmetakrilat) PGMA partiküllerinin sentezi için dispersiyon polimerizasyonu yöntemi kullanılarak partikül sentezi yapılmıştır. Elde edilen mikrokürelerin boy dağılımı elektron mikroskobu (SEM) ve monomer dönüşümü gravimetrik analiz ile tayin edilmiştir.

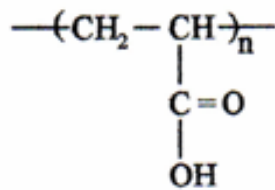
Çalışmanın ikinci bölümünde; karakterizasyonu yapılan polimerik partiküller C-reaktif protein tanısında; tanısı yapılacak antibadiye karşı hazırlanan antijenin immobilizasyonu için mikrot taşıyıcı olarak kullanılmıştır.

İmmobilize edilecek antijen olarak Monoklonal anti-human C-reaktif protein (Sigma Chem. Comp., ABD) seçilmiş ve satın alma yolu ile temin edilmiştir. Antijen başlangıç derişimi, glutaraldehit derişimi, pH, immobilizasyon süresi ve sıcaklık immobilizasyon koşullarının bulunmasında değişkenler olarak kabul edilmiş ve bunların ayrıntılı olarak incelenmesiyle en uygun koşullar saptanmıştır.

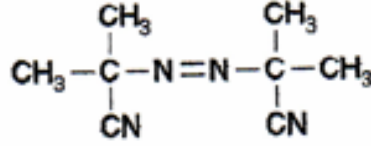
Son adımda ise; antijen immobilize partiküller, yani sentezlenen kitler hastalardan alınan serum örnekleri ve ticari olarak temin edilen pozitif kontroller ile etkileştirilerek sentezlenen kitin performansı test edilmiştir.

3.1. PGMA Partiküllerin Sentezlenmesi ve Karakterizasyon

Polimerik partiküllerin sentezi sırasında Sıcaklık Kontrollü Çalkalamalı Reaktör Sistemi kullanılmıştır. Ortalama partikül boyu ve boy dağılımının tayini ve monomer toplam dönüşümünün tayini literatürde belirtildiği şekilde yapılmıştır (Yalçın , 2002). Dispersiyon polimerizasyonu ile PGMA partiküllerin sentezlenmesi için monomer olarak glisidil metakrilat (GMA 97%, Aldrich Chem. Co., A.B.D.), stabilizör olarak poliakrilik asit (PAA) kullanılmıştır. Molekül ağırlığı, viskozimetrik yöntem ile tayin edilmiş olan poli akrilik asitin (MA: 1107.5 g/mol) dioksan ortamında çözelti polimerizasyonu olarak sentezlenmesiyle literatürde söz edildiği gibi elde edilmiştir. Polimerizasyonda başlatıcı olarak metanolla kristrillendirilmiş azobisizobutironitril (AIBN, BDH Chemicals Ltd., İngiltere); dağıtma ortamı olarak ise etanol (96%, Birpa Ltd. Şti. Ankara) kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Kullanılan PAA stabilizörünün kimyasal yapısı.



Şekil 3.2. Kullanılan başlatıcı AIBN kimyasal yapısı.

Polimerizasyon deneyleri 30 ml sabit reaksiyon hacminde 70°C’de ve 120 vuruş/dak. (cpm) çalkalama hızında gerçekleştirilmiştir. Başlatıcı derişimi 20 mg/ml monomer, stabilizör için ise 15 mg/ml olarak tutulmuştur. Polimerizasyon parametrelerinin değişiminin elde edilen polimer üzerine etkisi detaylı olarak daha önceden incelenmiştir (Yalçın , 2002).

Bu araştırma kapsamında elde edilen PGMA partiküllerin üretim yöntemi kısaca şöyledir; 30 ml dağıtma ortamında stabilizörün çözünmesinin ardından 3.0 ml GMA sisteme eklenmiştir. Belirlenen derişimde başlatıcı reaksiyon ortamında çözüldükten sonra homojen çözelti yaklaşık iki dakika boyunca azot ile yıkanmıştır. Reaktör, ağız sıkıca kapatılarak çalkalamalı su banyosuna yerleştirilmiştir. Banyo oda sıcaklığından 70°C olan polimerizasyon sıcaklığına yaklaşık yarım saat süreyle 120 cpm çalkalama varlığında ısıtılmış ve bu koşullarda 24 saat polimerizasyona devam edilmiştir. Yukarıda ayrıntılı olarak sunulan polimerizasyon reçetesi Çizelge 3.1’de verilmektedir.

Çizelge 3.1. Reaktif monodispers PGMA partiküllerin dispersiyon polimerizasyon koşulları.

Monomer GMA (ml/ml dağı. ort.)	Dağıtma Ortamı Etanol (ml)	Başlatıcı AIBN (mg/ml dağı. ort.)	Stabilizör PAA (mg/ml dağı. ort.)
0,1	30,0	20,0	15,0

Ortalama Partikül Boyu ve Boy Dağılımı

Sentezlenen PGMA mikrokürelerin ortalama boy ve boy dağılımlarının saptanması için taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılmıştır. Bu amaçla 0.10 ml partikül 5000 rpm’de santrifüjlenmiş, süpernatantı atılarak etanol ortamında ultrasonik banyoda dispers edilmiştir. Bu işlem üç kez yinelendikten sonra elde edilen dispersiyon dairesel örnek disklerinin (stub) üzerine yayılarak oda sıcaklığında sıvı fazın buharlaşması sağlanmıştır. Daha sonra vakum altında

100Å kalınlığında altın ile kaplanarak SEM cihazında (JEOL-JEM 1200 EX, Japonya) 3000X büyütme oranı ile fotoğraflanmıştır.

Elde edilen fotoğraflardan partiküller sayılarak aşağıdaki ifadeler yardımıyla sayıca ortalama çap (D_n), ağırlıkça ortalama çap (D_w) ve polidispersite indeksi hesaplanmıştır.

$$D_n = \sum n_i D_i / \sum n_i$$

$$D_w = \sum n_i D_i^4 / \sum n_i D_i^3$$

$$PDI = D_w / D_n$$

Monomer Toplam Dönüşümünün Tayini

Dispersiyon polimerizasyonu ile sentezlenen PGMA mikroküreler için monomer toplam dönüşümü gravimetrik yöntemle tayin edilmiştir. Bu amaçla polimerizasyon sonrası oda sıcaklığında soğutulan latekslerlerden alınan 5 ml örnek elektronik terazide (± 0.001) tartılmış ve 60°C'de vakum etüvünde kurutulmuştur. Sabit tartıma gelen örnek ile ilgili hesaplamalar aşağıdaki gibi yapılmıştır.

$$PA = (\text{toplam hacim} * a) / \text{örnek hacmi}$$

Burada; PA (g): oluşan polimerin ağırlığı

a (g): 5 ml örneğin ağırlığı

Toplam hacim: 30.0 ml

$$\% \text{ Monomer Dönüşümü} = (PA * 100) / (MH * d_m)$$

Burada; MH (3 ml): Polimerizasyonda kullanılan monomer hacmi

d_m : GMA monomerinin yoğunluğu

3.2. PGMA Partiküllere Antijen İmmobilizasyonu

AIBN-PAA sisteminde sentezlenen 1.166 µm çapa sahip PGMA partiküller, monoclonal anti-human CRP olarak adlandırılan antijen (Sigma Chem. Comp., ABD) immobilizasyonunda taşıyıcı olarak kullanılmıştır. İmmobilizasyonda, en eski immobilizasyon yöntemi olan; “taşıyıcıya bağlama” yönteminin kovalent bağlanma biçimi uygulanmıştır. Bu deneylerin uygulanmasında öncelikle sentezlenen polimerik mikroküreler aminleme reaksiyonuna tabi tutulmuş, daha sonra glutaraldehit (GA; ağırlıkça % 50'lik, Aldrich Chem. Co., A.B.D) kullanılarak antijen immobilizasyonu için hazır hale getirilmiştir. Antijen immobilizasyonu için

glutaraldehit, ortam pH'ı, immobilizasyon süresi, ortam sıcaklığı ve başlangıç antijen derişimi değıştirilerek immobilizasyon koşulları optimize edilmiştir. İmmobilizasyon koşullarını optimize etmek için gereken farklı pH'lardaki tamponlar; HCl (Merck, Almanya), NaOH (Merck, Almanya), CH₃COOH (BDH Chem.Ltd., İngiltere), CH₃COONa.3H₂O (Merck, Almanya), Na₂HPO₄.2H₂O (Riedel-de Haen, Sigma-Aldrich, Almanya), NaH₂PO₄.2H₂O (Riedel-de Haen, Sigma-Aldrich, Almanya), NaN₃ (Fischer Scientific Company, ABD) ve borat kullanılarak hazırlanmıştır. Antijen (Anti-antibadi) immobilizasyon miktarını saptamak için ise, IgG (Sigma Chem. Co., A.B.D) ile yapılan kalibrasyon grafiğı temel alınmıştır.

Spesifik olmayan etkileşimlerin tespiti için yapılan deneyinin ilk basamağında 1 µg antijen; 10, 25, 50, 75 ve 100 mg PGMA partiküllerine eklenmiş ve toplam hacim sodyum azit varlığında pH 7.4 tamponuyla 5 ml'ye tamamlanmıştır. Cam reaktörlere aktarılan bu karışımlar 90 dakikalık sürede ve oda sıcaklığında (25°C) manyetik karıştırıcıda 100 rpm karıştırma hızıyla etkileşime tabi tutulmuştur.

Bu etkileşimden sonra partiküller, santrifüjlenerek dağıtma ortamından uzaklaştırılmıştır. Adsorbe antijen miktarı hakkında hasta serumları ile yapılan çökeltme deney sonuçlarına göre yorum yapılmıştır .

3.2.1. Yüzey Modifikasyonu

Taşıyıcı olarak seçilen PGMA mikrokürelere antijen immobilizasyonu için yüzey modifikasyonu işleminde; öncelikle mikrokürelere üzerindeki epoksi grubu açılarak buraya bir amin grubunun (-NH₂) yerleştirilmesi sağlanmıştır. Daha sonra da bu amin grubuna bağlanan ve bifonksiyonel bir reaktif olan glutaraldehit ile de mikroküre üzerinde açıkta kalacak şekilde bir aktif aldehit grubunun antijen immobilizasyonu için hazır halde bulundurulması hedeflenmiştir.

Aminleme İşlemi

Dispersiyon polimerizasyonu ile sentezlenen mikrokürelere önce santrifüjlenerek, dağıtma ortamı olan organik fazdan (etanol) uzaklaştırılmıştır. Bu işlemten sonra partiküller distile su ile birkaç kez yıkanmış ve bu partiküllerden 1.0 g reaktöre alınarak, 10.0 ml % 25'lik amonyak çözeltisi ile 50°C'de, çalkalamalı su banyosunda 6 saat etkileştirilmiştir. Bu basamakta PGMA mikrokürelere üzerindeki epoksi halkası açılarak partikül yüzeyinde amin (-NH₂) gruplarının oluşması sağlanmıştır. Aminleme işleminden sonra partiküller distile su ile pH 7 değerine ulaşınca kadar yıkanmış, daha sonra partiküllerin gravimetrik analizi yapılmıştır.

Glutaraldehit Bağlanması

Antijenin taşıyıcıya kovalent olarak bağlanabilmesi için bifonksiyonel bir reaktif olan glutaraldehit (GA) kullanılarak mikrokürelerin yüzey aktivasyonunun gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Bu hedef doğrultusunda, glutaraldehit aktivasyonu aminleme işlemi yapılan partiküllere uygulanmıştır. Gravimetrik analizi yapılan PGMA mikrokürelerden 100 mg bir reaktöre alınarak, ağırlıkça %1 glutaraldehit içeren 10.0 ml pH 8.2 sodyumtetraborat tamponu ile etkileştirilmiştir. Aktivasyon reaksiyonu, oda sıcaklığında, 100 rpm'de ve 120 dakikada tamamlanmıştır. Bu süre sonunda partiküller, santrifüjlenerek dağıtma ortamından uzaklaştırılmış ve pH 7.4 tamponu ile üç kez yıkanarak, ortamda kalan ve özgül olmadan tutunan glutaraldehit moleküllerinin ortamdaki uzaklaştırılması sağlanmış ve partiküller immobilizasyon işlemi için hazır hale getirilmiştir.

3.3. Optimum Koşulların Tayini

Bu bölümde, antijenin optimum immobilizasyon koşullarının belirlenmesi amacıyla; glutaraldehit derişiminin, ortam pH'ının, immobilizasyon süresinin, ortam sıcaklığının ve başlangıç antijen derişiminin verime olan etkileri araştırılmıştır.

3.3.1. Glutaraldehit Derişiminin Etkisi

Değişkenlerden biri olan glutaraldehit derişiminin antijen immobilizasyonuna ve immobilize antijenin aktivitesine etkisinin belirlenmesi için yapılan çalışmalar bu bölümde belirtilmiştir.

Çift aldehit gruplu bir bileşik olan glutaraldehitin kullanılma amacı, mikroküre ile antijen arasında bir uzatma kolu görevi yaparak immobilizasyon sonucunda olması muhtemel aktivasyon kaybını mümkün olduğunca engellemektir. Değişen glutaraldehit konsantrasyonu ile bu amaç için en uygun glutaraldehit miktarı belirlenebilecektir.

Bu amaçla başlangıç glutaraldehit derişimi %0.5, 1, 2 ve 4 olarak denenmiştir. 100 mg PGMA partikülleri değişen miktarlarda glutaraldehit içeren 10 ml pH 8.2 sodyum tetraborat/HCl tamponunda 120 dakika süresince, 100 rpm karıştırma hızında, oda sıcaklığında reaksiyona sokulmuştur. Glutaraldehitleme işleminin ardından partiküller, santrifüjlenerek dağıtma ortamından uzaklaştırılmış ve 3 kez de pH 7.4 tamponu ile yıkandıktan sonra partiküllere 1 µg antijen eklenmiş ve toplam hacim yine pH 7.4 tamponuyla 5 ml'ye tamamlanmıştır. Reaksiyon 90 dakika sonunda tamamlanmış ve immobilizasyon miktarı Modifiye Lowry analizinin uygulanmasıyla hesaplanmıştır.

3.3.2. PH Etkisi

PGMA partiküllerine antijen immobilizasyonunda etkin olan bir başka değişken ise immobilizasyon ortamının pH'ıdır.

Proteinlerin 3-boyutlu yapısını değiştiren etkenlerden birisi ortam pH'ıdır. 3-boyutlu yapının değişmesi proteinin aktivasyonunu ve yüzeye tutunabilmesini değiştirmektedir. Belirli bir aralıktaki pH değerlerinin denenmesiyle antijenin 3-boyutlu yapısının immobilizasyon için en uygun hale getirilmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla gerçekleştirilen deneylerde ortam pH'ı çeşitli tamponlar kullanılarak 6-8 aralığında değiştirilmiştir.

Deneylerde yine 100 mg partikülün glutaraldehitlenmesi, 10 ml hacim içersinde %2'lik GA kullanılarak ve manyetik karıştırıcıda 100 rpm karıştırma hızında 120 dakika karıştırılarak gerçekleştirilmiştir. Bu işlemin ardından partiküller santrifüjlenerek dağıtma ortamından uzaklaştırılmış ve yine 3 kez pH 7.4 tamponu ile yıkanmıştır.

Yıkama işleminin ardından cam reaktörlerdeki partiküllere eşdeğer miktarda (1 µg) antijen eklenmiş ve toplam hacim, farklı pH'larda (6, 7, 7.4, 8) tamponlar kullanılarak 5 ml'ye tamamlanmıştır.

Partiküller, 90 dakika manyetik karıştırıcıda 100 rpm karıştırma hızında immobilizasyona tabi tutulduktan sonra, santrifüjlenerek dağıtma ortamından uzaklaştırılmış ve immobilize antijen miktarı, yine süpernatanta uygulanan Modifiye Lowry toplam protein tayin yöntemi ile saptanmıştır.

3.3.3. Sürenin Etkisi

PGMA partiküllerine antijen adsorpsiyon ve immobilizasyonunda etkin olan önemli değişkenlerden biri immobilizasyon süresidir. Bu amaçla gerçekleştirilen deneylerde süre 30, 60, 90 ve 120 dakikalık periyotlar kullanılarak deneyler gerçekleştirilmiştir.

Kovalent bağlama yönteminin birinci aşamasında herbiri 100 mg PGMA partikülleri içeren cam reaktörlere, % 2'lik GA eklenmiş ve toplam çözelti hacmi de pH 8.2 sodyum tetraborat/HCl tamponu ile 10 ml'ye tamamlanmıştır. Cam reaktörlerdeki 10 ml'lik çözeltiler, oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda 100 rpm karıştırma hızında 120 dakika karıştırılarak; glutaraldehitlenme reaksiyonuna tabi tutulmuştur.

Bu süre sonunda partiküller, dağıtma ortamından uzaklaştırılmak amacıyla santrifüjlenmiş ve 3 kez pH 7.4 tamponu ile yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından 1 µg antijen, 100 mg PGMA partiküllerine eklenmiş ve toplam hacim pH 7.4 tamponuyla 5 ml'ye tamamlanmıştır. Cam reaktördeki bu karışımlar farklı

immobilizasyon süreleri boyunca (30, 60, 90 ve 120 dak.) manyetik karıştırıcıda 100 rpm karıştırma hızında reaksiyona tabi tutulmuştur. Bu etkileşimden sonra partiküller, santrifüjlenerek dağıtma ortamından uzaklaştırılmış ve immobilize antijen miktarı, süpernatanta uygulanan Modifiye Lowry toplam protein tayin yöntemi ile saptanmıştır.

3.3.4. Sıcaklık Etkisi

İmmobilizasyon ortam sıcaklığının antijen immobilizasyonuna ve immobilize antijenin aktivitesine etkisinin belirlenmesi için yapılan çalışmalar bu bölümde belirtilmiştir. Ortam sıcaklığı da pH değerleri gibi proteinin 3-boyutlu yapısına etki eden ortam koşullarındandır.

Bu amaçla immobilizasyon ortam sıcaklığı 4, 25 ve $37\pm1^{\circ}\text{C}$ olmak üzere üç farklı sıcaklığa ayarlanarak deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu deneyler sırasında da birinci aşamada partikül miktarı 100 mg, reaksiyon hacmi 10 ml, GA derişimi % 2, glutaraldehitlenme süresi 120 dak. ve ortam pH'ı 8.2 olarak sabitlenmiştir. İkinci aşamada ise pH 7.4 tamponu kullanılarak 3 kez yapılan yıkamanın ardından yine herbiri glutaraldehitlenmiş 100 mg partikül içeren cam reaktörlere 1 μg antijen eklenmiş ve toplam hacim pH 7.4 tamponuyla 5 ml'ye tamamlanmıştır. Antijenin partiküllere immobilizasyonu sırasında ise 90 dakika manyetik karıştırıcıda 100 rpm karıştırma hızında işlem her bir reaktör için ayrı bir sıcaklıkta (4, 25 ve 37°C) ± 1 hassasiyetle gerçekleştirilmiştir.

Farklı sıcaklıklardaki immobilizasyonun ardından partikülleri dağıtma ortamından uzaklaştırmak için santrifüjleme yapıldıktan sonra immobilize antijen miktarı, yine süpernatanta uygulanan Modifiye Lowry toplam protein tayin yöntemi ile saptanmıştır.

3.3.5. Başlangıç Antijen Derişiminin Etkisi

Kovalent bağlama deneylerinde başlangıç antijen derişiminin etkisi incelenirken; yine herbiri 100 mg PGMA partikülleri içeren cam reaktörlere, eşdeğer miktarda (%2'lik) GA eklenmiş ve toplam çözelti hacmi de pH 8.2 sodyum tetraborat/HCl tamponu ile 10 ml'ye tamamlanmıştır. Cam reaktörlerdeki 10 ml'lik çözeltiler, oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda 100 rpm karıştırma hızında 120 dakika karıştırılarak; glutaraldehitlenme işlemine tabi tutulmuştur. Bu süre sonunda partiküller, santrifüjlenerek dağıtma ortamından uzaklaştırılmış ve 3 kez pH 7.4 tamponu ile yıkanmıştır.

Yıkama işeminin ardından 1.5, 2.0, 2.5, 5, 10, 15, 20 ve 25 μg olarak belirlenen farklı miktarlardaki antijen, 100 mg PGMA partiküllerine eklenmiş ve toplam hacim pH 7.4 tamponuyla 5 ml'ye tamamlanmıştır. Cam reaktördeki bu

karışımlar 90 dakika manyetik karıştırıcıda 100 rpm karıştırma hızında immobilizasyona tabi tutulmuştur. Bu etkileşimden sonra partiküller, santrifüjlenerek dağıtma ortamından uzaklaştırılmıştır. Son basamakta immobilize antijen miktarı, süpernatanta uygulanan Modifiye Lowry toplam protein tayin yöntemi ile saptanmıştır.

3.4. Antijen İmmobilize Partiküllerin Hasta Serum ve Pozitif Kontrol ile Testleri

Araştırmanın son bölümünde enfeksiyon geçiren hastalardan temin edilen taze serum örnekleri ve ticari olarak temin edilen pozitif kontroller (Human Serum with sodium azide 0.1%; Linear Chemicals, İspanya) kullanılarak in-vitro ortamda çökelme (agglomerasyon/flokülasyon) deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerde kullanılan ve araştırma kapsamında sentezlenen partiküllerin tanımları Çizelge 3.2'de verilmektedir.

Çökelme testinin uygulanışı

Uygulanan CRP tanı testinde: Antijen emülsiyonu; antijen immobilizasyonu sonucu elde edilen PGMA partiküllerinin, 5 ml pH 7.4 (sodyum azitli) tamponu ile homojenize edilmesi sonucu hazırlanmıştır. Bu antijen emülsiyonundan mikropipet ile, tek kullanımlık bir test kartı üzerine damlatılarak, oda sıcaklığındaki ve eşit miktardaki (~30-40 µl) hasta serumuyla etkileştirilmiştir. Kart üzerinde kit ve serum bir pipet ucu ile karıştırılmış ve bu işlemin hemen ardından kart nemli koşullarda ve oda sıcaklığında manuel olarak döndürülmüştür. Etkileşimi gözleyebilmek için karışım 2 dakika boyunca gözlenmelidir (Gabay ve Kushner, 1999).

Hasta serumlarındaki CRP tanısı için antijen antikor etkileşimi sonunda oluşan çökelek hakkında yapılan yorumlar, Çizelge 3.3'de verilen skorlama tablosuna uyularak gerçekleştirilmiştir. Agglutinasyon esaslı tanı kitlerinde oluşan çökelekler birçok farklı şekilde yorumlanabilmektedir. Bir grup tanı kitlerinde çökelek oluşumunun süresi önemliyken (ör: RPR, HIA, BBA kitleri) diğer bir grup kitlerde ise oluşan çökeleğin şiddeti önem kazanmaktadır (ör: RF kitleri). CRP tanı kitlerinin de içinde bulunduğu diğer bir grup test kitlerinde ise çökelek oluşumunun süresinden veya şiddetinden bahsedilerek performansı değerlendirilemez. CRP test kitlerinde reaktif ile hasta serumunun reaksiyona girmesiyle ya çökelek oluşumu gözlenerek pozitif değer bildirilir ya da çökelek oluşmaz ve negatif sonuç bildirilir. Kullanılan kitin hassasiyetine bağlı olarak zayıf bir çökelti oluştuğunda bu sonuç gözönüne alınamaz. Kesin sonuç için şiddetli bir çökeleğin gözlenmesi şarttır.

Çizelge 3.2. Serum ve pozitif kontroller ile yapılan deneylerde kullanılan partiküllerin tanımları.

Sentezlenen Kit numaraları	Sentezlenen kitlerin Tanımı
1-1	yüzeyleri amin modifiye 10 mg polimerik taşıyıcı ile hazırlanan kit
1-2	yüzeyleri amin modifiye 25 mg polimerik taşıyıcı ile hazırlanan kit
1-3	yüzeyleri amin modifiye 50 mg polimerik taşıyıcı ile hazırlanan kit
1-4	yüzeyleri amin modifiye 75 mg polimerik taşıyıcı ile hazırlanan kit
1-5	yüzeyleri amin modifiye 100 mg polimerik taşıyıcı ile hazırlanan kit
2-1	yüzeyleri aldehit modifiye 10 mg polimerik taşıyıcı ile hazırlanan kit
2-2	yüzeyleri aldehit modifiye 25 mg polimerik taşıyıcı ile hazırlanan kit
2-3	yüzeyleri aldehit modifiye 50 mg polimerik taşıyıcı ile hazırlanan kit
2-4	yüzeyleri aldehit modifiye 75 mg polimerik taşıyıcı ile hazırlanan kit
2-5	yüzeyleri aldehit modifiye 100 mg polimerik taşıyıcı ile hazırlanan kit
2-6	yüzeyleri aldehit modifiye 125 mg polimerik taşıyıcı ile hazırlanan kit
3-1	% 0,25 GA konsantrasyonu ile hazırlanan kit
3-2	% 0,5 GA konsantrasyonu ile hazırlanan kit
3-3	% 1,0 GA konsantrasyonu ile hazırlanan kit
3-4	% 2,0 GA konsantrasyonu ile hazırlanan kit
3-5	% 4,0 GA konsantrasyonu ile hazırlanan kit
4-1	pH 6' da hazırlanan kit
4-2	pH 7' de hazırlanan kit
4-3	pH 7.4' de hazırlanan kit
4-4	pH 8' de hazırlanan kit
5-1	30 dakikalık immobilizasyon ile hazırlanan kit
5-2	60 dakikalık immobilizasyon ile hazırlanan kit
5-3	90 dakikalık immobilizasyon ile hazırlanan kit
5-4	120 dakikalık immobilizasyon ile hazırlanan kit
5-5	180 dakikalık immobilizasyon ile hazırlanan kit
6-1	+4°C'de yapılan immobilizasyon ile hazırlanan kit
6-2	+25°C'de yapılan immobilizasyon ile hazırlanan kit
6-3	+37°C'de yapılan immobilizasyon ile hazırlanan kit
7-1	1,5 µg başlangıç antijen miktarı ile hazırlanan kit
7-2	2,0 µg başlangıç antijen miktarı ile hazırlanan kit
7-3	2,5 µg başlangıç antijen miktarı ile hazırlanan kit
7-4	5,0 µg başlangıç antijen miktarı ile hazırlanan kit
7-5	10,0 µg başlangıç antijen miktarı ile hazırlanan kit
7-6	15,0 µg başlangıç antijen miktarı ile hazırlanan kit
7-7	20,0 µg başlangıç antijen miktarı ile hazırlanan kit
7-8	25,0 µg başlangıç antijen miktarı ile hazırlanan kit

Çizelge 3.3. Serum ve pozitif kontroller ile yapılan deneylerde kullanılan skarlama tanımları.

Skor	Tanım
+++	10 mg/dl CRP kons. şiddetli çökelti oluşumu
++	20 mg/dl CRP kons. şiddetli çökelti oluşumu
+	30 mg/dl CRP kons. şiddetli çökelti oluşumu
-	Çökelti oluşumu yok.

Burada verilen tablodaki çökelti tanımlarında yer alan CRP konsantrasyonu değerleri ölçüm aygıtından (Hitachi 912, ABD) okunan değerlerdir. (+++) ile skorlanan bir kit, CRP derişimi 10 mg/l olan bir hasta serumu ile etkileştirdiğinde çökelti oluşturduğu anlamındadır. Aynı şekilde (++) ile skorlanan bir kit 20 mg/l ve (+) ile skorlanan bir kit de 30 mg/l CRP derişiminde çökelti oluşturduğu anlamındadır. Sonuç olarak sentezlenen kitlerden (+++) ile skorlanan en yüksek hassasiyete (+) ile skorlanan ise en düşük hassasiyete sahip kit anlamındadır. (-) ise hasta serumu ile etkileştiğinde çökelti oluşturmayan kitleri tanımlamak amacıyla kullanılacaktır. Yapılan çökeltme deneyleri sonunda hazırlanan bu skarlama tablosuna sadık kalınarak kitlerin reaktifliği saptanmıştır.

3.5 Modifiye Lowry Toplam Protein Tayin Yöntemi

Antijen immobilizasyonu deneylerinden sonra immobilize olan antijen miktarının tayininde, mikroküreler uzaklaştırıldıktan sonra kalan deney çözeltisine Modifiye Lowry yöntemi uygulanmıştır. Yöntem, aşağıda sunulan prosedür izlenerek uygulanmıştır.

Stok çözeltiler

1. *Copper-tartrate-carbonate* (bakır-tartarat-karbonat, CTC). %20'lik sodyum karbonat çözeltisi sonuçta %0,1 bakır sülfat (pentahidrat), %0,2 potasyum tartarat ve %10 sodyum karbonat içerecek şekilde bakır sülfat-tartarat çözeltisine yavaşça karıştırılarak eklenir. Oluşan çözelti oda sıcaklığında (20°C) en az 2 ay saklanabilir.

2.%10'luk sodyum dodesil sülfat (SDS). Yaklaşık %95 saflıkta (Sigma Chem. Comp., ABD) sodyum dodesil sülfat kullanılmıştır. 750 nm'de son örnek içinde yaklaşık 0.005 absorbans vermektedir. Uygun hazırlanan kör ile kontrol edilebilir.

3.0,8 N Sodyum Hidroksit (NaOH)

4.Folin-Ciocalteu fenol reaktifi. 2N çözelti halinde kullanılmaktadır (Merck, Almanya).

Deney çözeltileri

1.%0,15 Sodyum deoksikolat (DOC).

2.%72 Trikloro asetik asit (TCA).

3.Reaktif A. Eşit miktarlarda stok CTC, NaOH, SDS ve distile suyun karıştırılmasıyla elde edilir. Bu çözelti oda sıcaklığında (20°C) en az 2 hafta korunabilir. Oluşabilecek beyaz çökelti (SDS), kullanımdan önce iyice karıştırılması koşuluyla renk gelişimini etkilemeyecektir. Düşük sıcaklıklarda SDS çözeltilerden ayrılacaktır ancak tekrar ısıtma veya seyreltme ile tekrar çözünür.

4.Reaktif B. 1 hacim Folin-Ciocalteu fenol reaktifi 5 hacim saf su ile karıştırılır. Oluşan çözelti oda sıcaklığında (20°C) ve koyu renkli bir şişede saklanabilir.

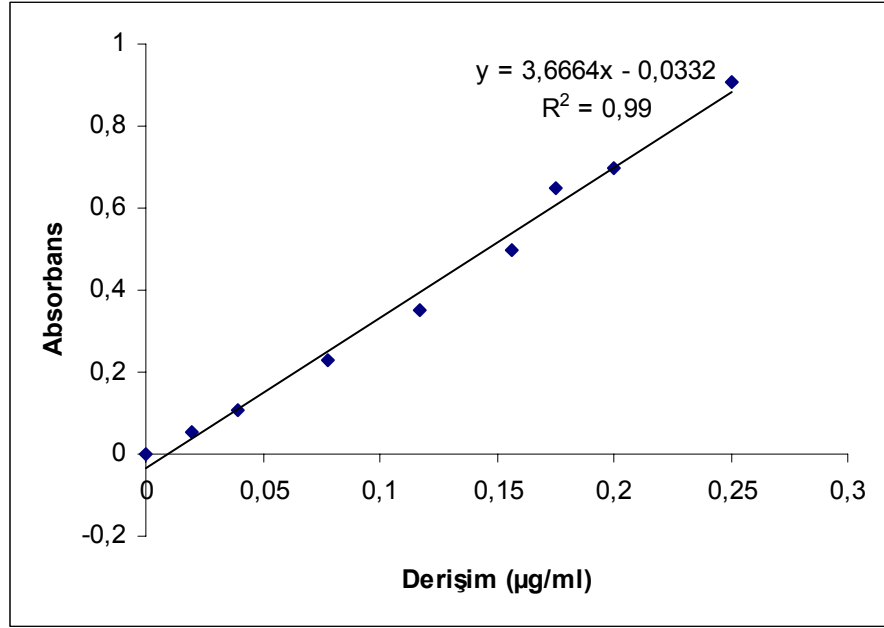
Yöntem

1.Çöktürme basamağı. Protein örneği 1 ml olacak şekilde saf su ile seyreltilir. Bu örneğe 0.1 ml %0,15'lik DOC eklenir, karıştırılır ve 10 dakika oda sıcaklığında (20°C) bekletilir. Bu karışıma 0.1 ml %72'lik TCA eklenir, karıştırılır ve 10 dakika oda sıcaklığında (20°C) bekletilir. 30 dakika boyunca 14000 rpm'de santrifüjlenir. Supernatant atılır, oluşan çökelek protein tayinin ikinci basamağı için saklanır. Örnekteki protein konsantrasyonunun çok düşük olduğu durumlarda burada verilen miktarlar arttırılabilir ancak çökelmenin tamamlanabilmesi için daha uzun santrifüjleme zamanı gerekebilir.

2.Spektrofotometri basamağı. İlk basamaktan elde edilen çökeleğe 0,2 ml saf su eklenir. Buna 0,2 ml reaktif A eklenir, karıştırılır ve 10 dakika oda sıcaklığında (20°C) bekletilir. Reaktif A'nın eklenmesiyle protein çökeleği derhal çözünür. 0,1 ml reaktif B eklenir ve karıştırılır. 30 dakika oda sıcaklığında (20°C) ve karanlık bir ortamda bekletildikten sonra 750 nm'de absorbans ölçümleri alınır. En geç 2 saat içinde ölçümlerin alınması gerekir aksi takdirde her saat başına renk kaybı yaklaşık %1-2'dir.

Şekil 3.3'de Modifiye Lowry toplam protein tayini için kullanılmak üzere hazırlanmış bir kalibrasyon grafiği görülmektedir. Grafikte x-ekseni antikor

konsantrasyonunu ($\mu\text{g/ml}$), y-ekseni ise bu konsantrasyonlara karşılık gelen 750nm'deki absorbens değerleridir.



Şekil 3.3. Kalibrasyon grafiği.

4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞILMASI

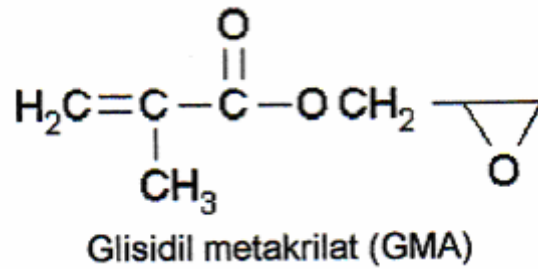
Sunulan bu çalışma kapsamında dispersiyon polimerizasyonu yöntemi kullanılarak monodispers PGMA partiküllerinin üretimi gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen polimerik mikrokürelerin boy dağılım özellikleri elektron mikroskobu (SEM) ile; monomer dönüşümleri ise gravimetrik analiz metoduyla tayin edilmiştir.

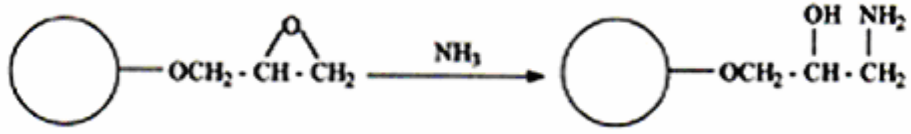
Polimerik partiküller, C-reaktif protein tanısında; tanısı yapılacak antibadiye karşı antijen olarak bulunan anti human C-reaktif protein immobilizasyonu için mikrotasıyıcı olarak kullanılmıştır. İmmobilizasyon süresi, glutaraldehit derişimi, antijen başlangıç derişimi, pH ve sıcaklık immobilizasyon koşullarının bulunmasında değişkenler olarak kabul edilmiş ve bunların ayrıntılı olarak incelenmesiyle optimum koşulların saptanması çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın son aşamasında antijen immobilize partiküllerin hastalardan alınan serum örnekleriyle ve pozitif kontroller ile etkileştirilmesiyle sentezlenen kit için performans çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda elde edilen sonuçlar ve bunlara ait tartışmalar aşağıda gruplandırılarak sunulmuştur.

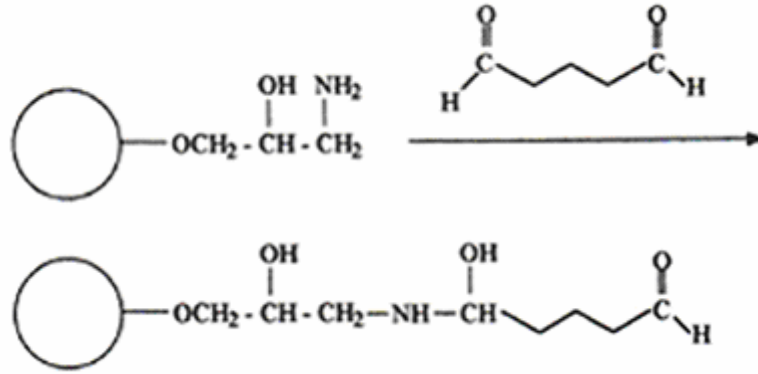
4.1. PGMA Partiküllerinin Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu

Sunulan çalışmanın bu bölümünde GMA monomeri, başlatıcı olarak azobisisobutironitril (AIBN) ve stabilizör olarak anyonik yapıda bir polimer olan poliakrilikasit (PAA) kullanılarak, etanol dağıtma ortamında dispersiyon polimerizasyonu ile polimerleştirilmiştir. Şekil 4.1'de gösterildiği gibi, GMA, yapısında bir reaktif epoksi halkası içermektedir. Bu fonksiyonel grup yüzey aktivasyonu için kullanılmıştır. Birinci adımda amonyak ile etkileştirilerek primer amin formuna dönüştürülmüş ve ikinci adımda ise GA ile reaksiyona sokularak protein enzim v.b moleküllerin immobilizasyonu sağlanmıştır. Açıklanan aktivasyon basamakları Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.





a) Aminleme



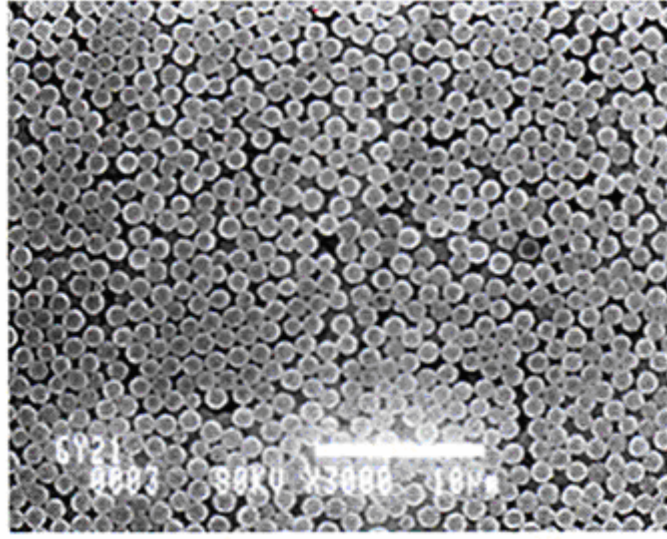
b) GA takılması

Şekil 4.1. GMA monomerinin kimyasal yapısı ve aktivasyon reaksiyonları.

Sentezlenen PGMA partiküllerinin karakterizasyonu çalışmalarında AIBN-PAA sistemine ait partiküllerin boy dağılımı ve monomer dönüşümü özellikleri Çizelge 4.1’de verilmektedir. Bu çizelgede elde edilen monomer dönüşümü değerlerinin yeterince yüksek olduğu görülmektedir. Yine bu sisteme ait partiküllerin ortalama boy ve boy dağılım özelliklerini gösteren SEM mikrografı Şekil 4.2’de sunulmuştur. Bu sonuçlar kullanılan formülasyonun başarıyla çalıştığını göstermektedir. Ayrıca sentezlenen partiküller monodispers yapıdadır. PAA’nın stabilizör olarak kullanıldığı bu çalışmada sentezlenen partiküllerin özelliği, yüzeylerinin kontrollü bifonksiyonel yapıya sahip olmasıdır. Bilindiği gibi dispersiyon polimerizasyonu sisteminde partikül oluşumu, sürekli fazda oluşan polimer zincirlerinin aynı fazdaki stabilizör zincirleri üzerine graft olarak sürekli fazdan ayrılması (çekirdeklenme basamağı) ile meydana gelmektedir. Dispersiyon polimerizasyonu üzerine yapılan çalışmalar stabilizörün polimerizasyon sonrasında ağırlıklı olarak partikül yüzeyi üzerinde toplandığını ortaya koymaktadır (Cawse et al., 1997). Dolayısıyla PAA’nın stabilizör olarak kullanıldığı dispersiyon polimerizasyonu deneyleri sonucunda üretilen partiküllerin yüzeyinde, GMA’dan gelen epoksipropil grubu ve PAA’dan gelen karboksil grubunun birlikte olması beklenir.

Çizelge 4.1. Reaktif monodispers PGMA partiküllerin dispersiyon polimerizasyon sonuçları.

AIBN derişimi (ml/ml)	PAA Derişimi (mg/ml)	Sayıcı Ort. Çap (D_n μ m)	Ağırlıkça Ort. Çap (D_w μ m)	Polidispersite indeksi (PDI)	Monomer Dönüşümü (% ağırlık)
20,0	15,0	1,166	1,166	1,000	88,67



Şekil 4.2. AIBN-PAA sisteminde elde edilen PGMA partiküllere ait SEM fotoğrafı.

4.2. PGMA Partiküllere Antijen İmmobilizasyonu

Yapılan çalışmanın bu bölümünde AIBN-PAA sisteminde sentezlenen 1.166 μ m çapa sahip PGMA partiküllere antijen immobilizasyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Literatürde, benzer uygulamalar için hazırlanan taşıyıcı olarak kullanılan mikrokürelerin çapları Wei ve arkadaşlarının 2000 yılındaki çalışmalarında 48 nm, Molina-Bolivar ve arkadaşlarının 1997 yılındaki çalışmalarında 196 nm ve Deegan ve arkadaşlarının 2003 yılındaki çalışmalarında ise 210 nm'dir (Molina-Bolivar et al., 1997, Deegan et al., 2003 ve Wei et al., 2000). Ancak bu büyüklükteki taşıyıcıların oluşturacağı çökelti ancak nefelometre, türbidimetre veya luminometre gibi optik ölçüm aletleriyle türbidite ölçümüyle belirlenebilmektedir. CRP/PC (C-reaktif/protein-fosfokolin) etkileşimini kullanan Tamura ve arkadaşlarının 2000 yılındaki çalışmalarında kullandıkları başka bir test sisteminde ise CRP/PC kompleksinin miktar tayini için florometri ve radiometri gibi ileri sinyal yorumlama tekniklerine ihtiyaç duymuşlardır (Tamura et

al., 2000). Sunulan araştırma kapsamında sentezlenen kitin avantajı ise sentezlenen mikrokürelerin oluşturduğu çöktillerin hemen gözle izlenebilmesidir.

Sunulan çalışmanın ilgili literatürlerdeki çalışmalardan farkı; kitin sentezlenmesinde katı immunosorbent olarak, PGMA partiküllerinin kullanılmasıdır. Serra ve arkadaşlarının 1992 yılındaki ve Hidalgo-Alvarez ve Galisteo-Gonzalez'in de 1995 yılındaki çalışmalarında katı immunosorbent olarak kullandıkları polistren mikroküreler, düşük kolloid stabiliteye sahiplerdir (Serra et al., 1992, Hidalgo-Alvarez ve Galisteo-Gonzalez, 1995).

Polistren mikroküreler kullanılarak gerçekleştirilen immobilizasyon çalışmalarında düşük stabilite nedeniyle spesifik olmayan çökeltme gözlenmiştir. Bunun anlamı, mikroküreler etkileşime girdiği serum içerisinde hedef molekül dışında herhangi başka bir maddeye bağlanarak çökelti oluşturabilirler.

Bu tür bir etkileşim test kitinin sonucunu olumsuz etkiler. Bu tür sorunları ortadan kaldırmak amacıyla lateks mikrokürelerin yüzeyini inaktif proteinlerle kaplamak ya da iyonik olmayan yüzey aktif maddelerin kullanılması önerilmiştir (Okubo et al., 1987, Ortega-Vinuesa ve Hidalgo-Alvarez, 1995). Ancak bu tür stabilizasyon işlemlerinin bazı dezavantajları bulunmaktadır. Örneğin; IgG-lateks komplekslerinden yalnızca düşük protein miktarlı olanları inaktif proteinlerle stabilize edilebilir. Yüzey aktif maddeler ise protein desorpsiyonuna neden olabilmektedirler.

İmmobilizasyonda; en eski immobilizasyon yöntemi olan, "taşıyıcıya bağlama" yönteminin kovalent bağlama biçimlerinin verimleri araştırılmıştır. Oldukça sıkça kullanılan yöntemde bir ELİSA kitinde, IgG plastik bir mikrotitre tabakaya adsorpsiyon yöntemiyle immobilize edilmiştir. Bu tür bir immunoessayde fonksiyonellik büyük oranda IgG'nin antijeni bağlayabilme koşuluna dayanır. Adsorbe olan IgG molekülünün yapısındaki değişiklik bağlanma bölgelerinde istenmeyen oryantasyon bozukluklarına neden olur. Sonuçta, antijen IgG üzerindeki bağlanma bölgesine ulaşamaz.

Sunulan bu çalışmada yine en eski immobilizasyon yöntemi olan, "taşıyıcıya bağlama" yönteminin kovalent bağlama biçimi kullanılmış ve ayrıca uzatma kolu olarak kullanılan glutaraldehit ile yüzeyler modifiye edilmiştir. GA modifiye yüzeye immobilizasyon ile de oluşabilecek aktivasyon kayıplarını önemli oranda engellemektedir.

Antijen immobilize partiküllerin serum ve pozitif kontrol ile etkileşim deneyleri sonucunda gerek hiç işlem görmemiş mikrokürelere gerekse yüzeyi aminlenmiş mikrokürelere spesifik olmayan etkileşimin olmadığı görülmüştür.

Araştırmanın bu bölümünde elde edilen sonuçlar aşağıda gruplandırılarak sunulmuştur.

4.2.1. Yüzey Modifikasyonu

4.2.1.1. Amin Modifiye Partiküller ile etkileşim

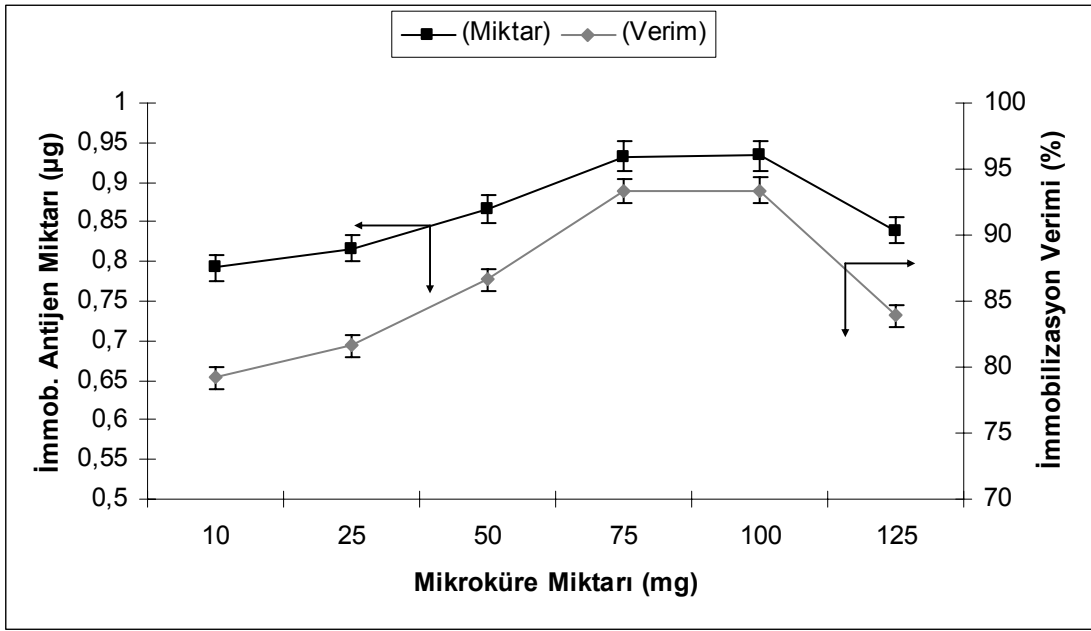
Bu bölümde öncelikle antijenin PGMA partiküllerinin epoksi fonksiyonel grubu üzerinden oluşturulan amino grubu ile spesifik olmayan etkileşim denemeleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 1 µg antijen, 5 ml pH 7.4 tamponunda farklı polimerik taşıyıcı miktarlarında (10, 25, 50, 75 ve 100 mg), 100 rpm karıştırma hızında ve oda sıcaklığında etkileşime tabi tutulmuştur.

Bölüm 4.4'te verilen, hasta serumları ile yapılan çökelme deneyi sonuçlarına göre partiküller üzerine adsorbe olan antijen miktarı ile anti CRP arasında olduğu düşünülen etkileşim sonuçlarına göre, spesifik olmayan etkileşimin olmadığı anlaşılmıştır. Serum etkileşimleri (Çizelge 4.2) sonuçlarından da anlaşılabacağı gibi yüzeyi amin modifiye mikrokürelere tutunan anti-CRP, hasta serumuyla ya da pozitif kontroller ile reaksiyon vermemekte yani çökelek oluşturmamaktadır.

4.2.1.2. Glutaraldehit Modifiye Partiküllere İmmobilizasyon

Bu bölümde PGMA mikrokürelere antijen immobilizasyonunda uzatma kolu takılması gerçekleştirilmiştir. Uzatma kolu olarak bifonksiyonel bir bileşik olan ve yaygın olarak kullanılan glutaraldehit seçilmiştir (Hou et al., 1991). Bu amaçla glutaraldehit derişimi %1 olan ve 10, 25, 50, 75, 100 ve 125 mg PGMA partikül içeren 10 ml pH 8.2 sodyum tetraborat/HCl tamponunda 120 dakika süresince, 100 rpm karıştırma hızında, oda sıcaklığında reaksiyona sokulmuştur. Glutaraldehitlenme işleminin ardından partiküller, santrifüjlenerek dağıtma ortamından uzaklaştırılmış ve pH 7.4 tamponu ile 3 defa yıkandıktan sonra partiküllere 1 µg antijen eklenmiş ve toplam hacim yine pH 7.4 tamponuyla 5 ml'ye tamamlanmıştır. Reaksiyon 90 dakika sonunda tamamlanmış ve immobilize antijen miktarı Modifiye Lowry toplam protein analizinin uygulanmasıyla hesaplanmıştır.

Söz konusu Modifiye Lowry analizinin sonuçlarına göre %93,4 değerlerine varan immobilizasyon verimi sağlanmış ve de hasta serumu ve pozitif kontroller ile yapılan çökelme reaksiyonları olumlu sonuç vermiştir.



Şekil 4.3. Yüzeyi glutaraldehit modifiye taşıyıcı miktarı ile immobilizasyon yüzdesi değişimi. Ortam Koşulları: 1µg/5ml antijen derişimi, %1 [GA], pH 7.4, 25°C, 90 dak. immob. süresi.

Şekil 4.3'te immobilize antijen miktarının değişen mikroküre miktarı ile ilişkisi görülmektedir. Bu bilgiye göre varsayılan koşullar için mikroküre miktarı 100 mg olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar değerlendirilerek glutaraldehit modifiye yüzeyin immobilizasyon için kullanıldığı bu uzatma kolu takılması yönteminin uygun olduğuna karar verilmiştir. Buijs ve arkadaşları ve yine Molina-Bolivar ve arkadaşları tarafından 1997 yılında polistren mikroküreler kullanılarak yapılan çalışmalarda uygulanan yüzey modifikasyonu işlemlerinden birisi de immobilizasyon sonrası yüzeyin BSA ile kaplanmasıdır (Buijs et al., 1997, Molina-Bolivar et al., 1997). Bu tür bir modifikasyonun amacı taşıyıcı üzerindeki uygun olmayan bağlanma bölgelerini kapatarak hedef antijeni spesifik olmayan bağlanmadan korumaktır. Ancak BSA'nın bu şekilde kullanımının önemli bir dezavantajı vardır. Ortama eklenen BSA taşıyıcıya tutunan IgG ile yerdeğiştirebilir veya immobilize haldeki IgG molekülünün oryantasyonunda değişimlere sebep olabilir. Her iki durumda da kitin performansının olumsuz etkileneceği açıktır. Sunulan bu çalışmadaki immobilizasyon yönteminde ise yüzey modifikasyonu için glutaraldehit dışında kullanımına gereksinim duyulan herhangi ek bir reaktif bulunmadığından, yöntem son derece basittir.

Uygulanan yüzey modifikasyonunda, glutaraldehitin bir ucundaki aldehit grubu, polimerik mikrokürelerin yüzeylerinde oluşturulan amin uç gruplarına diğer aldehit uç grubu açıkta kalacak şekilde bağlanmıştır. Bu bağlanmanın yarattığı etki, immobilize antijen molekülünün aktivitesinin korunmasına yardımcı olmuştur.

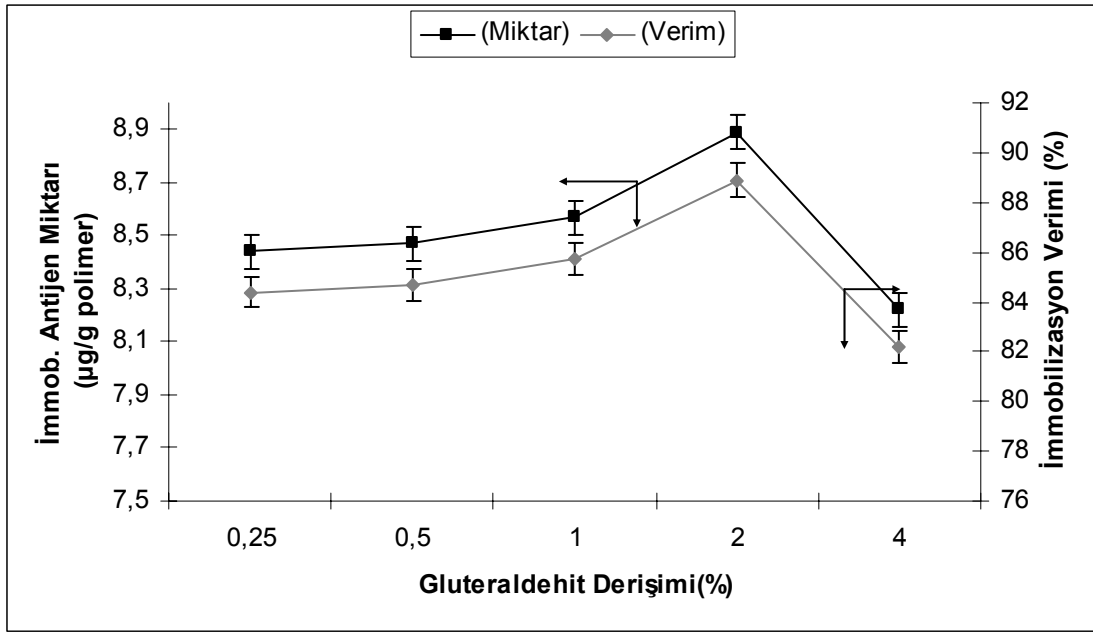
4.3. Optimum İmmobilizasyon Koşulları

Antijen immobilize edilmiş polimerik partiküller, hasta serumu ve pozitif kontroller ile etkileştirildiğinde; kovalent bağlama yönteminin ve glutaraldehitin uzatma kolu olarak kullanımının etkin olduğunu göstermiştir. Bu nedenle çalışmanın bundan sonraki aşamalarında bu yöntem seçilmiş ve kullanılmıştır.

Bu amaçla; glutaraldehit derişiminin (% 0.5, 1, 2 ve 4), ortam pH'ın (6, 7, 7.4 ve 8), immobilizasyon süresinin (30, 60, 90, 120 ve 180 dak.), immobilizasyon sıcaklığının (4, 25 ve 37°C) ve başlangıç antijen derişiminin (1, 1.5, 2.0, 2.5, 5, 10, 15, 20 ve 25 µg/5ml) immobilizasyon verimine ve immobilize antijen aktivitesine olan etkileri araştırılmıştır. Detaylı bilgiler aşağıda gruplandırılarak sunulmaktadır.

4.3.1. Glutaraldehit Derişiminin Etkisi

Çalışmanın bu bölümde PGMA mikrokürelere antijen immobilizasyonunda immobilize antijen moleküllerinin aktivitesini korumak amacıyla uzatma kolu takılması gerçekleştirilmiştir. Uzatma kolu olarak bifonksiyonel bir bileşik olan glutaraldehit kullanılmıştır. Glutaraldehit iki ucunda birer reaktif aldehit grubu bulunan bir moleküldür ve moleküllerin immobilizasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır (Hou et al., 1991; Rembaum et al., 1978). Bu amaçla başlangıç glutaraldehit derişimi % 0.25, 0.5, 1, 2 ve 4 (55, 110, 220, 440 µmol/ml) olarak seçilmiş ve deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 100 mg PGMA partiküller değişen miktarlarda glutaraldehit içeren 10 ml pH 8.2 sodyum tetraborat/HCl tamponunda 120 dakika süresince, 100 rpm karıştırma hızında, oda sıcaklığında reaksiyona sokulmuştur. Glutaraldehitleme işleminin ardından partiküller, santrifüjlenerek dağıtma ortamından uzaklaştırılmış ve 3 kez de pH 7.4 tamponu ile yıkandıktan sonra partiküllere 1 µg antijen eklenmiş ve toplam hacim yine pH 7.4 tamponuyla 5 ml'ye tamamlanmıştır. Reaksiyon 90 dakika sonunda tamamlanmış ve immobilizasyon miktarı Modifiye Lowry analizinin uygulanmasıyla hesaplanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.4'de verilmektedir.



Şekil 4.4. Glutaraldehit derişiminin immobilizasyon verimine etkisi. Ortam Koşulları: 1µg/5ml antijen derişimi, 100 mg polimer mikroküre, pH 7.4, 25°C, 90 dak. immob. süresi.

Şekil 4.4'ten anlaşılabileceği gibi mevcut reaksiyon sistemi için en uygun glutaraldehit derişim oranı %2'dir (220 µmol/ml). Bu değerin üzerindeki derişimler immobilize antijen miktarında düşüslere neden olduğu gibi, serum etkileşimlerinde de (Çizelge 4.2) çökelme sonuçlarını olumsuz etkilemektedir.

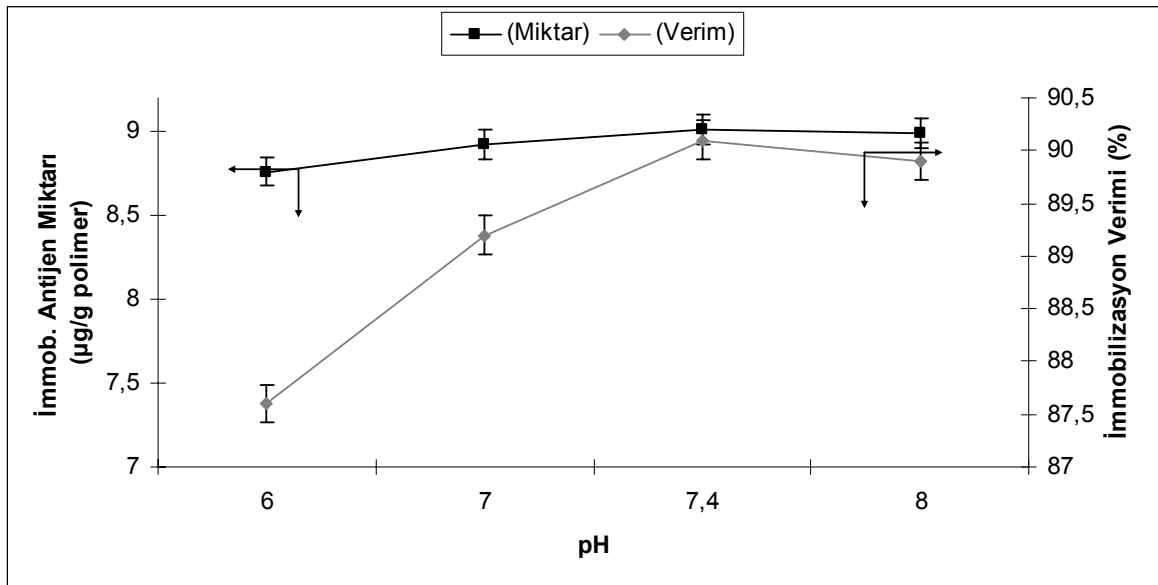
Antijen miktarı sabit olduğu halde artan glutaraldehit derişimi herbir molekül antijene bağlanabilecek daha fazla aldehit grubu sağlamaktadır. Bu durumun; antijen molekülünde deformasyona, protein sarmalında açılmaya ve yüzey modifikasyonuna neden olabileceği Albarghouti ve arkadaşlarının 2000 yılındaki çalışmalarında açıklanmaktadır (Albarghouti et al., 2000). Böyle bir etki sonucunda anti-CRP'nin bağlanma bölgeleri aktifliğini yitirerek daha az CRP'ye bağlanır. Benzer sonuçlar Martino ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da raporlanmıştır (Martino et al., 1996). 1996 yılındaki bu çalışmada β-glikosidaz kitosan üzerine glutaraldehit ile immobilize edilmiştir.

Söz konusu Modifiye Lowry sonuçları ve serum-pozitif kontrol ile yapılan çökelme reaksiyonları değerlendirilerek glutaraldehitin uzatma kolu olarak kullanıldığı bu yöntemin uygun olduğu görülmüştür. Burada glutaraldehitin bir ucundaki aldehit grubu, polimerik mikrokürelerin yüzeylerinde oluşturulan amin uç gruplarına bağlanarak diğer ucu antijen bağlanmasına uygun şekilde açık bırakmıştır. Bunun sağlanması amacıyla yani çapraz reaksiyon oluşmaması amacıyla ortama glycine ilavesi yapılmıştır. Böylece protein, immobilizasyon sırasında taşıyıcının neden olduğu engellemeye karşı taşıyıcıdan

uzaklaşmaktadır. Bu bağlanmanın yarattığı etkinin, immobilize antijen molekülünün aktivitesinin korunmasına ve sağlam bir şekilde taşıyıcıya tutunmasına yardımcı olduğu kolaylıkla söylenebilir.

4.3.2. pH Etkisi

PGMA partiküllerine antijen immobilizasyonunda etkin olan bir başka değişken ise immobilizasyon ortamının pH'ıdır. Bu amaçla gerçekleştirilen deneylerde ortam pH'ı çeşitli tamponlar kullanılarak 6-8 aralığında değiştirilmiştir. Deneylerde yine 100 mg partikülün glutaraldehitlenmesi, 10 ml hacim içerisinde %2'lik GA kullanılarak ve manyetik karıştırıcıda 100 rpm karıştırma hızında 120 dakika karıştırılarak gerçekleştirilmiştir. Bu işlemin ardından partiküller santrifüjlenerek dağıtma ortamından uzaklaştırılmış ve yine 3 kez pH 7.4 tamponu ile yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından cam reaktörlerdeki partiküllere eşdeğer miktarda (1 µg) antijen eklenmiş ve toplam hacim, farklı pH'larda (6, 7, 7.4, 8) tamponlar kullanılarak 5 ml'ye tamamlanmıştır.



Şekil 4.5. Ortam pH'ının immobilizasyon verimine etkisi. Ortam Koşulları: 1µg/5ml antijen derişimi, %2 [GA], 100 mg polimer mikroküre, 25°C, 90 dak. immob. süresi.

Partiküller, 90 dakika manyetik karıştırıcıda 100 rpm karıştırma hızında immobilizasyona tabi tutulduktan sonra, santrifüjlenerek dağıtma ortamından uzaklaştırılmış ve immobilize antijen miktarı, yine süpernatanta uygulanan Modifiye Lowry toplam protein tayin yöntemi ile saptanmıştır.

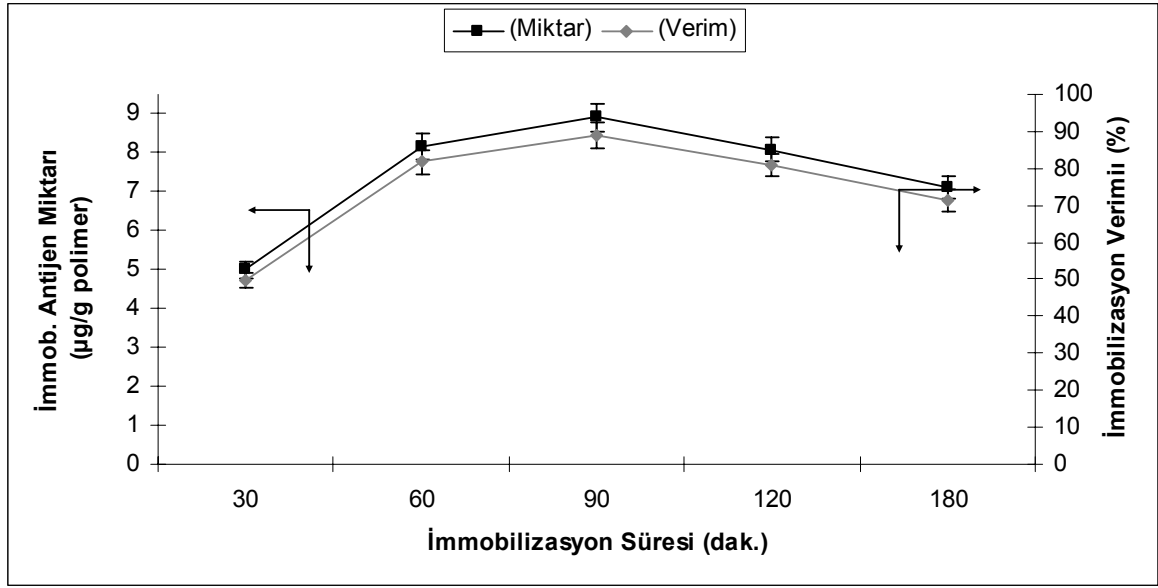
Elde edilen bulgular Şekil 4.5'de verilmektedir. Bu şekilde immobilizasyon yüzdesinin ve immobilize antijen aktivitesi sonuçlarının pH 7.4 değerinde örtüştüğü

görülmektedir. Wei ve arkadaşlarının 2000 yılındaki *Dimension®* klinik sistemi için CRP tayin yöntemi geliştirme çalışmalarında immobilizasyonda pH 7.5 değerini kullanmışlardır (Wei et al., 2000). Molina-Bolivar ve arkadaşları ise 1997 yılındaki çalışmalarında poloistren mikrokürelere F(ab')₂ immobilizasyonunu pH 7.2'de gerçekleştirmişlerdir (Molina-Bolivar et al., 1997). Yukarıdaki grafikte görüldüğü gibi immobilize antijen miktarı, denenen tüm pH değerleri için benzerdir. Ancak, serum etkileşim sonuçları (Çizelge 4.2) dikkate alındığında pH 7.4'de antijen immobilize edilerek hazırlanan mikrokürelere haricindeki kitlerde çökme gözlenememektedir. Bu pH değeri diğer bölümlerde yapılan deneylerde kullanılmak üzere seçilmiştir.

4.3.3. Immobilizasyon Süresinin Etkisi

PGMA partiküllerine antijen immobilizasyonunda etkin olan önemli değişkenlerden biri de immobilizasyon süresidir. Bilindiği gibi immobilizasyon ortamının uygunsuz koşullarına maruz kalan antijenin üç boyutlu yapısında meydana gelebilecek bir hasar veya tamamen denatüre olması nedeniyle immobilizasyon süresi mümkün olduğu kadar kısa tutulmalıdır. Ancak proteinin etkin bir biçimde bağlanabilmesini sağlayacak kadar da reaksiyon devam ettirilmelidir. Buijs ve arkadaşları tarafından 1997 yılında yapılan benzer bir çalışmada immobilizasyon süresinin 30 dakika, Ortega-Vinuesa ve arkadaşları tarafından yine 1997 yılında yapılan bir çalışmada ise immobilizasyon süresinin 240 dakika olarak kullanıldığı görülmüştür (Buijs et al., 1997, Ortega-Vinuesa et al., 1997). Bu bağlamda immobilizasyon için en uygun immobilizasyon süresinin bulunması amacıyla 30, 60, 90, 120 ve 180 dakikalık reaksiyon süreleri belirlenmiştir. Immobilizasyon yönteminin birinci aşamasında herbiri 100 mg PGMA partikülleri içeren cam reaktörlere, eşdeğer miktarda (%2'lik) GA eklenmiş ve toplam çözelti hacmi de pH 8.2 sodyum tetraborat/HCl tamponu ile 10 ml'ye tamamlanmıştır. Cam reaktörlerdeki 10 ml'lik çözeltiler, oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda 100 rpm karıştırma hızında 120 dakika karıştırılarak; glutaraldehitlenme reaksiyonuna tabi tutulmuştur. Bu süre sonunda partiküller, dağıtma ortamından uzaklaştırılmak amacıyla santrifüjlenmiş ve 3 kez pH 7.4 tamponu ile yıkanmıştır.

Yıkama işleminin ardından 1 µg antijen, 100 mg PGMA partiküllerine eklenmiş ve toplam hacim pH 7.4 tamponuyla 5 ml'ye tamamlanmıştır. Cam reaktördeki bu karışımlar farklı immobilizasyon süreleri boyunca (30, 60, 90, 120 ve 180 dak.) manyetik karıştırıcıda 100 rpm karıştırma hızında reaksiyona tabi tutulmuştur. Bu etkileşimden sonra partiküller, santrifüjlenerek dağıtma ortamından uzaklaştırılmış ve immobilize antijen miktarı, süpernatanta uygulanan Modifiye Lowry toplam protein tayin yöntemi ile saptanmış ve Şekil 4.6'da sunulmuştur.



Şekil 4.6. İmmobilizasyon süresinin immobilizasyon verimine etkisi. Ortam Koşulları: 1µg/5ml antijen derişimi, %2 [GA], 100 mg polimer mikroküre, pH 7.4, 25°C.

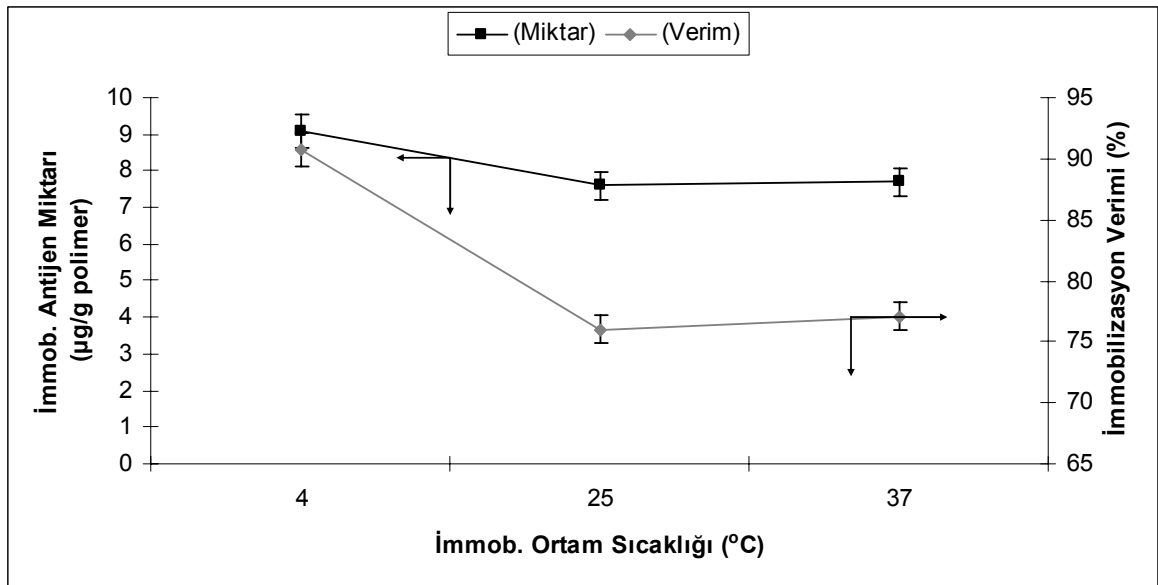
Grafikten de anlaşılacağı gibi 90 dakikalık immobilizasyon süresi immobilize olan antijen miktarı bakımından en uygun sonuç gibi görünmektedir. Ancak 60 dakikadan sonra elde edilen immobilize antijen miktarında önemli bir değişiklik olmamaktadır. Buna karşılık 120 ve 180 dakika immobilizasyon sürelerinde elde edilen kitlerde ise serum etkileşimleri olumsuz olmuştur. Bu nedenle optimum immobilizasyon süresi olarak bundan sonraki deneylerde kullanılmak üzere 90 dakika seçilmiştir.

4.3.4. Sıcaklık Etkisi

Ortam sıcaklığının antijen immobilizasyonuna etkisinin belirlenmesi için yapılan çalışmalar bu bölümde belirtilmiştir. Ortam sıcaklığı da ortam pH'ının etkisine benzer şekilde antikorun 3-boyutlu yapısında değişikliklere neden olabilir. Buradaki deneylerle immobilizasyon sıcaklığı için en uygun değerin bulunması amaçlanmıştır. Bu amaçla immobilizasyon ortam sıcaklığı 4, 25 ve 37±1°C olmak üzere üç farklı sıcaklıkta deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu deneyler sırasında da birinci aşamada partikül miktarı 100 mg, reaksiyon hacmi 10 ml, GA derişimi %2, glutaraldehitlenme süresi 120 dakika ve glutaraldehitlenme ortam pH'ı 8.2 olarak sabit tutulmuştur. İkinci aşamada ise pH 7.4 tamponu kullanılarak 3 kez yapılan yıkamanın ardından yine herbiri glutaraldehitlenmiş 100 mg partikül içeren cam

reaktörlere 1 µg antijen eklenmiş ve toplam hacim pH 7.4 tamponuyla 5 ml'ye tamamlanmıştır.

Antijenin partiküllere immobilizasyonu sırasında ise 90 dakika manyetik karıştırıcıda 100 rpm karıştırma hızında işlem her bir reaktör için ayrı bir sıcaklıkta (4, 25 ve 37°C) $\pm 1^\circ\text{C}$ hassasiyetle gerçekleştirilmiştir. Farklı sıcaklıklardaki immobilizasyonun ardından partikülleri dağıtma ortamından uzaklaştırmak için santrifüjleme yapıldıktan sonra immobilize antijen miktarı, yine süpernatanta uygulanan Modifiye Lowry toplam protein tayin yöntemi ile saptanmıştır. Bu grup deneylerden elde edilen sonuçlar Şekil 4.8'de sunulan grafikte toplu olarak verilmiştir. Grafikteki sonuçlara göre optimum sıcaklık olarak 25°C seçilmiş ve kullanılmıştır. Grafikteki verilere bakıldığında, ilk anda en uygun değer olarak 4°C ortam sıcaklığı görülmektedir. Ancak hasta seumları ile yapılan çökelme sonuçları (Çizelge 4,2) gözönüne alındığında en uygun değer 25°C olduğu bulunmuştur. Ortega-Vinuesa ve arkadaşları da, 1997 yılındaki çalışmalarında polistren latex üzerine F(ab')_2 immobilizasyonunda ortam sıcaklığı olarak 25°C değerini kullanmışlardır (Ortega-Vinuesa et al., 1997).



Şekil 4.7 Ortam sıcaklığının immobilizasyon verimine etkisi. Ortam Koşulları: 1µg/5ml antijen derişimi, %2 [GA], 100 mg polimer mikroküre, pH 7.4, 90 dak. immob. süresi.

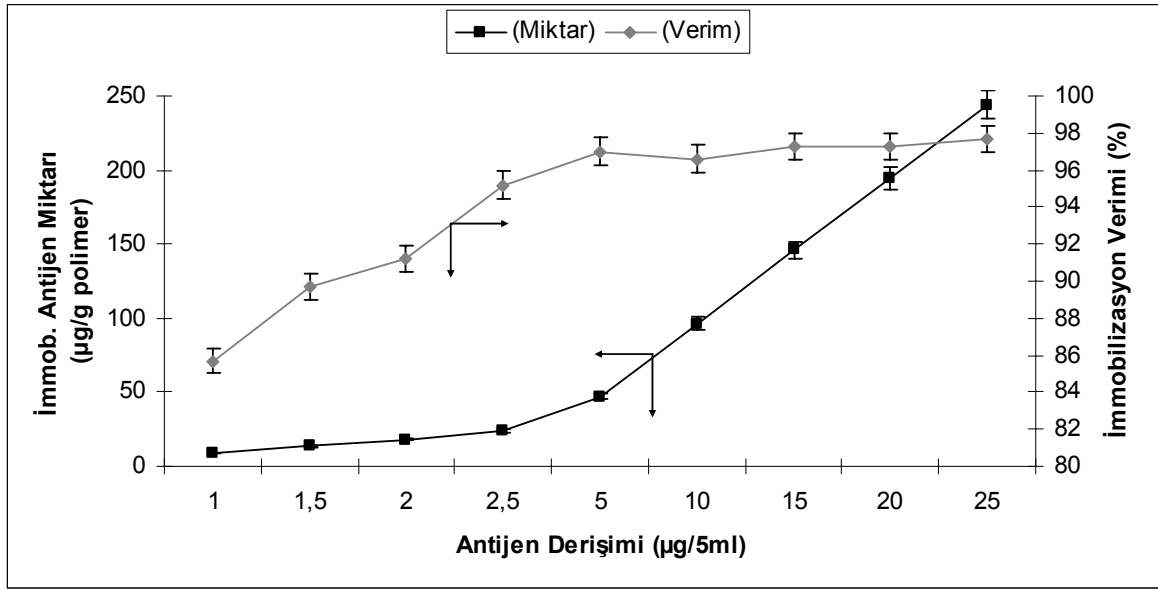
4.3.5. Başlangıç Antijen Derişiminin Etkisi

Partikül yüzeylerinde yaratılan aldehit uç gruplarında meydana gelen bağlanmanın antijen derişimi ile nasıl etkilendiği bu bölümde incelenmiştir. Yüzeyi glutaraldehit modifiye mikrokürelerin kullanıldığı deneylerde antijen derişiminin

immobilizasyon verimine ve antijenin bağıl aktivitesine olan etkisi incelenirken; yine herbiri 100 mg PGMA partikülleri içeren cam reaktörlere, eşdeğer miktarda (%2'lik) GA eklenmiş ve toplam çözelti hacmi de pH 8.2 sodyum tetraborat/HCl tamponu ile 10 ml'ye tamamlanmıştır.

Cam reaktörlerdeki 10 ml'lik çözeltiler, oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda 100 rpm karıştırma hızında 120 dakika karıştırılarak glutaraldehitlenme işlemine tabi tutulmuştur. Bu süre sonunda partiküller, santrifüjlenerek dağıtma ortamından uzaklaştırılmış ve 3 kez pH 7.4 tamponu ile yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 ve 25.0 µg olarak belirlenen farklı miktarlardaki antijenler, 100 mg PGMA partiküllerine eklenmiş ve toplam hacim pH 7.4 tamponuyla 5 ml'ye tamamlanmıştır. Cam reaktördeki bu karışımlar 90 dakika manyetik karıştırıcıda 100 rpm karıştırma hızında immobilizasyona tabi tutulmuştur. Bu etkileşimden sonra partiküller, santrifüjlenerek dağıtma ortamından uzaklaştırılmıştır. Son basamakta immobilize antijen miktarı, süpernatanta uygulanan Modifiye Lowry toplam protein tayin yöntemi ile saptanmıştır. Immobilizasyon miktarı Modifiye Lowry analizinin uygulanmasıyla hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar toplu olarak Şekil 4.8'de verilmektedir.

Şekil 4.8'e göre mikroküreler 5µg/5ml başlangıç antijen derişiminden itibaren yüksek antijen immobilizasyon miktarına ulaşmaktadır. Ancak, çökeltme deney sonuçları göz önüne alındığında, 1µg/5ml başlangıç konsantrasyonu ile sentezlenen kitler, CRP değeri en düşük hasta serumlarında çökelti oluşturmaktadır. Başka bir deyişle sentezlenen kitler arasında hassasiyeti en yüksek olan kittir. Başlangıç antijen miktarı 1µg/5ml değerinden yükseldikçe hassasiyet azalmakta ve 5µg/5ml değerinden itibaren çökelti oluşumu gözlenememektedir. Bu durum şu şekilde açıklanabilir; yüksek başlangıç antijen konsantrasyonunda protein-protein etkileşimleri oluşabilmektedir. Bu tür bir etkileşim zayıf bağlanma kuvvetiyle yüzeyde birden fazla protein tabakasının oluşmasına neden olarak sonuçta antijen immobilizasyonunun artmasını sağlar. Deshpande, 1996 yılındaki enzim immunoessayleri ile ilgili çalışmasında da başlangıç antijen derişiminin etkisi hakkında benzer açıklamalarda bulunmaktadır (Deshpande, 1996).



Şekil 4.8 Başlangıç antijen derişiminin immobilizasyon verimine etkisi. Ortam Koşulları: %2 [GA], 100 mg polimer mikroküre, pH 7.4, 25°C, 90 dak. immob. süresi.

Şekil 4.8'de görüldüğü gibi immobilizasyon verimi %85'ten başlayarak %98 seviyelerine ulaşmıştır. Martino ve arkadaşlarının 1996 yılında gerçekleştirdiği agglutinasyon esaslı bir test kiti çalışmasında ise kitosan kürelere uygulanan protein immobilizasyonunda, verim olarak maksimum %85 değerine varılabilmektedir (Martino et al., 1996).

Şekil 4.8'e ve hasta serumları ile yapılan çökelme deneylerine dayanılarak belirlenen başlangıç antijen miktarı ise 5 ml deney düzeneğinde 1 µg'dır (0,2 µg/ml). Aljinat-kitosan küreler kullanılarak sentezlenen bir CRP kitinde başlangıç antijen derişimi olarak en uygun değer 0,2 mg/ml olduğu belirtilmektedir (Albarghouti et al., 2000). Albarghouti ve arkadaşları tarafından yapılan deneylerde 0,2 µg/ml başlangıç antijeni ile yalnızca %20 değerlerinde immobilizasyon verimine ulaşılabilmiştir.

4.4. Antijen İmmobilize Partiküllerin Hasta Serum ve Pozitif Kontrol ile Testleri

Araştırmanın son bölümünde enfeksiyon geçiren hastalardan alınan taze serum örnekleri ve pozitif kontroller kullanılarak in-vitro ortamda çökelme deneyleri gerçekleştirilmiştir.

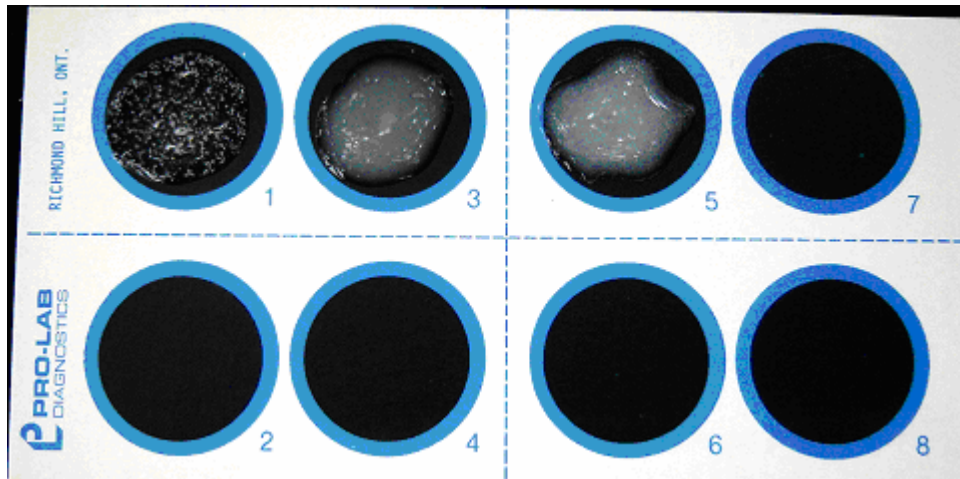
Serum örnekleri ve pozitif kontrollerle yapılan deneyler sonucunda; çökelme skorlarına göre yüksek performans gösterenlerden seçilen kitler ve piyasada yaygın olarak kullanılan ticari CRP tanı kiti pozitif kontroller ve hasta serumları ile

etkileştirilerek kıyaslanmıştır. Bu kıyaslama sonucunda kitlerin performansı saptanmıştır.

Uygulanan CRP testinin ilk bölümünde; antijen emülsiyonu; antijen immobilizasyonu sonucu elde edilen PGMA partiküllerinin, 5 ml pH 7.4 tamponu ile homojenize edilmesi ile hazırlanmıştır. Bu antijen emülsiyonu; mikropipet ile, tek kullanımlık plastik bir test kartı üzerine damlatılarak eşit miktarda (~30-40 µl) ve oda sıcaklığındaki hasta serumuyla etkileştirilmiştir. Reaksiyonun gerçekleştirildiği test kartı Şekil 4.9'da gösterilmektedir. Test kartı üzerinde kit ve serum bir pipet ucu ile karıştırılmış ve bu işlemin hemen ardından kart nemli koşullarda ve oda sıcaklığında manuel olarak döndürülerek karıştırılma sağlanmıştır. Etkileşimin tamamlanabilmesi için karışımın 2 dakika boyunca gözlenmiştir. Bu gözlemin gerekliliği, Gabay ve Kushner'ın 1999 yılındaki çalışmalarında da belirtilmektedir.

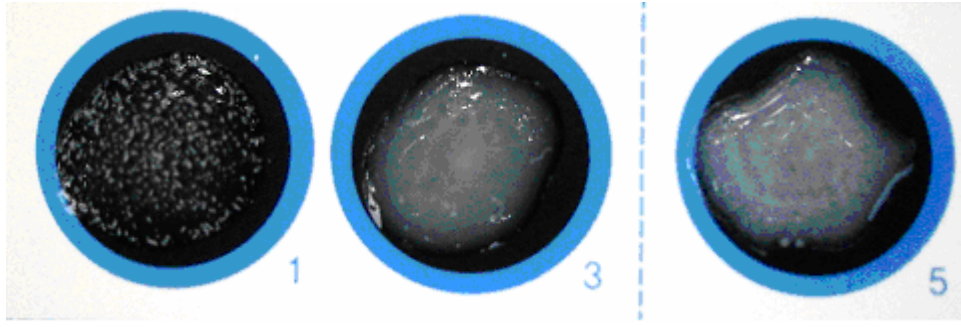
Yaygın olarak kullanılan bir ticari RIA kiti olan *Binding Site* (UK) firmasının CRP test kitinde reaktifler etkileşime sokulduktan sonra sonuç, oluşan çökeltinin çapı ölçülerek elde edilmektedir. Çökeltinin çapının ölçülebilmesi için reaktifler etkileşime sokulduğu andan itibaren 72 saat (23-27°C) bekletilmelidir.

Buna karşın sunulan araştırmada ise serumdaki CRP teşhisi için, 2 dakikalık süreç boyunca antijen-antikor etkileşiminin çökelti oluşturup oluşturmadığı gözlenmiş, bu gözlemlerin makroskopik yorumu Çizelge 3.3'e göre yapılmıştır. Bu deneyler sonucu elde edilen skora sonuçları Çizelge 4.2'de ayrıntılı olarak sunulmaktadır.



Şekil 4.9 Tanı amaçlı çökeltme reaksiyonunun gerçekleştiği slayt kartın optik fotoğrafı.

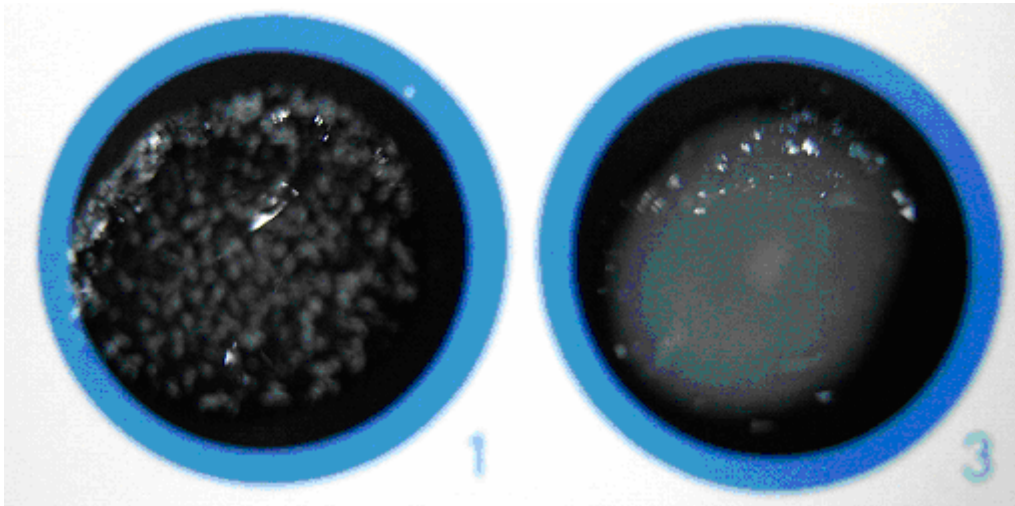
Şekil 4.9'da hasta serumu ile etkileşimlerin gerçekleştiği slayt kart gösterilmiştir.



Şekil 4.10 Gerçekleştirilen çökelme reaksiyonunun optik fotoğrafı.

Şekil 4.10 ise deneyler sonucu sentezlenen kit ve ticari olarak kullanılan CRP test kitinin çökelme reaksiyonlarını göstermektedir. Şekilde; (1) ile gösterilen bu çalışmada sentezlenen kitin oluşturduğu, (5) ticari CRP test kitinin oluşturduğu çökeleklerdir. (3) ise negatif kontroldür.

Hasta serumları ile yapılan deneyler sonunda Çizelge 3.3 referans alınarak sentezlenen kitler skorlandığında, hassasiyeti en yüksek olan kit 3-4 olarak kodlanan, %2 glutaraldehit derişimi ile yüzey modifikasyonu gerçekleştirilen, pH 7.4'de 25°C ortam sıcaklığında 90 dakika boyunca 1µg/5ml başlangıç antijen derişimi kullanılarak immobilizasyonu gerçekleştirilen kittir. CRP derişimi 18,4 mg/l olan serumla etkileştirildiğinde çökelek oluşmuştur. Serum konsantrasyonu ½ oranında seyreltildiğinde de 9,2 mg/l CRP değerinde yine çökelek gözlenmiştir. Oluşan bu çökelek Şekil 4.11'de gösterilmiştir.

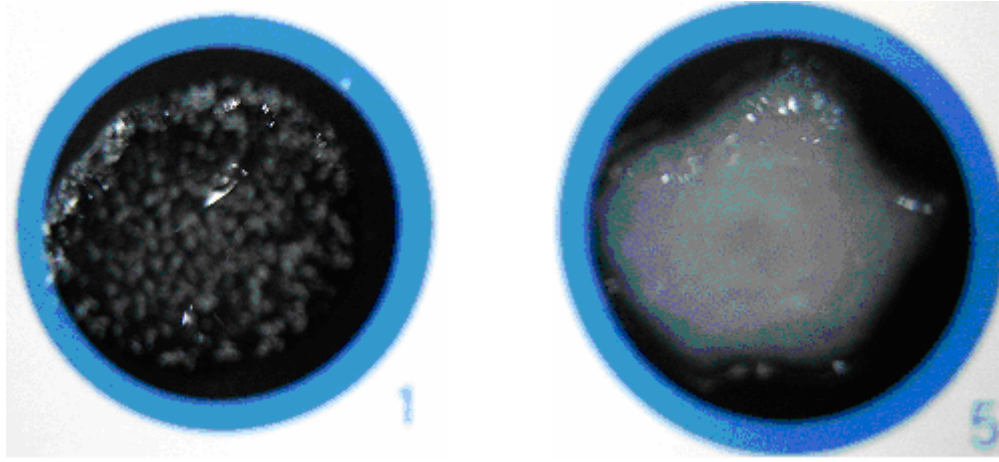


Şekil 4.11 3-4 kodlu kitin 9,2 mg/L CRP konsantrasyonundaki serum ile etkileşiminin optik fotoğrafı.

Yukarıdaki şekilde, (1) ile gösterilen çökelek sentezlenen CRP kiti ile hasta serumu arasındaki etkileşim sonucudur. (3) ile gösterilen ise CRP nin bulunmadığı negatif kontrol ile etkileştirildiğindeki sonuçtur. Şekil 4.11'deki optik fotoğraf kitin sentezlenmesinden 180 gün sonra gerçekleştirilen etkileşim sonucu oluşan

Çökeleği göstermektedir. Bu süre içerisinde sentezlenen kit cam kapta ve +4°C sıcaklıkta saklanmıştır. Buijs ve arkadaşlarının aljinat-kitosan kürelere glutaraldehit varlığında anti-lisinopril IgG immobilize ederek ürettikleri küreler stabilitesini ancak 25 gün koruyabilmiştir (Buijs et al., 1997).

Sentezlenen 3-4 kodlu kitin yaygın olarak kullanılan ticari CRP test kiti ile de performans karşılaştırılması yapılmıştır. Şekil 4.12’de konsantrasyonu 9,2 mg/l CRP olan hasta serumu ile hem sentezlenen hem de ticari kitin etkileşimindeki çökelek oluşumları görünmektedir.



Şekil 4.12. Sentezlenen 3-4 kodlu kit ve ticari CRP kitinin konsantrasyonu 9,2 mg/l CRP olan hasta serumu ile etkileşiminin optik fotoğrafı.

Yukarıdaki şekilde (1) sentezlenen kit ile 9,2 mg/l CRP derişimindeki hasta serumu arasındaki etkileşim sonucu oluşan çökelek, (5) ise yine aynı CRP derişimindeki hasta serumu ile ticari olarak kullanılan CRP test kitinin etkileşimi sonucu oluşan ökelektir. Şekilden de görüldüğü gibi (1) ile gösterilen çökelek daha net gözlenebilmektedir. Bu şekilde oluşturulan bir çökeleğin tanı sırasındaki kullanımda kolaylık sağlayacağı söylenebilir.

Çizelge 4.2. Sentezlenen kitlerin Hasta Serumu ve pozitif kontroller ile etkileşim sonuçları.

Deney Numarası	Sentezlenen Kitler	Sentezlenen Kitlerin Tanımı	Hasta Serumu
1.	1-1	10 mg amin modifiye taşıyıcı	-
2.	1-2	25 mg amin modifiye taşıyıcı	-
3.	1-3	50 mg amin modifiye taşıyıcı	-
4.	1-4	75 mg amin modifiye taşıyıcı	-
5.	1-5	100 mg amin modifiye taşıyıcı	-
6.	2-1	10 mg aldehit modifiye taşıyıcı	+
7.	2-2	25 mg aldehit modifiye taşıyıcı	+
8.	2-3	50 mg aldehit modifiye taşıyıcı	+
9.	2-4	75 mg aldehit modifiye taşıyıcı	+
10.	2-5	100 mg aldehit modifiye taşıyıcı	++
11.	2-6	125 mg aldehit modifiye taşıyıcı	+
12.	3-1	%0,25 GA	-
13.	3-2	%0,5 GA	+
14.	3-3	%1,0 GA	+
15.	3-4	% 2,0 GA	+++
16.	3-5	%4,0 GA	+
17.	4-1	pH 6	-
18.	4-2	pH 7	+
19.	4-3	pH 7.4	+++
20.	4-4	pH 8	+
21.	5-1	30 dakika	-
22.	5-2	60 dakika	+
23.	5-3	90 dakika	+++
24.	5-4	120 dakika	-
25.	5-5	180 dakika	-
26.	6-1	+ 4°C	-
27.	6-2	+ 25°C	+++
28.	6-3	+ 37°C	+
29.	7-1	1,0 µg başlangıç antijen	+++
30.	7-2	1,5 µg başlangıç antijen	++
31.	7-3	2,0 µg başlangıç antijen	++
32.	7-4	2,5 µg başlangıç antijen	+
33.	7-5	5,0 µg başlangıç antijen	-
34.	7-6	10,0 µg başlangıç antijen	-
35.	7-7	15,0 µg başlangıç antijen	-
36.	7-8	20,0 µg başlangıç antijen	-
37.	7-9	25,0 µg başlangıç antijen	-
38.	Dade Behring	RapiTex® CRP(Ticari Kit)	+++

Deegan ve arkadaşları, 2003 yılında yaptıkları çalışmada mevcut CRP test kitlelerine alternatif olmak üzere 2 farklı test kiti geliştirmişlerdir. Bunlardan ilki HRP enzimine bağlı PC-BSA kompleksinin serum içerisinde CRP'ye bağlanarak kompleks oluşturmaya dayalı bir sistemdir. İkincisi ise yüzeyi karboksi-modifiye mikrokürelere PC-BSA immobilizasyonu ile yine serum içerisindeki CRP'ye bağlanarak kompleks oluşumuna dayalıdır.

CRP-ELSA olarak adlandırılan ilk sistemde kompleks oluşumu sonrası turbidite ölçümü için gelişmiş bir izleme cihazı gerekmektedir. Ölçümün alınması 60 dakika sürmektedir ve hassasiyeti 1.06 mg/l'ye kadar inebilmektedir.

PC-BSA'nın mikrokürelere immobilizasyonu ile hazırlanan sistemde ise ölçüm süresi 5 dakikadır ve ölçülebilen en düşük CRP konsantrasyonu 25 mg/l'dir.

Ortega-Vinuesa ve arkadaşları tarafından $F(ab')_2$ 'nin polistren mikrokürelere immobilize edilmesiyle geliştirilen başka bir CRP test kitinde ise ortamda çözünmeyen kompleks oluşumu için BSA kullanılması gerekmiştir. Hassasiyet ise 50 dakikalık reaksiyon sonunda 46 mg/l, 24 saatlik reaksiyon sonunda ise 9 mg/l'dir.

Life Diagnostics, Inc. (USA) firması tarafından geliştirilen bir CRP test kitinde ise sonuç oluşan çökeltinin çapının ölçülmesiyle elde edilmektedir. Sonucun alınması için gereken süre 24-48 saat arasında değişmektedir.

Biocheck, Inc. (USA) tarafından geliştirilen test kitinde ise CRP, antijen olarak davranan iki farklı enzim arasına hapsedilmektedir. Etkileşimin başlayabilmesi ve sonlandırılması için de 2 farklı kimyasala ihtiyaç duyulmaktadır. Bu test kitinde de 80 dakikalık reaksiyon sonunda 1mg/l CRP derişimi ölçülebilmektedir.

Bu araştırma kapsamında sentezlenen yüzeyi glutaraldehit modifiye anti-human CRP immobilize edilmiş PGMA mikrokürelere yapılan deneyler sonucunda ise başka herhangi bir reaktife ihtiyaç duyulmadan 2 dakikalık bir etkileşim neticesinde 9,2 mg/l CRP konsantrasyonunun tayin edilmesi mümkün olmuştur.

5. SONUÇLAR

Ticari örneklerine alternatif olmak üzere, serum CRP miktarının tanısında kullanılacak polimerik taşıyıcı bazlı bir diyagnostik test kitinin geliştirilmesi amacıyla hazırlanan bu çalışmada elde edilen önemli sonuçlar aşağıda sırasıyla verilmiştir:

- ❖ Çalışmanın birinci bölümünde GMA monomeri dispersiyon polimerizasyonu yöntemi ile yaklaşık % 89 verimle polimerleştirilmiştir. Elde edilen PGMA mikroküreler 1.166 µm çapında ve eşboyutludur.
- ❖ GMA'nın yapısında bulunan epoksi halkası kullanılarak yüzeyine aminleme işlemi başarıyla yapılmış, ve uzatma kolu olarak da glutaraldehide kullanılarak antijen immobilizasyonu için yüzey hazır hale getirilmiştir.
- ❖ Çalışmanın ikinci bölümünde PGMA partiküllere antijen immobilizasyonu deneyleri kovalent bağlama yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. yüzeyi glutaraldehide modifiye partiküllere antijen immobilizasyonu başarıyla gerçekleştirilmiştir. Modifiye Lowry toplam protein tayini sonuçlarına göre %90'lara ulaşan immobilizasyon sağlanmış, hasta serumu ve pozitif kontroller ile yapılan çökelme reaksiyonları olumlu sonuç vermiştir.
- ❖ Mikrokürelere bağlanacak antijenin immobilizasyonunda optimum koşullar; immobilizasyon süresi 90 dakika; başlangıç glutaraldehide derişimi 220 (µmol/ml); başlangıç antijen derişimi 1µg/5ml; immobilizasyon ortam pH'ı 7.4 ve immobilizasyon ortam sıcaklığı 25°C olarak bulunmuştur.
- ❖ Çalışmanın son aşamasında ise; hastalardan temin edilen serum örnekleri ve pozitif kontroller kullanılarak in-vitro ortamda çökelme deneyleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda tarafımızdan oluşturulan skrolama tablosu referans alınarak hassasiyeti en yüksek olan kit olarak deney kodu 3-4 olan %2 glutaraldehide derişimi ile yüzey modifikasyonu gerçekleştirilen, pH 7.4'de 25°C ortam sıcaklığında 90 dakika boyunca 1µg/5ml başlangıç antijen derişimi kullanılarak immobilizasyonu gerçekleştirilen kit olarak belirlenmiştir. Bu kit ile yapılan çökelme

deneylerinde 18,4 mg/L CRP derişimindeki serum ile etkileşiminde çökelek gözlenmiştir.

- ❖ Bu çalışmada ticari kit ve deneyler sonucu sentezlenen 3-4 kodlu %2 glutaraldehyde derişimi ile yüzey modifikasyonu gerçekleştirilen, pH 7.4'de 25°C ortam sıcaklığında 90 dakika boyunca 1µg/5ml başlangıç antijen derişimi kullanılarak immobilizasyonu gerçekleştirilen kit, 18.4 mg/L CRP derişimli serumun ½ oranında seyreltilmiş çözeltisi ile etkileşiminde çökelek vermişlerdir. Hasta serumları ile gerçekleştirilen çökelme sonuçları göz önüne alındığında; 3-4 kodlu %2 glutaraldehyde derişimi ile yüzey modifikasyonu gerçekleştirilen, pH 7.4'de 25°C ortam sıcaklığında 90 dakika boyunca 1µg/5ml başlangıç antijen derişimi kullanılarak immobilizasyonu gerçekleştirilen kitin en yüksek performansı gösterdiği yani söz konusu kitler arasında en düşük seviyedeki (9,2 mg/l) antikor miktarını tayin edebilecek kapasitedeki kit olduğu belirlenmiştir.
- ❖ Çalışmada ayrıca üretilen kitin raf ömrü 180 güne kadar izlenmiş, yapılan aktivite testinde başarılı sonuç alınmıştır.

6. KAYNAKLAR

- Agrawal, A., Yuanayuan, X., Ansardi, D., Macon, K. ve Olanakis, J. E. (1992) *Biological Chemistry*, **267**, 25352-25358.
- Ahlstedt, S., Holmgren, J. ve Hanson, L. A. (1974). Protective capacity of antibodies against E.coli O antigen with special reference to the avidity. *Int. Arch. Allergy*, **46**, 470.
- Albarghouthi, M., Fara, D. A., Saleem, M., El-Thaher, T., Matalaka, K. ve Badwan, A. (2000) Immobilization of antibodies on alginate-chitosan beads. *Int. J. Pharm.*, **206**, 23-24.
- Baysal, B. (1981). *Polimer Kimyası : cilt I, polimerizasyon prosesleri*. ODTÜ Fen ve Edebiyat Fakültesi, Yayın No: 33, Ankara.
- Berson, S.A. and Yalow, R.S. (1958) *Adv. Biol. Med. Phys.*, **6**, 349.
- Buijs, J., White, D.D. ve Norde, W., (1997) The effect of adsorption on the antigen binding by IgG its F(ab')₂ fragments, *Coll. Surf. B: Biointerf.*, **8**, 239-249.
- Butler J. E. (1978). The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): a measure of antibody concentration of affinity. *Immunochemistry*, **15**,131.
- Catt, K. ve Tregear, G. W. (1967). Solid-phase radioimmunoassay in antibody-coated tubes. *Science (NY)*, **158**, 1570.
- Catty, D. (1989). *Antibodies : a practical approach*. Vol. I., II IRL Press, Oxford.
- Cawse, J.L., Lovell, P.A. ve El-Aasser, M.S. (1997) Dispersion polymerization, emulsion polymerization and emulsion polymers, 743-761.
- Ceska, M. ve Lundqvist, U. (1972). A new and simple immunoassay method for detection of IgE. *Immunochemistry*, **9**, 1021.
- Collins, E. A., Bares, J. ve Bilmeyer, Jr. F. W. (1973). Experiments In Polymer Science. John Wiley and Sons,Inc. New York.
- Conradie, J. D., Govender, M. ve Visser, L. (1983). ELISA solid-phase partial denaturation of coating antibody yields a more effective solid-phase. *J. Imm. Methods*, **59**, 289.
- Coons, A.H. ve Kaplan, M.H. (1950) *J. Exp. Med.* , **91**, 1.
- Curran,R.C. ve Gregory,J. (1978) *J. Clin. Pathol.*, **31**, 974.
- Danielson, H., Funderud, S., Nustad, K., Reith, A. ve Ugelstad, J., (1986) The interaction between cell-surface antigens and antibodies bound to monodispers polymer particles in normal and malignant cells, *Scand. J. Immunol.*, **24**, 179-187.

- Deegan, O., Walshe, K., Kavanagh, K. ve Doyle, S. (2003). Quantitative detection of C-reactive protein using phosphocoline-labelled enzyme or microspheres. *Anaylt. Biochem.*, **312**, 175-181.
- Ekins, R. P. (1980). More sensitive immunoassays. *Nature*, **284**, 14.
- Gabay, C. Ve Kushner, I. (1999) Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation, *N. Engl. J. Med.*, **340**, 448-454.
- Galvin J. P. (1983) *Particle enhanced immunoassays A review*. In: Rippey JH, Nakamura RM, ed. Diagnostic immunology: Technology assessment and quality assurance. Skokie, IL: College of American Pathologists, 17-28.
- Gewurz, A. T., Lint, T. F., Imherr, S. M., Garber, S. S. ve Gewurz, H. (1982) Detection and analysis of inborn and acquired complement abnormalities. *Clin. Imm. Immunopath.*, **23**, 297-311.
- Gleu, K. ve Petsch, W. (1935). The chemiluminescence of the dimethylbiacridilium salts. *Angew. Chem.*, **48**, 57.
- Gosling, J. P. (1990) A decade of devolopment in immunoassay methodology. *Clin. Chem.*, **36**, 1408-1427.
- Greenberg, D. N., Ascher, D. P., Yoder, B. A., Hensley, D. M., Heiman, H. S. ve Keith, J. F. (1995) Sensitivity and specificity of rapid diagnostic tests for detection of group B steptococcal antigen in bacteremic neonates. *J. Clin. Microbiol.*, **33**, 193-198.
- Grundy, M. A., Bolek, W. E., Coakley, W. T. ve Benes, E. (1993) Rapid agglutination testing in ultrasonic standing waves. *J. Immunol. Methods.*, **165**, 47-57.
- Heidelberger, M. ve Kendall, F.E. (1929) *J. Exp. Med.*, **50**, 809.
- Hidalgo-Alvarez, R. ve Galisteo-Gonzalez, F., (1995) The adsorption characteristics of immunoglobulins, *Heterogenous Chem.*, **2**, 249.
- Holmes, N. J. ve Parnham, P. (1983). Enhancement of monoclonal antibodies against HLA-A2 is due to antibody bivalency. *J. Biol. Chem.*, **258**, 1580.
- Hou, K.C., Zaniewski, R. ve Roy, S. (1991) Protein A immobilized affinity cartridge for immunoglobulin purification, *Biotech. and Appl. Biochem.*, **13**, 257.
- Kemeny, D. M. ve Challacombe, S. J. (1989). *Elisa and other solid phase immunoassays*. Wiley and Sons LTD. New York.
- Kitano, H., Iwai, S., Okubo, T. ve Ise, N. (1987). Direct examination of chemical kinetic laws by visual imagery 3. Association of latex particles modified with antigens and antibodies. *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 7608.

- Lim, P. L., Ko, K. H., Choy, W. F. (1989) A two-particle turbidometric latex immunoassay for the detection of specific IgM antibodies. *J. Immunol. Methods*, **117**, 267-273.
- Mangili R., Kemeny D. M., Li L. K. ve Viberti G. G. (1987). Development of a sensitive enzym-linked immunosorbent assay (ELISA) for quantification of human IgG subclass. *J. All. Clin. Immun.*, **79**, 223.
- Martino, A., Pifferi, P.G., Spagna, G., (1996) Immobilization of β -glucosidase from a commercial preparation. Part 2. Optimization of the immobilization process on chitosan, *Process Biochem.*, **31**, 287-293.
- Maurer, P.H. (1971) *Immunology and Immunochemistry*, Vol. III. Williams, C.A. ve Chase, M.W. (eds), Academic Press, New York, Chapter 13, p. 1.
- Miles, L. E. M. ve Hales, C. N. (1968). Labelled antibodies and immunological assay systems. *Nature (Lond)*, **219**, 186.
- Molina-Bolivar, J. A., Galisteo-Gonzalez, F. ve Hidalgo-Alvarez, R. (1997). Particle enhanced immunoassays stabilized by hydration forces: a comparative study between IgG and F(ab')₂ immunoreactivity. *J. Imm. Methods*, **211**, 87-95.
- Nakane, P.K. ve Pierce, G.B., Jr. (1966) *J. Histochem. Cytochem.*, **14**, 929.
- Newman, D. J., Henneberry, H. ve Price, C. P. (1992) Particle enhanced light scattering immunoassay. *Ann. Clin. Biochem.*, **29**, 22-42.
- Nilsson, B. (1990) Enzyme-linked immunosorbent assays. *Curr. Opin. Immunol.*, **2**, 898-904.
- Ober, C. K. ve Hair, M. L. (1987). *J. Polym. Sci.*, **25**, 1395.
- Okubo, M., Yamamoto, Y., Uno, M., Kamei, S. ve Matsumoto, T., (1987) Immunoreactivity of polymer microspheres with their hydrophilic/hydrophobic heterogeneous surface sensitized with an antibody, *Colloid Polym. Sci.*, **265**, 1061.
- Ortega-Vinuesa, J. L., Molina-Bolivar, J. A., Peula, J. M. ve Hidalgo-Alvarez, R. (1997). A comparative study of optical techniques applied to particle-enhanced assays of C-reactive protein. *J. Imm. Methods*, **151**, 205.
- Papadea C., Check I. J. ve Reimer C. B. (1985). Monoclonal antibody based solid-phase immunoenzymetric assays for quantifying human immunoglobulin G and its subclass in serum. *Clin. Chem.*, **31**, 1940.
- Parker, C.W. (1976) *Radioimmunoassay of Biologically Active Compounds*. Prentice-Hall Inc., New Jersey.
- Pressman, D. ve Grossberg, A.L. (1968). *The structural basis of antibody specificity*. W. A. Benjamin, Inc. New York.

- Rembaum, A., Yen, S.P., Cheong, E., Wallace, S., Molday, R.S., Gordon, I.L. ve Dreyer, W.J. (1976). Functional polymeric micro-spheres based on 2-hydroxyethyl methacrylate for immuno-chemical studies. *Macromolecules*, **9**, 328.
- Serra, J., Puig, J., Martin, A., Galisteo, F., Galvez, M.J., ve Hidalgo-Alvarez, R. (1992) On the adsorption of IgG onto polystyrene particles: Electrophoretic mobility and critical coagulation concentration, *Colloid Polym. Sci.*, **270**, 574.
- Singer, J. M. ve Plotz, R. M. (1956) The latex fixation test-applications to rheumatoid arthritis. *Am. J. Med.*, **21**, 888-892.
- Soos, M. ve Siddle, K. (1983). Characterization of monoclonal antibodies for human luteinizing hormone and mapping of antigenic determinants on the hormone. *Clin. Chim. Acta.*, **133**, 263.
- Steward, M. W., ve Petty, R. E. (1972). The use of ammonium sulphate globulin precipitation for determination of antibody affinity of anti-protein antibodies in mouse serum. *Immunology*, **22**, 747.
- Stoll, S., Lanet, V. ve Pfefferkorn, E. (1993). Kinetics and modes of destabilization of antibody – coated polystyrene latices in the presence of antigen : reactivity of the system IgG – IgM. *J. Colloid Interface Sci.*, **175**, 302.
- Tamura, H., Lee, Y.C., Kawaguchi, K., Takagahara, I. ve Matuo, Y., Saito, K. 2000 Methods for assaying CRP with the use of phosphocoline, European Patent Application EP1076240A1.
- Thompson, R. J. ve Jackson, A. P. (1984). Cyclic complexes and high avidity antibodies. *Trends Biochem. Sci.*, **9**, 1.
- Tuncel, A. ve Pişkin, E. (1993). *J. Appl. Polym. Sci.*, **50**, 303 – 319.
- Wei, T.Q., Kramer, S., Chu, P.V., Hudson, D., Kilgore, D., Salyer, S., Parker, G., Eyberger, A., Arentzen, R. ve Koiv, H. (2000) An improved automated immunoassay for C-reactive protein on the Dimension® clinical chemistry system, *J. Autom. Meth. Manag. Chem.*, **22**, 125-131.
- Whitehead, T. P. (1983). Enhanced luminescence procedure for sensitive determination of peroxidase-labelled conjugates in immunoassay. *Nature (Lond.)*, **305**, 158.
- Wide, L. ve Porath, J. (1966). Radioimmunoassay of proteins with use of Sephadex-coupled antibodies. *Biochem. Biophys. Acta.* **130**, 257.
- Yalçın, G.S., 2002 Yüksek Mühendislik Tezi, Hacettepe Üniv., Fen Bil. Enst., Ankara

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Erinç OZAN

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Yılı : 1982

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu :

Lise : 1996-1999 TED Ankara Koleji Lisesi

Lisans : 1999-2003 Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya
Mühendisliği Bölümü, Beytepe Ankara

Yabancı Dil : İngilizce

İş Tecrübesi : -----