Aşı Prototipi ve Tanı kiti Uygulama Amaçlı Q Humma Hastalığına Karşı Lipopolisakkarit-Biyopolimer Kompleks ve Konjugatlarının Geliştirilmesi

Program Kodu: 2513- Slovakya Bilimler Akademisi (SAS) ile İkili İşbirliği Programı

Proje No: 113Z938

Proje Yürütücüsü:
Yrd.Doç.Dr. Mesut KARAHAN

Araştırmacılar:
Prof.Dr. Emine KARAKUŞ
Doç.Dr. Korkut ULUCAN
Yrd. Doç. Dr. Zeynep AKDESTE
Dr. Sezcan SAĞLAM

Bursiyerler:

Pelin PELİT ARAYICI
Başak Funda EKEN

EYLÜL 2017
İSTANBUL

ÖNSÖZ

Projemiz kapsamında ilk 6 aylık aşamada Slovakya tarafından *Coxiella burnetii* lipopolisakkaritinin izolasyonu gerçekleştirilmiş, karakterizasyonu ve fonksiyonel özellikleri incelenerek tarafımıza saf bir şekilde verilmiştir. Türkiye tarafında ise, bu ilk 6 aylık dönemde kullanacağımız polimerlerin [Polioksidonyum, Poli(vinilpirolidon-co-akrilikasid)] sentezi yapılmıştır. Daha sonraki 1 yıllık aşamada; Biyopolimerler ve lipopolisakkarit kullanılarak, fiziksel karışımla Polimer-lipopolisakkarit kompleksleri, bakır metal iyonu aracılığı ile 3'lü Polimer-Bakır-lipopolisakkarit kompleksleri ve çapraz bağlayıcıyla konjugatlar oluşturulmuş ve karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir.

İkinci 1,5 yıllık bir sürede hazırlanan bu kompleks ve konjugatlar Balb/c farelere enjekte edilerek ELISA metoduyla antikor seviyeleri saptanmıştır. Alınan en iyi antikor seviyesi oranındaki kompleks ve konjugatımızın aşı prototipi olarak tespiti yapılmıştır. En yüksek düzeyde antikor ürettiği tespit edilen Balb/c Hibridoma teknolojisi ile monoklonal antikor eldesi çalışmalarında kullanılmıştır. Coxiella burnetii'ye karşı elde edilen bu monoklonal antikorla tanı kiti denemesi gerçekleştirilmiş ve daha öncesinde Q humması olduğu anlaşılan hasta serumunda bize ait yöntemle de hastalık başarılı bir şekilde tespit edilmiştir.

Bu proje 113Z938 nolu 2513- Slovakya Bilimler Akademisi (SAS) ile İkili İşbirliği Programı kapsamında TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

ÖNSÖZ i

İÇİNDEKİLER ii

SİMGE LİSTESİ viii

KISALTMA LİSTESİ ix

ŞEKİL LİSTESİ x

TABLO LİSTESİ xvi

ÖZET xvii

ABSTRACT xix

BÖLÜM 1 1

BÖLÜM 2 4

2. LİTERATÜR ÖZETİ…… 4

2.1 Q Humması Hastalığı…….. 4
2.2 Aşı ve Tanı Kiti……..6
2.2.1 Aşı Tanımı……..6
2.2.2 Tanı Kitleri……..……...7
2.3 Lineer Polimer Özellikteki Antijen Taşıyıcılar…….. 8
2.3.1 Poli(N-Vinil-2-Pirolidon-ko-Akrilikasid) [P(VP-co-AA)]……8
2.3.2 Polioksidonyum (POX)……..……..8
2.4 Çapraz Bağlama Reaktifleri……. 9
2.4.1 Direkt (Zero-Length) Çapraz Bağlayıcılar……...……10
2.4.1.1 Karbodiimidler…… 10
2.4.1.1.1EDC……11
2.5 Radikal Zincir Polimerizasyonu…… 11
2.6 Temel İmmunoloji…….. 13
2.6.1 Hibridoma Teknolojisi ve Uygulama Alanları……..15
2.6.2 Monoklonal Antikorların Kullanım Alanları……..20

BÖLÜM 3 22

3.GEREÇ VE YÖNTEM……..22

3.1 Kullanılan malzemelerin ve cihazların listesi……..22
3.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar……...25
3.3 Deneylerde Kullanılan Çözeltiler……..26
3.3.1 0,01 M ’lik PBS Tamponu (pH=7)……26
3.3.2 100 mM’lık $NaHCO_3$ Tamponunun Hazırlanması……..26

3.3.3 Sodyum Sitrat Çözeltisi…… 26
3.3.4 0,5 M PBS Tamponu (pH=7,2)……..... 26
3.3.5 Yıkama Tamponu……27
3.3.6 Substrat Tamponu…….. 27
3.3.7 % 0,1 Süt Tozu Çözeltisi…….. 27
3.3.8 Polivalent İmmünoglobulin Alkalin Fosfataz Çözeltisinin Dilüsyonu…….…… 27
3.3.9 4-nitrofenil Fosfat Substrat Çözeltisinin Hazırlanması……. 27
3.3.10Besiyerleri…… 27
3.3.11 DMEM hazırlanışı…….. 28
3.3.12 Polietilen Glikol (PEG) Çözeltisi Hazırlanışı…….. 28
3.3.13 Monoklonal Antikorları Saklama Tamponu…… 28
3.3.14 Azaguanin Hazırlanması…… 28
3.4 KULLANILAN ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ……29
3.4.1 GPC (Jel Geçirgenlik-Moleküler Eleme Kromatografisi)……. 29
3.4.2 Boyut ve Zeta Potansiyel Ölçümleri…… 29
3.4.3 FTIR Spektroskopisi…….. 31
3.4.4 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC)…… 34
3.4.5 Elisa Yöntemi…… 35
3.4.6 Konjugatların Saflaştırılması……..... 39
3.4.6.1 Diyaliz……..39
3.4.6.2 Santrifüjlü Filtrasyon (Membranlı Santrifüj Tüpleri)……..40
3.4.7 Komplement Fiksasyon Testi (Komplement Bağlanma Testi, CFK)…… …… 40
3.5 DENEYSEL KISIM……42
3.5.1 Lipopolisakkaritin izolasyonu……42
3.5.1.1 *Coxiella burnetii* hücrelerinin kültüre alınması ve saflaştırılması 42
3.5.1.2 *Coxiella burnetii* hücrelerinden lipopolisakkarid izolasyonu 42
3.5.2 Polimerlerin Sentezi……43
3.5.2.1 Polioksidonyum Polimerinin Sentezi…….. 43
3.5.2.2 Poli(vinilpirolidon-akrilikasid) kopolimeri sentezi:……..44
3.5.3 Komplekslerin Hazırlanması ve Konjugatların Sentezi……...47
3.5.3.1 LPS ile komplekslerin hazırlanması……47
3.5.3.1.1P(VP-co-AA)-LPS Fiziksel Kompleks Hazırlanması:……47
3.5.3.1.2Polioksidonyum-LPS Fiziksel Kompleks Hazırlanması:…...47
3.5.3.1.3P(VP-co-AA)-Cu^{2+}-LPS komplekslerinin Hazırlanması:…...48
3.5.3.1.4Polioksidonyum-Cu^{2+}-LPS kompleksleri Hazırlanması:…...49
3.5.3.2 Konjugatların Oluşturulması……50
3.5.3.2.1EDC Kullanılarak Konjugatların oluşturulması……..50
3.5.3.2.2NH_2-LPS'nin Biyopolimerle Konjugasyonu……56
3.5.3.2.2.1NH_2-LPS'nin P(VP-co-AA) ile Konjugasyonu……57
3.5.3.2.2.2NH_2-LPS'nin Polioksidonyum ile Konjugasyonu……58
3.5.3.2.3T iyonil Klorür Yöntemi ile Konjugasyon……59

3.5.3.2.3.1LPS-P(VP-co-AA) konjugatlarının $SOCl_2$ yöntemi ile Konjugasyonu……60
3.5.4 Hayvan Deneyleri…….. 61
3.5.4.1 Fare Serumlarının alınması…… 64
3.5.5 ELİSA Deneyleri…… 64
3.5.5.1 ELİSA Kaplamada kullanılması için gerçekleştirilen Konjugatlar 64
3.5.5.2 ELİSA platelerinin LPS Kaplanmasında Standardizasyon çalışması.....65
3.5.5.3 ELİSA Deneyinin Yapılışı:.....65
3.5.6 Hücre Kültürü ve Hibridoma Çalışmaları ile Monoklonal Antikor Eldesi (Son 1 yılda yapılan Çalışmalar burdan itibaren raporlanmıştır) ……66
3.5.6.1 Sıvı Azottaki Hücrelerin Kültür Şişelerine Aktarımı;.....66
3.5.6.2 Hücrelerin Sayımı.....66
3.5.6.3 Hücrelerin Pasajı.....67
3.5.6.4 Hücrelerin Dondurulması.....67
3.5.7 Füzyon ve Hazırlıkları……68
3.5.7.1 Besleyici Hücrelerin Hazırlanması.....68
3.5.7.2 Bağışıklanmış Dalak Hücrelerinin Elde Edilmesi.....69
3.5.7.3 Bağışık Fareden Lenf Hücre Eldesi.....69
3.5.7.4 Myeloma Hücrelerinin Hazırlanması.....69
3.5.7.5 Füzyon.....70
3.5.7.6 Alt Klonlama İşlemi.....71
3.5.7.7 Monoklonal Antikorların Saflaştırılması.....71
3.5.8 Kompleman Fiksasyon Testi (Tanı Kiti Çalışmaları)……..…..71

BÖLÜM 4.....76

4.BULGULAR……76

4.1 LPS nin izolasyonuna ve Karakterizasyonuna ait Sonuçlar.....76
4.2 Polimerlerin Sentezine Ait Bulgular.....78
4.2.1 Polioksidonyum Polimerinin Sentezine ait Bulgular…….....78
4.2.1.1 GPC Analizi.....78
4.2.1.2 ZetaSizer Analizi.....81
4.2.1.3 FT-IR Analizi.....81
4.2.1.4 NMR Analizi.....82
4.2.2 Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) Polimerinin Sentezine ait Bulgular……83
4.2.2.1 GPC Analizi.....83
4.2.2.2 ZetaSizer Analizi.....95
4.2.2.3 FTIR Analizi.....96
4.2.2.4 NMR Analizi.....97
4.3 Komplekslerin ve Konjugatların Analizine Ait Bulgular.....98
4.3.1 LPS ile Komplekslerin Analizine ait Bulgular……98

4.3.1.1 LPS-P(VP-co-AA) Fiziksel Komplekslerinin Analizine ait Bulgular ……..98
4.3.1.1.1 ZetaSizer Analizi.....98
4.3.1.1.2 FTIR Analizi.....99
4.3.1.2 LPS-Polioksidonyum Fiziksel Komplekslerinin Analizine ait Bulgular……100
4.3.1.2.1ZetaSizer Analizi.....100
4.3.1.2.2Analizi.....101
4.3.1.3 P(VP-co-AA)-Cu^{2+}-LPS Komplekslerinin Analizine Ait Bulgular ……...102
4.3.1.3.1ZetaSizer Analizi.....102
4.3.1.3.2FTIR Analizi.....103
4.3.1.4 POX-Cu^{2+}-LPS Komplekslerinin Analizine Ait Bulgular….106
4.3.1.4.1ZetaSizer Analizi.....106
4.3.1.4.2FTIR Analizi.....108
4.3.1.5 Konjugatların Oluşturulmasına ait Bulgular.....110
4.3.1.5.1LPS'nin aldehit türevinin oluşturulması.....110
4.3.1.5.1.1Dekstranın Aldehit Türevinin oluşturulmasın ait Bulgular110
4.3.1.5.1.2LPS 'nin aldehit türevinin oluşumuna ait Bulgular.....112
4.3.2 NH_2-LPS'nin Biyopolimerle Konjugasyonu……..……112
4.3.2.1 -NH_2-LPS'nin P(VP-co-AA) ile Biyokonjugatlarının Sentezi ve Karakterizasyonuna ait Bulgular.....112
4.3.2.1.1GPC Analizi.....112
4.3.2.1.2HPLC Analizi.....114
4.3.2.1.3FTIR Analizi.....118
4.3.2.1.4ZetaSizer Analizi.....120
4.3.2.2 -NH_2-LPS'nin Polioksidonyum Polimeri ile Biyokonjugatlarının Sentezi ve Karakterizasyonuna ait Bulgular.....121
4.3.2.2.1GPC Analizi.....121
4.3.2.2.2HPLC Analizi.....123
4.3.2.2.3FTIR Analizi.....126
4.3.2.2.4ZetaSizer Analizi.....128
4.3.2.3 LPS-P(VP-co-AA) konjugatlarının $SOCl_2$ yöntemi ile Konjugasyonuna ait Bulgular.....129
4.3.2.3.1HPLC analizi.....129
4.3.2.3.2FTIR Analizi.....131
4.4 ELİSA DENEYLERİNE AİT BULGULAR.....132
4.4.1 ELİSA Kaplamada kullanılması için gerçekleştirilen Konjugatlara ait Bulgular……..……132
4.4.2 ELİSA Platelerine LPS Kaplamada Standardizasyon çalışması……133
4.4.3 Dolaylı yoldan Enzim Bağlı İmmün Assay (ELİSA) Yöntemi Kullanılarak Farelerden Alınan Serum Örneklerinde Fiziksel Kompleks, Metal Kompleksleri ve Biyokonjugatlara Karşı Oluşan Antikor Miktar Tayini Sonuçları……134
4.4.3.1 LPS-P(VP-co-AA) Fiziksel Kompleks ve Konjugatlarına Karşı Oluşan Antikor Miktar Tayini Sonuçları.....134

4.4.3.2 LPS-P(VP-co-AA) Fiziksel Kompleks ve LPS-Cu^{2+}-P(VP-co-AA) 3'lü kompleksine Karşı Oluşan Antikor Miktar Tayini Sonuçları.....135
4.4.3.3 LPS-POX Fiziksel Kompleks ve Konjugatlarına Karşı Oluşan Antikor Miktar Tayini Sonuçları.....136
4.4.3.4 LPS-POX Fiziksel Kompleks ve LPS-Cu^{2+}-POX Kompleksine Karşı Oluşan Antikor Miktar Tayini Sonuçları.....137
4.4.3.5 LPS-P(VP-co-AA) Konjugatlarına ve LPS-P(VP-co-AA)-Freund's Adjuvantına Karşı Oluşan Antikor Miktar Tayini Sonuçları Kıyaslanması…….. 138
4.4.3.6 LPS-BSA-Freund's Konjugatlarına Karşı Oluşan Antikor yanıtları….....139
4.5 Hibridoma Teknolojisi ile Monoklonal Antikor Eldesine ait Bulgular140
4.5.1 Hücrelerin Sayımına Ait Bulgular……. 140
4.5.2 Klonların tespiti……..141
4.5.3 Spesifik Antikor Üreten Hibrit Hücrelerinin ELİSA ile Belirlenmesine ait Bulgular……. 142
4.6 Kompleman Fiksasyon Testine ait Bulgular.....144
BÖLÜM 5.....146
5.TARTIŞMA / SONUÇ……146
5.1 LPS nin izolasyonuna ve Karakterizasyonuna ait Tartışma.....146
5.2 Polimerlerin Sentezine ve Karakterizasyonuna Ait Tartışma.....146
5.2.1 Polioksidonyum Polimerinin Sentezine ait Tartışma 146
5.2.2 Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) Polimerinin Sentezine ait Tartışma…….. 146
5.3 Komplekslerin ve Konjugatların Analizine Ait Tartışma.....147
5.3.1 LPS ile Komplekslerin Analizine ait Bulgular…… 147
5.3.1.1 LPS-P(VP-co-AA) Fiziksel Komplekslerinin Sentezi ve Analizine ait Tartışma.....147
5.3.1.2 LPS-Polioksidonyum Fiziksel Komplekslerinin Sentezi ve Analizine ait Tartışma.....149
5.3.1.3 P(VP-co-AA)-Cu^{2+}-LPS Komplekslerinin Sentezine ve Analizine Ait Tartışma.....151
5.3.1.4 POX-Cu^{2+}-LPS Komplekslerinin Analizine Ait Tartışma…153
5.3.2 Konjugatların Oluşumuna ait Tartışma……..155
5.3.2.1 Dekstran Aldehit Türevinin Eldesine ait Tartışma.....155
5.3.2.2 LPS'nin aldehit türevinin oluşumuna ait Tartışma.....156
5.3.2.3 NH_2-LPS'nin Biyopolimerle Konjugasyonu.....156
5.3.2.3.1-NH_2-LPS'nin P(VP-co-AA) ile Biyokonjugatlarının Sentezi ve Karakterizasyonuna ait Bulgular.....156
5.3.2.3.2-NH_2-LPS'nin Polioksidonyum ile Biyokonjugatlarının Sentezi ve Karakterizasyonuna ait Bulgular.....157
5.3.2.4 LPS-P(VP-co-AA) konjugatlarının $SOCl_2$ yöntemi ile Konjugasyonuna ait Tartışma.....158

5.4 ELİSA Deneylerine ait Tartışmalar.....158
5.4.1 ELİSA Kaplamada kullanılması için gerçekleştirilen Konjugatlara ait Tartışma……..158
5.4.2 ELİSA Platelerine LPS Kaplamada Standardizasyon çalışmasına ait Tartışma……...159
5.4.3 Dolaylı yoldan Enzim Bağlı İmmün Assay (ELİSA) Yöntemi Kullanılarak Farelerden Alınan Serum Örneklerinde Fiziksel Karışım, Metal Kompleksleri ve Biyokonjugatlara Karşı Oluşan Antikor Miktar Tayini Sonuçlarına Ait Tartışma……. 159
5.4.3.1 LPS-P(VP-co-AA) Fiziksel Kompleks ve Konjugatlarına Karşı Oluşan Antikor Miktar Tayini Sonuçları.....159
5.4.3.2 LPS-P(VP-co-AA) Fiziksel Kompleks ve LPS-Cu^{2+}-P(VP-co-AA) 3'lü kompleksine Karşı Oluşan Antikor Miktar Tayini Sonuçları.....159
5.4.3.3 LPS-POX Fiziksel Kompleks ve Konjugatlarına Karşı Oluşan Antikor Miktar Tayini Sonuçları.....160
5.4.3.4 LPS-POX Fiziksel Kompleks ve LPS-Cu^{2+}-POX Kompleksine Karşı Oluşan Antikor Miktar Tayini Sonuçlarına ait Tartışma.....160
5.4.3.5 LPS-P(VP-co-AA) Konjugatlarına ve LPS-P(VP-co-AA)-Freund's Adjuvantına Karşı Oluşan Antikor Miktar Tayini Sonuçları Kıyaslanmasına ait Tartışma.....160
5.4.3.6 LPS-BSA-Freund's Konjugatlarına Karşı Oluşan Antikor yanıtlarına ait Tartışma.....161
5.5 Hibridoma Teknolojisi ile Monoklonal Antikor Eldesine ait Bulgular161
5.6 Komplement Fiksasyon Testine ait Tartışma.....161

KAYNAKLAR.....163

SİMGE LİSTESİ

Å	Amström
L	Litre
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
g	Gram
mg	Miligram
ng	Nanogram
µm	Mikrometre
nm	Nanometre
Da	Dalton
kDa	Kilodalton
M	Molar
µM	Mikromolar
mM	Milimolar
n	Mol
mMol	Milimol
mV	Milivolt
dak	Dakika
˚C	Derece santigrat

KISALTMA LİSTESİ

NaCl	Sodyum klorür
$Na_2HPO_4.7H_2O$	Disodyum hidrojen fosfat heptahidrate
$NaH_2PO_4.2H_2O$	Sodyum dihidrojen fosfat dihidrate
NaN_3	Sodyum azid
PAA	Poliakrilikasit
PBS	Fosfat Tamponu
RALS	Işık Saçılması
RI	Kırılma İndisi
SEC	Moleküler eleme kromatografisi (Size Exclusion Chromatography)
UV	Ultra Violet
P(VP-co-AA)	Poli(N-Vinil-2-Pirolidon-*ko*-Akrilikasid)
POX	Polioksidonyum
WHO	The World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
Mab	Monoklonal Antikor
ELİSA	Enzim Bağlı İmmün Assay
PEG	Polietilen glikol
DMSO	Dimetil sülfoksid
DMF	Dimetil formamid
THF	Tetrahidrofuran
PNFP	Paranitrofenil fosfat
LPS	Lipopolisakkarit
ASH	Antijen Sunan Hücreler
MHC	Major Histokompatibilite Antijen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Media
HGPRT	Hipoksantin fosforiboziltransferaz
ASH	Antijen sunan hücreler
CFT (KFT)	Komplement Fiksasyon Testi (Complement Fixation Test)

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2. 1. Poli(N-Vinil-2-Pirolidon-ko-Akrilikasid).....8
Şekil 2. 2. Polioksidonyumun Yapısı (Kabanov, 2004).....9
Şekil 2. 3. EDC Molekülü (Hermanson, 2013).....11
Şekil 2. 4. Benzoil peroksit başlatıcısının radikal halini alması (Kızılbey, 2012).....12
Şekil 2. 5. İlk monomerin radikale katılımı (Kızılbey, 2012).....12
Şekil 2. 6. Reaksiyonun ilerlemesi; monomerin zincirle birleşmesi (Kızılbey, 2010).....12
Şekil 2. 7. Reaksiyonun sonlanma basamağı (Kızılbey, 2012).....13
Şekil 2. 8. Monoklonal antikorların eldesi.....17

Şekil 3. 1. Negatif Yüklü Partikülün Zeta Potansiyeli (Dalgakıran, 2006).....31
Şekil 3. 2. Moleküldeki titreşim hareketlerinin gösterimi.....32
Şekil 3. 3. CH_3OH'daki gerilme ve eğilme titreşimleri.....33
Şekil 3. 4 Modern bir FT-IR spektrometresinin genel gösterimi.....33
Şekil 3. 5. Temel HPLC Donanımı (Kılınç, 2010).....35
Şekil 3. 6. Direct Elisa, Indirect Elisa, Sandwich Elisa ve Yarışmalı Elisa ile ilgili şematik gösterim.....36
Şekil 3. 7 İndirekt Elisa Yöntemi (Kızılbey, 2012).....38
Şekil 3. 8. Enzim substratının ilavesinden sonra rengin şeffaftan sarıya değişiminin görünümü.....39
Şekil 3. 9. Diyaliz işleminin Genel Prensibinin Şematik Gösterimi (Berg vd., 2002).....40
Şekil 3.10. Konjugatların membranlı tüpte saflaştırılmasının şematik gösterimi (Acar, 2006)40
Şekil 3. 11 Komplement Fiksasyon Testi Şematik gösterimi (MEB, 2014).....42
Şekil 3.12. Polioksidonyumun sentezi (Kabanov, 2004).....44
Şekil 3.13. Poli(vinilpirolidon-akrilikasid) kopolimerinin sentez reaksiyonu.....45
Şekil 3.14. P(VP-co-AA) polimerinin sentezine ait deney düzeneğinin şematik gösterimi.....46
Şekil 3.15. P(VP-co-AA)-LPS Fiziksel Kompleks Hazırlanış Şeması.....47
Şekil 3.16. Polioksidonyum-LPS Fiziksel Kompleks Hazırlanış Şeması.....48
Şekil 3. 17. P(VP-co-AA)- Cu^{2+}-LPS komplekslerinin hazırlanış şeması.....49
Şekil 3. 18. Polioksidonyum-Cu^{2+}-LPS komplekslerinin hazırlanış şeması.....50
Şekil 3.19. EDC kullanılarak gerçekleştirilen biyopolimer-LPS konjugatının şeması (Arayıcı-Pelit vd., 2017).....51
Şekil 3. 20. Ardışık hidroksil gruplarının periyodat oksidasyonu ile aldehit gruplarına dönüştürülmesi (Kılınç, 2013).....52
Şekil 3. 21. Dekstran yapısı.....52
Şekil 3. 22. Dekstran aldehit türevinin oluşumu (Altikatoglu vd., 2009).....52
Şekil 3. 23. Dekstran aldehit türevinin oluşumuna ait hazırlanış şeması.....53
Şekil 3. 24. LPS nin $NaIO_4$ ile oksidasyon mekanizması.....54
Şekil 3. 25. Lipopolisakkaritin aldehit türevinin oluşumuna ait hazırlanış şeması.....54

Şekil 3. 26. Aldehit içeren moleküllerin amin türevlerinin oluşturulmasına ait genel mekanizması.....55
Şekil 3. 27. Amin türevlerinin oluşturulmasına ait reaksiyon mekanizması.....55
Şekil 3. 28. LPS'nin amin türevlerinin oluşturulmasına ait hazırlanış şeması.....56
Şekil 3. 29. NH_2-LPS'nin Biyopolimerle Konjugasyonuna ait reaksiyon mekanizması.....57
Şekil 3. 30. NH_2-LPS'nin P(VP-co-AA) ile Konjugasyonunun hazırlanış şeması.....58
Şekil 3. 31. NH_2-LPS'nin POX ile Konjugasyonunun Hazırlanış şeması.....59
Şekil 3. 32. LPS-P(VP-co-AA) konjugatının $SOCl_2$ yöntemi ile Konjugasyon Hazırlanış Şeması.....61
Şekil 3. 33. Balb/c türü farelerimiz.....61
Şekil 3. 34. Balb/c fareye karınaltından enjeksiyon yapışımız.....62
Şekil 3. 35. Yapmış olduğumuz fare serumlarının alınması ve serumlarının ayrıldığı santrifüj aşamaları işlemleri.....64
Şekil 3. 36. Myeloma hücrelerinin sayımının mikroskop görüntüsü.....67
Şekil 3. 37. Besleyici hücrelerin mikroskop görüntüsü.....68
Şekil 3. 38. Myeloma hücrelerinin mikroskop görüntüsü.....70
Şekil 3. 39. Koyun eritrositi.....73
Şekil 3. 40. Kompleman Fiksasyon Testi Örnek Gösterimi.....74
Şekil 3. 41. Pozitif (hastalığın olduğunun tespiti), negatif ve serum antikomplementerlerin gösterimi74

Şekil 4. 1. LPS'nin sırasıyla Zetasizer şiddet ve hacim grafikleri.....77
Şekil 4. 2. LPS'nin Zeta Potansiyel Grafiği.....77
Şekil 4. 3. LPS'nin FTIR spektrumu.....78
Şekil 4. 4. Sentezlenen polioksidonyum polimerinin GPC Kırılma İndisi kromatogramı.....79
Şekil 4. 5. Sentezlenen polioksidonyum polimerinin GPC Işık Saçılması Kromatogramı.....79
Şekil 4. 6. Sentezlenen polioksidonyum polimerinin GPC Kırılma İndisi Kromatogramına göre Molekül Ağırlığı Tayini.....80
Şekil 4. 7. Sentezlenen polioksidonyum polimerinin Zetasizer sonuçlarının sırasıyla şiddet ve hacim grafikleri.....81
Şekil 4. 8. Sentezlenen polioksidonyum polimerinin Zeta potansiyel değeri.....81
Şekil 4. 9. Polioksidonyumun FTIR spektrumu.....82
Şekil 4. 10 Poliokdisonyum polimerine ait NMR analizi sonucu.....83
Şekil 4. 11. Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,1** oranı için GPC Kırılma İndisi Kromatogramı (molekül ağırlığı tespiti için kullanılır).....84
Şekil 4. 12. Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,1** oranı için GPC Işık Saçılması Kromatogramı (molekülün boyutu, tek pik halinde monomerin olmadığı sadece polimerin pikinin görüldüğü durum).....84
Şekil 4. 13. Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,1** oranı için GPC Kırılma İndisi Kromatogramına göre Molekül Ağırlığı Tayini.....85
Şekil 4. 14. Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,15** oranı için GPC Kırılma İndisi Kromatogramı.....86
Şekil 4. 15. Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,15** oranı için GPC Işık Saçılması Kromatogramı.....86
Şekil 4. 16. Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,15** oranı için GPC Kırılma İndisi Kromatogramına göre Molekül Ağırlığı Tayini.....87
Şekil 4. 17. Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,2** oranı için GPC Kırılma İndisi Kromatogramı.....88
Şekil 4. 18. Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,2** oranı için GPC Işık Saçılması Kromatogramı.....88
Şekil 4. 19. Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,2** oranı için GPC Kırılma İndisi Kromatogramına göre Molekül Ağırlığı Tayini.....89
Şekil 4. 20. Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,25** oranı için GPC Kırılma İndisi Kromatogramı.....90

Şekil 4. 21. Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,25** oranı için GPC Işık Saçılması Kromatogramı.....90
Şekil 4. 22. Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,25** oranı için GPC Kırılma İndisi Kromatogramına göre Molekül Ağırlığı Tayini.....91
Şekil 4. 23. Poli(N-Vinil-2-pirolidon-co-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,3** oranı için GPC Kırılma İndisi Kromatogramı.....92
Şekil 4. 24. Poli(N-Vinil-2-pirolidon-co-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,3** oranı için GPC Işık Saçılması Kromatogramı.....92
Şekil 4. 25. Poli(N-Vinil-2-pirolidon-co-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,3** oranı için GPC Kırılma İndisi Kromatogramına göre Molekül Ağırlığı Tayini.....93
Şekil 4. 26. Poli(N-Vinil-2-pirolidon-co-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3** oranları için karşılaştırılmalı GPC Kırılma İndisi Kromatogramları.....94
Şekil 4. 27. Poli(N-Vinil-2-pirolidon-co-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,1 ; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3** oranları için karşılaştırılmalı GPC Işık Saçılması Kromatogramları.....94
Şekil 4. 28. Poli(N-Vinil-2-pirolidon-co-Akrilik asit) polimerinin sırasıyla Zetasizer şiddet ve hacim grafikleri.....95
Şekil 4. 29. P(VP-co-AA) polimerine ait Zeta potansiyel grafiği.....95
Şekil 4. 30. Akrilik asit ve vinil pirolidon monomerlerine ait FTIR spektrumları.....96
Şekil 4. 31. Elde edilen 5 farklı molekül ağırlığındaki polimerlerin FTIR spektrumları.....97
Şekil 4. 32 P(VP-co-AA) polimerine ait NMR analizi sonucu.....97
Şekil 4. 33. LPS-P(VP-co-AA) Fiziksel Komplekslerinin sırasıyla ZetaSizer şiddet ve hacim grafikleri.....98
Şekil 4. 34. LPS-P(VP-co-AA) Fiziksel Komplekslerinin Zeta Potansiyeli.....99
Şekil 4. 35. LPS-P(VP-co-AA) fiziksel kompleksine ait FTIR spektrumu.....99
Şekil 4. 36. LPS, P(VP-co-AA) ve LPS-P(VP-co-AA) fiziksel kompleksine ait kıyaslamalı FTIR spektrumu.....100
Şekil 4. 37. LPS-POX Fiziksel Komplekslerinin ZetaSizer şiddet ve hacim grafikleri.....100
Şekil 4. 38. LPS-POX Fiziksel Komplekslerinin Zeta potansiyel grafiği.....101
Şekil 4. 39. LPS-POX fiziksel kompleksine ait FTIR spektrumu.....101
Şekil 4. 40. P(VP-co-AA)-Cu^{2+}-LPS-1 kompleksine ait sırasıyla ZetaSizer şiddet ve hacim grafikleri.....102
Şekil 4. 41. P(VP-co-AA)-Cu^{2+}-LPS-2 kompleksine ait sırasıyla ZetaSizer şiddet ve hacim grafikleri.....103
Şekil 4. 42. P(VP-co-AA)-Cu^{2+}-LPS-1 kompleksine ait zeta potansiyeli.....103
Şekil 4. 43. P(VP-co-AA)-Cu^{2+}-LPS-2 kompleksine ait zeta potansiyeli.....103
Şekil 4. 44. P(VP-co-AA)-Cu^{2+}-LPS-1 Kompleksine ait FTIR spektrumu.....104
Şekil 4. 45. P(VP-co-AA)-Cu^{2+}-LPS-2 Kompleksine ait FTIR spektrumu.....105
Şekil 4. 46. $CuSO_4.5H_2O$'a ait FTIR spektrumu.....105
Şekil 4. 47. P(VP-co-AA)-Cu^{2+}-LPS-1 Kompleksi, $CuSO_4.5H_2O$ ve LPS'ye ait karşılaştırmalı FTIR spektrumu.....106
Şekil 4. 48. Polioksidonyum-Cu^{2+}-LPS-1 kompleksine ait ZetaSizer şiddet ve hacim grafiği 107
Şekil 4. 49. Polioksidonyum-Cu^{2+}-LPS-2 kompleksine ait ZetaSizer şiddet ve hacim grafiği 107
Şekil 4. 50. Polioksidonyum-Cu^{2+}-LPS-1 kompleksine ait zeta potansiyel değeri.....107
Şekil 4. 51. Polioksidonyum-Cu^{2+}-LPS-2 kompleksine ait zeta potansiyel değeri.....108
Şekil 4. 52. POX-Cu^{2+}-LPS-1 Kompleksine ait FTIR spektrumu.....109
Şekil 4. 53. POX-Cu^{2+}-LPS-2 Kompleksine ait FTIR spektrumu.....109
Şekil 4. 54. Polioksidonyum-Cu^{2+}-LPS2 Kompleksi, $CuSO_4.5H_2O$ ve LPS'ye ait karşılaştırmalı FT-IR spektrumu.....110
Şekil 4. 55. Dekstranın 2mM (♣), 5 mM (♣) ve 10mM (♣) $NaIO_4$ ile oksidasyonunun dekstran (♣) ile kıyaslamalı FTIR analizi.....111

Şekil 4. 56. Dekstranın 500 mM (♣) ve 1 M (♣) $NaIO_4$ ile oksidasyonunun dekstranla (♣) kıyaslamalı FTIR analizi.....111
Şekil 4. 57. LPS'nin Aldehit türevinin (LPS-OH) (♣) FTIR spektrumu.....112
Şekil 4. 58. $n_{P(VP\text{-}co\text{-}AA)}/n_{LPS}$ oranları 0,5; 1 ve 2 olan konjugatlara ait LPS ve polimer kıyaslamalı GPC Kırılma İndisi kromatogramı.....113
Şekil 4. 59. $n_{P(VP\text{-}co\text{-}AA)}/n_{LPS}$ oranları 0,5; 1 ve 2 olan konjugatlara ait LPS ve polimer kıyaslamalı GPC UV kromatogramı.....113
Şekil 4. 60. $n_{P(VP\text{-}co\text{-}AA)}/n_{LPS}$ oranları 0,5; 1 ve 2 olan konjugatlara ait LPS ve polimer kıyaslamalı GPC Işık Saçılması kromatogramı.....114
Şekil 4. 61. LPS'ye (♣) ait HPLC kromatogramı.....115
Şekil 4. 62. P(VP-co-AA)' ya (♣) ait HPLC kromatogramı.....115
Şekil 4. 63. LPS (♣); P(VP-co-AA) (♣) ve n=0,5 oranındaki LPS- P(VP-co-AA) (♣) konjugatına ait kıyaslamalı HPLC Kromatogramı.....116
Şekil 4. 64. LPS (♣); P(VP-co-AA) (♣) ve n=1 oranındaki LPS- P(VP-co-AA) (♣) konjugatına ait kıyaslamalı HPLC Kromatogramı.....116
Şekil 4. 65. LPS (♣); P(VP-co-AA) (♣) ve n=2 oranındaki LPS- P(VP-co-AA) (♣) konjugatına ait kıyaslamalı HPLC Kromatogramı.....117
Şekil 4. 66. LPS (♣); P(VP-co-AA) (♣); LPS- P(VP-co-AA) oranlarına ait n=0,5 (♣); n=1(♣); n=2(♣); ait kıyaslamalı HPLC Kromatogramı.....117
Şekil 4. 67. Karbodiimid yöntemiyle sentezlenmiş olan $n_{P(VP\text{-}co\text{-}AA)}/n_{LPS}$ =0,5 oranındaki konjugatın FTIR Analiz Sonucu.....118
Şekil 4. 68. Karbodiimid yöntemiyle sentezlenmiş olan $n_{P(VP\text{-}co\text{-}AA)}/n_{LPS}$ =1 oranındaki konjugatın FTIR Analiz Sonucu.....119
Şekil 4. 69. Karbodiimid yöntemiyle sentezlenmiş olan $n_{P(VP\text{-}co\text{-}AA)}/n_{LPS}$ =2 oranındaki konjugatın FTIR Analiz Sonucu.....119
Şekil 4. 70. Karbodiimid yöntemiyle sentezlenmiş olan $n_{P(VP\text{-}co\text{-}AA)}/n_{LPS}$ =0,5 (♣); 1(♣); 2(♣) oranlarındaki konjugatların karşılaştırmalı FTIR Analiz Sonucu.....120
Şekil 4. 71. $n_{P(VP\text{-}co\text{-}AA)}/n_{LPS}$= 0,5; 1; 2 oranlarındaki konjugatlar ait polimer kıyaslamalı zeta potansiyel değerlerinin (mV cinsinden) grafik olarak gösterimi.....121
Şekil 4. 72. n_{POX}/n_{LPS} oranları 0,5; 1 ve 2 olan konjugatlara ait LPS ve polimer kıyaslamalı GPC Kırılma İndisi kromatogramı.....122
Şekil 4. 73. n_{POX}/n_{LPS} oranları 0,5; 1 ve 2 olan konjugatlara ait LPS ve polimer kıyaslamalı GPC UV kromatogramı.....122
Şekil 4. 74. n_{POX}/n_{LPS} oranları 0,5; 1 ve 2 olan konjugatlara ait LPS ve polimer kıyaslamalı GPC Işık Saçılması Kromatogramı.....123
Şekil 4. 75. Polioksidonyuma (♣) ait HPLC kromatogramı.....124
Şekil 4. 76. LPS (♣); POX (♣) ve n=0,5 oranındaki LPS-POX (♣) konjugatına ait kıyaslamalı HPLC Kromatogramı.....124
Şekil 4. 77. LPS'ye (♣); POX (♣) ve n=1 oranındaki LPS-POX (♣) konjugatına ait kıyaslamalı HPLC Kromatogramı.....125
Şekil 4. 78. LPS (♣); POX (♣) ve n=2 oranındaki LPS-POX (♣); konjugatına ait kıyaslamalı HPLC Kromatogramı.....125
Şekil 4. 79. LPS (♣); POX (♣); LPS-POX konjugatının n=0,5 (♣); n=1(♣); n=2(♣) oranlarına ait kıyaslamalı HPLC Kromatogramı.....126
Şekil 4. 80. Karbodiimid yöntemiyle sentezlenmiş olan n_{POX}/n_{LPS} =0,5 oranındaki konjugatın FTIR Spektrumu.....126
Şekil 4. 81. Karbodiimid yöntemiyle sentezlenmiş olan n_{POX}/n_{LPS} =1 oranındaki konjugatın FTIR Spektrumu.....127
Şekil 4. 82. Karbodiimid yöntemiyle sentezlenmiş olan n_{POX}/n_{LPS} =2 oranındaki konjugatın FTIR Spektrumu.....127
Şekil 4. 83. Karbodiimid yöntemiyle sentezlenmiş olan n_{POX}/n_{LPS} =0,5 (♣); 1(♣); 2(♣) oranlarındaki konjugatların karşılaştırmalı FTIR Analiz Sonucu.....128

Şekil 4. 84. Polioksidonyum-LPS Konjugatlarına ait polimer ve LPS kıyaslamalı zeta potansiyel değerleri (mV cinsinden).....129
Şekil 4. 85 $SOCl_2$ varlığında sentezlenen LPS- P(VP-co-AA) Konjugatına (♣) ait HPLC sonucu.....130
Şekil 4. 86. LPS (♣); P(VP-co-AA) (♣) ve $SOCl_2$ yöntemi ile sentezlenmiş n=0,5 oranındaki P(VP-co-AA) (♣) konjugatına ait kıyaslamalı HPLC Kromatogramı.....130
Şekil 4. 87. LPS (♣); $SOCl_2$ yöntemi ile sentezlenmiş n=0,5 oranındaki LPS- P(VP-co-AA) (♣) konjugatı ve LPS çözeltisi ilave edilen n=0,5 oranındaki LPS- P(VP-co-AA) (♣) konjugatına ait kıyaslamalı HPLC Kromatogramı.....131
Şekil 4. 88. Tiyonil Klorür Yöntemi ile Sentezlenmiş P(VP-co-AA) -LPS Konjugatına ait Analizi.....132
Şekil 4. 89. 1.Yöntemle sentezlenmiş LPS-BSA Konjugatı (♣), 2. Yöntemle sentezlenmiş LPS-BSA konjugatı (♣), 3. Yöntemle sentezlenmiş LPS-BSA konjugatı (♣), BSA proteini (♣) ne ait GPC Işık Saçılması Kromatogramı.....133
Şekil 4. 90. ELİSA platelerinin LPS ile kaplanma standardizasyonu.....134
Şekil 4. 91. LPS (♦), P(VP-co-AA) (■), LPS- P(VP-co-AA) Fiziksel Kompleksi (▲), LPS-P(VP-co-AA) Konjugatı n=1 oranı (**x**) ve LPS- P(VP-co-AA) Konjugatı n=2 oranı (**+**) enjekte edilen farelerden 58 gün boyunca aralıklarla alınan serumlar daki antikor miktarlarının karşılaştırılması.....135
Şekil 4. 92. LPS (♦), P(VP-co-AA) (■), LPS- P(VP-co-AA) fiziksel Kompleksi (▲), LPS-Cu^{2+}-P(VP-co-AA) Kompleksi 1. oranı (●) ve LPS-Cu^{2+}- P(VP-co-AA) Kompleksi 2. oranı (**+**) enjekte edilen farelerden 58 gün boyunca aralıklarla alınan serumlardaki antikor miktarlarının karşılaştırılması.....136
Şekil 4. 93. LPS (♦), POX (■), LPS-POX Fiziksel Kompleksi (▲), LPS-POX Konjugatı (●) için enjekte edilen farelerden 58 gün boyunca aralıklarla alınan serumlardaki antikor miktarlarının karşılaştırılması.....137
Şekil 4. 94. LPS (♦), POX (■), LPS-POX Fiziksel Kompleksi (▲), LPS-Cu^{2+}-POX Konjugatı (●) için LPS-Cu^{2+}-POX Kompleksi 2. oranı (**+**) enjekte edilen farelerden 58 gün boyunca aralıklarla alınan serumlardaki antikor miktarlarının karşılaştırılması.....138
Şekil 4. 95. LPS (♦), P(VP-co-AA) (■),LPS- P(VP-co-AA) Konjugatı n=1 oranı (▲), LPS-P(VP-co-AA) Konjugatı n= 2 oranı(●) ve LPS- P(VP-co-AA) -Freund's Adjuvantı (**+**), LPS+ Freund's Adjuvantı (**X**) enjekte edilen farelerden 58 gün boyunca aralıklarla alınan serumlardaki antikor miktarlarının karşılaştırılması.....139
Şekil 4. 96. LPS (♦), LPS-Freund's (■), LPS- BSA-Freund's Adjuvantı (●) enjekte edilen farelerden 58 gün boyunca aralıklarla alınan serumlardaki antikor miktarlarının karşılaştırılması.....140
Şekil 4. 97. Dalak hücrelerinin mikrosop altında görülen hücre sayısının sayımı.....141
Şekil 4. 98. Füzyondan sonra 10. günde klon oluşumunun tespitine dair fotoğraflarımız….142
Şekil 4. 99. Füzyondan sonra 10. günde oluşan kolanlara ait mikroskop görüntülerimiz…..142
Şekil 4. 100. ELİSA yapılan klonlar ve plaktaki kuyuları.....143
Şekil 4. 101. Tespit edilen klonların üst sıvılarından gerçekleştirilen ELISA testi sonuçları. 143
Şekil 4. 102. Mycoplasma ve Q fever için çalışılan komplement fiksasyon testi. Daha önce hastalık tespiti yapılmış serumdaki hastalık antijeni başarıli bir şekilde teşhis edildi.....145

Şekil 5. 1. LPS, P(VP-co-AA) ve LPS-P(VP-co-AA) Fiziksel Kompleksinin Z-Ave değerlerinin kıyaslamalı grafiği.....148
Şekil 5. 2. LPS, P(VP-co-AA) ve LPS-P(VP-co-AA) Fiziksel Kompleksinin Zeta Potansiyel değerlerinin kıyaslamalı grafiği.....149
Şekil 5. 3 LPS, POX ve LPS-POX Fiziksel Kompleksinin Z-Ave değerlerinin kıyaslamalı grafiği.....150
Şekil 5. 4 LPS, POX ve LPS-POX Fiziksel Kompleksinin Zeta Potansiyel değerlerinin kıyaslamalı grafiği.....150

Şekil 5. 5. LPS ile polimerin bakır metali varlığında oluşturduğu kompakt yapının şematik gösterimi.....151
Şekil 5. 6. LPS, P(VP-co-AA) ve P(VP-co-AA)-Cu^{2+}-LPS-1 ve P(VP-co-AA)-Cu^{2+}-LPS-2 Kompleksinin Z-Ave değerlerinin kıyaslamalı grafiği.....152
Şekil 5. 7. LPS, P(VP-co-AA) ve P(VP-co-AA)-Cu^{2+}-LPS-1 (Pol-Cu^{2+}-LPS1) ve P(VP-co-AA)-Cu^{2+}-LPS-2 (Pol-Cu^{2+}-LPS2) Kompleksinin Zeta potansiyel değerlerinin kıyaslamalı grafiği 152
Şekil 5. 8. LPS, POX, POX-Cu^{2+}-LPS1 (P2-Cu^{2+}-LPS1) ve POX-Cu^{2+}-LPS2 (P2-Cu^{2+}-LPS2) kıyaslamalı Z-Ave (d.nm) değerleri.....154
Şekil 5. 9. LPS, POX, POX-Cu^{2+}-LPS1 (P2-Cu^{2+}-LPS1) ve POX-Cu^{2+}-LPS2 (P2-Cu^{2+}-LPS2) kıyaslamalı zeta potansiyel değerleri (mV).....155

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2. 1. Seçici ortamın füzyondaki hücrelere etkisi.....19

Tablo 3. 1. Kullanılan malzeme ve cihazların listesi.....22
Tablo 3. 2. Elisa Protokolleri (Kızılbey, 2012).....36
Tablo 3. 3. P(VP-co-AA) polimerinde kullanılan başlatıcı miktarları.....46
Tablo 3. 4. Polimerin 4 farklı organik çözücüdeki çözünürlük durumları.....60
Tablo 3. 5. Kafes numaraları, fare sayıları ve enjekte edilen maddenin içeriği.....62

Tablo 4. 1. Sentezlenen polioksidonyum polimerinin GPC Kırılma İndisi Kromatogramına göre Molekül Ağırlığı Tayinine ait elde edilen veriler.....80
Tablo 4. 2. Sentezlenen Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,1** oranı için GPC Kırılma İndisi Kromatogramına göre Molekül Ağırlığı Tayinine ait elde edilen veriler....85
Tablo 4. 3. Sentezlenen Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) Polimerinin **n= 0,15** GPC Kırılma İndisi Kromatogramına göre Molekül Ağırlığı Tayinine ait elde edilen veriler.....87
Tablo 4. 4. Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,2** oranı için GPC Kırılma İndisi Kromatogramına göre Molekül ğırlığı Tayinine ait elde edilen veriler.....89
Tablo 4. 5. Sentezlenen Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,25** oranı için GPC Kırılma İndisi Kromatogramına göre Molekül ğırlığı Tayinine ait elde edilen veriler……91
Tablo 4. 6. Sentezlenen Poli(N-Vinil-2-pirolidon-co-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,3** oranı için GPC Kırılma İndisi Kromatogramına göre Molekül ğırlığı Tayinine ait elde edilen veriler……93
Tablo 4. 7. Füzyon için seçilen fareler ve Füzyondan önce son immunizasyonda enjekte edilen maddelerin içerikleri.....140

ÖZET

Biyopolimerlerin lipopolisakkarit, protein ve diğer biyomoleküllerle kompleks ve konjugasyonu tıp, eczacılık, biyoteknoloji ve biyomühendislik alanlarında uygulamalar için çeşitli yenilikler getirmektedir. Son zamanlarda polimer-biyomolekül kompleks ve konjugatları proteinlerin saflaştırılması, enzim kararlılığının arttırılması, yeni nesil aşı sistemleri, tanı kitleri, biyosensör üretimi, kontrollü ilaç salımı ve doku mühendisliğinde kullanılmaktadırlar.

Q hummanın etiyolojik ajanı lipolisakkarit yapısındaki *Coxiella burnetii*'dir. Q humması Dünya'da en sık görülen riketsiyal kaynaklı zoonotik hastalıklardandır. İnsanlarda meydana getireceği kalıcı enfeksiyonlar Q hummasının kronik formuna yol açabilir ve sıklıkla ölümcül olabilmektedir. Ancak bu hastalığa karşı sentetik aşı geliştirilmesine zemin hazırlayacak olan Polimer-Lipopolisakkarit kompleks ve konjugatları geliştirilmesi ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Projemiz kapsamında ilk 6 aylık aşamada Slovakya tarafından *Coxiella burnetii* lipopolisakkaritinin izolasyonu gerçekleştirilmiş, karakterizasyonu ve fonksiyonel özellikleri incelenerek tarafımıza saf bir şekilde verilmiştir. Türkiye tarafında ise, bu ilk 6 aylık dönemde polimerlerin [Polioksidonyum, Poli(vinilpirolidon-co-akrilikasid)] sentezi yapılmıştır. Daha sonraki 1 yıllık aşamada; Biyopolimerler ve lipopolisakkarit kullanılarak, (1)fiziksel karışımla Polimer-lipopolisakkarit kompleksleri, (2)Bakır metal iyonu aracılığı ile 3'lü Polimer-Bakır-lipopolisakkarit kompleksleri ve (3)çapraz bağlayıcıyla konjugatlar oluşturulmuş ve karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir.

İkinci 1,5 yıllık bir sürede hazırlanan bu kompleks ve konjugatlar Balb/c farelere enjekte edilerek ELİSA metoduyla antikor seviyeleri saptanmıştır. Alınan en iyi antikor seviyesi oranındaki kompleks ve konjugatımızın aşı prototipi olarak tespiti yapılmıştır. En yüksek düzeyde antikor ürettiği tespit edilen Balb/c Hibridoma teknolojisi ile monoklonal antikor eldesi çalışmalarında kullanılmıştır. Coxiella burnetii'ye karşı elde edilen bu monoklonal antikorla tanı kiti denemesi gerçekleştirilmiş ve hastanın serumundan hastalık başarılı bir şekilde tespit edilmiştir.

Projemizden elde edilen çıktılar ile yeni tip aşı ve tanı kiti prototipleri üretilmiştir. Gelecekteki aşamada destek bulunarak patentlerinin alınmasıyla Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği tekniklerini kullanarak yapılan ilklerden olan aşı ve teşhis amaçlı bir kit olarak ticarileştirme çalışmalarının yapılması planlanmaktadır. Yapılan bu çalışmanın farklı hastalıklar için de

üretilecek aşı ve tanı kitlerinin yapımına alt yapı, bilgi, birikim açısından büyük katkısı olacağını ve ülkemizin dışa bağımlılığını ortadan kaldırılacağını düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Q Humması, Lipopolisakkarit, Aşı, Tanı Kiti, ELİSA, Balb/c

ABSTRACT

Conjugation of biopolymers with lipopolysaccharides, peptides, proteins and other biomolecules is used in medicine, pharmaceuticals, biotechnology and bioengineering applications to bring various novelties. Aside non-water soluble polymeric systems used in functional applications such as controlled drug release, tissue engineering; water soluble Polymer-biomolecule complexes and conjugates recently have been used in protein purification, increasing enzyme stability, drug release systems, new generation vaccine systems, diagnostic kits, production of biosensors, controlled drug release, tissue engineering.

Coxiella burnetii is the etiologic agent of Q fever. This lipopolysaccharide is the most widespread rickettsia sourced zoonotic disease. Permanent infections in humans can cause chronic form of Q fever to arise, endocarditis induced with *Coxiella burnetii* often results fatally. However, there are no studies to form a ground for development of synthetic vaccines for this illness using polymer-lipopolysaccharide complexes and conjugates.

Within the scope of our project, isolation of *Coxiella burnetii* lipopolysaccharide was performed and the characterization and functional properties was investigated and were given purely to us by Slovakia during the first 6 months. In the Turkish side, we had synthesized polymers [Polyoxidonium, Poly (vinylpyrrolidone-co-acrylic acid)] in the first 6 months. In the next 1 year stage using biopolymers and lipopolysaccharide; polymer-lipopolysaccharide complexes using physical mixtures(1), polymer-copper-lipopolysaccharide complexes via copper metal ion(2) and cross-linker conjugates(3) were formed and characterized.

In the second half and a year stage, these complexes and conjugates were injected into Balb/c mice and antibody levels were determined by ELISA method. We have determined that the best antibody level ratio of the complex and conjugate is the vaccine prototype. The Balb/c which was found to produce the highest level of antibody, has been used in monoclonal antibody production studies with hybridoma technology. A diagnostic kit test was performed with this monoclonal antibody against Coxiella burnetii and the patient's disease was successfully diagnosed.

New types of vaccine and diagnostic kit prototypes have been produced with outputs from our project. It is planned to carry out the commercialization studies as a kit for vaccination and diagnosis, which is supported by the future stage and is obtained from the patents and

biotechnology and genetic engineering techniques. We think that this study will be a great contribution to the construction of vaccines and diagnostic kits to be produced for different diseases and will eliminate the foreign dependency of our country.

Keywords: Q fever, Lipopolysaccharide, Vaccine, Diagnostic Kit, ELISA, Balb/c

BÖLÜM 1

1.GİRİŞ

Coxiella burnetii (*C. burnetii*) Q humması hastalığına neden olan zorunlu hücre içi, gram negatif bir bakteridir. Bir lipopolisakkarit (LPS) olan C. burnetii, dış membranının ana bileşenini oluşturmaktadır. LPS mikrop ile konağın etkileşiminde, patojenite ve immünojenitelerinde önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca LPS, antikor tepkisini indükleme yeteneğine sahiptir ve immünojen koruyucu olduğu düşünülmektedir.

Aşı; spesifik bir hastalığa karşı bağışıklık kazanılmasını veya bağışıklık düzeyinin arttırılmasını sağlayan biyolojik olarak hazırlanan maddelere verilen bir isimdir. Günümüzde Q hummasına karşı klasik yöntemle üretilmiş mevcut aşılar (Q-Vax®, Coxevac®, M-44 vaccine) bulunmakla beraber bu aşıların dezavantajları bilinmektedir. Ayrıca kullanışlı bir tanı kitinin karakteristik iki kriteri hassasiyet ve özgüllüktür. Q Humması Hastalığı her ne kadar çok sık görülmesede insanların ölümle tehdit etse de elde ettiği kurbanlar genel olarak çiftlik hayvanlarıdır. Türkiye gibi hayvancılığa sahip ülkeler için bu tür bir hastalık ülkenin geleceği için tehdit olarak sınıflandırılabilir. Tüm bunlar göz önünde bulundurularak Q Humması için basit, ucuz yeni aşı sistemleri ve tanı kitinin ülke ekonomisi için ne oranda kritik olduğu anlaşılabilir.

Yeni nesil polimerik aşı sistemlerinde immünojenliği arttırmak için bu biyomoleküller lineer özellikteki polimerlere bağlanabilmektedir. Bu proje kapsamında kullanılan Poli(N-Vinil-2-Pirolidon-ko-Akrilikasid) [P(VP-*co*-AA)] ve Polioksidonyum (POX) genel olarak kullanılan lineer taşıyıcılardır ve biyomoleküller bu tür taşıyıcılara kararlı kovalent bağlarla bağlanmıştır.

Projenin Slovakya Bilimler Akademisi (SAS) ile yapılmasında iki temel neden vardır; 1) Q hummanın etiyolojik ajanı olan lipolisakkarit yapısındaki Coxiella burnetii' nin PhD, DSc. Rudolf Toman (lipopolisakkaritler konusunda çalışan Dünya çapında bir bilim insanı) ve ekibiyle izolasyonu, karakterizasyonu ve fonksiyonel özelliklerinin aydınlatılıp saf olarak sağlanması, 2) Slovakya Cumhuriyeti'nde hayvancılık ülkelerinin ekonomisinde büyük yer

tutmaktadır. Bu hastalık Slovakya Cumhuriyeti'nde gerek hayvan gerekse de insanlarda sıklıkla görülmekte, ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Daha önceleri Q humma aşılaması için önerilen Lipopolisakkarit-protein kompleksi, deri altı yoluyla karakterize edilmiş ve Slovakya Cumhuriyeti'nde Q hummaya maruz kalan binlerce kişide kullanılmıştır. Ancak yan etkilerinin giderilememiş olması ve ülkemizde de bu hastalığa ait vakaların görülmesi bu konudaki iki ülkenin ihtiyacını ortaya koymaktadır. Sunulan projeyle geliştirilmiş olan aşı protitipi kullanılabilir hale getirilerek her iki ülkenin ihtiyacı karşılanmış olacaktır.

Bu projede biyopolimerlerin *Coxiella burnetii* ile fiziksel karışım ve metal varlığında oluşturulan kompleksler ve yanı sıra çapraz bağlayıcı varlığında oluşturulan polimer-lipopolisakkarit konjugatlarıyla Q humma hastalığına karşı potansiyel tanı kiti ve yeni nesil aşı geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu yöntemlere dayanarak Q hummasının etiyolojik ajanı olan LPS yapısındaki *Coxiella burnetii,* değişik molekül ağırlıklarına ve yapılarına sahip taşıyıcı moleküller olan biyopolimerlerle [Polioksidonyum, Poli(vinilpirolidon-akrilikasid) kopolimeri] (sentezlendikten sonra) fiziksel karışımı, ikili polimer-LPS konjugatları ve üçlü polimer-bakır-LPS kompleksleri elde edilmiş ve saflaştırılmıştır. Polimer-LPS kompleks ve konjugatlarının yapıları, Polimer/LPS' nin farklı oranlarında hazırlanan örneklerinin fraksiyon bileşimi ve saf konjugat moleküllerinin parçacık boyutları farklı fizikokimyasal yöntemler (HPLC, GPS-Viscotek dörtlü dedektör sistemi, Zeta potansiyeli-parçacık boyutu ölçüm sistemi, FTIR vb.) kullanılarak analiz edilmiştir. Ayrıca, yapıları aydınlatılan ve saflaştırılan Polimer-LPS kompleks ve konjugatları Balb/c cinsi erkek farelere enjekte edilerek ELİSA yöntemiyle antikor seviyeleri tespit edilmiştir. Elde edilen en iyi antikor seviyesi oranındaki kompleks ve/veya konjugatımız ''aşı prototipi'' olarak tespit edilmiştir. En yüksek düzeyde antikor ürettiği tespit edilen fareler Hibridoma teknolojisi çalışmalarında kullanılmıştır. Bu yöntemle monoklonal antikor elde edilerek, Q humması hastalığına karşı tanı kiti prototipi oluşturulmuştur.

Ülkemizde aşı ve kit üretiminde çoğunlukla dışa bağımlılığın olması, bu ürünlerin ithalatı için önemli miktarda bir parasal kaynağın yurtdışına gitmesi sebebiyle aşı ve tanı kiti üretiminin (Tübitak öncelikli alanlarda aşı ve tanı kiti hakkında çağrıya çıkmaya devam etmektedir) çok önemli ve ivedilikle yapılması gerektiğini düşündük.

Bu çalışmadaki asıl hedefimiz;

Polimer-LPS kompleks ve konjugatlardan immunojenite ve koruma aktivitesinin düzenlenmesini sağlayan yapı-işlev-fonksiyon ilişkisi fikrini araştırmaktır.

Bu araştırmalardan Q hummasına karşı yeni nesil aşı ve teşhisde kullanılabilecek tanı kitinin (yeni tip sentetik aşı prototipi ve tanı kiti patentini alarak araştırma, aşı uygulamaları ve teşhis

amaçlı bir kit olarak ticarileştirmeye çalışılacaktır) prototipleri elde edilmiştir. Bu sonuçlar hem Slovakya Cumhuriyeti hem de ülkemizde ve daha sonra da tüm Dünya‘da aktif olarak kullanılabileceği kanaatindeyiz. Özellikle bu ürünlerin ülkemizde çoğunlukla ithal edildiği düşünülürse, bu proje çalışmasıyla bu yöndeki harcamaların önüne geçerek ülkemizde dışa bağımlı olmadan ihtiyaç duyulan hastalılara karşı aynı sistemler uygulanarak yerli üretim amaçlanmaktadır.

BÖLÜM 2

2. LİTERATÜR ÖZETİ

TÜBİTAK Bitirme Raporu kapsamında literatür özeti bölümünde Q humması hastalığı, konjugat ve komplekslerin oluşturulması, temel immunoloji ve hibridoma teknolojisi ile ilgili genel bilgiler verilmiştir.

1.1 Q Humması Hastalığı

Q humması terimi, ilk kez 1937 yılında Avustralya'nın Brisbane şehrinde, Edward Holbrook Derrick tarafından, mezbaha işçilerinde meydana gelen ateşli hastalığı betimlemek için kullanılmıştır. Hastalık, şüpheli anlamında kullanılan "query" kelimesinin baş harfi ve yüksek vücut sıcaklığı anlamına gelen "fever" kelimesi alınarak "Q fever" (Q humması) olarak isimlendirilmiştir (Özbey vd., 2009; Gazyağcı vd., 2011).

C. burnetii konağa bağlı faz varyasyonu geçiren tek mikroorganizmadır ve ısı, kurutulma ve kimyasal ajanlara karşı yüksek oranda dirençlidir. Aerosol olarak alındığında oldukça infeksiyöz olan *C. burnetii*, tek bir mikroorganizma olarak inhale edildiğinde bile klinik hastalık gelişimine neden olabilir. Q humması genellikle birden başlayan ateş, titreme, halsizlik, baş ağrısı, iştahsızlık gibi özgül olmayan semptomlarla seyreden, riketsialardan C. burnetii'nin neden olduğu zoonotik bir hastalıktır. Q humması hastalığı küçük (0.2 to 0.4 µm genişliğinde, 0.4 to 1 µm uzunluğunda) gram negatif intrasellüler C. burnetii bakterisinin sebep olduğu Dünya'da en sık görülen riketsiyal kaynaklı zoonotik bir hastalıktır (Maurin vd., 1999; Gale vd., 2015). Q hummasının en yaygın akut formu grip benzeri bir hastalık, alışılmamış bir zatürre veya daha az sıklıkta görülen granülomatöz hepatiti olarak, nörolojik komplikasyonların etki alanı ile karakterize edilmiştir. İnsanlarda endokarditlerle ilişkili olabilecek kalıcı enfeksiyonlar, Q hummasının kronik formuna yol açabilir. Sonuçta, *C. burnetii* indüklenmiş endokarditler sıklıkla ölümcül olabilmektedir. Doğal konakları, koyun, sığır, keçi, köpek, kedi ve kuşlar gibi insanlara yakın olan hayvanlardır. Mikroorganizma özellikle plasental dokularda yoğun olarak bulunur ve çoğalır. Enfekte hayvanlarda genellikle

semptom ve bulgular gözlenmez, bir diğer ifade ile hastalık gelişmez ancak mikroorganizmayı yüksek oranlarda plasental dokularla ve ayrıca süt, idrar, gaita ve diğer vücut sıvıları ile birlikte atarlar. Tarım ve hayvancılıkla ilgilenenler, mezbaha çalışanları da artmış risk taşıyan gruplardır. Ülkemizde tarım ve hayvancılıkla uğraşan nüfusun çok olduğu göz önüne alındığında hastalığın risk boyutları ve kapsamı oldukça fazla olduğu görülmektedir. Laboratuvar koşullarında da çalışanlar için risk yaratan *C. burnetii* biyolojik silah olarak kullanıldığında da doğal enfeksiyona benzer hastalık oluşturacaktır. İnhalasyon yolu ile kolaylıkla bulaşma kapasitesine sahip olması, çevre şartlarına karşı direnç göstermesi ve klinik bulguların az sayıda mikroorganizmanın alınmasını takiben gelişmesi, C*. burnetii*'nin biyolojik silah olarak ilgi çekmesine neden olmuştur. Sıklıkla 2-14 günlük inkübasyon süresini takiben (inkübasyon süresi 40 güne kadar uzayabilir) gelişen Q humması, 2 gün ile 2 hafta arasında klinik bulguları devam eden ve sonrasında, yavaş yavaş iyileşen, kendi kendine düzelen bir hastalıktır. Hastalık Dünya çapında endemiktir ve tipik olarak sığır, keçi ve koyun yetiştirilen bölgelerde görülür. İnkübasyon periyodunun süresi inhale edilen mikroorganizma sayısı ile ilişkilidir, alınan mikroorganizma sayısı artıkça, inkübasyon süresi kısalırken mikroorganizma sayısının az olduğu durumlarda inkübasyon süresi göreceli olarak uzun olmaktadır. Hastalığın tipik mevsimsel özelliği olmamakla birlikte, bazı yörelerde koyun ve keçilerin yavrulama döneminde artış olduğu da bildirilmektedir. Hastalık özgül olmayan ateş, başağrısı, yorgunluk ve miyaljinin (kas romatizması) ön planda olduğu semptomlarla ortaya çıkar. Q humması vakalarının yaklaşık %33'ünde akut hepatit gelişir. Pulmoner semptom ve bulgular gelişmeden, hepatitli vakalarda ateş ve yüksek serum transamilazları tespit edilir. Nadir olmakla birlikte kronik hepatit, kültür negatif endokardit, aseptik menenjit, ensefalit ve osteomyelit görülebilecek komplikasyonlardır. Hastalık balgam veya diğer klinik örneklerde mikrobiyolojik incelemeler genellikle sonuçsuz kalır. Eğer hastalar, hastaneye yatırılacak olursa standart önlemlerin alınması yeterlidir, özel izolasyon koşullarının sağlanması gerekmez. Formalin ile inaktif hale getirilmiş tüm hücre aşısı yüksek risk altındakiler için kullanılmaktadır ve Avusturya'da lisans almıştır. Aşının en önemli yan etkisi özellikle immün kişilerde görülen ve nekroza kadar uzanabilen lokal yan etkilerdir. *C. burnetii* toplumda iş gücü kaybına ve bakım ihtiyacı olacak çok sayıda kişiye neden olabileceği için üzerinde durulması ve değerlendirilmesi gereken ajanlardan birisidir. Bütün hücre aşılarının kullanımı, düşük ama kalıcı sertleşmiş kitlelerin etki alanıyla veya enjeksiyon bölgesindeki apselerle ilişkilendirilmektedir. Sıklıkla insanlarda görülen komplikasyonlar, önceki aşının indüklediği bağışıklığın ortaya çıkmasıyla olmaktadır. Böylece bütün hücre aşılarının kullanımı insanların ihtiyacına göre gerçekleştirmek üzere, cilt testleri, serolojik test ve hücre dışı lenfosit proliferasyon deneyinin çeşitli kombinasyonları tarafından aşılanmak

için kısıtlandırıldı. Q hummasına karşı yeni tipte aşı geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Ayrıca tanı kitlerinin de oluşturulması hastalığın teşhisinde büyük bir kazanç olarak görülmektedir MMWR, 2001; Kortepeter vd., 2001; American Academy of Pediatrics, 2012).

Bir LPS olan *C. burnetii*, dış membranının ana bileşenini oluşturmaktadır. LPS, mikrop ile konağın etkileşiminde, patojenite ve immünojenitelerinde önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca LPS, antikor tepkisini indükleme yeteneğine sahiptir ve immünojen koruyucu olduğu düşünülmektedir. *C. burnetii*'nin yapı-işlev ilişkisini çalışmayı amaçlayan bu proje sonucunda, Q hummasının patogenez ve bağışıklık mekanizmaları hakkında daha ayrıntılı bilgi sağlanmıştır. Bu projenin ışığında hastalığın tanısı için tanı kiti ve korunması için aşı konusunda yeni çalışmalara ve hatta ticari anlamda satışının yapılacağı günlere ışık tutacağı düşünülmektedir (Williams vd., 1981; Toman vd., 1996; Škultéty vd.,1998; Hussein vd., 2001).

1.2 Aşı ve Tanı Kiti

1.2.1 Aşı Tanımı

Bağışıklama, bireyin bağışıklık sistemini yapay yollarla uyararak enfeksiyon hastalıklarına karşı korunmasını gerçekleştirme işlemine verilen isimdir. Bağışıklık kelimesinin Latince muaf tutmak anlamına gelen "immunis" ve "immunitas'' kelimelerinden türetilmiştir (Kutlu, 2012; Yadav vd., 2014).

Aşı; spesifik bir hastalığa karşı bağışıklık kazanılmasını veya bağışıklık düzeyinin arttırılmasını sağlayan biyolojik olarak hazırlanan maddelere verilen bir isimdir (Sezer, 2014). Aşı olarak kullanılan maddeler doğrudan hastalık etkenlerinin inaktif (ölü) veya zayıflatılmış şekilleri, bu mikroorganizmaların antijenik yapıları ya da bunların hücre dışına saldıkları toksinleri olabilir (Altuğ vd., 2013). Etken vücudun bağışıklık sistemini, etkenin yabancı olduğunu fark etmesi, onu yok etmesi gerektiği ve hatırlanması gerektiğine dair uyarmaktadır, böylece bağışıklık sistemi bu etken ile ilerleyen zamanlarda tekrar karşılaştığında onu kolay bir şekilde fark etmekte ve yok edebilmektedir (Sezer, 2014). Günümüzde Q hummasına karşı klasik yöntemle üretilmiş mevcut aşılar (Q-Vax®, Coxevac®, M-44 vaccine) bulunmakla beraber bu aşıların dezavantajları bilinmektedir.

1.2.2 Tanı Kitleri

Kullanışlı bir tanı kitinin karakteristik iki kriteri hassasiyet ve özgüllüktür. Hassasiyet kriteri, tanı kitinin gerçekten hastalıklı bireyden alınan numunenin pozitif sonuç verme olasılığı

olarak tanımlanırken özgüllük özelliği tanı kitinin hasta olmayan bireyin negatif sonuç vermesini sağlar. Bu değerler olasılık üzerinden değerlendirildiği için yüzdelik 10 olarak tanımlanırlar. Hassasiyet ve özgüllük, “altın standart” olarak da bilinen hastalıklı örnekler ile sağlıklı örnekleri birbirinden tamamen ayırt edebilen bir referans standardı ile karşılaştırırlar. Bu standardın sonuçlarıyla altın standardın sonuçları arasında olan fark tanı kitinin hata oranını verir. Referans standardının farklı kullanıcılar tarafından aynı sonuçları vermesi o tanı kitinin tutarlılığını gösterir ve tutarlılık zaman zaman bir tanı kitinin performansı için önemli olan tek kriter olmaktadır. Bir tanı kiti için önemli olan diğer değerler Pozitif Öngörü Değer [Positive Predictive Value (PPV)] ve Negatif Öngörü Değeri [Negative Predictive Value (NPV)]’dir. Bu değerler sırasıyla gerçek pozitif ve gerçek negatif değerlerin yüzdelerini verir. Hassasiyet ve özgüllük değerlerini vermekle birlikte bir popülasyonda ilgili hastalığın ne kadar yaygın olduğunu da gösterir. Tanı kitlerinin diğer önemli kriterlerinden olan tekrarlanabilirlik, bir tanı kitinin bir numuneyi her test ettiğinde aynı sonucu verme oranı ile ifade edilir ve tanı kitinin uzun vadeli kullanılabilmesi için yüksek olması gerekmektedir. Tanı kitinin kullanımının kolaylığı, cevabı verdiği süre ve istikrarı da kullanımını kolaylaştıran ve kullanan kişinin alması gereken eğitimi azaltan kriterlerdir, yani kullanım kolaylaştıkça kitin kullanımı yaygınlaşır. Bir tanı kiti oluşturulurken belirlenmesi gereken ilk şey kite ihtiyacı doğuran sorundur. Tehlikeli olan bir hastalığın semptom vermemesi, hızlı yayılan bir hastalığın acil tespiti veya invaziv olmayan yöntemlerle hastalığın belirlenmesinin istenmesi bu nedenler arasında sayılabilir. Daha sonra kitin oluşturulma amacı belirlenmelidir. Bu amaç var olan bir teşhisin kalitesini arttırma veya bu teşhisin ulaşılabilirliğini geliştirmek olabilir. Tanı kitinin oluşturulmasında son basamak söz konusu hastalık için var olan teşhis yöntemlerinin belirlenip, bu yöntemlerin sınırlarının tespit edilmesidir. Bu basamak tanı kitinin oluşturulmasını hızlandırmak ve ayrıca kolaylaştırmakla kalmaz hastalığın hangi yönlerden incelendiğini de belirler. Tanı kitlerinin kullanımının genel amacı şüpheli bir canlıdan elde edilen doku üzerinden o organizmada bir patojenin varlığını doğrulamak veya yalanlamak ya da bir zamanlar olup olmadığını belirlemektir. Patojenin varlığını zararlı organizma veya bu organizmaya özgü işaretleyici molekül üzerinden belirlemek özelikle klinik alanda hastalık kontrolü için kritik önem taşımaktadır. Tanı kitlerinin tutarlı, ucuz ve basit olmaları ve kısa sürede sonuç vermeleri gerekmektedir. Birçok hastalık için erken teşhis ve müdahale o hastalığın geniş kitlelere yayılmasını engellemek için kritik öneme sahiptir (Banoo S. vd., 2010). Q Humması Hastalığı her ne kadar insanları da tehdit etse de elde ettiği kurbanlar genel olarak çiftlik hayvanlarıdır. Türkiye gibi kırsal ekonomiye sahip ülkeler için bu tür bir hastalık ülkenin geleceği için tehdit olarak sınıflandırılabilir. Bu ve benzer hastalıkların hastalığın varlığının kanıtlanması için yapılması gereken harcamalar göz önünde

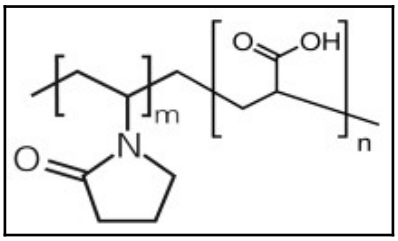
bulundurulursa; Q Humması için basit, ucuz aşı ve tanı kitinin ülke ekonomisi için neden kritik olduğu anlaşılabilir kanaatindeyiz (Heinzen vd., 1995).

1.3 Lineer Polimer Özellikteki Antijen Taşıyıcılar

Lipolisakkaritlere karşı antikor üretiminde immünojenliği arttırmak için bu biyomoleküller lineer özellikteki polimerlere bağlanabilmektedir. Bu proje kapsamında kullanılan P(VP-*co*-AA) ve POX genel olarak kullanılan lineer taşıyıcılardır ve biyomoleküller bu tür taşıyıcılara kararlı kovalent bağlarla bağlanmaktadırlar (Deliloglu-Gürhan vd., 2002).

1.3.1 Poli(N-Vinil-2-Pirolidon-ko-Akrilikasid) [P(VP-co-AA)]

R.V. Petrov ve arkadaşları fareler üzerindeki çalışmalarında poliakrilik asitin (PAA) immün sistemin güçlü uyarıcısı olduğunu göstermişlerdir. Ancak yüksek toksisiteden dolayı immünojenik araştırmalarda geniş kullanım alanı bulamamışdır. PAA'nın toksisitesini düşürmek amacıyla PAA'nın N-vinil pirolidon ile çeşitli oranlarda ve farklı molekül ağırlıklarında kopolimerleri sentezlenmiştir. N-Vinil-2-Pirolidon-Akrilik asit kopolimerinin de en az PAA kadar immune sistemi uyarıcı etkisi olduğunu göstermişlerdir. (Mansuroğlu vd., 2011).

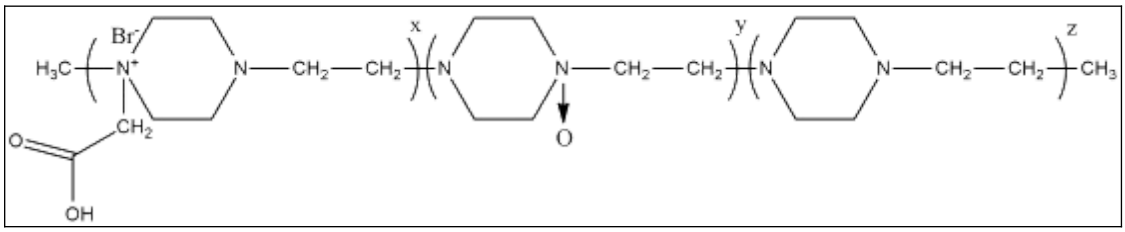


Şekil 2. 1. Poli(N-Vinil-2-Pirolidon-ko-Akrilikasid)

1.3.2 Polioksidonyum (POX)

Antijenlerin sentetik immunostimulan polimerlerle konjugasyonuyla oluşturulan polimer-subunit aşı prensibi, teorik olarak temel alınmış ve deneysel olarak doğrulanmıştır. Bu prensibe göre gribe karşı Grippoll ticari ismiyle üretimi yapılan ilk sentetik polimer aşısı geliştirilmiş ve Rusya'da milyonlarca insan aşılanmıştır. Grippol, sentetik bir polimer olan Polioksidonyum (POX) ile influenza virüs proteinlerinin konjuge edilmesiyle elde edilmiştir. POX, N-oxidized polyethylene-piperazine türevi olup, suda çözünebilen sentetik immunomodülatör bir moleküldür. Polielektrolit antijen konjugatının hem hücresel hemde hümoral immun yanıtı 10 ila 100 kat arasında artırdığı ve koruyucu özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak POX ile yapılan Grippol aşısı yüksek etkinlik ve mutlak koruyuculuğuyla halen ilk sentetik polimer aşısı olarak kullanılmaktadır. POX ile konjuge

edilmek üzere bruselloz, tüberküloz, dizanteri, AIDS ve hepatit virüs antijenlerine karşı polimer-subunit aşıların önklinik ve klinik denemeleri halen devam etmektedir (Elçiçek, 2013). Bu sebeple projemizde kullanımı uygun görülmüştür.



Şekil 2. 2. Polioksidonyumun Yapısı (Kabanov, 2004)

1.4 Çapraz Bağlama Reaktifleri

Biyomolekül-protein ve biyomolekül-polimer kovalent konjugatlarının geleneksel olarak sentezinin, makromoleküllerin sulu çözeltide aktive edilmiş fonksiyonel grupları arasındaki reaksiyonlara dayandığı bilinmektedir. Bu sebeple, sulu ortamda yapılan konjugasyon reaksiyonlarında çapraz bağlama reaktifleri gibi kimyasal moleküller kullanılmaktadır (İşcanı, 2007).

Çapraz bağlama iki ya da daha fazla molekülün kovalent bağ yoluyla kimyasal olarak bağlanma prosesidir. Bu teknik protein ve diğer biyomoleküllerin bağlanması durumunda biyokonjugasyon olarak adlandırılır. Çapraz bağlayıcı reaktifler spesifik fonksiyonel gruplara (primer aminler, sülfidriller gibi) kimyasal olarak bağlanabilen ve iki ya da daha fazla reaktif uç içeren moleküllerdir (Hermanson, 2013).

Çapraz bağlayıcılar kimyasal reaktiflikleri ve farklı uygulamalardaki davranışlarını etkileyen diğer kimyasal özellikleri baz alınarak seçilmektedir (Hermanson, 2013). Buna göre;

- Kimyasal spesifiklik (genel yaklaşım reaktifin iki uçta aynı ya da farklı gruplara sahip olup olmadığıdır)

- Arabulucu kolunun uzunluğu

- Suda çözünürlük ve hücre membran geçirgenliği

- Kendiliğinden reaktif veya fotoreaktif grupların olması

Tüm bu özellikler kullanılacak çapraz bağlayıcının belirlenmesinde çok çok önemlidir.

Çapraz bağlanma reaktifleri kullanılarak kovalent bağlanma ile elde edilen konjugatlar her iki molekülün biyolojik aktivitesini birlikte taşımaktadır (Acar, 2006).

1.4.1 Direkt (Zero-Length) Çapraz Bağlayıcılar

Çapraz bağlayıcıların çalışmamız kapsamında kullanılan bir grubu zero-length olarak da bilinen direkt çapraz bağlama reaktifleridir. Bu alt gruptaki bağlayıcılar iki molekülü arada herhangi bir grup ya da atom olmaksızın birbirine bağlamaktadır. Yani ilk moleküldeki bir atom diğer moleküle kovalent olarak bağlanırken arada hiçbir arabulucu ya da bağlayıcı bulunmamaktadır.

Lipopolisakkarit-polimer konjugatları, taşıyıcı polimere bağlanmış olan lipopolisakkarite karşı immun cevabın arttırılması amacı ile sentezlenmiştir. Bazı durumlarda oluşturulan antikorların bir kısmı, konjugasyon reaksiyonunda kullanılan çapraz bağlayıcı ajanlara spesifiktir. Direkt çapraz bağlama reaktifleri iki molekülü birbirlerine arada bir arabulucu ya da bağlayıcı bulunmadan direkt bağladığı için bu tür istenmeyen antikor oluşumlarını engellemektedirler (Acar, 2006; Mansuroğlu, 2007; Hermanson, 2013).

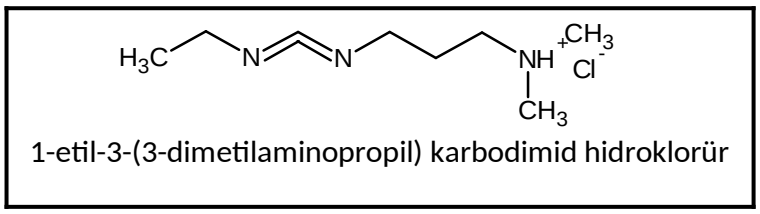
1.4.1.1 Karbodiimidler

Karbodiimidler kullanılan direkt çapraz bağlama reaktifleri arasında en çok tercih edilenidir. Karbodiimidlerin suda çözünebilir ve çözünemeyen formları bulunmaktadır. Karboksilat ve primer aminlerin amid bağı ile, fosfat ve amino gruplarının ise fosfoamid bağı ile bağlanmasına arabuluculuk etmektedirler. Biyokimyasal konjugasyonlarda daha çok suda çözünebilir özellikteki karbodiimidler tercih edilmektedir. Bunun sebebi biyolojik kökenli birçok makromolekülün sulu tampon çözeltilerde çözünmesidir. Yalnızca karbodiimidler değil, ona ek olarak yan ürünler olan üre türevleri de suda çözünebilmektedir. Bu durum konjugatın saflaştırılmasında oldukça kolaylık sağlamaktadır. Suda çözünemeyen özellikteki karbodiimidler ise moleküllerin sadece organik çözücülerde çözünmesi gereken biyokonjugasyon reaksiyonlarında tercih edilmektedir. Bu reaksiyonlarda meydana gelen ürünler ve yan ürünler de yalnızca organik çözücülerde çözünebilmekte, suda çözünememektedir (Acar, 2006; Mansuroğlu, 2007; Karahan vd., 2012; Hermanson, 2013).

EDC

EDC ya da EDAC adı ile bilinen 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorid primer amin ve karboksil grupları ihtiva eden birçok molekülün konjugasyonu için en çok tercih edilen karbodiimidtir ve EDC suda çözünebilir özelliktedir. Bu özelliği çapraz bağlayıcıyı reaksiyon ortamına daha önce bir organik çözücüde çözme zorunluluğu olmadan direkt olarak ekleme imkanı sunmaktadır. Karbodiimidin fazlası ve çapraz bağlama reaksiyonunun yan ürünü olan üre türevleri de suda çözünebilir özellikte olduklarından jel filtrasyon ya da

diyaliz yöntemleri kulanılarak ortamdan kolayca uzaklaştırılabilir ve oluşturulan konjugatlar saflaştırılabilmektedir (Acar, 2006; Mansuroğlu, 2007; Hermanson, 2013).

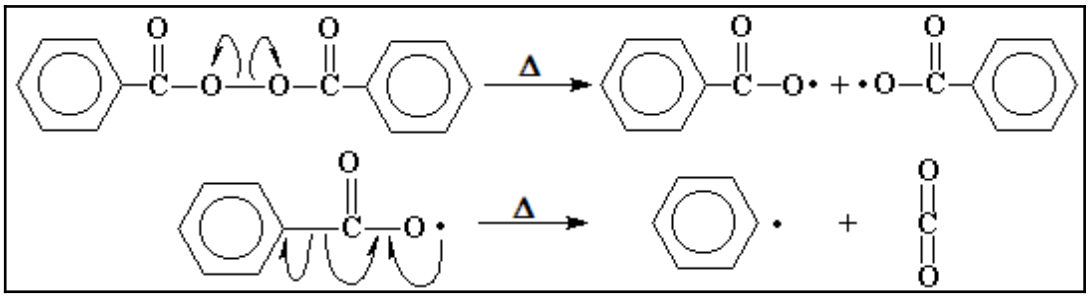


Şekil 2. 3. EDC Molekülü (Hermanson, 2013)

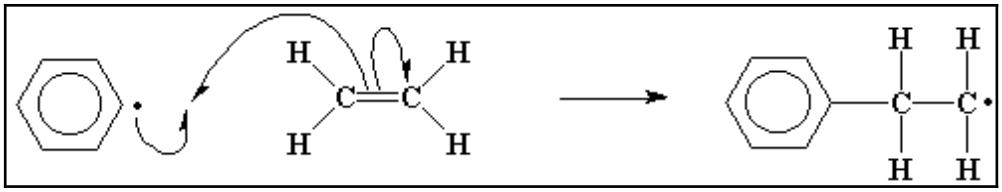
1.5 Radikal Zincir Polimerizasyonu

Radikalik katılma polimerizasyonu en ince detayına kadar incelenen, özellikleri çok iyi bilinen bir polimerizasyon yöntemidir. Polimerizasyon radikaller üzerinden başlamaktadır ve zincir büyümesi yine radikaller üzerinden devam etmektedir. Katılma polimerizasyonuna yönelik ilk bilgiler 1920'lerde Staudinger tarafından ifade edilmiştir, 1937'de Flory radikalik polimerizasyonun küçük moleküllü maddelerin verdiği zincir tepkimelerine benzer bir şekilde; başlama, büyüme ve sonlanma adımları üzerinden ilerlediğini göstermiştir (Özbay, 2010; Kızılbey, 2012).

Başlama Basamağı; çeşitli etkenlerle meydana gelen serbest radikallerin ilk monomer molekülleri ile etkileştiği adımdır. Başlama basamağında monomer molekülleri ısı, ışık, yüksek enerjili ışınlar gibi fiziksel etkenlerle ya da çeşitli başlatıcı molekülleri kullanılarak kimyasal yolla radikal haline dönüştürülebilir (Kurşun, 2008). Şekil 2.4'de örnek olarak benzoilperoksitin parçalanması ve Şekil 2.5'de monomere bağlanması reaksiyonları verilmiştir (Kızılbey, 2012).

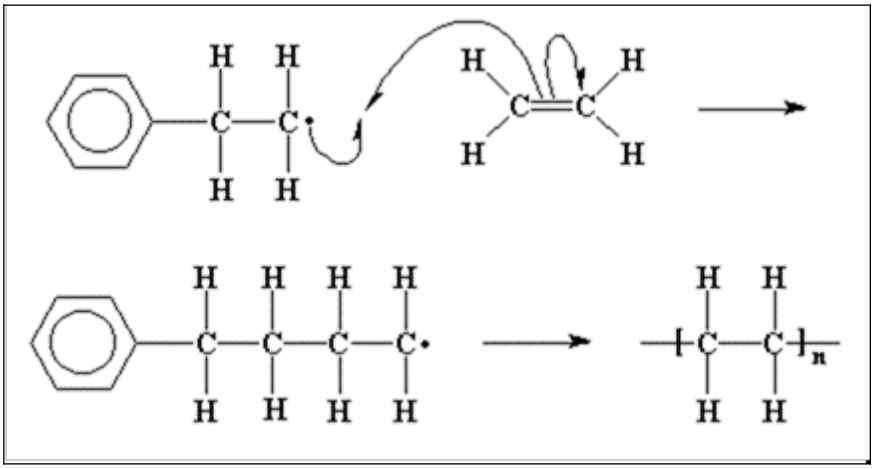


Şekil 2. 4. Benzoil peroksit başlatıcısının radikal halini alması (Kızılbey, 2012)



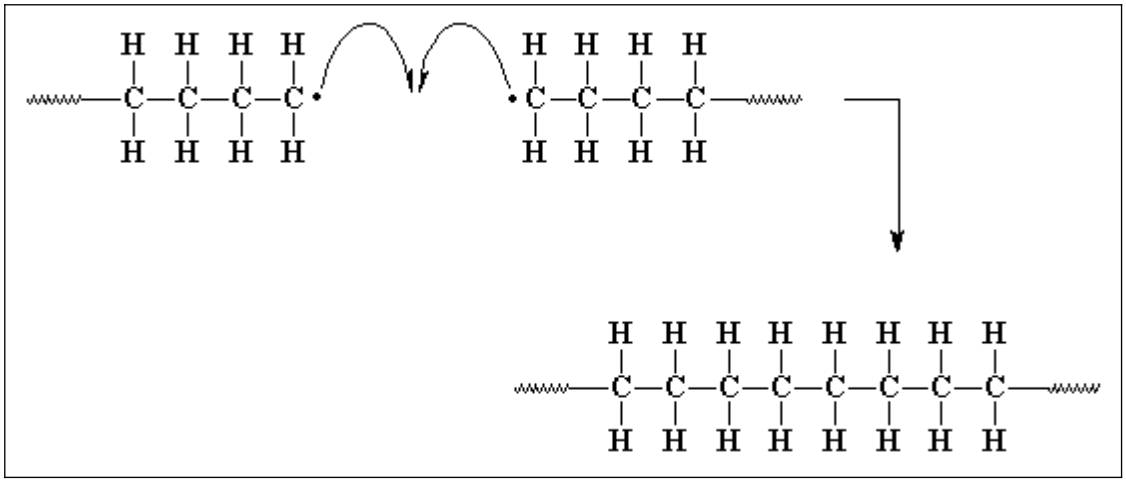
Şekil 2. 5. İlk monomerin radikale katılımı (Kızılbey, 2012)

Büyüme Basamağı; monomer moleküllerinin başlama basamağında meydana gelen monomer radikallerine arka arkaya katılması ile polimer zincirinin büyüdüğü basamaktır (Kurşun, 2008).



Şekil 2. 6. Reaksiyonun ilerlemesi; monomerin zincirle birleşmesi (Kızılbey, 2010)

Sonlanma Basamağı; Büyüyen aktif polimer zincirlerinin ortamdaki herhangi bir molekülle etkileşmesi sonucunda aktifliklerini kaybedip, ölü polimer zincirlerini meydana getirdiği basamaktır (Kurşun, 2008).



Şekil 2. 7. Reaksiyonun sonlanma basamağı (Kızılbey, 2012)

1.6 Temel İmmunoloji

Bağışıklık sistemi (immün sistem) vücuda zararlı olarak tanımlanan tüm antijenlere karşı savunma sağlayan hücre, doku ve moleküllerin toplamının oluşturduğu sisteme verilen isimdir. Her ne kadar özgüllük derecesine ve enfeksiyonlara karşı savunmadaki önceliklerine göre Doğal (Innate) ve Adaptif (Acquired) olarak ikiye ayrılsa da bu sistemlerin etkileşim ve ortak bir çalışma halinde olması o organizmanın normal yaşamını sürdürmesi için hayati önem taşımaktadır. Mesela doğal bağışıklık sadece erken savunma sistemi oluşturup birçok enfeksiyonu kontrol altına alma özelliğine sahip değildir Aynı zamanda adaptif bağışıklığın en etkili biçimde gelişmesini sağlayacak şekilde aktivasyonunda ve farklılaşmasında rol oynar. Öte yandan adaptif bağışıklık enfeksiyonlarla mücadelede çoğu kez doğal bağışıklıkta rol oynayan hücreleri ve plazma proteinlerini kısmen de olsa kullanarak etkili yanıt verebilir. Kısaca doğal ve adaptif bağışıklık arasında çift taraflı bir etkileşim söz konusudur.

Doğal bağışıklıkta rol alan dokular (epitel vb.), hücreler (makrofajlar, NK hücreleri, nötrofil vb.) bunların ürettiği moleküller (sitokinler, antibiyotikler vb.), plazmada bulunan bazı proteinler (kompleman sisteminin proteinleri gibi), mikroplar vücuda zararlı görünen molekülleri özgür olarak tanıyıp onlara karşı hızlı ve erken yanıt geliştirme mekanizmalarına sahiptirler. Adaptif bağışıklık sistemi temel olarak lenfositlerden (T ve B hücreleri) ve onların efektör fonksiyonlarından sorumlu ürünlerinden (antikor, sitokinler, enzimler vb) oluşur. Doğal bağışıklık "yabancı" olarak tanımlanabilecek ajanları (mikroplar vb.) ayırt edecek genel reseptörlere sahipken, adaptif yanıt doğal yanıt tarafından elimine edilememiş ajanların her birine özgü reseptöre (bir ajanda birden fazla reseptöre özgül epitop olabilir) sahip olup hücresel (hücre içinde saklanmış mikroplara karşı) ve hümoral (hücre dışı plazma ve dokularda bulunan ajanlara karşı) yanıt olarak ikiye ayrılır. T (hücresel) ve B (hümoral) hücreleri aktif hale gelerek çoğalıp farklılaşmak ve yüksek kalite ve miktarda efektör fonksiyonu gösterebilmek için, birbirlerine ve doğal immünitenin bir parçası olan antijen sunan hücrelere (makrofaj, dendritik hücreler vb) ihtiyaçları vardır.

T ve B hücreleri timus ve kemik iliğinde ortak hematopoietic kök hücrelerinden oluşurlar. Olgun hale gelen T ve B lenfositler, bu organları terk ederek dolaşım ve lenf sisteminde yabancı antijenleri tanıyıp aktif hale gelene kadar dolanırlar. Antijenler lenfositlerin yüzeyindeki reseptörler tarafından tanındıktan sonra T ve B hücreleri aktive olabilirler. Bu aktivasyon antijen sunan hücrelerin (ASH) yüzeyinde bulunan veya bu hücreler tarafından salgılanan proteinler aracılığıyla ikinci uyarıların (second signal) sağlanmasına bağlıdır. B ve T hücrelerinin aktive olması için gereken antijen sunuşu farklıdır. B hücreleri antijenleri bütün olarak çözünür halde veya mikrop ve ASH yüzeyindeki reseptörlerle (BHR- antikorun hücre

membranına bağlı hali) tanıyarak aktif hale gelirken, T hücreleri ASH tarafından işlenmiş antijenleri (protein kökenli) ancak MHC (majör histokompatibilite antijenleri) adı verilen antijene özgül peptidleri sunan moleküllere bağlı halde Özellikle bazı patojenlere karşı kuvvetli bir yanıtın gelişebilmesi ancak aktive olmuş B ve CD4 T hücrelerin (yardımcı T hücreleri) etkileşimine bağlıdır. Bu yolla daha fazla farklılaşmış lenfositlerin bir kısmı efektör hücre haline gelir ve lenf düğümlerini ve dalağı terk ederek patojenlerin yoğunlaştığı dokulara gider ve patojenleri elimine ederler. B hücrelerinin efektör olarak ana rolü plazma hücrelerine dönüşüp antikor (immünoglobülin) salgılamaktır. Salgılanan antikorlar kanda, dokularda ve mukozal salgılarda mikroplara ve toksinlere bağlanarak immün kompleksler oluşturur. Bu yolla "yabancı" antijenler nötralize ve yok edilirler. Antikorların bu fonksiyonlarını işleve geçirebilmesi doğal bağışıklığın değişik elemanlarının yardımı ile olur. Mikropların opsonizasyonu ve fagositozu, NK hücreleri tarafından antikora bağlı hücresel sitotoksisite, kompleman sistemin aktivasyonu ile mikropların direk ya da fagositoz ve enflamasyon ile yok edilmesi buna en iyi bilinen örneklerdir.

Plazma hücreleri B hücreleri için en son farklılaşma noktasıdır, sadece antikor salgılanmasından sorumludurlar ve bu hücrelerde antikorun membran formu çok düşük seviyede bulunur. Plazma hücrelerinin ve aktive olmuş B hücrelerinin çoğu antijenin elimine edilmesiyle eş zamanlarda ölürler. Geriye sadece uzun ömürlü plazma hücreleri ve zamanla "bellek" hücrelerine dönüşen B hücreleri kalır (aktif T lenfositlerinın bir kısmı da bellek hücresi olarak farklılaşır). Doğal bağışıklık aynı ajanla her karşılaşmasında benzer yanıt oluştururken, adaptif immün sistem daha önce tanıdığı ajanlar ile sonraki karşılaşmalarında çok daha farklı bir yanıt oluşturur. Bellek hücreleri antijeni ikinci kez gördüğünde hem çok daha hızlı ve kuvvetli hem de yüksek kalitede (affinitesi yüksek antikor ve T hücresi reseptörü) immün yanıt verirler.

Dalakta ve lenf düğümlerinde bulunan B hücrelerinin yüksek afiniteli antikor üreten plazma hücrelerine dönüşmesi CD4 yardımcı T hücreleri tarafından uyarılmasına bağlıdır (ikincil uyarı). Bu üretilen antikorlar genellikle protein yapılı antijenlere karşı geliştirilmiş bir cevaptır. Fakat dalakta bulunan B hücrelerinden (B2) bulundukları doku (periton boşluğu), aktivasyon için CD4 T hücre bağımlılığı (T-cell independent), oluşan immoglobulin sınıfı (IgM), antijen türü (polisakkaritler, lipidler, nükleik asit vb) ve afinitesi itibariyle farklılık gösteren B (B1) hücreleri de mevcuttur. Bu yolla vücutta bulunabilecek her türlü yabancı maddeye karşı geliştirilmiş bir bağışıklık sağlanır (Güloğlu, 2016).

1.6.1 Hibridoma Teknolojisi ve Uygulama Alanları

Antikorlar, bağışıklık sisteminde enfektif ajan dediğimiz antijenleri bularak yok edilmesini sağlayan bir glikoproteindir. Bu moleküllerin üstünlüğü, üç boyutlu bir yapıda tıpkı anahtar-kilit arasındaki uyum gibi antijene özgün olarak bağlanmasıdır. Böylece antikorlar, organizmaya giren antijenlere bağlanarak onları etkisiz hale getirirler veya kompleman enzimleri ve diğer savunma hücrelerini harekete geçirerek antijenleri yok ederler. Sonuçta antikorlar basit bir ifade ile vücudumuzun bekçisidir ve yabancıyı tanıyarak onu kuşatır ve etkisiz hale getirirler.

Her antijenin farklı bir antikoru vardır, vücutta her bir antijenik yapıyı spesifik olarak tanıyan ve ona anahtar-kilit gibi uyumlu biçimde bağlanabilen antikorlar immün sistem hücrelerince (B hücreleri) geliştirilir.

Antikorlar vücudumuza giren zararlı maddeleri yakaladığı için bilim adamları tarafından teşhis amaçlı kullanılırlar. Bu yapılar vücudumuza giren yabancı moleküllerin yerini ve türünü de belirleyebildiklerine göre bünyelerine bağlanmış olan işaretli bir ajan yardımı ile (radyoaktivite, toksin vb) vücudun derinliklerindeki patojenin veya kanser metastazının tedavisinde de öncü rol alabilirler.

Antikorların canlıda en kolay elde edildiği yer kandır. Ancak kanda yer alan antikorlar çeşitli tipte antikorların yer aldığı poliklonal özellikte ve devamlılık arz etmemektedir. Bu nedenle devamlılık özelliği kazandırılmış, aynı ana hücreden bölünerek çoğalmış hücrelerin sentezlediği monoklonal antikorların üretildiği hibridoma teknolojisi geliştirilmiştir.

İki somatik hücrenin sitoplazma ve çekirdeklerinin tamamen birbirine kaynaşması anlamında olan bu yöntem, 1975'de Georges Köhler ve Cesar Milstein adlı araştırıcıların koyun alyuvarları ile immünize ettikleri farelerin, dalak hücreleri (blastositler) ile antikor sentezlemeyen fare myeloma hücrelerini sendai virus aracılığıyla birleştirmeleri sonucunda oluşan hibrit hücrelerin sadece alyuvarlara karşı antikor sentezlediklerini belirtmeleri ile bilimde bir devrim oluşturmuşlardır.

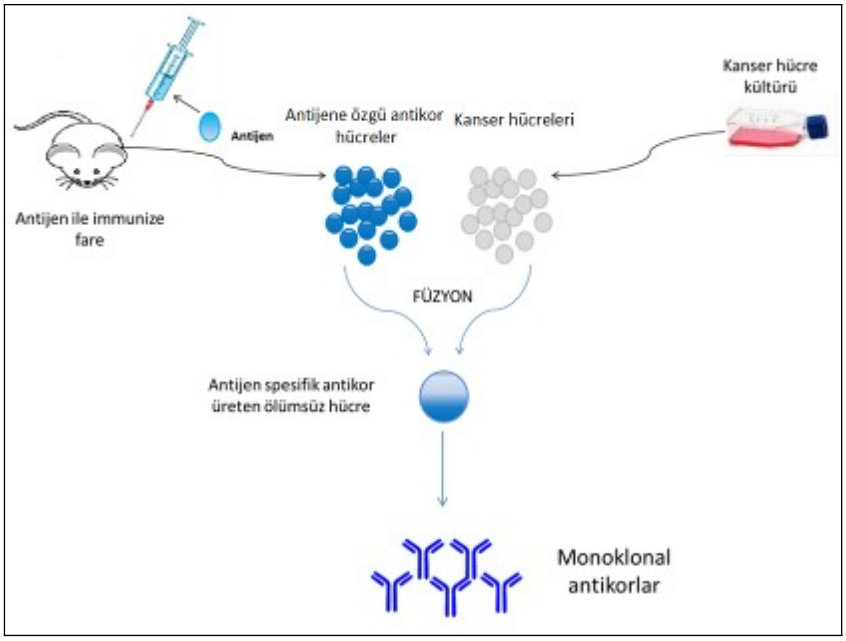
Çalışmaların sonucunda oldukça spesifik ve tek bir B hücre klonundan sentezlenen antikorlar elde edilmiş in-vitro ve in-vivo ortamda devamlı üreyebilen hücreler (hibridomalar) meydana getirilmiştir. Bu çalışmalar 1984 yılında Köhler ve Milstein'e Nobel Tıp Ödülü'nü kazandırmıştır.

Monoklonalik kavramının tarihçesini incelediğimizde ilk kez 1950 yıllarında Bumet ve arkadaşları tarafından ortaya atılan "klonal seçim hipotezi" görülmektedir. Bu hipoteze göre her bir B hücresi farklı bir epitopa (6- 10 aminoasitlik antijenik yapı) özgü bir antikor molekülü

sentezlemek üzere programlanmıştır. Antijenik uyarı üzerine özgün lenfosit çoğalarak aynı özellikleri taşıyan hücrelerden oluşanları klon oluşturur. Farklı plazma hücrelerinin ürettiği antikorlar poliklonal, tek bir plazma hücresinin ürettiği antikorlar monoklonaldirler. Organizmanın aynı anda birçok farklı antijene karşı antikor ürettirmesi nedeni ile vücut sıvıları ve serumda poliklonal antikorlar oluşur. Monoklonal antikorların ise bir canlıdan eldesi mümkün değildir. Monoklonal antikorlar, antijenin belirli bir bölgesine spesifik olarak bağlanabilen ve tek bir B hücre klonundan sentezlendikleri için, tek tip immünglobulin yapısı gösteren moleküllerdir.

İstenilen özelliklere sahip bir antikorun laboratuar koşullarında istendiği miktarda elde edilebilmesi için, ilgili antikoru sentezleyen B hücresinin ölümsüzleştirilmesi gerekmektedir. B lenfositleri in-vitro koşullarda 4-5 günden uzun süre yaşatılamazlar. Bu nedenle monoklonal antikor eldesi çalışmalarında başlangıçta B lenfositleri Epstein Barr Virüsü (EBV) gibi onkojenik virüslerle transforme edilerek ölümsüzleştirilmişlerdir. Bu yolla elde edilen antikor miktarının az olması ve kullanılacak antijen miktarının kısıtlı olması nedeniyle yaygın olarak kullanılamamıştır.

1973 yılında Cesar Milstein, Cotton ve Secher adlı araştırmacılar ile çalışırken in vitro şartlarda fare myeloma hücre kültüründen spontan mutasyon yapmayı başarmışlardır. Daha sonra Milstein ve Köhler, ilk kez mutant fare myeloma hücresini bir antijen ile immünize edilmiş dalak hücresiyle birleştirerek monoklonal antikor sentezleyen "Hibridoma" tekniğini tanımlamışlardır. Böylece B lenfositlerinin özgül antikor yapıcı özelliklerini myeloma hücrelerinin ise ölümsüz olma özelliğini kazanan hibrit hücreler özel şartlarda üretildikleri zaman tek bir antijenik determinanta karşı çok yüksek özgüllükte ve sonsuz miktarda monoklonal tipte antikor sentezleyebileceklerini göstermişlerdir. Hibridoma teknolojisinin ortaya çıkması ile poliklonal antikorların yarattığı problemler azaldığı gibi miktar ve duyarlılık yönünden daha verimli olan bu teknoloji immünoloji, biyoloji, tip, veterinerlik sahalarındaki araştırmalara yeni bir boyut kazandırmaktadır. Monoklonal antikor elde etmek için kullanılan melezleme tekniği, yararlı özelliklere sahip iki hücrenin birleştirilmesi ile gerçekleşir. Hücre kültüründe hızla çoğalabilen, ölümsüzlük özelliği kazanmış myeloma (kanser) hücreleri ile aktif olarak istediğimiz antikoru üreten bağışık bir hayvanın dalak lenfositleri birleştirilir. Sonuçta, kompleks bir antijenin tek bir belirleyici grubuna (epitop) karşı monoklonal antikor üreten ölümsüz hibrit hücreler elde edilir. Monoklonal antikorların eldesini şu sekilde şemaitk olarak Şekil 2.8’de özetleyebiliriz.



Şekil 2. 8. Monoklonal antikorların eldesi

Monoklonal antikorların hibridoma teknolojisi ile üretilmesi son derece titiz çalışma, dikkat, sabır, iyi gelişmiş laboratuvar koşulları gerektirmektedir ve yaklaşık 3-4 ay kadar zaman alan bir yöntemdir. İlk olarak deney hayvanı antikoru üretilecek antijen ile enjeksiyon yoluyla immünize edilir. Antijen protein yapıda olduğunda doğrudan adjuvan ile karıştırılarak hayvana enjekte edilir. Fakat söz konusu antijen bir hapten olduğunda küçük molekül ağırlıkları nedeniyle farelere doğrudan enjekte edildiklerinde antikor yanıtı oluşturamazlar. Haptenlere spesifik antikor yanıtı oluşturulabilmesi için, kendilerinden daha büyük ve antikor yanıtı oluşturma yeteneği olan (immunojenik) bir moleküle kovalent olarak bağlanmaları gerekir. Bu işleme konjugasyon adı verilir. Konjugasyon reaksiyonlarında mikotoksinlerde bulunan reaktif bir grup, proteinlerde bulunan başka bir grup ile reaksiyona sokulur ve iki molekül birbirine kovalent olarak bağlanır. Genellikle protein veya hapten üzerindeki reaktif grupların zenginleştirilmesi ve reaksiyon veriminin artırılması için köprü moleküller kullanılmaktadır.

Monoklonal antikor üretim çalışmalarında özellikle farelerden yararlanılmaktadır. Bu hayvanların küçük ve kolay temin edilebilmeleri üretimlerinin bakım ve beslenmelerinin kolay ve ucuz olmaları, immünizasyonlara iyi cevap vermeleri tercih sebeplerindendir. Antijenik uyarımlara iyi yanıt vermelerinden ve myeloma hücrelerinin de fare orijinli olmaları gibi nedenlerle Balb/c genetik soyuna ait fareler kullanılmaktadır. İmmünizasyon hayvanının genç seçilmesi (6-8 haftalık) antijene karşı yanıtın etkinliği üzerine olumlu katkıda bulunur. İmmünizasyon için genellikle 5-10 arası fareler kullanılmaktadır. Çünkü immünizasyon süresi içinde şok veya çeşitli nedenlerle hayvanlar olabilirler veya her fareden istenilen düzeyde

immünolojik yanıt alınamamaktadır. İmmünizasyon yöntemleri kullanılan antijenin yapısına, molekül ağırlığına bağlı olarak farklılıklar göstermektedir.

Genellikle son enjeksiyondan 2-4 gün sonra füzyon yapılır. Hibridoma yönteminde, bir kemik iliği kanser hücresi olan BALB/c kökenli uygun myeloma hücrelerinin seçimi çalışmanın verimi açısından çok önemlidir. Çünkü iki farklı türe ait hücrelerden oluşturulan hibritlerin sürekli karakter değiştirdiği, kromozom kaybı ve antikor sentezleme sürelerinin azalması gibi sorunlar söz konusudur. İki hücrenin de antikor üretmesi hibridomanın tek tip antikor yapımına uygun değildir. Bu nedenle seçilmiş olan myeloma hücre hattının antikor üretmiyor olması tercih edilir. İmmünglobulin üretmeyen ilk fare myeloma hücre line'i 1978'de Schulman ve arkadaşlarınca izole edilmiştir ve monoklonal antikor yapan hibridoma oluşturmak için yararlı bir partner olmuştur (SP2-O-Ag14). Kearney ve arkadaşları 1979 yılında (P3x63-Ag8-653) immünglobilin ekspresyon kapasitesini kaybetmiş yeni bir myeloma hattı geliştirmişlerdir.

Hibridoma çalışmalarında seçilen myeloma hücresinde aranan diğer bir önemli özellik de myelomaları, hibridoma hücrelerinden ayırt eden bir mutasyonun var olmasıdır. En yaygın kullanılan mutasyon purin biyosentezinde görevli bir enzim olan hipoksantin fosforiboziltransferaz (HGPRT) mutasyonudur. Fare myelom hatlarında 8-Azaguanin veya 6-tioguanin ile seleksiyon yapılmaktadır. Hücreler genellikle pürin ve pirimidin sentezleri aracılığı ile DNA yaparlar. Bu iki maddeden birinin olmaması DNA sentezinin bloke edilmesine dolayısıyla hücrelerin ölümüne neden olur. Füzyonda "hypoxanthine, aminopterin ve thymidine (HAT) içeren seçici kültür ortamı kullanılır. Bu ortamda bulunan, aminopterin pürin ve pirimidin "denovo" (temel sentetik yol) sentez yolu inhibitörüdür. Seçici medyumda, HGPRT enzimi yönünden mutant olan myeloma hücrelerinin üremesi engellenmektedir. Pirimidin sentezi için timidin kinase (TK), pürin sentezi için de HGPRT pozitif olan dalak B lenfositleri ve füzyon sonucu hibritleşmiş hücreler, ortamdaki hypoxanthine ve thymidini kullanarak yan yol denilen "salvage" sentez yolundan yararlanarak pürin ve pirimidin sentezini tamamlarlar. Füzyona girmemiş normal HGPRT pozitif B lenfositleri kültür şartlarında 4-5 gün içerisinde ölürler. Böylece hibridoma hücreleri myelom hücrelerin sonsuz üreme özelliğini ve B hücrelerinin HGPRT enzim sağlam genini almış olduğundan HAT ortamında üremesini devam ettirebilmektedir. Füzyona giren hücrelerin, füzyondaki seçicilik özellikleri Tablo 2. 1. de gösterilmektedir.

Tablo 2. 1. Seçici ortamın füzyondaki hücrelere etkisi

Hücre tipi	DNA Sentezi		HAT medyumundaki yaşam
	Salvage Sentez yolu	De novo Sentez yolu	
Myeloma	HGPRT[1]	Aminopterine duyarlı	Ölür[1]
Dalak	HGPRT[1]	Aminopterine duyarlı	Ölür[2]
Myeloma-Dalak Hibrit	HGPRT[1]	Aminopterine duyarlı	YAŞAR
Myeloma-Myeloma Hibrit	HGPRT[1]	Aminopterine duyarlı	Ölür[1]
Dalak-Dalak Hibrit	HGPRT[1]	Aminopterine duyarlı	Ölür[2]

[1]DNA sentezi yok [2] *in vivo* ortamdaki yaşamı sınırlı

Hibridoma yöntemi ile yüksek oranda monoklonal antikor üreten hibridomalar elde etmek için farenin immünizasyon işleminin en uygun bir biçimde düzenlenmesi ve her antijenin immünizasyonunun en iyi sonucu alınacak bir protokolle uygulanması gerekmektedir. Myeloma hücre kültürlerinin istenilen özelliklere yani mutasyonuna, immünglobulin üretip üretmediğine, in vitro olarak sonsuz üreme yeteneğine, yüksek oranda birleşme özelliğine uyum derecesi çok önemlidir. Farklı polietilen glikol tiplerinden en uygun olanının seçilmesi de aynı derecede önemlidir (Yücel, 2016).

1.6.2 Monoklonal Antikorların Kullanım Alanları

Hastalıkların teşhisinde;

Enfeksiyonların ve bunlara bağlı olarak meydana gelen hastalıklarda etkenin (bakteri, virüs, parazit vb.) veya antikorların saptanmasında monoklonal antikor (Mab) büyük yararlar sağlamaktadır. Hastalık teşhisinin çok çabuk ve güvenilir biçimde yapılması ile hastalığın etrafa yayılmadan tedavisi mümkün olmaktadır.

Mab'ler aynı zamanda hastalık odaklarının, kanser hücrelerinin, tümör ve markırlarının ve metastazlarının teşhisinde, ayrıca süt, idrar, doku sıvıları vb. sıvılardaki hormon, enzim, ilaç, eriyebilir protein, metabolit gibi bazı kimyasal maddelerin tespitinde de kullanılmaktadır.

Tümör antijenlerine karşı geliştirilen monoklonal antikorlar ile tümör dokusunun yerinin saptanması ve bu antikorlara radyoaktif madde veya toksin bağlanarak tümör hücrelerinin özgül olarak yok edilmesi yönünde çalışmalar yapılmıştır. Kanserli hastaların kendi tümör antijenlerine karşı hazırlanmış Mab ile immünsintigrafik tarama yapılabilmektedir. Tümör hücresi üzerine sitotoksik etki ile tümör dokusunun yok edilmesi konusunda da aminoterapin, difteri toksini ve risin gibi sitotoksik moleküllerle yapılan çalışmalar olumlu sonuç vermektedir. Monoklonal antikorların bir toksine bağlanmadan da tümöre karşı etki gösterdiği belirlenmiştir. Yine malign myeloma hücre yüzeylerinde bulunan yüksek molekül ağırlıklı glikoproteinlere karşı geliştirilen antikorlar ile hedef antijenlere yönelik tedaviler uygulamak mümkündür.

Not: *Projemiz kapsamında oluşturduğumuz ve gelecekte ticarileştirmek istediğimiz tanı kiti prototipi hastalıkların teşhisinde önemli yer tutmaktadır.*

Hastalıkların tedavisinde;

Özellikle kanserin tedavisinde, kanserli hücrelerin yüzey antijenlerine karşı geliştirilen monoklonal antikorlarla gerek direkt olarak gerekse antikorlara çeşitli toksinler veya kemoterapotik ajanlar konjuge edilerek tedavi çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla yarı ömürleri kısa olan iyodin ^{131} (Yarı ömrü 8 gün), Astadin ^{211} (yarı ömrü 7,2 saat) gibi radyo-isotoplar kullanılmıştır.

Hastalıklardan korunmada;

Koruyucu amaçla, çeşitli infeksiyonlara karşı geliştirilmiş Mab'ler pasif bağışıklık sağlamak amacı ile kullanılmıştır.

Aşıların Hazırlanmasında;

Antikorlar, antijenik epitoplara karşı gelişmektedir. Dolayısı ile antijene spesifik bölgeler olan idiotipik(antikor) lara karşı tekrar antikor geliştirildiğinde yani anti-idiotipik antikor geliştirildiğinde, bu yapılar antijenle aynı internal imaja sahip olmaları nedeni ile aşı olarak kullanılabilirler.

Monoklonal Antikorların Diğer Kullanım Alanları;

Birçok temel bilimsel çalışmalarda ve araştırmalarda monoklonal antikorlardan yararlanılmaktadır. Yeni bir bakteri veya virüsün antijenik yapısını belirleme çalışmasında,

antijenlerin saflaştırılmasında, tanı kitlerinin hazırlanmasında monoklonal antikorlardan yararlanılır (Yücel, 2010; Yücel, 2016).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Kullanılan malzemelerin ve cihazların listesi

Tablo 3. 1. Kullanılan malzeme ve cihazların listesi

1-Vinil-2-pirolidon	Fluka	95060
Benzoil peroxide	Fluka	33581
Akrilik asit anhydrous	Fluka	01730
Kobalt naftanat	Fluka	60830
Tetrahidrofuran (THF)	J.T. Baker	9441
Etil asetat	Riedel-de Häen	27227
Sodyum dihidrojen fosfat, (NaH2PO4)	Riedel-de Haën	04361
Sodyum hidrojen fosfat, ($Na_2HPO_4.7H_2O$)	Fluka	71647
Sodyum klorür, (NaCl)	Fluka	71376
Sodyum hidroksit, (NaOH)	Fluka	06203
Hidroklorik asit, (HCl)	Riedel-de Haën	07102
Sodyum azid, (NaN3)	Applichem	A1430
Trietilendiamin (DABCO)	Aldrich	290734
Hidrojen peroksit	Sigma	H1009

Bromoasetik asit	Fluka	17000
Bakır(II) sülfat pentahidrat $CuSO_4.5H_2O$	Sigma-Aldrich	209198
1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC)	Sigma	E-7750
Sodyum dihidrojen fosfat, (NaH2PO4)	Riedel-de Haën	04361
Sodyum hidrojen fosfat, ($Na_2HPO_4.7H_2O$)	Fluka	71647
Sodyum klorür, (NaCl)	Fluka	71376
Sodyum hidroksit, (NaOH)	Fluka	06203
Hidroklorik asit, (HCl)	Riedel-de Haën	07102
Sodyum azid, (NaN_3)	Applichem	A1430
Dietileter	Riedel-de Haen	24005
Tiyonil Klorür	Fluka	88952
Etilendiamin	Aldrich	240729-79-21
Sodyum borohidrid	Aldrich	452874
Sodyum periyodat	Fluka	71862
Gliserol	Sigma	G5516
Ultra-pure water	Millipore MilliQ system	

Dekstran	Sigma	D-5251
Bovine serum albumin	Sigma	A-4503
Freund's Adjuvant	Sigma	F-5506
Antimouse Polyvalent Immunoglobulins (G, A, M)-Alkaline Phosphatase antibody produced in goat	Sigma	A0162
Skim Milk Powder	Fluka	70166
4-Nitrophenyl phosphate di(tris) salt	Sigma	N-3254
Amboceptor	Siemens	ORLC25
Guinea Pig Complement	Siemens	ORAY15

2.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

- Sartorius CP 225D Hassas Terazi
- Precisa XB 220A Terazi
- Finnpipette Micropipet (1-10 mL, 100-1000μL, 5-50 μL)
- Eppendorf Pipet (0,5-10μL, 20-200μL, 100-1000μL)
- IKAMAG Çoklu Karıştırıcı
- WTW pH level 1 pH metre
- Telstar Liyofilizatör CRY 000S-80
- Heildolph MR 3000 Manyetik Karıştırıcı
- Heildolph MR 3001 Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı
- Milipore-Q Gradient Ultra Saf Su Cihazı
- Hettich Eba20 Santrifüj Cihazı
- Eppendorf GL010 Santrifüj Cihazı

- Heraeus Biofuge Stratos Santrifüj Cİhazı
- Viscotek 4 Detektörlü GPC (SEC) Sistemi (Viscotek TDA 302 üçlü detektör dizisi, Viscotek Model 2501 UV detektörü, Viscotek GPCmax VE2001 örnek modülü kısımlarından oluşur)
- Malvern ZEN 3600 Zetasizer Nano ZS Zetapotansiyel ve Parçacık boyut ölçüm cihazı
- Shimadzu HPLC Sistemi (UV Detektörlü)
- BioTek Synergy HT ELİSA reader
- BioTek ELx50 ELİSA yıkayıcı
- Benmari (sıcak su banyosu)

2.3 Deneylerde Kullanılan Çözeltiler

2.3.1 0,01 M 'lik PBS Tamponu (pH=7)

2,68 g $Na_2HPO_4.7H_2O$ (Mw=268,07 g/mol) tartılarak 1 L'lik balon joje içerisindeki 450 ml ultra saf suda çözünür. Aynı zamanda 1,56 g $NaH_2PO_4.2H_2O$ (Mw=156,01 g/mol) tartılarak 450 ml ultra saf suda çözünür. Hazırlanan NaH_2PO_4 çözeltisi balon jojedeki Na_2HPO_4 çözeltisinin üzerine eklenir ve tekrar karıştırılır. Bu karışıma son olarak 8,77 g NaCl eklenir ve tekrar karıştırılır. Karışımın pH'ı ölçülür ve 1 M NaOH veya 1 M HCl ile pH 7'ye ayarlanır. Ultra saf su ile çözeltinin hacmi 1 L olacak şekilde hacim tamamlanır.

2.3.2 100 mM'lık $NaHCO_3$ Tamponunun Hazırlanması

1,68 g $NaHCO_3$ tartılıp, 200 ml distile H_2O'da çözülür. pH'ı 8 olacak şekilde pH ayarlaması yapılır.

2.3.3 Sodyum Sitrat Çözeltisi

0,22 g D-(+) Glukoz ($C_6H_{12}O_6$; Mw=180,16 g/mol) tartılarak 3 ml ultra saf suda çözünür. Daha sonra 0,08 g sitrik asit $C_6H_5O_7Na_3$ (Mw= 258.07 g/mol) tartılarak 3 ml ultra saf suda çözünür. 0,23 g sodyum sitrat ($C_6H_5Na_3O_7$ $2H_2O$; Mw= 294.10 g/mol) 3 ml ultra saf suda çözünür. Bu üç çözelti birbirine eklenir ve son hacim ultra saf su ile 1 L'ye tamamlanır.

2.3.4 0,5 M PBS Tamponu (pH=7,2)

5,22 g potasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4; Mw=174 g/mol) tartılarak 500 ml ultra saf suda çözünür. 2,72 g potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO4; Mw=136 g/mol) tartılarak çözünür. K_2HPO_4 baz çözeltisi üzerine KH_2PO4 asid çözeltisi eklenir. 0,15 M olacak şekilde 8,77g NaCl eklenir. Son hacim 5 litreye tamamlanır ve pH 7,2' ye ayarlanır. Kaba süzgeç kağıdı ile süzülür.

2.3.5 Yıkama Tamponu

0,5 M PBS (pH 7,2) den litresi başına üzerine 0,5 ml Tween 20 ($C_{58}H_{114}O_{26}$; Mw=1227,72 g/mol) eklenir ve karıştırılır.

2.3.6 Substrat Tamponu

0,015 g glisin ($C_2H_5NO_2$; Mw=75,07 g/mol) 50 ml ultra saf su içerisinde çözündükten sonra 5M KOH çözeltisi ile pH 10,4' e ayarlanır. Daha sonra 0,028 g çinko klorür ($ZnCl_2$; Mw= 136,29 g/mol) tartılarak 50 ml ultra saf su içerisinde çözünür. 0,04 g magnezyum klorür ($MgCl_2$; Mw=95,3 g/mol) tartılarak 50 ml ultra saf su içerisinde çözünür. Bu üç çözelti karıştırılır ve ultra saf su kullanılarak çözelti hacmi 200 ml olacak şekilde hacim tamamlanır.

2.3.7 %0,1 Süt Tozu Çözeltisi

60 mg süt tozu tartılarak 60 ml 0,5 M PBS (pH 7,2) tamponu içerisinde çözünür.

2.3.8 Polivalent İmmünoglobulin Alkalin Fosfataz Çözeltisinin Dilüsyonu

0,5 M 30 ml PBS (pH 7) çözeltisi üzerine 15 µl Polivalent immünoglobulin alkalin Fosfataz eklenir ve vorteksle karıştırılarak 1/2000 dilüsyonu hazırlanır.

2.3.9 4-nitrofenil Fosfat Substrat Çözeltisinin Hazırlanması

4-nitrofenil fosfattan ($C_6H_6NO_6P.2C_4H_{11}NO_3$; Mw= 461,4 g/mol) 2,5 mg alınıp 25 ml substrat tamponunda çözünür ve karanlıkta saklanır.

2.3.10 Besiyerleri

Normal Besi Yeri;

F0 myeloma hücreleri veya bu hücreler ile oluşturulan hibrit hücreler için; %80 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM-Gibco), %20 fetal sığır serumu (FCS), Gentamisin (50

µg/ml) kullanılırken, P3X63.Ag 8.653 myeloma hücreleri veya bu hücreler ile oluşturulan hibrit hücreler için %90 RPIM-1640 medyum %10 FCS, Gentamisin (50 µg/ml) kullanılır. +4° C'de saklanır.

Seçici Besi Yeri;

A) Normal besi yerine litrede 20 ml olacak şekilde Hypoxanthine-aminopterine-thymidine içeren (50 X HAT= Gibco) çözeltinin eklenmesi ile hazırlanır.

B) Normal besi yerine litrede 20 ml olacak şekilde Hipoksantin-Timidin (50 X HAT= Gibco) çözeltinin eklenmesi ile hazırlanır. Buzdolabında saklanır.

Dondurma Besi Yeri;

%20 Fetal sığır serumu (Biocrom), %70 DMEM, %10 DMSO (Dimethyl Sulphoxide) olacak şekilde hazırlanır. DMSO kullanım anında ilave edilir.

2.3.11 DMEM hazırlanışı

13.40 gr DMEM, 2.00 gr $NaHCO_3$, 5.96 gr Hepes, %1 sodyum piruvat pH 7,2 olacak şekilde 0,20 µM'lik filtreden geçirilerek sterilizasyon sağlanır. 6 hafta buzdolabında muhafaza edilebilir.

2.3.12 Polietilen Glikol (PEG) Çözeltisi Hazırlanışı

10 gr PEG Mw 4000 (Merck), 10 ml PBS içinde çözdürdükten sonra otoklav edilir. Sonuçta %50 PEG solüsyonu (w/v) 1 ml olacak şekilde, steril tüplerde oda ısısında haftalarca saklanabilir.

2.3.13 Monoklonal Antikorları Saklama Tamponu

1 M TRIS pH 8.0 tamponuna, kullanırken %0,02 gr sodyum azid ilave edilir. Bu şekilde hazırlanan monoklonal antikorlar +4 °C'de 6 ay, üst sıvılar -20 °C'de 1-2 yıl saklanabilir.

2.3.14 Azaguanin Hazırlanması

Kültürde kullanımı 20 µg/ml' dir. Stok olarak 2 mg/ml hazırlanır. Bu stoktan 10 ml medyum için 200 µl azaguanin kullanılır. 10x stok hazırlamak için 20 mg azaguanin tartılır ve 8 ml distile su ilave edilir. Üzerine 1M NaOH mikropipetle damla damla ilave edilerek çözünmesi sağlandıktan sonra hacim 10 ml'ye tamamlanır. Solüsyon 0,20 mikronluk filtreden süzülerek 1 ml steril tüplere bölünerek -20 °C'de saklanır.

2.4 KULLANILAN ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ

2.4.1 GPC (Jel Geçirgenlik-Moleküler Eleme Kromatografisi)

Moleküler eleme kromatografisi (jel filtrasyon, jel geçirgenlik ve sterik eleme kromatografisi) dolgu malzemesinin ortalama gözenek çapına bağlı olarak makromoleküllerin hidrodinamik çaplarına göre entropik olarak kontrol edilen bir ayırma işlemidir. Bu teknikle ayırma işlemi ilk olarak Lathve ve Ruthven tarafından tanımlandı. İlerleyen yıllarda farklı araştırmacılar tarafından çeşitli alanlarda değişik amaçlarla kullanıldı. Bu yöntem hem sentetik polimerler hem de biyopolimerler için doğru ve güvenilir bir yöntem haline gelmiştir. Moleküler eleme kromatografisi kullanılan hareketli ve sabit fazlara göre ikiye ayrılır: Jel geçirgenlik kromatografisi (gel permeation chromatography, GPC) ve Jel filtrasyon kromatografisi (gel filtration chromatography, GFC). İdeal ayırma işlemi, makromoleküllerin hidrodinamik hacimleri ve şekilleri ile sabit fazın gözenek büyüklüğü ve şekline bağlı olarak gerçekleşmektedir. Moleküller dolgu malzemesinin dışında kalan hacimle gözeneklerin içindeki hacimler arasında dağılırlar. Ayırma sırasında belirli bir anda her bir molekül türünün belli bir kısmı gözeneklerin içinde bulunur. Molekül ne kadar ufaksa gözenek içinde o kadar çok molekül bulunur (büyük moleküllerin tamamı gözeneklerin dışındadır). Büyük moleküller sterik engellemeden dolayı gözeneklere giremezken ufak moleküllerin önemli bir kısmı gözeneklere girer. Ufak moleküller gözeneklerin içinde daha uzun süre bulunurlar. Sabit faz partiküllerinin dışında kalan büyük moleküller hareketli fazla birlikte hareket eder. Bu sebeple büyük moleküller ufaklardan daha önce kolondan çıkar (Topuzoğulları, 2006).

Viskotek 4 Dedektörlü GPC (SEC) Sistemi Viskotek TDA 302 üçlü dedektör dizisi, Viskotek Model 2501 UV dedektörü, Viskotek GPCmax VE2001 örnek modülü kısımlarından oluşur. Kompleks çözeltileri santrifüj edildikten sonra 0,45 µm'lik enjektör filtresiyle süzülerek bu cihaza verilmiştir. 25 °C'de, 1.0 ml/dak akış hızında, 100 µl enjeksiyon hacminde ve Shim-Pack Diol-300 kolonunda UV (280 nm'de), kırılma indisi ve ışık saçılması detektörleri kullanılarak çalışılmıştır. Ölçümleri için pH=7 PBS (%0,05 NaN_3) mobil faz olarak kullanılmıştır. Akış Hızı 1 ml/dak olarak ayarlanmıştır.

2.4.2 Boyut ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

En az bir boyutu 1nm-1µm arasında olan peptid, protein gibi katı bir maddenin sıvı bir çözücü içinde çözünmesiyle oluşan sisteme kolloidal süspansiyon denir. Kolloidal sistemlerin doğalarını gösteren en önemli özelliklerden ikisi, partikül boyutu ve yüzey özellikleridir. Peptid, protein, polimer çözeltilerinin ya da bunların karışımlarının ortalama boyut

analizlerinde Zetasizer Nano ZS cihazında; 633 nm dalga boyunda 4,0 mV He-Ne lazer kullanılarak 25 °C'de Foton Kolerasyon Spektroskopisi Yöntemi uygulanarak ölçüm yapılmaktadır. Vizkozitenin 0,8872 cP ve kırılma indisinin 1,33 olarak alındığı ölçümlerde tüm çözeltiler 0,22 µm' lik membranlardan filtre edilerek analiz yapılır. Bir korelatör tarafından kaydedilen zaman ölçümlerinden G2(τ) saçılma siddetine ait otokorelasyon fonksiyonu bulunur, bu fonkisyona en iyi uyan 3. dereceden polinom saptanır, polinomun katsayılarından translasyonel difüzyon katsayısı D ve polidispersite sabiti hesaplanır. Boyut degeri, Stokes-Einstein denkleminden bulunur (Dalgakıran, 2006).

$$D = \frac{kT}{3\pi\eta x}$$

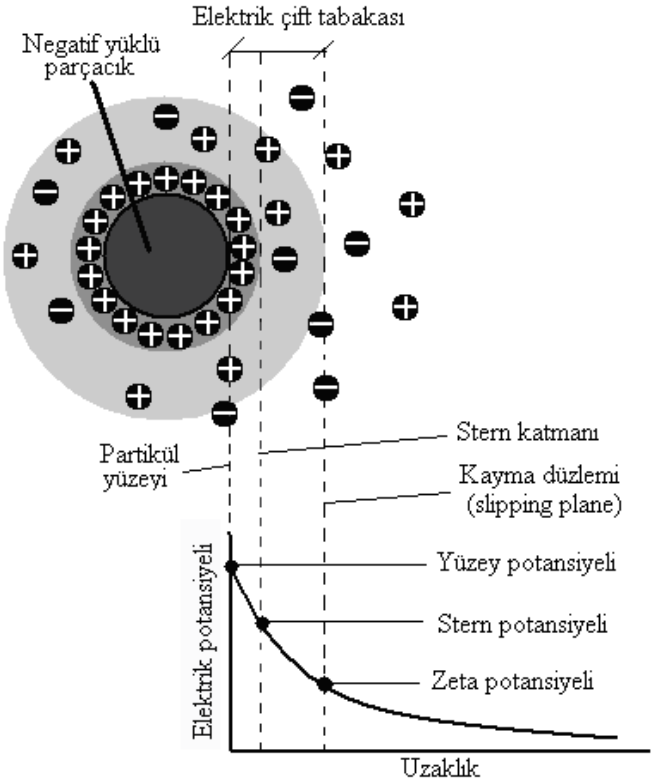
Stokes-Einstein Denklemi

Denklemdeki D = hidrodinamik çap (m); kT = ortalama kinetik enerji (J); k=Boltzmann sabiti = 1,381 x 10^{-23} J/K; T = mutlak sıcaklık (K); η = dispersantın viskozitesi (Pa•s)' dir.

Peptid, protein, polimer ya da bunların beraber olduğu çözeltilerinin Zeta Potansiyeli analizlerinde ise Zetasizer Nano ZS cihazında bir kapiler hücre içerisinde Lazer Doppler Elektroforez (LDE) tekniği uygulanarak ölçüm yapılmaktadır. 25°C'deki ölçümlerde vizkozite 0,8872 cP, dielektrik sabiti 79; f(ka) 1,50 (Smoluchowski) olarak alınmaktadır ve çözeltilerin tamamı 0,22 µm'lik membranlardan filtre edildikten sonra analiz yapılır. Zeta potansiyel partiküllerin yüzey yüklerinin oluşturduğu potansiyelin dolaylı olarak ölçümüdür. Başka bir ifade ile partiküller arasındaki itme veya çekme değeri ölçümüdür. Ölçümü ve tanımı çift iyon tabakası teorisine göre yapılır. Bu teoriye göre, negatif yüklü partiküllerin etrafında iki ayrı bölge bulunur, bunlardan birincisi Stern Tabakası olarak bilinir ve partikül yüzeyine çok yakın bir şekilde sınırlanmış yüksek derişimde zıt (pozitif) iyonlardan oluşur. Stern tabakası ve dağılımlı tabaka arasındaki iyon dağılımı ortamda potansiyel farkın oluşmasına neden olmaktadır. Molekülün Stern katmanındaki elektrik potansiyeline Stern potansiyeli, kayma düzlemindeki elektrik potansiyeline ise Zeta Potansiyeli denmektedir ve Zeta Potansiyeli Henry denkleminden hesaplanmaktadır (Dalgakıran, 2006).

$$U_E = [2\varepsilon z f(ka)]/3\eta$$

U_E = Elektroforetik hareketlilik; ε = Ortamın dielektrik sabiti; η= Ortamın viskozitesi; f(ka) = Henry Fonksiyonu



Şekil 3. 1. Negatif Yüklü Partikülün Zeta Potansiyeli (Dalgakıran, 2006)

2.4.3 FTIR (ATR) Spektroskopisi

Elektromanyetik spektrumun dalgaboyu 0,75 µm ile 1000 µm arasında kalan bölgeye *infrared bölgesi* adı verilir. İnfrared bölgesini, yakın (0,75 µm-2,5 µm), orta (2,5 µm-15 µm) ve uzak (15 µm-1000 µm) infrared olarak üçe ayırabiliriz.

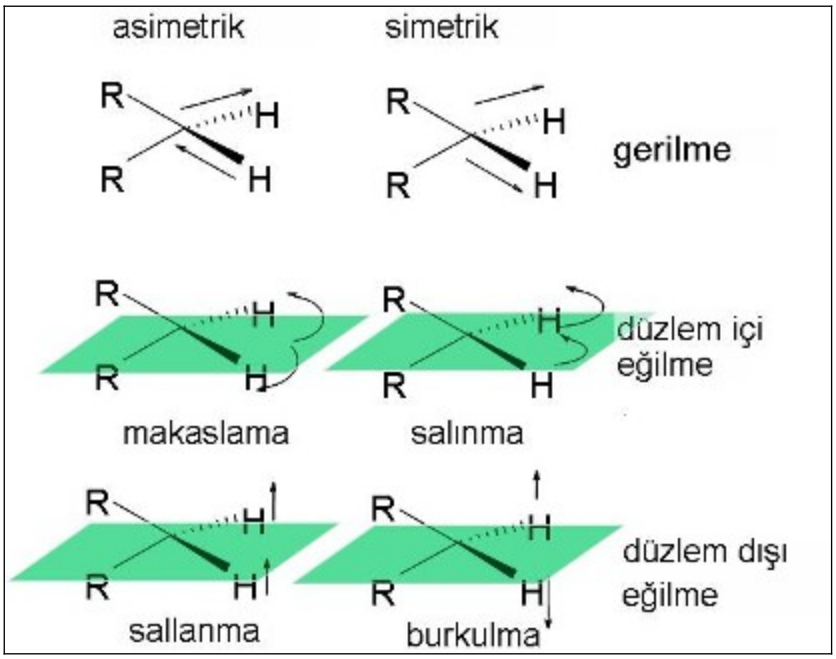
İnfrared absorbsiyon spektroskopisine titreşim spektroskopiside diyebiliriz Bunun sebebi infrared ışınları molekülün titreşim hareketleri tarafından absorplanmasıdır. Çünkü infrared ışıması UV ve görünür bölge ışıması gibi elektronik geçişleri sağlayacak kadar yüksek enerjili değildir. Ancak moleküldeki dönme ve titreşim düzeyleri arasındaki geçişleri sağlayabilir.

Bir molekülün infrared ışımasını absorplayabilmesi için dipol momentinde bir değişim olması gerekmektedir. Molekül üzerine gönderilen infrared ışımasının frekansı, molekülün titreşim frekansına eşit olduğu zaman ancak bir absorpsiyon söz konusu olabilir. Bunu HCl molekülü üzerinde açıklamaya çalışırsak Cl elektronegatif bir element olduğu için H-Cl arasındaki bağ elektronları Cl atomu tarafından çekilecektir. Yani simetrik bir yük dağılımı olmayacak, elektronlar Cl atomu etrafında yoğunlaşacaktır. Bu nedenle HCl, polardır ve net bir dipol momentten bahsedilebilir. O_2, N_2 Cl_2 gibi homonükleer moleküllerde titreşim ve dönme hareketleri sırasında net bir dipol moment değişimi olmadığı için bu moleküller infrared ışımasını absorplayamazlar. Polar olmayan bağlar (organik moleküllerdeki C-C ve C-H

bağlarının çoğu) zayıf soğurmaya neden olurlar. Buna karşılık, polar bağlar (C=O gibi) kuvvetli soğurma gösterirler.

Moleküllerin hareketlerini titreşim ve dönme olarak sınıflayabiliriz. Dönme hareketi, asimetrik bir molekülde, moleküllerin ağırlık merkezi etrafında dönmesiyle dipol momentte bir değişiklik olmasıdır.

Titreşim hareketi ise gerilme ve eğilme titreşimleri olarak ikiye ayrılır. Gerilme titreşimleri, iki atom arasındaki bağların simetrik veya asimetrik gerilmesi sonucunda (bağ uzaması veya kısalması) ortaya çıkmasıdır. Eğilme titreşimleri ise yana sallanma, makaslama, bükülme ve öne arkaya sallanma olarak 4'e ayırabiliriz.

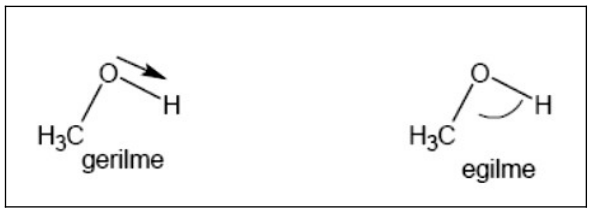


Şekil 3. 2. Moleküldeki titreşim hareketlerinin gösterimi

Kovalent bağlarla bağlı atomların çekirdekleri bir yayla birbirine bağlı iki topunkine benzer şekilde titreşir ya da salınırlar. Moleküller infrared ışığı soğurdukları zaman, soğurulan enerji, bağlı atomların titreşim genliklerinde bir artmaya neden olur. O zaman molekül uyarılmış titreşim halindedir. Molekül temel hale dönerken soğurulan enerji ısı olarak açığa çıkar.

Bağların titreşim halleri, sabit ya da paketlenmiş enerji seviyelerinde oluşur. Belirli bir bağ türünün belirli bir dalga boyundaki soğurması temel hal ve uyarılmış hal arasındaki enerji farkına bağlıdır. Bu nedenle, farklı bağ türleri (H-H, C-C, O-H ve diğerleri) infrared ışınını farklı karakteristik dalga boylarında soğururlar.

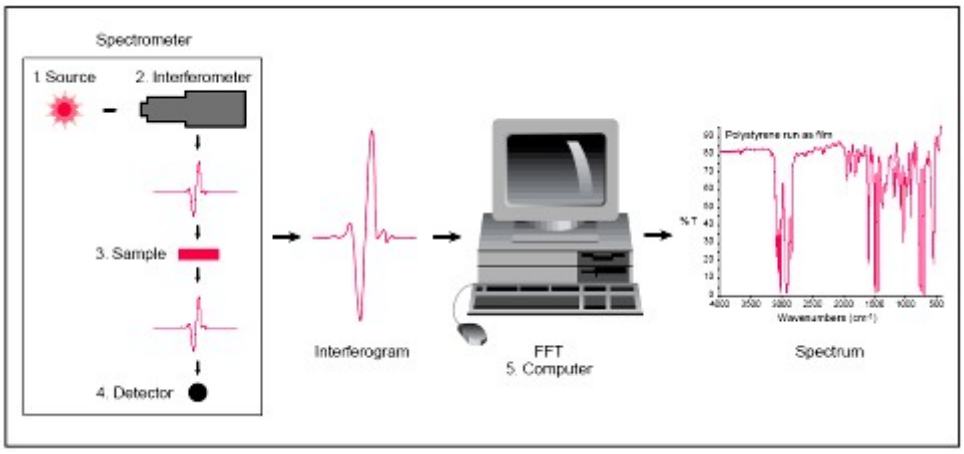
İnfrared spektrumlarının çoğu dalgaboyu ya da frekansı %Transmitans (%T)' ye karşılık verir. Bir moleküldeki bir bağ farklı salınımlar gösterebilir; bu nedenle belirli bir bağ birden fazla dalgaboyunda enerji soğurabilir. Örneğin bir O-H bağı 3300 cm^{-1} (3,0 µm) dolayında enerji soğurabilir. Bu dalgaboyundaki enerji O-H bağında artan gerilme titreşimlerine neden olur. O-H bağı 1250 cm^{-1} (8,0 µm) dolayında da soğurabilir; bu dalgaboyundaki enerji artan eğilme titreşimlerine neden olur. Bu farklı titreşim türleri farklı temel titreşim modları diye bilinir (Karahan, 2009).



Şekil 3. 3. CH_3OH'daki gerilme ve eğilme titreşimleri

Bir bağın soğurduğu enerji miktarı, bağ yapan atomlar titreştikçe bağ momentindeki değişikliğe bağlıdır. Bağ momentindeki daha büyük bir değişiklik daha büyük miktardaki enerji soğurmasıyla sonuçlanır.

Modern infrared düzenekleri spektrum elde etmek için hızlı bir Fourier analizi uygular ve Fourier transform infrared (FT-IR) spektrometreleri olarak bilinirler.



Şekil 3. 4 Modern bir FT-IR spektrometresinin genel gösterimi

İnfrared ışınımı iki demete ayrılır. Bir demet durağan kalırken, diğeri hareketli bir demet oluşturmak üzere hareketli bir aynaya yönelir. Daha sonra bu iki demet değişken bir demet elde etmek üzere birleşirler. Belirli bir dalga boyunda, değişken demette ya daha çok ışık enerjisi (yapıcı girişim) ya da daha az ışık enerjisi (yıkıcı girişim) olacaktır. Değişken demet örnekten geçirilir, sayısal hale getirilir ve bir bilgisayarla infrared spektruma Fourier-dönüşümlü hale getirilir (Karahan, 2009).

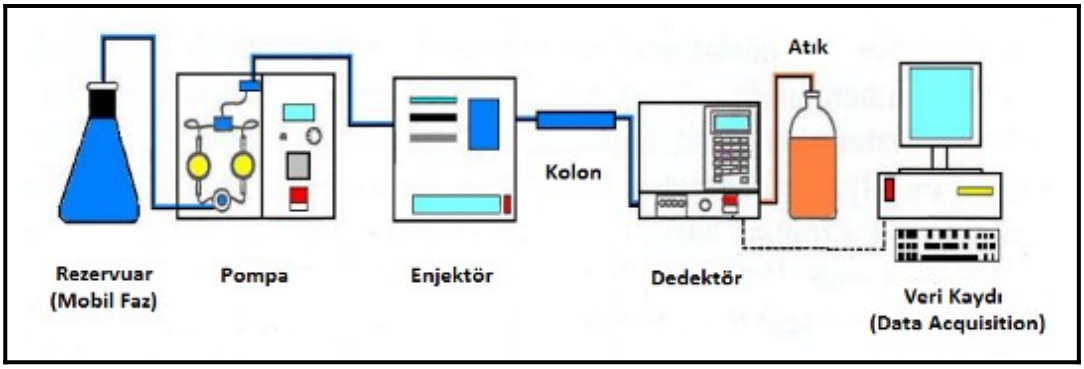
Hazırladığımız örneklerimizi FT-IR spektrometresi ile oda sıcaklığında ATR metoduyla ölçüm alınmıştır. Alınan sonuçlar literatürden faydalanılarak yorumlanmıştır.

2.4.4 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC)

Kromatografi, bir karışımda bulunan bileşenlerin birbirinden ayrılmasını gerçekleştiren ve bu sayede kalitatif ve kantitatif analizlerinin yapıldığı yöntemlerin genel adıdır. Kromatografik yöntemler, sabit faz ve hareketli faz arasında olan kütle aktarımını içeren ayıma teknikleri olarak tanımlanabilir. HPLC; sıvı bir mobil fazın kullanıldığı, sahip olduğu gelişmiş pompa sistemiyle yüksek basınçlara çıkarak, istenilen akış hızında ayırma yapabilen bir kromatografi sistemidir.

HPLC birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Kullanım amaçlarının başlıcaları kimyasal ayırma, saflaştırma ve tanımlamadır. Kimyasal ayırma işlemi her maddenin belli bir sabit faz ve mobil faz bileşiminde farklı çıkış süresinin olmasından faydalanılarak yapılmaktadır. Saflaştırma ise saflaştırılması istenen bir maddenin diğer maddelerden ya da safsızlıklardan ayrılmasıdır. Her maddenin belirli kromatografik şartlar altında karakteristik bir piki vardır. Ayrılması istenen maddeye göre ve diğer maddelerle olan ilişkisine göre uygun şartlar belirlenir. Kromatografik saflaştırma işleminde, istenen madde kolon çıkısında toplanarak diğer bileşenlerinden izole edilir. Bir maddenin HPLC ile tanımlaması işlemi ise HPLC analizlerinin kullanım alanlarının en önemlilerinden biridir. HPLC'de madde tanımlaması, bilinmeyene ait olan pik alıkonma süresinin standarda ait alıkonma süresiyle çakıstırılması ile yapılabilir.

HPLC sistemi, Şekil 3.5 'de de görüldüğü gibi pompa, enjektör, kolon, dedektör ve bilgisayar birimlerinden oluşmaktadır. Kromatografik analiz süreci, çözücüde çözünmüş örneğin sisteme enjekte edilmesi ile başlar. Bu sistemin kalbi, ayırmanın gerçekleştiği kolondur. Hareketli (sürekli) faz ile birlikte kolona pompalanan örnek, kolon içinde bileşenlerine ayrılmaya başlar ve her bileşenin gönderdiği sinyaller dedektör tarafından kaydedilir. Dedektör tarafından kaydedilen ve bilgisayara aktarılan sinyaller kromatogram olarak adlandırılır.



Şekil 3. 5. Temel HPLC Donanımı (Kılınç, 2010)

Deney çalışmalarında konjugatların analizinde kullandığımız HPLC kolon: Silika jel kolon LC column Shim Pack Diol-300 (7,9 mm x 50 cm)'dür. Akış hızı 1 ml/dak. ve dedektörü UV-VIS detektör (SPD-10AV)'dür. Mobil faz olarak pH=7 PBS (%0,05 NaN_3) kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 25 °C ve dalga boyu 280 nm'dir.

2.4.5 Elisa Yöntemi

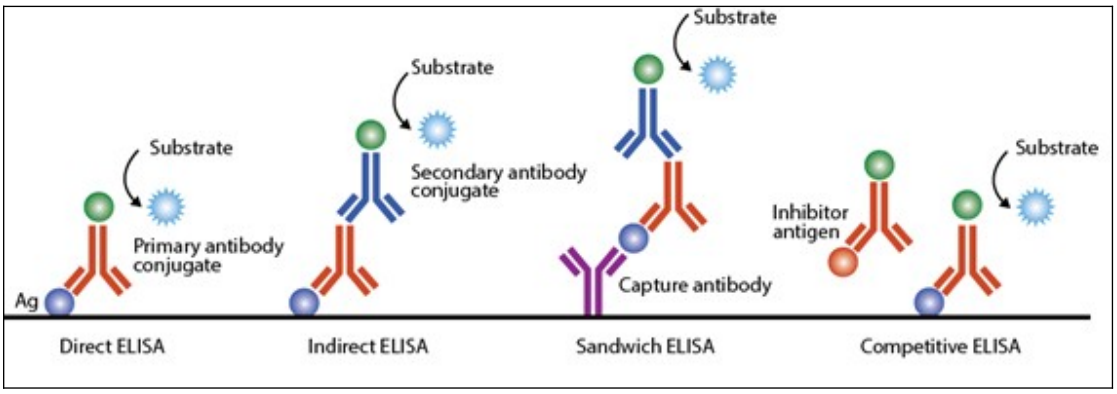
Elisa testi, son yıllarda viral enfeksiyonların tanısında kullanılan, klasik testlerden birçoğunun yerini almaktadır. Elisa yönteminde, antijen ya da antikor bir enzimle işaretlenmekte ve immunolojik reaksiyon, enzimatik bir aktivite sonucu ölçülmektedir. Duyarlı spesifik ve çabuk sonuç veren bir testtir. Serodiagnostik'de kolay ve hızlı olmasından dolayı geniş bir uygulama alanı bulmuştur.

Elisa yöntemine Engwall ve Perlmann öncülük etmişler, 1971 yılında antijen veya antikorları radyoizotop yerine enzim ile konjuge ederek immunolojik bir yöntem geliştirmişlerdir. Carllson ve arkadaşları 1972'de, Holmgren ve Svennerholm 1973'de, Voller 1974'de diagnostik mikrobiyolojide Elisa testini kullanmışlardır. 1978'de Bishaive Galli,1979'da Leinikki ve arkadaşları, 1980'de ise Ukkonen ve arkadaşları Influenza ve parainfluenza viruslarının neden olduğu enfeksiyonların tanısında Elisa yönteminden yararlanmışlardır. Elisa testi, 1980 yılında Ukkonen tarafından modifiye edilerek ve mikrotitrasyon pleytler kullanılarak denenmiştir. Elisa yönteminde antijen, katı bir faza bağlanmaktadır. Katı faz olarak rigid polistiren, polivinil ve polipropilen'den yapılmış tüpler ve mikropleytlerin daha uygun olduğunu belirtmişlerdir. Antijen ve antikoru uygun bir şekilde adsorbe eden ve diğer safhalarda yer alan komponentleri adsorbe etmeyen özellikte mikropleytler tercih edilmelidir. Elisa'da enzim olarak beta galaktozidaz, glukozoksidaz, peroksidaz ve alkalin fosfotaz kullanılmaktadır. Engvall ve Perlmann rutin olarak alkalin fosfatazı tercih etmişlerdir. Yüksek aktivite gösterdiğini ve ona karşı seçilen susbstratın ucuz ve nontoksik olduğunu belirtmişlerdir.

Alkalin fosfataz ile p-nitrofenil fosfat, substrat olarak kullanılmakta ve pozitif reaksiyonda sarı bir renk oluşturmaktadı (Kızılbey, 2012).

Tablo 3. 2. Elisa Protokolleri (Kızılbey, 2012)

ELISA protokolü	Kullanımları	Gerekli kimyasallar	Yorumlar
İndirekt	Antikor aramada	Antijen saf veya yarı saf: antikor içeren test solüsyonu; immünize örneklerde Ig'i bağlayan enzim konjugatı	Önceden varolan spesifik antikorların kullanımına gerek duyulmaz; relatif olarak fazla miktarda antijen gerektirir.
Direkt kompetetif (yarışmacı)	Antijen aramada; çözünür antijeni saptamada	Antijen saf veya yarı saf; antijen içeren test solüsyonu; spesifik antijen için enzim-antikor konjugatı	Sadece iki basamaktan oluşan hızlı test; antijenik çapraz reaksiyonu ölçmede çok kullanışlı
Antikor-sandviç yöntemi	Antijen aramada; çözünür antijeni saptamada	Antikor yakalama (capture) (saf veya yarı saf spesifik antikor); antijen içeren test solüsyonu, antijen için spesifik enzim-antikor konjugatı	En hassas antijen testi; relatif olarak fazla miktarlarda saf veya yarı saf antikor gerektirir (antikor yakalama)
Çift antikor-sandviç yöntemi	Antikor arama	Antikor yakalama (capture) (immünize örneklerde Ig için spesifik); antijen içeren test solüsyonu, antijen için spesifik enzim-antikor konjugatı	Saflaştırılmış antijen gerektirmez; beş basamaklı relatif olarak uzun bir testtir.
Direkt hücresel yöntem	Antijen ekspresse eden hücrelerin aranmasında; hücresel antijen ekspresyonunun ölçülmesi	İlgili antijeni ekspresse eden hücreler; hücresel antijen için spesifik enzim-antikor konjugatı	Fazla miktarda taramalarda hassas bir testtir; heterojen karışık hücre gruplarında hassas değildir.
İndirekt hücresel yöntem	Hücresel antijenlere karşı oluşan antikorların aranmasında	İmmünizasyonda kullanılan hücreler, antikor içeren test solüsyonları; immünize örneklerde Ig bağlayan enzim konjugatı	Düşük miktarda ekspresse edilen hücresel antijenler için spesifik antikorları saptayamayabilir.



Şekil 3. 6. Direct Elisa, Indirect Elisa, Sandwich Elisa ve Yarışmalı Elisa ile ilgili şematik gösterim

Elisa testinin her evresi için aşağıda belirtilen optimum şartlar gereklidir.

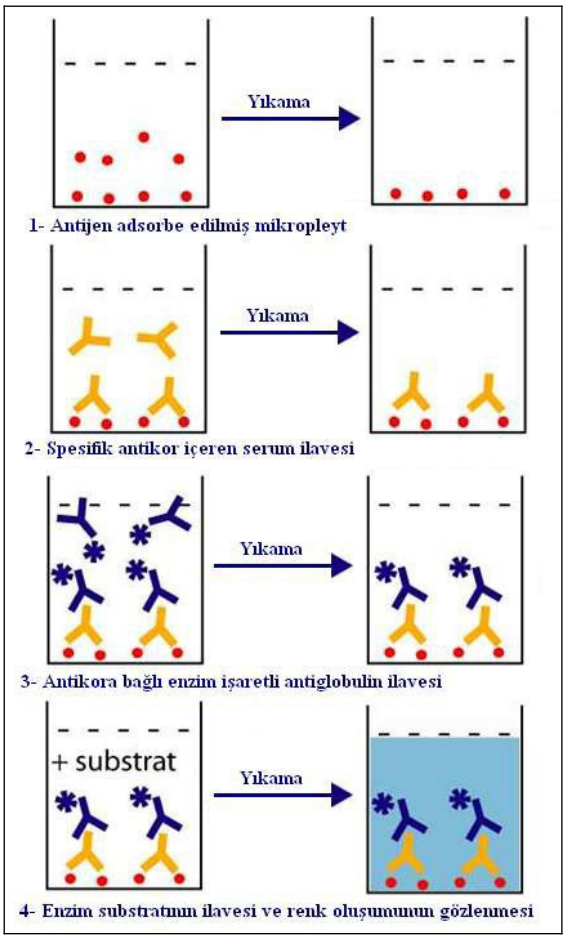
1. Solid fazın kaplamasında antijen veya antikor optimum konsantrasyonda olmalıdır.

2. İnkübasyon süresi ve sıcaklığı optimum olmalıdır.

3. En uygun substrat seçilmelidir.

Antijen ve antikorun optimum konsantrasyonunun saptanmasında chequer board yöntemi ile referans numuneler kullanılır. Direkt Elisa yöntemi ise yüksek molekül ağırlıklı antijenin miktar tayini için uygundur.

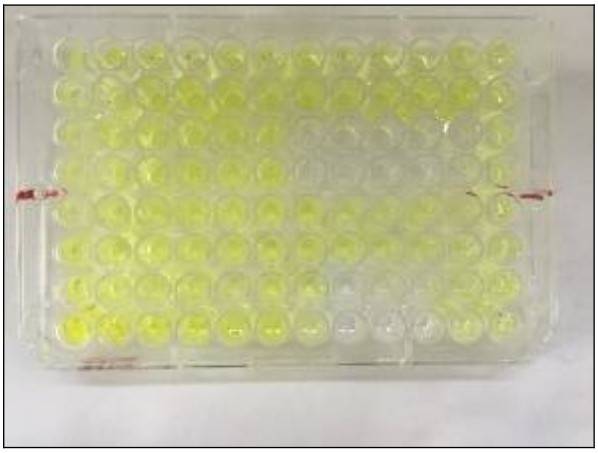
İndirekt metotda antijen, solid faza pasif adsorbsiyonla immobilize edilir. Daha sonra test serumu ilave edilerek belli süre inkübe edilir. Eğer test serumlarında ki antikorlar ile solid fazdaki antijenler uygun ise bağlama meydana gelir. Daha sonra yıkama solüsyonu ile yıkama işlemi yapılır. Yıkama ile reaksiyona girmemiş komponentler ortamdan uzaklaştırılır ve sonra ağır zincir spesifik antihuman IgG konjugatı ilave edilir (Kızılbey, 2012).



Şekil 3. 7 İndirekt Elisa Yöntemi (Kızılbey, 2012).

Antikor aramak için bilinen antijen plastik bir yüzeye yapıştırılır. Mikro-Elisa sisteminde bu antijen her hasta için kullanılmak üzere yapılan çukurların yüzeyine kaplanır. Antikor

aranacak hasta serumu bu çukurlara konur, bir süre beklenir ve yıkanır. Eğer serumda uygun antikor varsa antijenle birleşir. Bir enzim ile işaretlenmiş insan globülini antiserumu eklenir. Bir süre beklenir ve yıkanır. İncelenmekte olan serumda antijene uygun antikor var ise antijene bağlanmış olacağından bu son eklenen enzim ile işaretlenmiş insan antiglobülini de bağlayacak ve yıkama ile uzaklaştırılamayacaktır. Enzime uygun bir kromojen substrat eklenir. Sisteme bağlanmış enzim bu substratı parçaladığında ortaya çıkan renk, yapılacak kolorimetrik yöntemlerle ölçülerek bağlanmış olan enzim dolayısıyla bağlanmış olan antikor hakkında fikir verecektir (Tuğlu, 2012).



Şekil 3. 8. Enzim substratının ilavesinden sonra rengin şeffaftan sarıya değişiminin görünümü

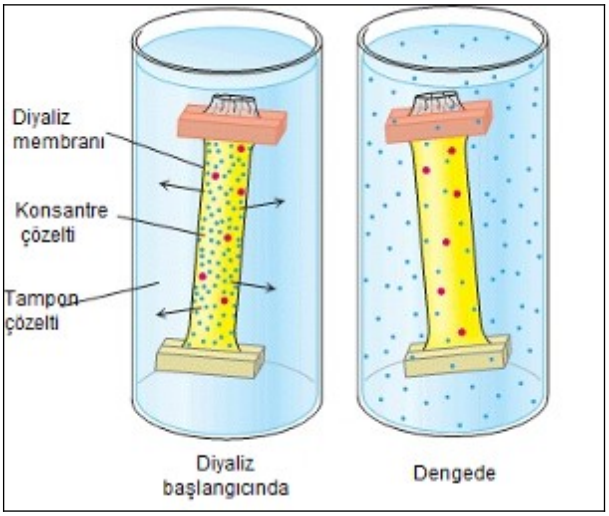
2.4.6 Konjugatların Saflaştırılması

Sentezlediğimiz konjugatları, bu tür reaksiyonlarda oluşan üre türevi veya reaksiyona girmemiş çapraz bağlayıcıların fazlasından diyaliz ve santrifüjlü filtrasyon (membranlı santrifüj tüpleri ile) gibi yöntemlerle saflaştırılmıştır.

2.4.6.1 Diyaliz

Temel prensibi, tüm maddelerin, kimyasal potansiyellerinin (madde akımının yürütücü kuvveti) büyük olduğu yerden küçük olduğu yere doğru kendiliğinden akmasına dayanan işleme diyaliz denir. Kimyasal potansiyellerin her iki tarafta birbirine eşit olduğu durumda dinamik denge oluşur ve madde geçişi denge durumunda da devam etmesine rağmen konsantrasyon değişimi olmaz. Kullanılan diyaliz torbalarının por çapı 1-20 nm arasında selüloz asetattan yapılmıştır. Konjugatların saflaştırılmasındaki kullanılan diyaliz işlemi konjugatların oluşumu sırasında meydana gelen üre türevlerinin, reaksiyona girmemiş çapraz bağlayıcıların ortamdan uzaklaştırılmasıdır. Aktivite kayıplarını en aza indirmek amacıyla diyaliz islemi 4 °C'de gerçekleştirilmektedir. Konjugatların; tuz, iyon ve küçük moleküllerden

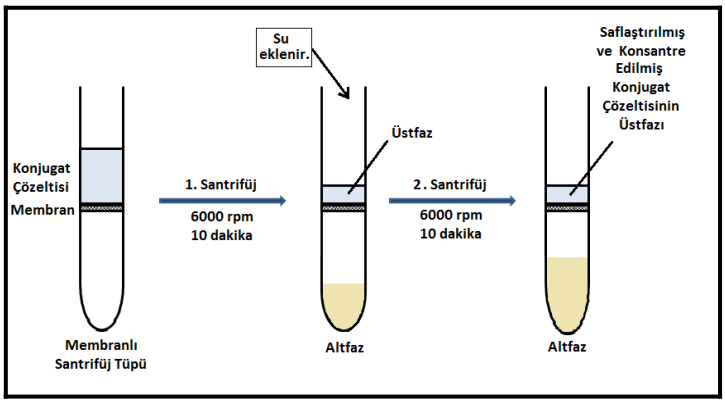
ayrılması sağlanmaktadır. Proje kapsamında dekstranın aldehit türevlerinin saflaştırılmasında kullanılmıştır. Ancak membranlı santrifüj tüplerine göre fazla zaman alması ve daha uğraştırıcı bir işlem olması, diğer saflaştırma işlemlerimiz için membranlı santrifüj tüplerini kullanmaya yönelmemize neden olmuştur.



Şekil 3. 9. Diyaliz işleminin Genel Prensibinin Şematik Gösterimi (Berg vd., 2002)

2.4.6.2 Santrifüjlü Filtrasyon (Membranlı Santrifüj Tüpleri)

Çeşitli boyutlardaki molekülleri ayıracak özelliğe sahip mebranları içeren santrifüj tüpleri; konjugatların küçük moleküllerden ayrılmasında kullanılmaktadır. Bunun için ayrılacak çözelti membranlı tüpe konulur ve tüpün santrifüjlenmesi sonucu membranın gözeneklerinden küçük molekülerin geçmesi ile büyük moleküller (konjugat) üst fazda kalımaktadır. Böylelikle konjugat saflaştırılmış ve konsantre edilmiş olmaktadır (Acar, 2006).



Şekil 3.10. Konjugatların membranlı tüpte saflaştırılmasının şematik gösterimi (Acar, 2006)

2.4.7 Komplement Fiksasyon Testi (Komplement Bağlanma Testi, CFK)

Antijen ve antikor kompleksine komplementin birleşme yeteneğinden yararlanılarak, hemolitik sistem aracılığıyla şüpheli Ag ya da Ab varlığının araştırılmasına imkan sağlayan bir yöntemdir.

Komplement sistemi, normal kan serumunda bulunan protein yapıda kompleks bağışıklık elemanlarından oluşur. Bu sistem antijen-antikor kompleksinin varlığında tetiklenir ve bunu takiben hücre lizisine kadar giden çeşitli reaksiyonlar gelişir.

Mikroorganizmaların *in vitro* öldürülmesinde serumdaki ısıya dayanıklı proteinler kadar ısıya dayanıksız olan fraksiyonların da etkili olduğu ve bundan dolayı hayvanların enfeksiyonlara karşı korunduğu ilk olarak 1800'lü yıllarda Nuthall, Pfeiffer, Bordet ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Eş zamanlı olarak Erlich ısıya dayanıksız fraksiyonu kompleman olarak adlandırmıştır. 1941'de Pillemer komlemanın en azından 4 komponentden oluştuğunu göstermiştir. 1960'lı yıllarda protein ayrıştırma yöntemlerinin gelişmesi ile Müller Eberhard ve Nelson listeyi klasik komponentleri kapsayacak şekilde genişletmiştir. Gerçek numaralandırma 1968 yılında WHO tarafından yapılmıştır. Günümüzde kompleman sisteminin 30 kadar proteinden meydana geldiği, 5 hücre membran regülatör proteini ve 7 hücre membran reseptörünün olduğu, kompleman aktivitesinin 56 °C'de 30 dakika içinde kaybolduğu; kompleman sisteminin normalde ve bir uyaran olmadığı sürece inaktif olduğu bilinmektedir. Kompleman proteinleri isimlendirilirken reaksiyon sırasından ziyade keşfedilme sırasına göre isimlendirilmişlerdir. Birden dokuza kadar numaralandırılmış olup ara elemanlar da bulunmaktadır.

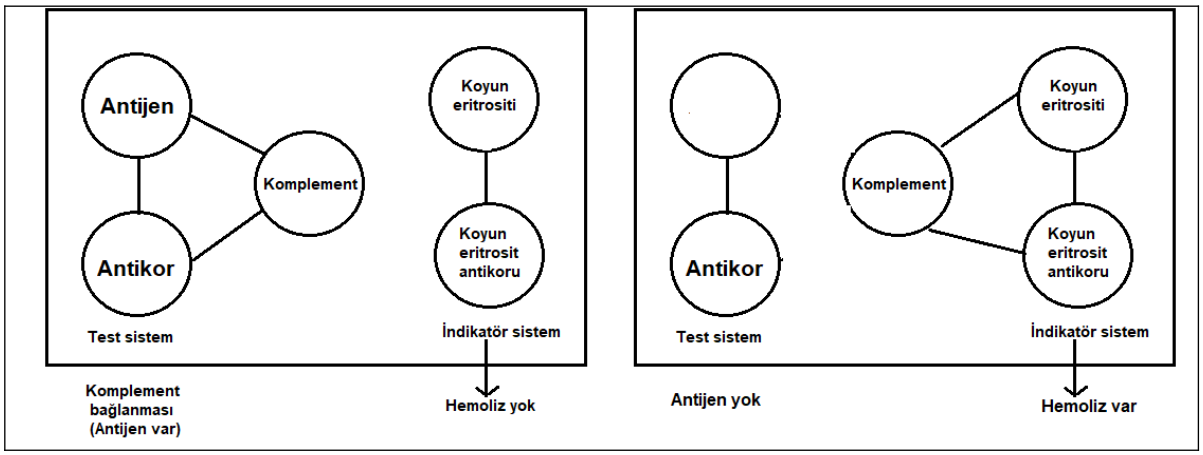
Komplementin taze kaynağı kobaylardır. Ancak kobay serumundan taze elde edilen komplement ısı ile kolayca inaktive olabilir. Günümüzde komplement ticari olarak da elde edilebilmektedir. Komplement testtem önce üreticinin önerileri üzerine uygun şekilde sulandırılır.

Test için kullanılan yönteme göre değişen konsantrasyonlarda yıkanmış koyun eritrositleri eşit hacimde tavşan-anti koyun eritrosit antikorları karıştırılır. Bu duyarlaştırılan eritrositlere amboseptör ya da hemolitik sistem ismi verilir ve testte indikatör sistem olarak kullanılır.

Normal kan serumu içerisinde immun sistemin yapı taşlarından biri olan komplementi barındırmaktadır. Bu nedenle var olan komplementin giderilmesi için test edilecek kan serumları 60°C'de 30 dak. tutularak inaktive edilir. Serumlar testten önce sulandırılır.

Testten önce koyun eritrositleri otoliz varlığı yönünden kontrol edilmelidir. Ayrıca her test pozitif ve negatif kontrol serumları ile çalışılmalıdır. Bu test iyi laboratuvar koşulları, eğitimli

personel ve düzgün titre edilmiş ve doğru koşullarda saklanmış reaktifler ile çalışmayı gerektirmektedir (Rice vd., 1960; Kılıçturgay K., 2003; Ak vd., 2015).



Şekil 3. 11 Komplement Fiksasyon Testi Şematik gösterimi (MEB, 2014)

2.5 DENEYSEL KISIM

2.5.1 Lipopolisakkaritin izolasyonu

Slovakya'daki Araştırma Grubu: 60,8 mg bir LPS olan Coxiella burnetii'nin izolasyonu ve karakterizasyonu yapılarak Türkiye Araştırma Grubuna iletilmiştir. Buna göre izlenilen yöntem aşağıdaki gibidir.

2.5.1.1 *Coxiella burnetii* hücrelerinin kültüre alınması ve saflaştırılması

Coxiella burnetii suşu Nine Mile I (RSA 493), S serolojik virülan faz I, Slovak Bilimler Akademisi, Viroloji Enstitüsün'de Riketsiya Referans ve Araştırma için WHO İş birliği Merkezi suş koleksiyonundan temin edilmiştir. Bakteri, embriyolu hen yumurtalarında tarif edildiği gibi yayılmıştır (Toman R. vd., 1996, Škultéty Ľ. vd., 1998) Kültüre alındıktan sonra, faz I hücreleri, eter ile tekrarlanan ekstraksiyon işlemleri ve Renografin yoğunluk gradient santrifüj ile saflaştırılmıştır (Williams vd., 1981; Toman vd.,1996; Škultéty vd., 1998; Toman vd., 2009; Toman vd., 2012).

2.5.1.2 *Coxiella burnetii* hücrelerinden lipopolisakkarid izolasyonu

Coxiella burnetii hücre süspansiyonundan santrifüj ile elde edilmiş, distile suyla yıkanmış ve son olarak liyofilize edilmiştir. Kısaca, *Coxiella burnetii* hücreleri (1,5 g) 50 mM Tris-HCl tampon (150 ml, pH 7,5) içinde süspanse edilmiş ve RNase ve DNase I [ikisi de sığır

pankreastan (Boehringer)] 37˚C de 16 saat boyunca eş zamanlı olarak işlem görmüştür. Hücreler daha sonra 90 dakika boyunca 37˚C'de Tripsin (Serva) ile ardından 16 saat boyunca 37˚C'de Tritirachium album (Sigma) Proteinaz K ile muamele edilmiştir. Enzim işlemlerinden sonra, hücre süspansiyonu 1400 g'da, 10˚C de 50 dakika santrifüj edildi ve çökelti aseton ile yıkandı. Kurutulan hücreler fosfolipidleri çıkartmak amacıyla 20 ˚C'de gece boyunca kloroform-metanol (2:1, v/v) ile eksrakte edildi. Ekstraksiyon taze çözücü karışımı ile 2 saat boyunca tekrarlandı. Hücre süspansiyonu, 20 dakika boyunca 3000 g'da santrifüjlenmiştir ve çökelti önceden ısıtılmış distile su (150 ml, 68˚C) içerisinde süspanse edildi ve %90 fenol ile ekstrakte edildi. LPS kapsamlı diyaliz ve liyofilizasyon işlemlerinden sonra sulu fazdan elde edildi, pellet distile su içerisinde süspanse edilmiştir ve liyofilize işlemi gerçekleştirilmiştir.

LPS ve Lipid A Analizi: LPS 3 saat süre ile 120˚C 'de 2 M trifluoroasetik asit ile hidroliz edildi ve doğal ve amino şekerleri, ilgili alditol asetatlar gibi gaz kromatografisi (GC) ve GC-kütle spektrometere (GC-MS) cihazı ile analiz edildi. LPS ve lipid A 'nın 2 ve 16 saat için, kuru metanol içinde 2 M hidroklorik asitte hidrolizinden sonra, serbest yağ asitleri GC ve GC-MS ile direkt olarak ve trimetilsililasyonundan sonra analiz edilmiştir (Hussein vd., 2001).

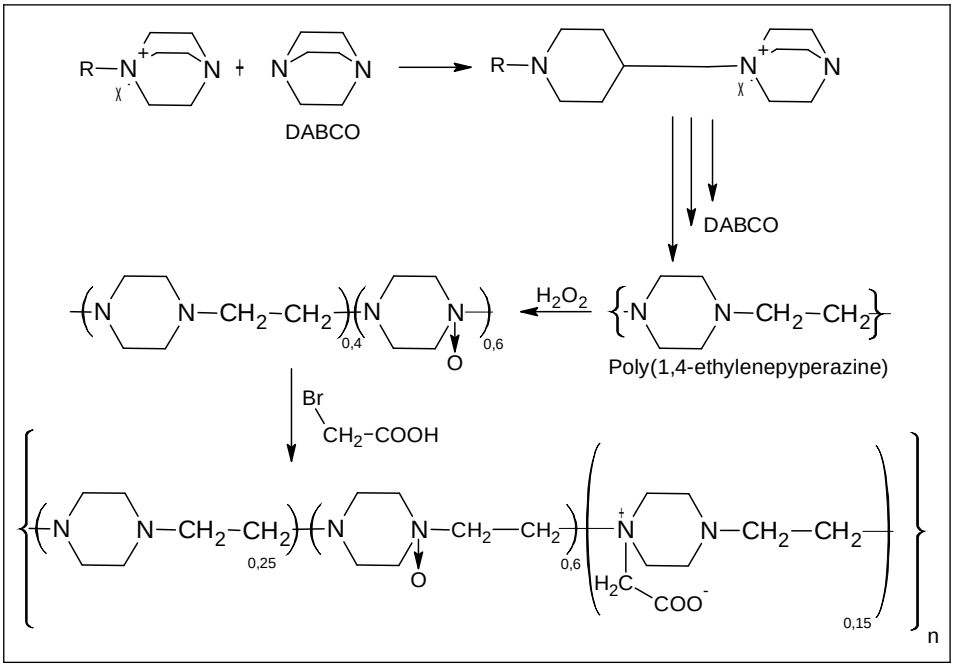
2.5.2 Polimerlerin Sentezi

2.5.2.1 Polioksidonyum Polimerinin Sentezi

Polioksidonyum polimeri Rusya'da yapılmış, hala kullanımda olan ve bizim yöntemimize benzeyerek üretilen Grippol aşısında kullanılmaktadır. Bu sebeple projemizde kullanımı uygun görülmüştür.

Başlangıç makromoleküllerinin sentezi için, daha önceden bulunmuş ve çalışılmış olan bir halka açılması ile sterik olarak gergin bisiklik aminlerin detaylı polimerizasyonu kullanıldı. 1,4-diaminobisiklo (2,2,2) oktan (DABCO) (trietilendiamin) çeşitli nedenlerden (teknik, ekonomik parametreler de dâhil olmak üzere) dolayı başlangıç monomeri olarak seçilmiştir. Yaşam zinciri mekanizması yoluyla DABCO'nun polimerizasyonu, dar bir moleküler kütle dağılımına sahip poli 1,4-etilenpiperazin oluşumuna yol açar. Nontoksik bir polikatyonik immunostimulant olan polioksidonyum, poli 1,4-etilenpiperazin polimerinin birimlerinin belirli parçalarının hidrojen peroksit ile N-oksit'e oksidasyonunu takiben nonoxidized amin gruplarının bromoasetik asit ile kısmi kuaternizasyonu sonucu sentezlendi. Aslında1,4-etilenpiperazin, 1,4-etilenpiperazin-N-oksit ve (N-karboksimetilen)- 1,4-etilenpiperazinyum bromitin suda çözünebilen üçlü bir kopolimeri olan polioksidonyumun sentezinin şeması

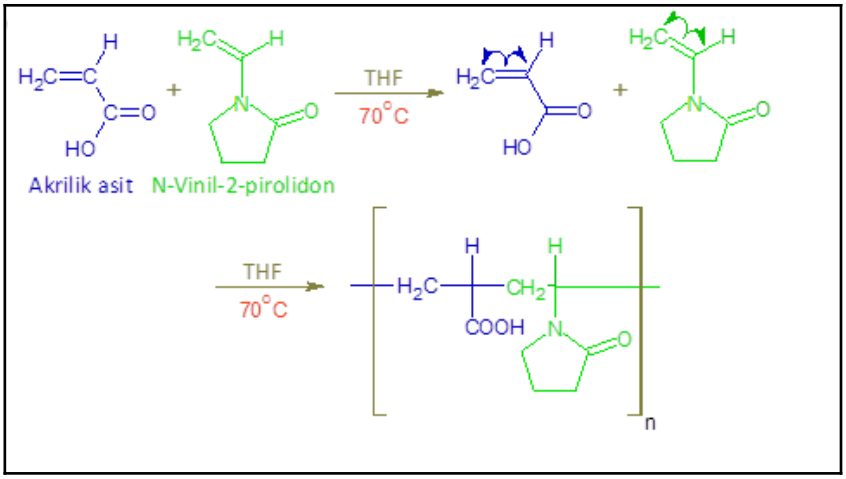
aşağıda verilmiştir (Kabanov, 2004). Sentezlenen polimerlerin karakterizasyonu FT-IR analizi ile gerçekleştirilmiş, molekül ağırlığı (Mw) hesaplaması yine 4 detektörlü GPC cihazında elde edilen sonuçlar ile yapılmıştır.



Şekil 3.12. Polioksidonyumun sentezi (Kabanov, 2004)

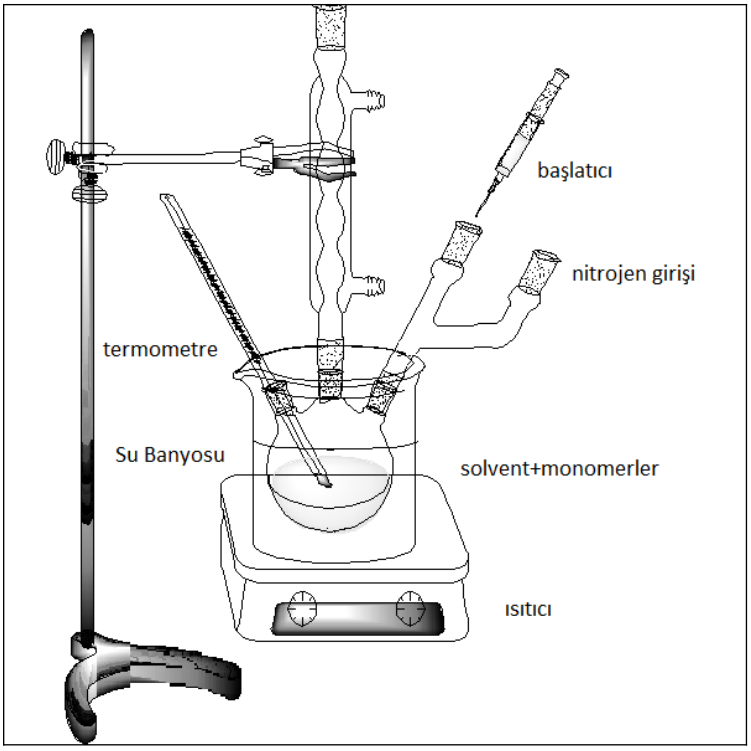
2.5.2.2 Poli(vinilpirolidon-akrilikasid) kopolimeri sentezi:

Yapay polimerik aşı sistemlerinde kullanılmak üzere sentezlenen polimerlerin (kopolimerlerin) bazı özellikleri olmalıdır. Bunlar; biyobozunurluk, biyouyumluluk ve molekül ağırlığı minimum 30.000 Da olmasıdır. Poli (vinilpirolidon-akrilik asid) kopolimerinin sentezlenmesinde molekül ağırlığının çok düşük olması problemiyle karşılaşılmıştır. Sebebi araştırılınca, kullanılan başlatıcının miktarı fazla olduğu polimerleşme reaksiyonu çok çabuk gerçekleşmekte ve elde edilen polimerin molekül ağırlığı istenilen düzeyde olmaması olarak tespit edilmiştir. Dolayısıyla başlatıcının oranları değiştirilerek 5 faklı şekilde bu kopolimer sentezlenmiştir.



Şekil 3.13. Poli(vinilpirolidon-akrilikasid) kopolimerinın sentez reaksiyonu

Polimerin sentezinde literatürdeki yöntemden faydalanılmıştır. Literatürde belirtilen başlatıcı miktarı monomerlerin toplamının %0,4'ü kadardır. Ancak elde ettiğimiz kopolimerin molekül ağırlığı yaklaşık 20.000 Da olduğu için başlatıcı oranlarını ve eklenen monomer ve çözücü miktarlarını değiştirdik. Daha verimli ve iyi sonuç alabilmek için yapmış olduğumuz polimer sentezlerinde çalışmada literatürde belirtilen monomer oranları sabit tutularak başlatıcı miktarları monomerlerin toplamının %0,1; %0,15; %0,2; %0,25 ve %0,3'ü olmak üzere 5 farklı başlatıcı oranı kullanılmıştır (Uelzmann, 1958). Akrilik asit (48 g) ve vinilpirrolidon-2 (111 g) 350 g THF içerisinde karıştırılır. Benzoil peroksit (318 mg) ve kobalt naftanat (32 mg) akrilik asit ve vinilpirolidon karıştırılırken ortama eklenir. Bu işlemler esnasında sıcaklık 65-70 ^{o}C'de tutulur. Polimerizasyon N_2 gazı varlığında 3 saat sürer. Elde edilen P(VP-co-AA) polimeri kirli beyaz kristalin katı şeklinde oluşmuştur. Reaksiyon sonucunda kopolimer çökelti olarak elde edilir. Çökelti filtre edilir ve 40 ^{o}C'de vakum etüvde kurutulur. Reaksiyon sonucunda verim %98,5 dir. Suda çözünmesi yüksektir ve HCl asit içerisinde de çözünmektedir. Sentezlenen polimerlerin karakterizasyonu FT-IR analizi ile gerçekleştirilmiş, molekül ağırlığı (Mw) hesaplaması yine 4 detektörlü GPC cihazında elde edilen sonuçlar ile yapılmıştır.



Şekil 3.14. P(VP-co-AA) polimerinin sentezine ait deney düzeneğinin şematik gösterimi

Deneylerimizde: Glacial akrilik asit: 9,6 g; vinilpirrolidon-2: 22,2 g; THF: 70 g; Kobalt naftanat: 6,4 mg miktarında kullanılmıştır. Başlatıcı oranları Tablo 3.3'de gösterilmektedir.

Tablo 3. 3. P(VP-co-AA) polimerinde kullanılan başlatıcı miktarları

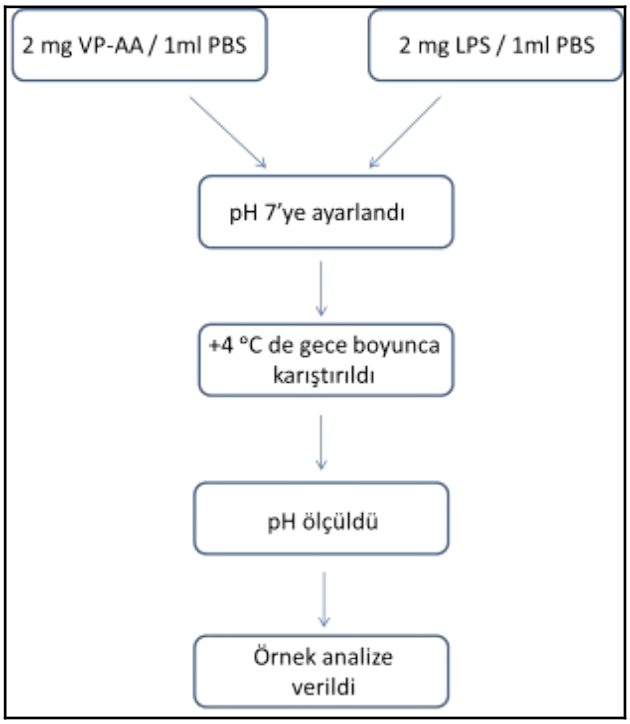
Başlatıcı oranı	**Deneyde kullanılan miktar (mg)**
Oran 0,1	31,8 mg
Oran 0,15	47,7 mg
Oran 0,2	63,6 mg
Oran 0,25	79,5 mg
Oran 0,3	95,4 mg

2.5.3 Komplekslerin Hazırlanması ve Konjugatların Sentezi

2.5.3.1 LPS ile komplekslerin hazırlanması

P(VP-co-AA)-LPS Fiziksel Kompleks Hazırlanması:

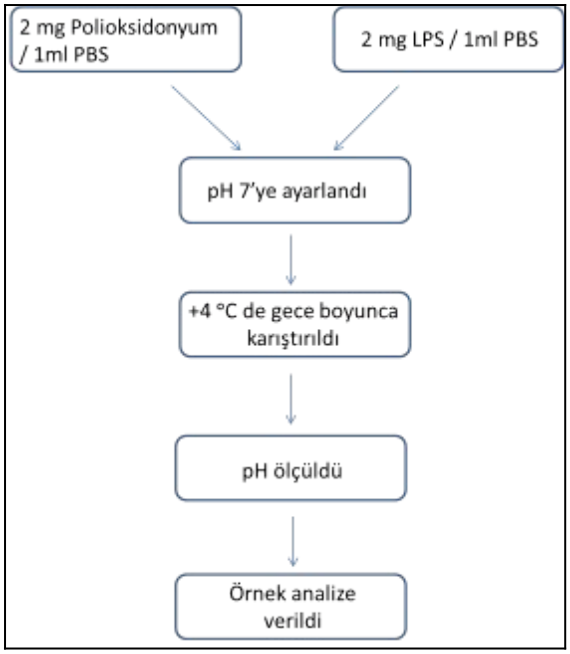
2 mg/ml P(VP-co-AA) ve 2 mg/ml LPS'nin PBS pH: 7 tamponundaki çözeltileri ile 1:1 oranında (bir gece karıştırılarak) fiziksel kompleks hazırlandı.



Şekil 3.15. P(VP-co-AA)-LPS Fiziksel Kompleks Hazırlanış Şeması

Polioksidonyum-LPS Fiziksel Kompleks Hazırlanması:

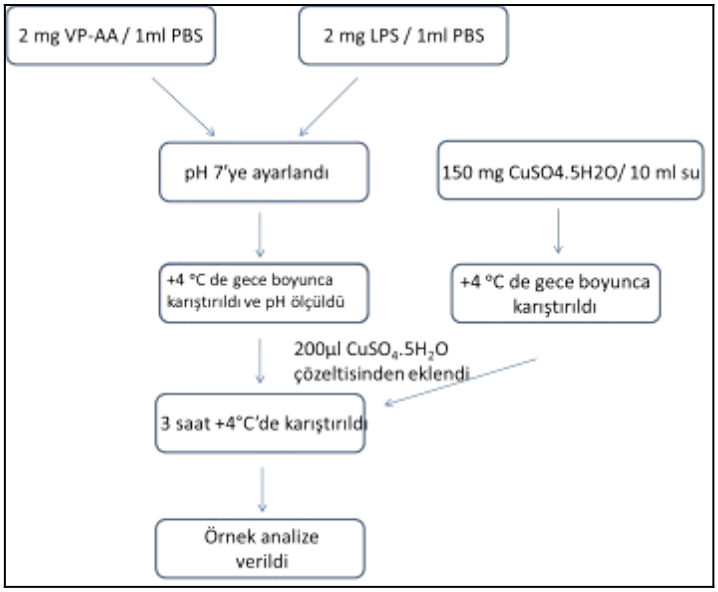
2 mg/ml Polioksidonyum ve 2 mg/ml LPS'nin PBS pH 7 tamponundaki çözeltileri ile 1:1 oranında 1 gece karıştırılarak fiziksel kompleks hazırlandı.



Şekil 3.16. Polioksidonyum-LPS Fiziksel Kompleks Hazırlanış Şeması

P(VP-co-AA)-Cu^{2+}-LPS komplekslerinin Hazırlanması:

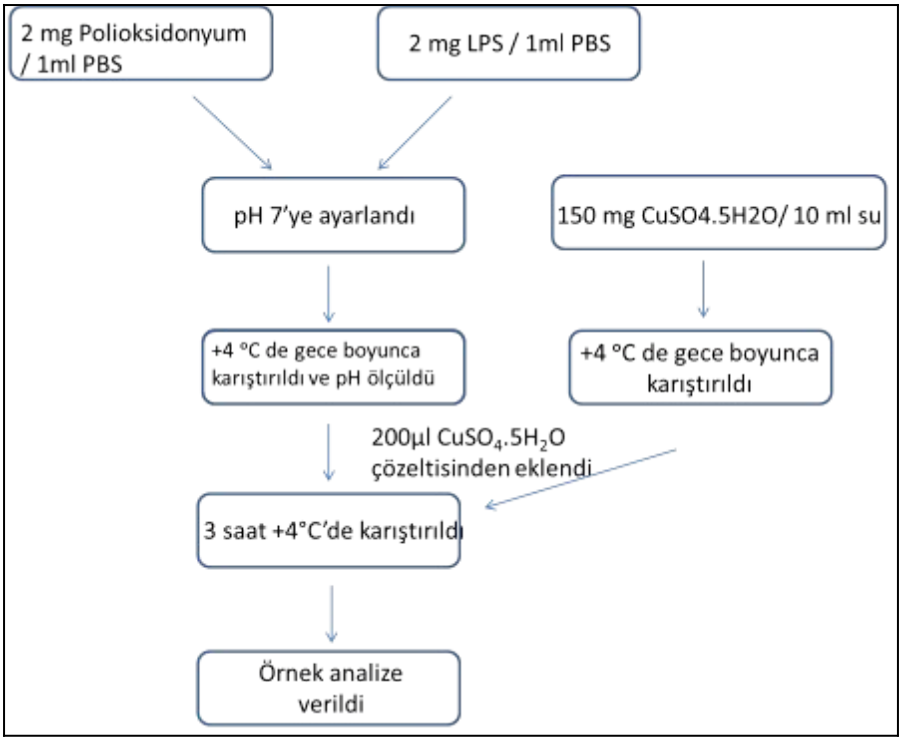
2 adet 2 mg/ml P(VP-co-AA) ve 2 mg/ml LPS'nin PBS pH 7 tamponundaki çözeltileri ile 1:1 oranında fiziksel kompleks hazırlandı ve 1 gece +4°C'de bekletildi. 150 mg $CuSO_4.5H_2O$ 10 ml suda çözülerek stok çözelti hazırlandı ve 1 gece +4°C'de bekletildi. Fiziksel komplekse 200 µl $CuSO_4.5H_2O$ stok çözeltisinden eklendi. 3 saat +4°C'de karıştırıldı. Literatürden faydalanılarak (Karahan, 2009; Karahan vd., 2010; Karahan vd., 2013; Karahan vd., 2014; Karahan vd., 2014) geçiş metallerle polimer-protein kompleksinin bağlanması ve yapı analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kompleksler deney hayvanlarına verilerek antikor seviyeleri tespit edilmiştir. Buna göre bu bakır geçiş metal kompleksleri çok daha stabil hem de deney hayvanlarında daha etkili olarak antikor seviyelerini kat kat arttırmıştır. Bu sebepten dolayı 2. kompleks bakır metalinin iki katı kullanılarak hazırlanmıştır. Sonuç olarak P(VP-co-AA)-Cu^{2+}-LPS-1 ve P(VP-co-AA)-Cu^{2+}-LPS-2 kompleksleri elde edilmiş ve analizleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3. 17. P(VP-co-AA)- Cu^{2+}-LPS komplekslerinin hazırlanış şeması

Polioksidonyum-Cu^{2+}-LPS kompleksleri Hazırlanması:

2 adet 2 mg/ml Polioksidonyum ve 2 mg/ml LPS'nin PBS pH 7 tamponundaki çözeltileri ile 1:1 oranında fiziksel kompleks hazırlandı ve 1 gece +4°C'de bekletildi. 150 mg $CuSO_4.5H_2O$ 10 ml suda çözülerek stok çözelti hazırlandı ve 1 gece +4°C'de bekletildi. Fiziksel komplekse 100 µl $CuSO_4.5H_2O$ (P(VP-co-AA) polimerine oranla daha az bakır metali kullanmamızın sebebi, bakır metallerinin çözeltide çökmesi) stok çözeltisinden eklendi. 3 saat +4°C'de karıştırıldı (Karahan, 2009; Karahan vd., 2010; Karahan vd., 2013; Karahan vd., 2014; Karahan vd., 2014). P(VP-co-AA) polimerinde hazırladığımız gibi iki kat daha fazla miktarda bakır kullanılarak 2. Kompleks hazırlanmıştır.

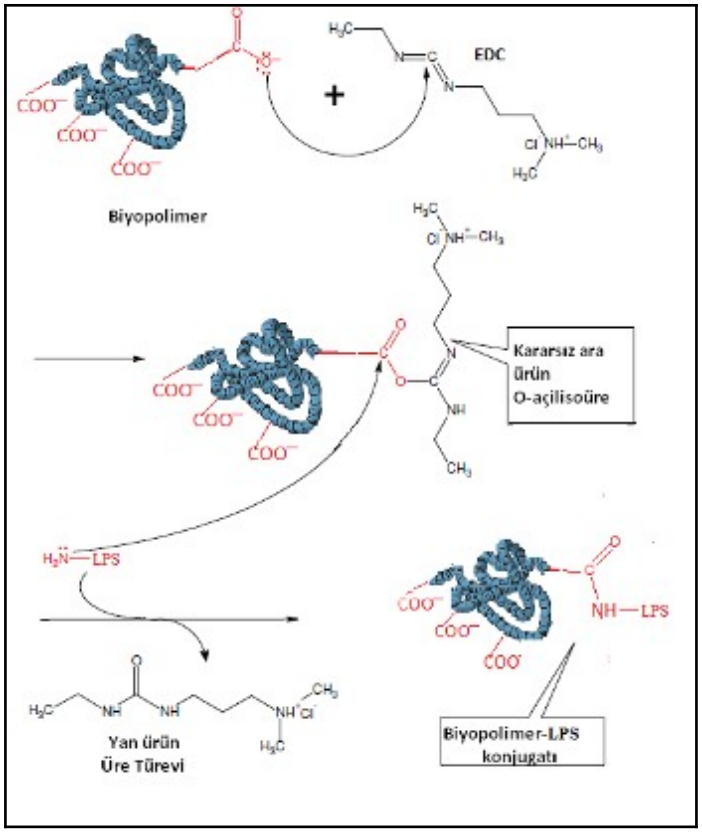


Şekil 3. 18. Polioksidonyum-Cu^{2+}-LPS komplekslerinin hazırlanış şeması

2.5.3.2 Konjugatların Oluşturulması

EDC Kullanılarak Konjugatların oluşturulması

Bu yöntemle konjugatların oluşturulması için öncelikle LPS'nin OH gruplarının NH_2'ye modifiye edilmesi gerekmektedir. Bu aşama 2 adımdan oluşmaktadır. İlk olarak sodyum periyodat ile LPS' nin aldehit türevi oluşturulmakta ve 2. Adımda etilendiamin ve sodyumborhidrür ile NH_2 gruplarının eklenmesi ve Schiff baz indirgenmesi ile gerçekleştirilir. NH_2-LPS oluşturulduktan sonra Biyopolimer-LPS konjugatları EDC çapraz bağlayıcısı kullanılarak sentezlenmiştir. EDC kullanılarak gerçekleştirilen biyopolimer-LPS konjugatının şeması Şekil 3.18'de gösterilmiştir.

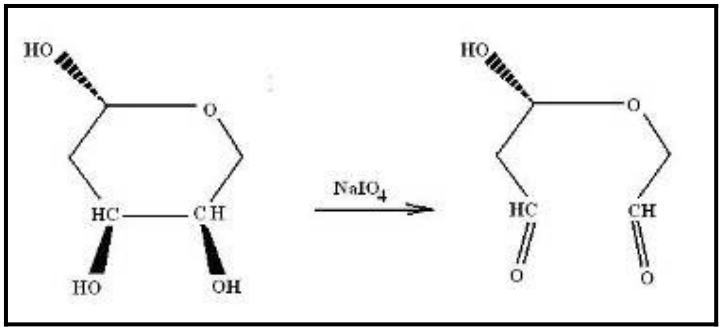


Şekil 3.19. EDC kullanılarak gerçekleştirilen biyopolimer-LPS konjugatının şeması (Arayıcı-Pelit vd., 2017)

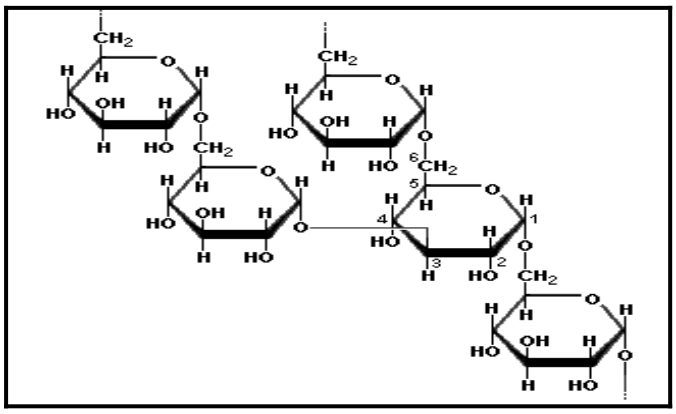
LPS'de bulunan Kısım –OH gruplarının -NH_2 grubuna dönüştürülerek modifiye edilmesi:

İlk Adımda: LPS nin $NaIO_4$ ile oksidasyonu: Karbon-Karbon Bağlarının kırılarak aldehit türevinin oluşturulması sağlanır.

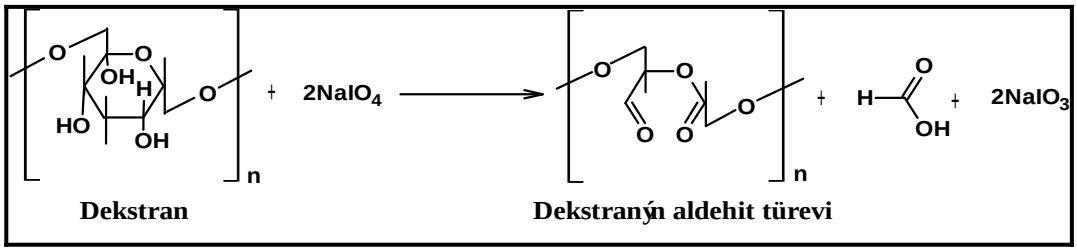
Bu amaçla elimizde bulunan LPS'nin miktarının azlığı sebebiyle ilk olarak yine bir polisakkarit olan Dekstran molekülü üzerinde denemeler yapılarak yöntem denenmiş ve geliştirilmiştir. Dekstran doğada bulunabilen, biyobozunur, inert ve toksik özelliği olmayan bir polimerdir. Bu özelliklerinden dolayı dekstran ve türevleri biyolojik birçok uygulamada kullanılmaktadır. Periyodat oksidayonu, şeker rezidülerinin göreceli olarak reaktif olmayan hidroksil gruplarını amin grupları ile reaksiyona girebilecek aldehit gruplarına dönüştürmede kullanılabilecek yöntemlerden biridir. Periyodat, ardışık hidroksil grubu taşıyan C-C bağlarını kırmaktadır ve –OH gruplarını yükseltgeyerek yüksek oranda reaktif aldehit grupları oluşturmaktadır.



Şekil 3. 20. Ardışık hidroksil gruplarının periyodat oksidasyonu ile aldehit gruplarına dönüştürülmesi (Kılınç, 2013)



Şekil 3. 21. Dekstran yapısı

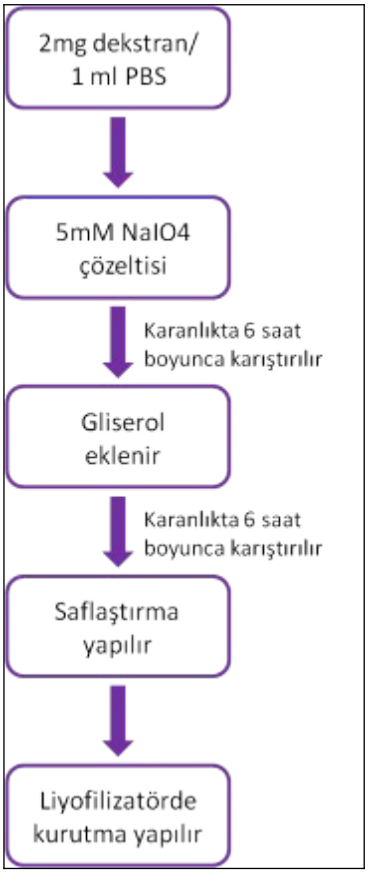


Şekil 3. 22. Dekstran aldehit türevinin oluşumu (Altikatoglu vd., 2009)

Dekstran aldehit türevinin oluşumu

Reaksiyon şeması yukarıda gösterilen Dekstran-Aldehit türevinin eldesi literatürde belirtildiği şekilde yapıldı (Altikatoğlu vd., 2009; Hermanson, 2013; Kılınç, 2013). 5 adet 2 mg dekstran 1 ml PBS pH 7'de çözüldü. 2 mM, 5 mM, 10 mM, 500 mM ve 1000 mM $NaIO_4$ (Sodyum periyodat) dekstran çözeltilerinin üzerine yavaş yavaş ve karıştırılarak eklendi (ışıktan korunarak). Elde edilen bu çözelti oda sıcaklığında ve karanlıkta 6 saat karıştırıldı. Reaksiyonun sönümlenmesi için çözelti ml'si başına 0,1ml gliserol eklendi ve oda sıcaklığında ve karanlıkta 6 saat karıştırıldı. Membranlı (MWCO 10kDa) santrifüj tüpünde saf

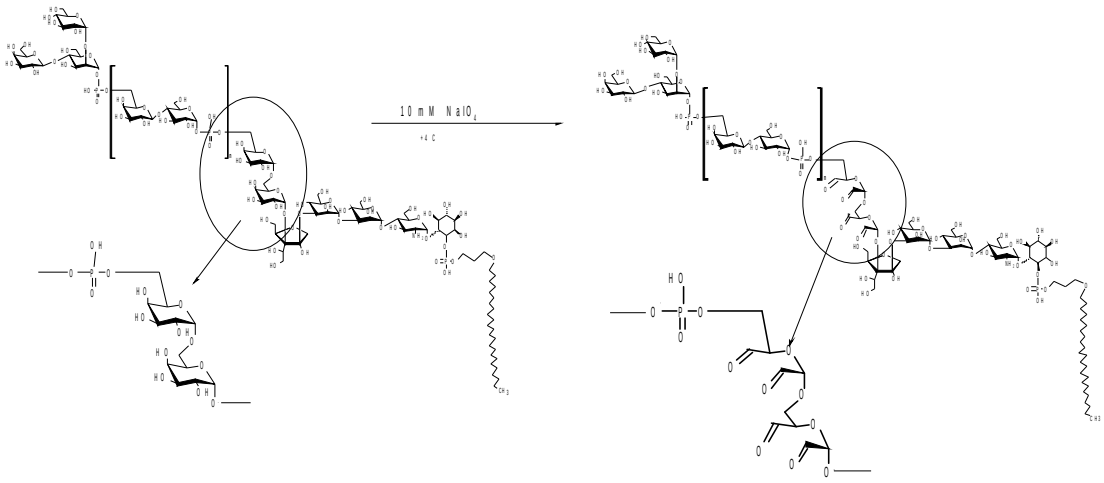
su ile 6000 rpm'de 10 dak. olacak şekilde 2 kez yıkama yapılarak saflaştırma yapıldı. Liyofilizatörde kurutma yapıldı.



Şekil 3. 23. Dekstran aldehit türevinin oluşumuna ait hazırlanış şeması

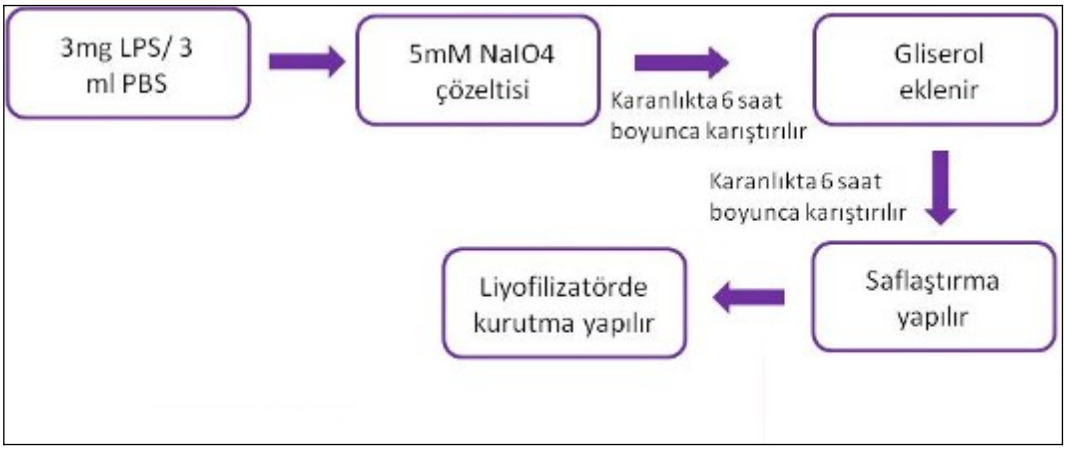
LPS'nin aldehit türevinin oluşumu

Oksidasyon mekanizması aşağıda gösterilen LPS-Aldehit türevinin eldesi için literatürde belirtildiği şekilde yapıldı (Hermanson, 2013). 3 mg LPS 3 ml PBS (pH 7)'de çözüldü. 5mM, $NaIO_4$ (Sodyum periyodat) LPS çözeltisinin üzerine yavaş yavaş ve karıştırılarak eklendi (ışıktan korunarak). Elde edilen bu çözelti oda sıcaklığında ve karanlıkta 6 saat karıştırıldı. Reaksiyonun sönümlenmesi için çözelti ml'si başına 0,1ml gliserol eklendi ve oda sıcaklığında ve karanlıkta 6 saat karıştırıldı. Membranlı (MWCO 10kDa) santrifüj tüpünde saf su ile 6000 rpm'de 10 dak. olacak şekilde 2 kez yıkama yapılarak saflaştırma yapıldı. Liyofilizatörde kurutma yapıldı.



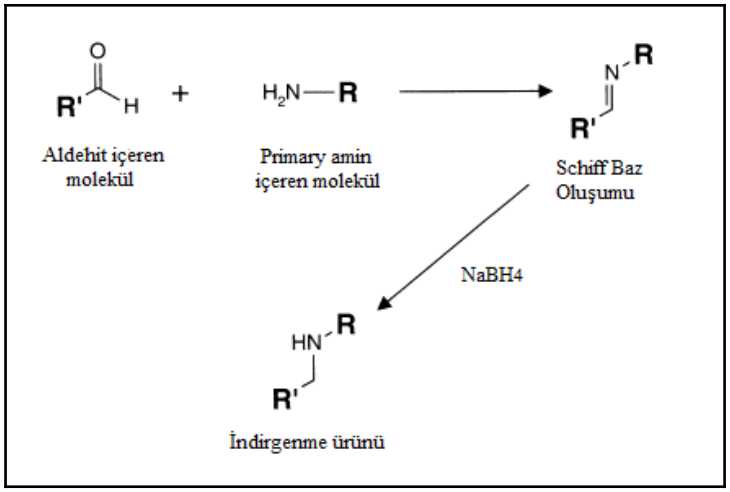
(HO-LPS) (C-C bağlarının kırılarak Aldehid türevinin oluşumu)

Şekil 3. 24. LPS nin $NaIO_4$ ile oksidasyon mekanizması

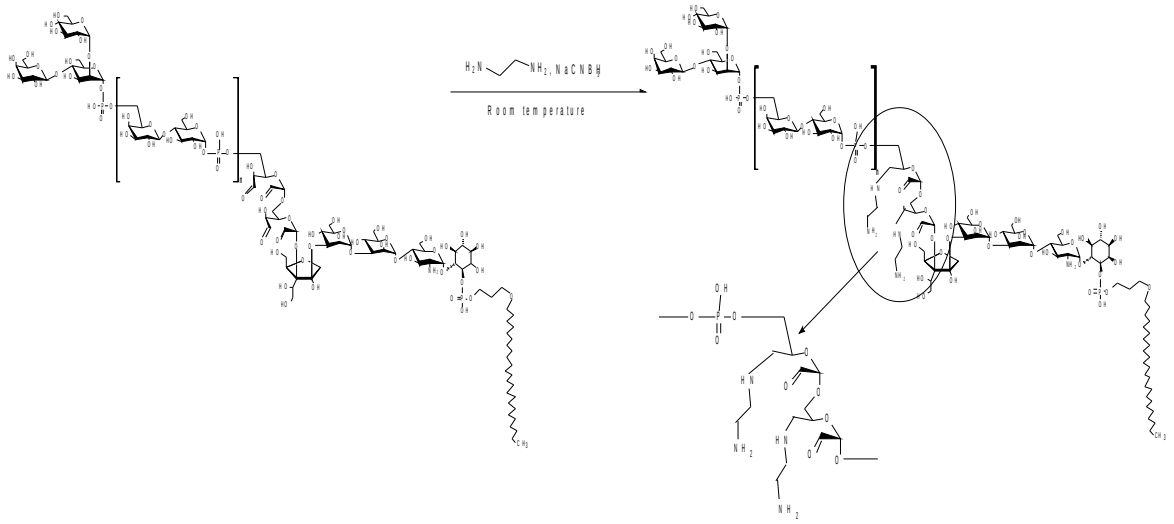


Şekil 3. 25. Lipopolisakkaritin aldehit türevinin oluşumuna ait hazırlanış şeması

2. Adım: LPS'nin Amin türevlerinin oluşturulması: (NH_2-CH_2-CH_2-NH_2 ve $NaBH_4$ ile)

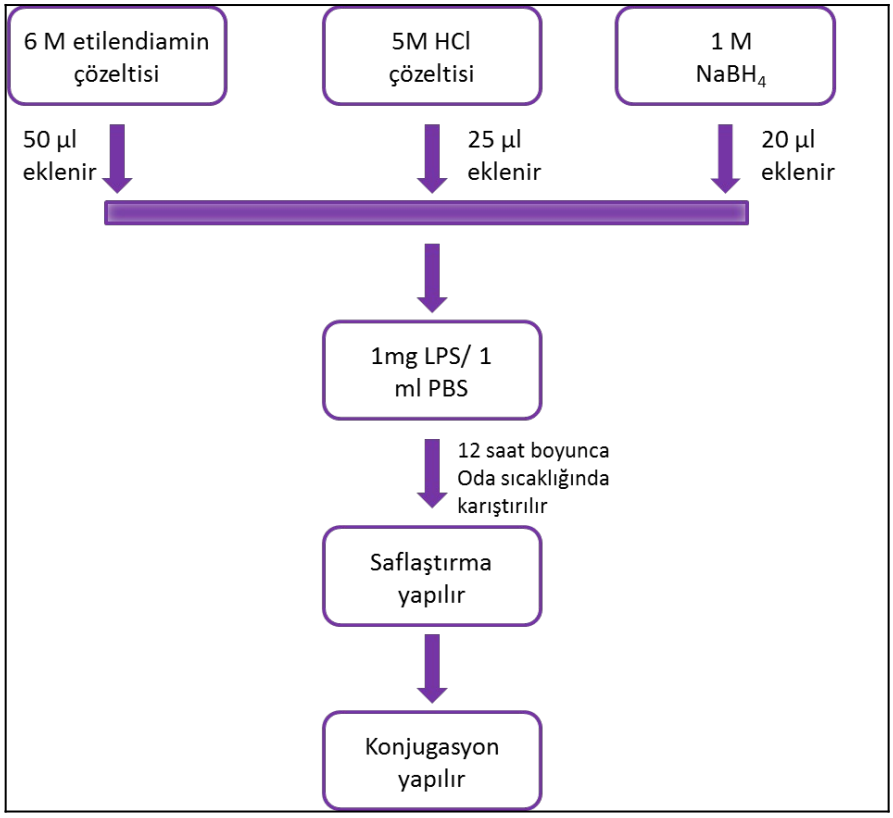


Şekil 3. 26. Aldehit içeren moleküllerin amin türevlerinin oluşturulmasına ait genel mekanizması



Şekil 3. 27. Amin türevlerinin oluşturulmasına ait reaksiyon mekanizması

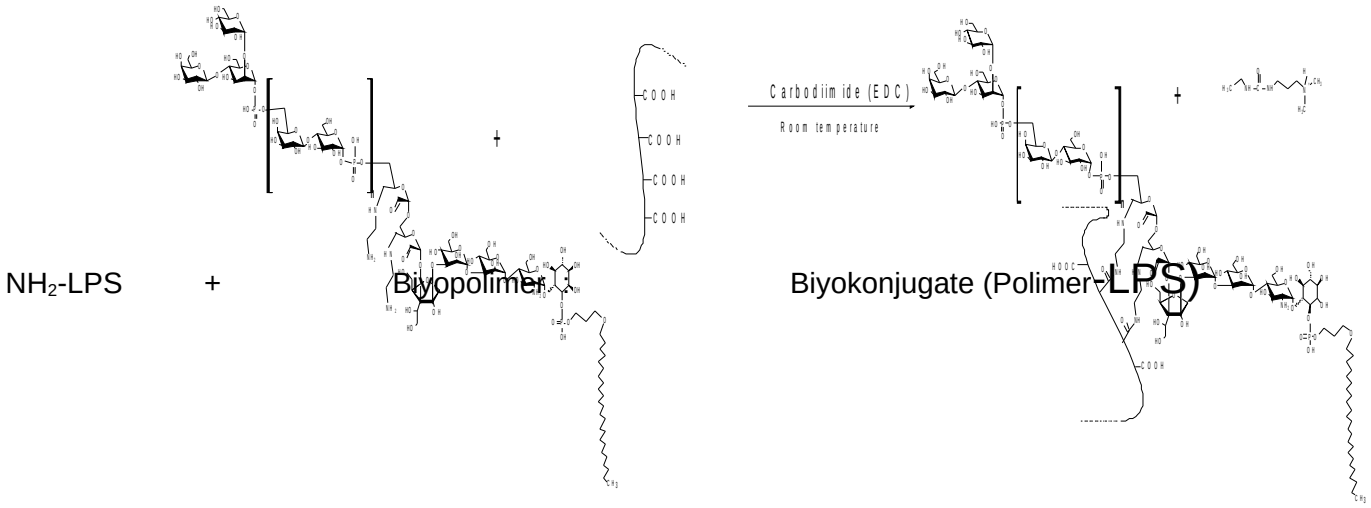
Literatürden faydalanılarak LPS'nin amin türevlerinin oluşturulmasında 1mg LPS-aldehit/1ml PBS (pH=7) çözeltisi hazırlanır ve 2 saat karıştırılır (Hermanson, 2013). 50 µl 6M etilendiamin çözeltisi, 25 µl 5 M HCl çözeltisi ve 20 µl 1 M sodyum borhidrür ($NaBH_4$) çözeltisi LPS-aldehit çözeltisine ilave edilerek 12 saat oda sıcaklığında karıştırılır. Membranlı (MWCO 10kDa) santrifüj tüpünde PBS pH 7,2 tamponu ile 6000 rpm'de 5 dak. olacak şekilde 3 kez yıkanarak saflaştırma yapıldı.



Şekil 3. 28. LPS'nin amin türevlerinin oluşturulmasına ait hazırlanış şeması

NH_2-LPS'nin Biyopolimerle Konjugasyonu

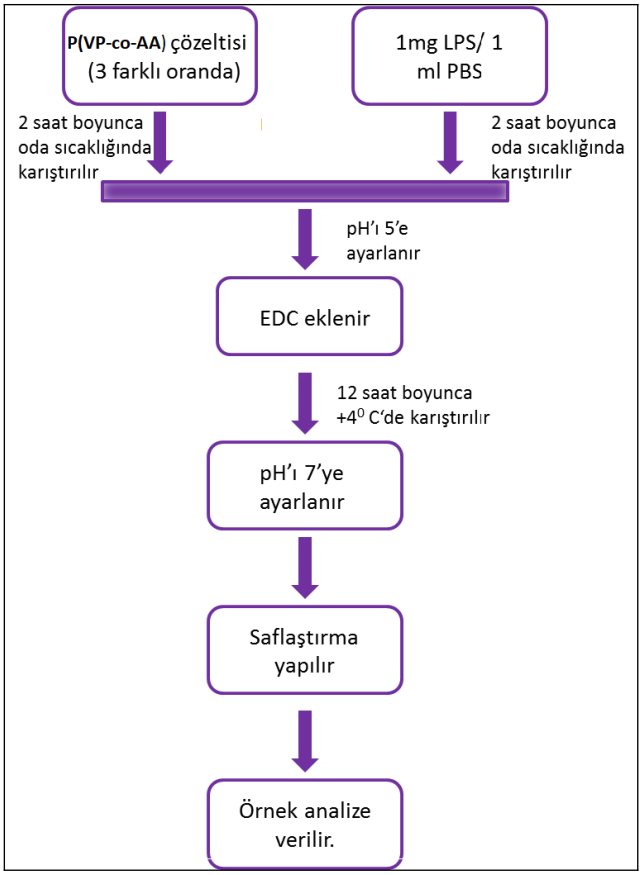
Proje çerçevesinde, Hidroksil grupları NH_2'ye modifiye edilmiş LPS'nin POX ve P(VP-co-AA) polimerleri ile EDC çapraz bağlayıcısı varlığında biyokonjugatları sentezlenmiştir.



Şekil 3. 29. NH_2-LPS'nin Biyopolimerle Konjugasyonuna ait reaksiyon mekanizması

NH_2-LPS'nin P(VP-co-AA) ile Konjugasyonu

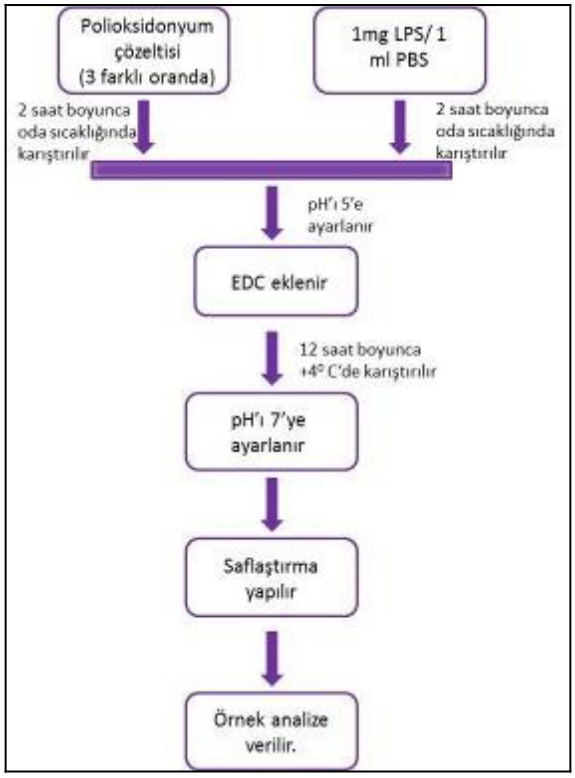
OH grupları NH_2'ye modifiye edilmiş LPS (NH_2-LPS) ve P(VP-co-AA) polimerinin EDC çapraz bağlama reaktifi kullanılarak Polimer/ LPS oranları 0,5; 1 ve 2 olacak şekilde polimerin artan oranlarında 3 adet konjugatı sentezlenmiştir. Bunun için, polimer stok çözeltileri hazırlandı ve örnekler 2 saat karıştırıldı. Polimer çözeltisi ve NH_2-LPS çözeltisi karıştırılarak 2 saat daha karıştırıldı. Karışımın pH'ı 5'e düşürüldü ve aktivasyon amacıyla EDC eklendi. 4 ^{o}C'de gece boyunca karıştırıldı ve pH 7,2 'ye ayarlandı. Membranlı (MWCO 10kDa) santrifüj tüpünde PBS pH 7,2 tamponu ile 6000 rpm'de 5 dak. olacak şekilde 3 kez yıkanarak saflaştırma yapıldı ve örnek analize verildi.



Şekil 3. 30. NH_2-LPS'nin P(VP-co-AA) ile Konjugasyonunun hazırlanış şeması

NH_2-LPS'nin Polioksidonyum ile Konjugasyonu

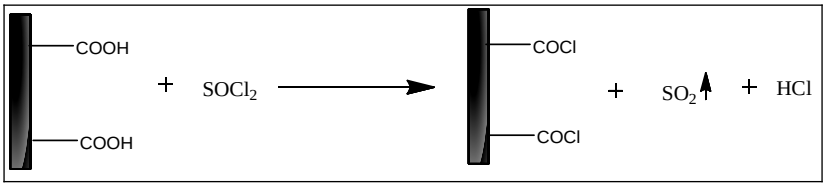
-OH grupları NH_2'ye modifiye edilmiş LPS (NH_2-LPS) ve Polioksidonyum (POX) polimerinin EDC çapraz bağlama reaktifi kullanılarak Polimer/ LPS oranları 0,5; 1 ve 2 olacak şekilde polimerin artan oranlarında 3 adet konjugatı sentezlenmiştir. Polimer stok çözeltileri hazırlandı ve örnekler 2 saat karıştırıldı. Polimer çözeltisi ve NH_2-LPS çözeltisi karıştırılarak 2 saat daha karıştırıldı. Karışımın pH'ı 5'e düşürüldü ve aktivasyon amacıyla EDC eklendi. 4 ^{o}C'de gece boyunca karıştırıldı ve pH 7'ye ayarlandı. Membranlı (MWCO 10kDa) santrifüj tüpünde PBS pH 7,2 tamponu ile 6000 rpm'de 5 dak. olacak şekilde 3 kez yıkanarak saflaştırma yapıldı ve örnek analize verildi.



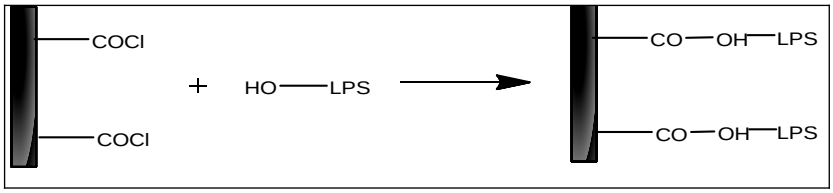
Şekil 3. 31. NH_2-LPS'nin POX ile Konjugasyonunun Hazırlanış şeması

T iyonil Klorür Yöntemi ile Konjugasyon

Tiyanülklorür yöntemi: PAA tiyanül klorür ile muamele edilerek Kloranhidridin elde edilir.



Elde edilen kloranhidridin LPS ile reaksiyona girerek biyokonjugatı oluştururuz.



* Reaksiyonun SO_2 ayrılması ile gitmesi konjugat sentezinin tek bir aşama ile elde edilmesini sağlar.

Projemizin B planında yer alan $SOCl_2$ yöntemi de B planında bahsedilen poliakrilik asit (PAA) yerine tarafımızca sentezlenen yine yapısında akrilik asit bulunan P(VP-co-AA) polimeri ile

yaparak, gelecek dönemdeki hayvan deneyleri için kıyaslama yapmanın daha doğru olacağı kanısına vararak B planımızı uyguladık.

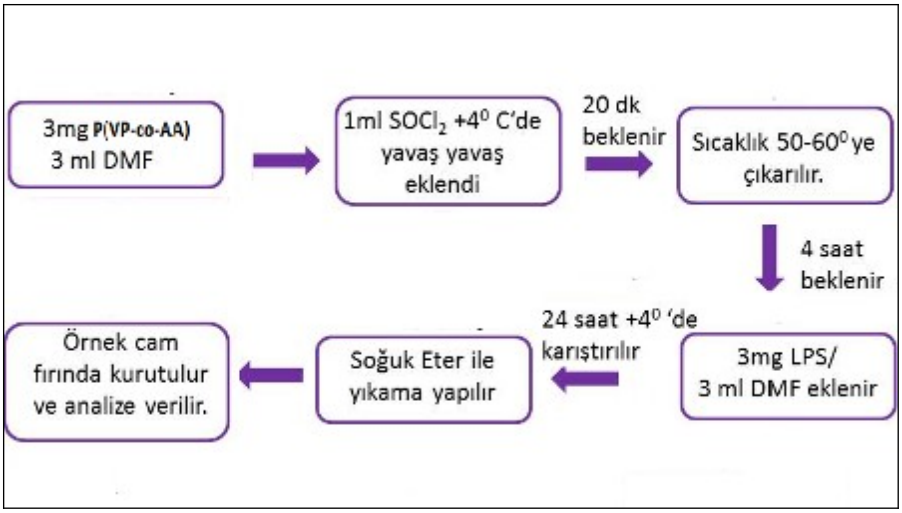
Polimerlerin çözünebilmesi için uygun organik çözücünün belirlenmesi amacıyla denemeler gerçekleştirilmiştir. Polimerler için DMF (Dimetilformamid), THF (Tetrahidrofuran), DMSO (Dimetil sülfoksit) ve Kloroform çözücüleri denendi. P(VP-co-AA) polimeri DMF'te çözünürken Polioksidonyum polimeri denediğimiz organik çözücülerde çözünmemiştir. Bu sebeple çalışmalarımızda $SOCl_2$ yöntemini kullanarak LPS-P(VP-co-AA) konjugatı gerçekleştirilirken, aynı yöntem Polioksidonyum için yapılamamıştır.

Tablo 3. 4. Polimerin 4 farklı organik çözücüdeki çözünürlük durumları

Polimer	**Çözücüler**			
	DMF	**THF**	**DMSO**	**Kloroform**
P(VP-co-AA)	✓	✘	✘	✘
Polioksidonyum (POX)	✘	✘	✘	✘

LPS-P(VP-co-AA) konjugatlarının $SOCl_2$ yöntemi ile Konjugasyonu

3 mg P(VP-co-AA) 3 ml DMF içerisinde çözündürülerek 2 saat karıştırılıp, üç boyunlu dibi yuvarlak şilifli reaksiyon kabına kondu. Reaksiyon kabının geniş boynuna geri soğutucu, dar boyunlarından birine şilifli termometre ve diğer boynu da sıkıca tıpa ile kapatılıp, 1 ml (0,015 mol) $SOCl_2$ +4 ^{o}C'de (dakikada bir damla olacak şekilde) eklendi. Bir süre karıştırıldıktan sonra 50-60 $^{\circ}$C'de 4 saat karıştırılır ve karbonil gruplarının klorlanması sağlanır. 3 mg LPS 3 ml DMF içinde çözündürülerek reaksiyon ortamına eklenir. 24 saat +4 ^{o}C'de karıştırılarak reaksiyon tamamlanarak, soğuk eter ile 3 kez yıkama yapıldı. Cam fırında oda sıcaklığında vakum ile kurutma yapılıp ve örnek analize verildi (Mustafaev vd., 2002; Tuğlu, 2012).



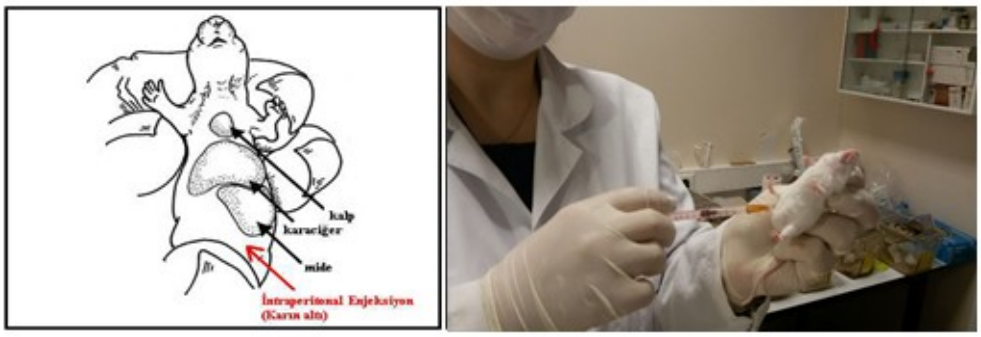
Şekil 3. 32. LPS-P(VP-co-AA) konjugatının $SOCl_2$ yöntemi ile Konjugasyon Hazırlanış Şeması

2.5.4 Hayvan Deneyleri

İmmünojenik ve Aşı Özelliği Taşıyabilen Suda Çözünebilen Farklı Polimer-LPS İkili, Üçlü Komplekslerinin ve konjugatlarının Balb/c Farelere enjekte edilmesi çalışmamızda TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü Transgen ve Deney Hayvanları laboratuvarında temin edilen 56 adet 8 haftalık 28-32 gr ağırlığında erkek Balb/c türü fare kullanıldı.

Şekil 3. 33. Balb/c türü farelerimiz

Enjeksiyon işlemi, eter anestezisi altında intraperitonal olarak 0,5 ml örnek enjeksiyonu ile gerçekleştirildi.



Şekil 3. 34. Balb/c fareye karınaltından enjeksiyon yapışımız

Bakır iyonları ve EDC çapraz bağlayıcısı varlığında sentezlenen biyokompleks ve biyokonjugatların enjekte edildiği gruplar ve kontrol grupları ile beraber deney hayvanları her bir grupta 3, 4 veya 5 tane Balb/c (Tübitak'taki Uzman görüşüyle sayılar belirlendi) olmak üzere 15 gruba ayrıldı. Fareler kulaklarından işaretlendi. (SAK: Sağ kulağı işaretlenen, SOK: Sol kulağı işaretlenen, NK: iki kulağı da işaretlenmeyen, SSK: hem sağ kulağı hem sol kulağı işaretlenen, SAKV: Sağ kulağı V şeklinde işaretlenen)

Aşağıdaki tabloda kafes numaraları, her kafeste bulunan fare sayısı ve enjekte edilen maddenin içeriği belirtilmiştir. Kafeslerle ilgili varsa özel durumlar, ELİSA yanıtları verilirken bahsedilecektir.

Tablo 3. 5. Kafes numaraları, fare sayıları ve enjekte edilen maddenin içeriği

Kafes No	Balb/c Fare Sayısı	Enjekte edilen madde içeriği
Kafes 1	3	100 µg LPS
Kafes 2	3	100 µg P(VP-co-AA)
Kafes 3	3	100 µg POX
Kafes 4	3	100 µg LPS+ 200 µl Freund's Adj
Kafes 5	4	100 µg LPS-100 µg P(VP-co-AA) içeren Fiz.Kompleks
Kafes 6	4	100 µg LPS-100 µg P(VP-co-AA) içeren Fiz. Kompleks

Kafes 7	3	100 µg LPS-100 µg P(VP-co-AA), 13 µl $CuSO_4.5H_20$ çözeltisi (150mg/10ml saf su) içeren LPS-Cu^{2+}- P(VP-co-AA) Kompleksi
Kafes 11	4	100 µg LPS-100 µg POX ve 13 µl $CuSO_4.5H_20$ çözeltisi (150mg/10ml saf su) içeren LPS-Cu^{2+}-POX Kompleksi
Kafes 12	3	100 µg LPS-100 µg POX ve 6 µl $CuSO_4.5H_20$ çözeltisi (150mg/10ml saf su) içeren LPS-Cu^{2+}-POX Kompleksi
Kafes 13	5	LPS- P(VP-co-AA) Konjugatı+ Freund's Adj (200 µg LPS-100 µg P(VP-co-AA) + 200µl incomplete Freund's Adj.)
Kafes 14	4	LPS- P(VP-co-AA) Kojugatı (100 µg LPS-100 µg P(VP-co-AA) içeren)
Kafes 15	4	LPS- P(VP-co-AA) Konjugatı (200 µg LPS-100 µg P(VP-co-AA) içeren)
Kafes 17	4	LPS-BSA Konjugatı (100 µg LPS-100 µg BSA içeren)
Kafes 18	4	LPS-POX konjugatı n=1 oranı (100 µg LPS-100 µg POX içeren)
Kafes 19	4	LPS-Cu^{2+}- P(VP-co-AA) Kompleksi 100 µg LPS-100 µg P(VP-co-AA), 6 µl $CuSO_4.5H_20$ çözeltisi (150mg/10ml saf su) içeren LPS-Cu^{2+}- P(VP-co-AA) Kompleksi

2.5.4.1 Fare Serumlarının alınması

Eter anestezisi altında kuyruk ucu kesilerek belirli bir periyot içinde 7 defa kan alındı. 10 µl sodyum sitrat içeren eppendorflara alınan kan örnekleri 10000 rpm devirde 45 saniye

santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üst fazdan 10 µl serum dikkatlice alınarak örnekler kanda antikor miktar tayin işlemi yapılana kadar -20 °C'de saklandı.

Şekil 3. 35. Yapmış olduğumuz fare serumlarının alınması ve serumlarının ayrıldığı santrifüj aşamaları işlemleri

2.5.5 ELİSA Deneyleri

2.5.5.1 ELİSA Kaplamada kullanılması için gerçekleştirilen Konjugatlar

ELİSA platelerin kaplanması amacıyla literatür de incelenerek kaplama amacıyla LPS tek başına ve LPS-BSA konjugatları oluşturularak denemeler yapılmıştır (Kováčová vd., 2005; Slabá vd., 2005; Nalbantsoy vd., 2010; Kızılbey, 2012; Tuğlu, 2012). LPS-BSA konjugatlarının verimli şekilde oluşturulması için 3 adet farklı yöntemle konjugatlar sentezlenmiştir ve GPC ile karakterizasyonu yapılmıştır.

Konjugatların hazırlanmasında kullanılan 3 yöntem aşağıda belirtilmektedir.

1. Yöntemde:

Literatürde belirtildiği gibi (Mustafaev vd., 2002) karbodiimid methodu ile gerçekleştirimiştir. BSA (4 mg) 1-ethyl-3-(3dimethylaminopropyl) carbodiimide ile pH 5'de aktive edilmiştir. Karışım +4 ^{o}C'de 2 saat karıştırılmıştır. LPS (4mg) PBS de çözündürülerek BSA-EDC karşımına eklenmiştir ve 2 saat +4 °C'de karıştırılmıştır. pH' ı 7,2 ye ayarlanan konjugat membranlı (MWCO 10kDa) santrifüj tüpünde saf su ile 6000 rpm'de 5 dak. olacak şekilde 2 kez ve sonrasında PBS pH 7,2 tamponu ile 2 kez daha yıkama yapılarak saflaştırıldıktan sonra liyofilizatörde kurutulmuştur.

2. Yöntemde:

Literatüre göre (Altikatoglu vd., 2009; Altikatoglu vd., 2010; Kılınç, 2013) 4 mg LPS / 2 ml destile su çözeltisi hazırlandı. Son konsantrasyonu 5 mMol olacak şekilde sodyum periyodat $NaIO_4$ çözeltisi LPS 'nin üzerine yavaş yavaş ve ışıktan korunarak eklendi. Elde edilen çözelti oda sıcaklığında ve karanlıkta 24 saat karıştırıldı. Reasiyon çözeltisi membranlı santrifüj tüpü ile saflaştırıldı, 4 kez saf su ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Liyofilizatörle kurutma sağlanarak katı LPS-aldehit türevi elde edildi. 2 mg LPS / 1 ml $NaHCO_3$ çözeltisi ve 2 mg BSA / ml $NaHCO_3$ çözeltisi hazırlandı. Oda sıcaklığında 16 saat boyunca karıştırıldı. +4ºC'de 5 mMol $NaBH_4$ çözeltisi eklenerek 15 dak. karıştırıldı, tekrar 5 mMol $NaBH_4$ eklendi ve 15 dak. daha karıştırılarak membranlı (MWCO 10kDa) santrifüj tüpünde saf su ile 6000 rpm'de 5 dak. olacak şekilde 2 kez ve sonrasında PBS pH 7,2 tamponu ile 2 kez daha yıkama yapılarak saflaştırma yapıldı. Elde edilen konjugat liyofilizatörde kurutuldu.

3. Yöntemde:

Literatürden faydalanılarak (Wu vd., 2015); Sodyum periyodat ($NaIO_4$) çözeltisini son konsantrasyonu 5 mMol ve LPS 2 mg / ml olacak şekilde 2 saat karıştırıldı. 2 mg / ml BSA çözeltisi 0.05 M karbonat tamponunda pH 9,6'da oda sıcaklığında 1 gece karıştırıldı. 200 µl $NaBH_4$ (5mg / ml) reaksiyon ortamına eklendi ve 2 saat +4°C'de karıştırıldı, pH'ı 7,2'ye getirildi. Konjugat membranlı (MWCO 10kDa) santrifüj tüpünde saf su ile 6000 rpm'de 5 dak. olacak şekilde 2 kez ve sonrasında PBS pH 7,2 tamponu ile 2 kez daha yıkama yapılarak saflaştırma yapıldı. Elde edilen konjugat liyofilizatörde kurutuldu.

2.5.5.2 ELİSA platelerinin LPS Kaplanmasında Standardizasyon çalışması

Kaplanacak LPS miktarının standardizasyonu açısından; 400 ng, 300 ng, 200 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 10 ng olmak üzere 7 miktar denenmiştir. Farklı miktarda LPS ile kaplanan kuyulara 7. Kafes NK faresinin serumu 1:500 dilüe ederek eklenmiştir.

2.5.5.3 ELİSA Deneyinin Yapılışı:

96 kuyu içeren ELİSA plağı (Nunc, Maxisorp) her kuyuya 0,2 µg LPS içerecek şekilde 100µl olarak kuyulara eklendi. Antijen ile kaplanan ELİSA plakları gece boyu +4 °C'de bekletildi. Kuyular % 0,05 Tween 20 ihtiva eden 0,5 M PBS pH 7 yıkama tamponu ile 3 defa yıkandı. ELİSA plaklarındaki herbir kuyuya 12 yollu otomatik pipet yardımıyla %1'lik 380 µl süt tozu çözeltisi eklendi. ELİSA plakası 37 °C sıcaklığında etüvde 1 saat bekledi ve 0,05 Tween20 ihtiva eden PBS yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı. Farelerden alınan serumlar 1:50 ve 1:100 oranında dilüsyonları yapıldı. Her bir kuyuya 1:50 ve 1:100 oranında dilüsyonları yapılan

serum örnekleri 100 µl olarak eklendi. ELİSA plakası +4 °C'de 2 saat bekledi. ELİSA plakası 0,05 Tween20 ihtiva eden PBS yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı. Antimouse polivalent immünoglobulin alkalin fosfataz 1:2000 oranında dilüe edilerek 100 µl her bir kuyuya eklendi. ELİSA plakası 1 saat 37 °C'de etüvde bekletildi. ELİSA plakası 0,05 Tween20 ihtiva eden PBS yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı. %0,1 Paranitrofenil fostat (PNFP) substrat çözeltisi eklendi. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 45 dak. ve 1 saat ölçümleri ELİSA plak okuyucu aletinde A_{405nm} dalga boyunda okundu. Raporda belirtilen ELİSA sonuçlarında 1 saatlik sonuçlar üzerinden tartışılmıştır. Sırasıyla 10, 20, 30, 37, 44, 51 ve 58. günlerde olmak üzere 7 kez ELİSA okuma gerçekleştirilmiştir.

2.5.6 Hücre Kültürü ve Hibridoma Çalışmaları ile Monoklonal Antikor Eldesi

2.5.6.1 Sıvı Azottaki Hücrelerin Kültür Şişelerine Aktarımı;

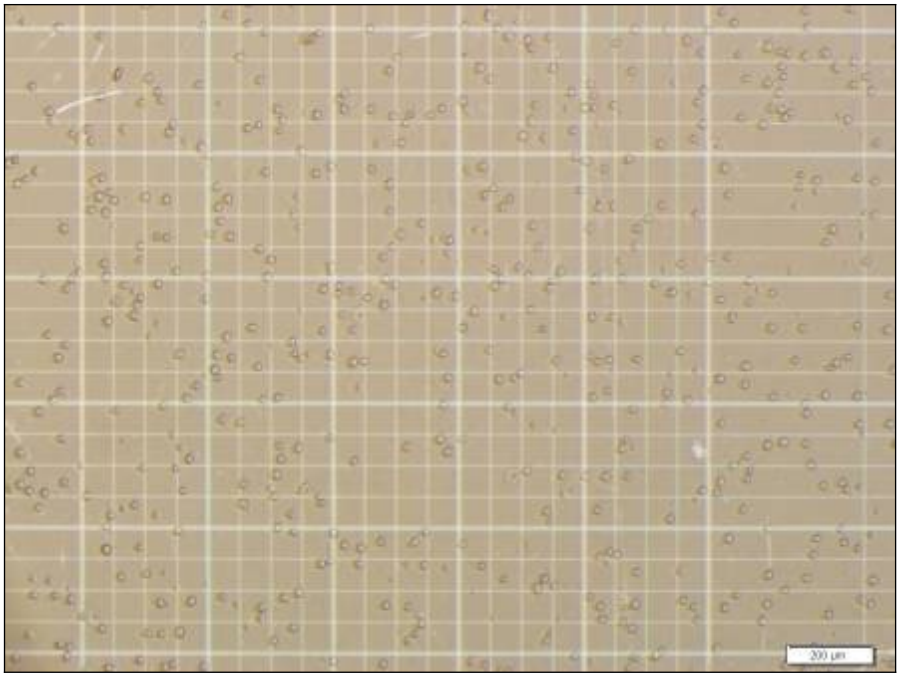
Hücreler 37°C sıcaklıkta çözülerek PBS tamponu içerisinde 900 rpm'de 10 dak. santrifüj edildi. Hücreler 2 kez bu şekilde yıkandıktan sonra, çöken hücreler normal besi yerine alınarak kültür şişelerine aktarıldı.

2.5.6.2 Hücrelerin Sayımı

Bir hücre süspansiyonunun konsantrasyonu, hücrelerin hemositometre (HS) adı verilen optik olarak düz bir hazneye konularak, binoküler, faz kontrast (ışığı ayarlanabilen) mikroskop altında sayılması ile belirlenir. Bu amaçla Hemositometrenin yüzeyi %70 Etil alkol ile temizlendi ve üzerine lamel yerleştirildi. Bir tüpe 10 µl trypan blue, üzerine 10 µl sayım yapılacak örnek ilave edildi. Hemositometre üzerine karışımdan 10 µl alındı. Örneğin hazneden taşmamasına ve boş alan kalmamasına dikkat edildi. 10X objektif ile hazne üzerindeki grid çizgilerine odaklanarak 1 mm^2'lik alandaki 25 kareye düşen hücreler sayıldı. Aşağıda belirtilen formülden hücre sayısı belirlendi.

Formül;

10^4(Sabit katsayı) X Hücre Hacmi (ml) X Sayılan Hücre Miktarı= Toplam Hücre Sayısı



Şekil 3. 36. Myeloma hücrelerinin sayımının mikroskop görüntüsü

2.5.6.3 Hücrelerin Pasajı

Kullanılan myeloma hücreleri, kültür şişelerinde zemine yapışma özelliğinde olan hücrelerdir. Pasaj yaparken ilk işlemde hücreler bulunduğu besi ortamından alındı. Sonra 5 ml PBS, kültür şişesine alındı ve şişe 5 dak. sallandı. Gerektiği kısımlarda steril bir pipet yardımı ile hücreler şişenin yüzeyinden çekip bırakma yöntemi ile kaldırıldı. 10 dakika 900 rpm'de santrifüj edildi. Bu işlem 2 kez tekrarlandı ve hücreler sayılarak 8-10^5-10^6 arası hücre 25 cm^2'lik kültür şişelerine 5 ml besi ortamında veya $2x10^6$ – $3x10^6$ arası hücre 75 cm^2'lik kültür şişelerine 10 ml'lik besi ortamına alınarak üretildi.

2.5.6.4 Hücrelerin Dondurulması

Hücreler yıkandıktan sonra, yaklaşık $3x10^6$ hücre/ml (dondurma medyumu) olacak şekilde özel dondurma tüplerine alındı. Dondurma tüpleri ilk etapta -20°C'de 2-3 saat kadar bekletilip -80°C'ye alındı. Bir gün -80°C'de bekletildikten sonra -196°C'de sıvı azot tanklarında muhafaza edildi.

2.5.7 Füzyon ve Hazırlıkları

2.5.7.1 Besleyici Hücrelerin Hazırlanması

Füzyondan bir önceki gün yapılan işlemdir. Bu amaçla hiç immunize olmamış normal bir fare kullanıldı. Fare öldürüldükten sonra alkol içerisinde temizlendi. Sırt üstü yatırılan farenin, laminar akımlı kabin içerisinde stertil makas ve pens yardımı ile karın bölgesi yanlara doğru açıldı, bir elle kuyruk tutulurken üst deri pens yardımı ile boyuna doğru çekilerek periton açığa çıkarıldı. Yağsız bir bölgeden organlara değmeden periton içerisine 5 ml Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) (serumsuz) zerk edildi, farenin karnının DMEM ile kaplanmasından sonra enjektöre geri çekildi (3 ml çekildi). Böylece periton iç yüzeyindeki besleyici hücreler alınmış oldu. Enjektör içindeki hücreler feeder için daha önceden hazırlanan DMEM'e % 20 Fetal Bovin Serum (FBS), 1/100 gentamisin) eklendi bir tüpe alındı. 10 adet hücre kültür plağı sayısına göre her kuyuya yaklaşık 100 µl olacak şekilde dağıtıldı. Plaklar 37°C'de inkübatöre kaldırıldı.

Amaç, Hibrid hücreler normal polistrenden yapılmış hücre kültür plaklarında yaşamakta güçlük çektiklerinden; makrofaj hücreleri, salgıladıkları sitokinler ile gerek hücre aktivitesini artırarak gerek ortamdaki artıkları varsa mikropları fagosite ederek ortamı hibrid hücrelerin yaşayabileceği bir ortam haline getirirler.

Şekil 3. 37. Besleyici hücrelerin mikroskop görüntüsü

2.5.7.2 Bağışıklanmış Dalak Hücrelerinin Elde Edilmesi

Antijen ile immunize edilen fareler arasında en yüksek antikor cevabı veren fare ELİSA yöntemi ile belirlendi. Fare dislokasyon yöntemi ile öldürüldü ve %70 alkol içerisinde dezenfekte edildi. Laminar akımlı kabin içerisinde, bağışıklanmış fare sırt üstü yatırılarak karın bölgesi açıldı. Dalak alınmadan önce daha sonraki ELİSA çalışmalarında pozitif kontrol olarak kullanmak üzere hayvanın kalbinden yüksek miktarda kan alınarak 1:1 oranında sodyum sitrat ile karıştırıldı, santrifüj edildi ve serumu buzluğa kaldırıldı. Ardından kaburganın hemen altından dalak, yağ dokusundan arındırılmış bir şekilde alınarak 5 ml PBS bulunan petri kabına alındı. Dalak burada diğer yabancı dokulardan temizlenerek 10 ml serum içermeyen DMEM içeren başka bir petri kabına alındı. Dalak küçük bir süzgeçte cam baget ile ezilerek hücreler açığa çıkarılır ve pipet yardımı ile süspanse edildi. Hücreler serum içermeyen DMEM'de tamponunda 1250 rpm'de 5 dak. santrifüj edilerek 2 kez yıkandı. Çöken hücreler 50 ml DMEM içerisine alınarak hücre sayımı yapılır.

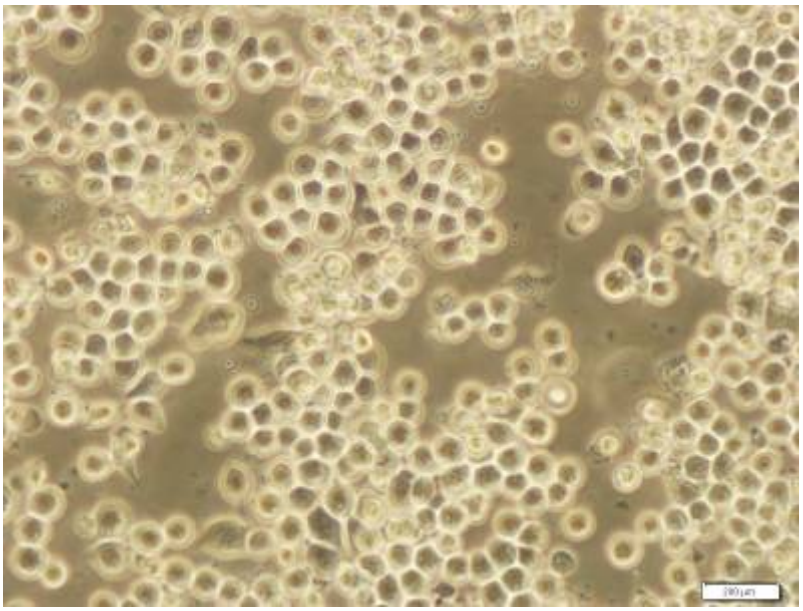
2.5.7.3 Bağışık Fareden Lenf Hücre Eldesi

ELİSA ile en yüksek bağışık yanıtı veren fare disloke edilerek alkol içinde dezenfekte edildi. Steril ortamda sırt üstü yatırılarak %70 alkol içerisinde dezenfekte edildi. Ön ve arka ayaklarından yanlara doğru iğnelendikten sonra gövde üzerinde genital bölgeden alt çeneye kadar deriye kesit atıldı. Deri yanlara doğru açılarak iğnelendi ve lenf toplama işlemi başlatıldı.

Çene ve koltuk altında 2 çift, yanlara açılan deri üzerinde ve kasıkta 1 çift olan "yüzey lenf düğümleri" toplandıktan sonra periton açılarak bağırsaktaki 4, sırttaki 3 tane olan "derin lenf düğümleri" toplandı. Çıkarılan lenf düğümleri dalak hücre eldesinde olduğu gibi petri kabına alınarak mekanik ezme işlemiyle lenf hücreleri de açığa çıkarıldı ve süspansiyon sonrası hücreler sayıldı.

2.5.7.4 Myeloma Hücrelerinin Hazırlanması

Füzyondan 10 gün öncesinde kültürde normal besi yeri içerisinde çoğaltılan F0 myeloma hücreleri hücre kültür şişelerinde çoğaltmaya alındı. Myeloma hücrelerinin çoğaltılması işlemlerinin başlangıcında hücrelerin bulunduğu besi yerine Azoguanin (20 µg/ml) eklenerek HGPRT (Hipoksantin fosforiboziltransferaz) mutantı hücrelerin ortamdan uzaklaştırılması sağlandı. Füzyon günü kültür şişelerinin içindeki kullanılmış besi yeri steril bir beher içine döküldü ve hücreler pasajla 50 ml'lik santrfiüj tüpü içerisine alındı ve 1250 rpm'de 5 dak. santrifüj edilerek 2 kez 25 ml serumsuz DMEM ile yıkandı. Çöken hücreler 50 ml serumsuz DMEM içerisine alınarak hücre sayımı yapıldı.



Şekil 3. 38. Myeloma hücrelerinin mikroskop görüntüsü

2.5.7.5 Füzyon

Hücre sayımı yapılan F0 myeloma hücreleri ve dalak hücreleri 1/10 oranı olacak şekilde birleştirildi ve 1250 rpm'de 5 dak. santrifüj edildi. Üst kesim atılarak çöken hücre karışımına 37°C'de ısıtılmış 1 ml Polietilen glikol 4000 1 dakika içerisinde oldukça yavaş yavaş eklendi. 1 dakika süresince hücre karışımı pipetaj yapılarak ve falkon döndürülerek beklendi. 4 ml sadece DMEM 4 dakika içerisinde yavaş yavaş falkon da döndürülerek ilave edildi. Daha sonra tekrar 10 ml DMEM yavaşça karıştırılarak ilave edildi. Karışım 5 dak. 37°C sıcaklıktaki CO_2 etüvde bekletildikten sonra, santrifüj edildi. Çöken hücrelere seçici kültür ortamı ilave edilerek bir önceki gün makrofaj ekilmiş hücre kültür plaklarına 150 µl /kuyu olacak şekilde dağıtıldı. 10 gün sonra hücrelerin üst sıvılarından 100 µl çekildi ve üzerine 100 µl seçici HAT medyum ilav edildi. 12. gün aynı şekilde seçici HT ortamı eklendi. Füzyondan yaklaşık 10 gün sonra hibrit hücreler HAT seçici besi yerinde canlı, belirgin ve büyük hücreler olarak gelişmiş ve klon oluşturmuştur.

Klonlardan alınan üst sıvılardan gerçekleştirilen ELİSA sonuçlarına göre spesifik antikor üreten hibrit hücreleri belirlenmiştir. Belirlenen kuyulara alt klonlama işlemi (Limiting Dilution) yapılmıştır.

2.5.7.6 Alt Klonlama İşlemi

Füzyon sonucu spesifik antikor üreten hibrit hücreleri, tek kolondan oluşan soyu oluşturmak için seyreltme işlemi yapılmaktadır. Bu amaçla yaklaşık olarak füzyonun 20. günlerinde ELİSA yöntemi ile pozitif reaksiyon verdiği tespit edilen hibrit klonlara alt klonlama işlemi

yapıldı. Bu hücreler, pipet yardımı ile tüplere alındı ve hücre sayımı yapılarak 96 kuyuluk kültür kaplarında tek hücre olacak şekilde dağıtıldı.

2.5.7.7 Monoklonal Antikorların Saflaştırılması

Monoklonal antikorları içeren kültür üst sıvıları, bağışık fare antikorlarını içeren poliklonal antikorlar ve hibridoma hücrelerinin zerk edilmesi ile elde edilen fare asidik sıvı kesimleri saf değildir. Bu sebeple monoklonal antikorun saflaştırılması amacıyla en genel ve en pratik yol olan Amonyum sülfat ile çöktürme tercih edilmiştir. Hibridoma üst sıvılarına %45 oranında amonyum sülfat kristalleri (341 g/L) soğukta yavaş bir şekilde ilave edildi. Üst sıvı gece boyu +4°C'de bu şekilde karıştırıldı. Daha sonra 13.000 rpm'de 1 saat santrifüj edilerek üst kısım atıldı, pellet PBS içerisinde çözülerek tekrar PBS tamponuna karşı gece boyu diyaliz edildi ve yoğun tuzdan uzaklaştırıldı.

Monoklonal antikorun eldesi ve saflaştırma işlemleri hizmet alımı kapsamında TÜBİTAK-MAM ve Üsküdar Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarları (Bursiyerlerimizden Doktora öğrencimiz Pelin Pelit Arayıcı tüm aşamalarında görev almıştır) tarafından ortak gerçekleştirilmiştir.

2.5.8 Kompleman Fiksasyon Testi (Tanı Kiti Çalışmaları)

Elde edilen monoklonal antikor tanı kiti çalışmalarında kullanıldı.

Buna göre: Kompleman fiksasyon testi yapıldı. Antijen (Ag) ve antikor (Ab) kompleksine komplementin birleşme yeteneğinden yararlanılarak, hemolitik sistem aracılığıyla şüpheli Ag ya da Ab varlığının araştırılmasına imkan sağlayan bir yöntemdir.

Antijen+Kompleman→Kompleman Antijene Bağlanamaz

Antikor+ Kompleman→ Kompleman Antikora Bağlanamaz

Antijen+Antikor+Kompleman→Kompleman Antijen-Antikor Kompleksine Bağlanır.

1) Öncelikle 3000 devirde 10 dak. santrifüj edilen hasta tam kanının serum kısmı alındı. Serumda bulunan insan komplemanı, 56 °C'deki benmaride 30 dak. bekletilerek inaktive edildi.
2) %2'lik koyun eritrositi hazırlandı. Bu amaçla; boncuklu bir balon jojeye koyun tam kan örneği alındı. Boncuklu balon joje, içerdiği boncukların kanda bulunan fibrini bağlaması için kullanılmaktadır. Santrifüj tüpüne az miktar alındı ve üstü serum fizyolojik ile tamamlandı. 3000 devirde 5 dak. santrifüj edilerek dip kısmı alındı ve aynı işlem üstte kalan kısım şeffaflaşıncaya kadar 3-4 kez tekrarlandı. Son aşamada

alınan dipte kalan kısım koyun eritrositlerdir. 2 µl koyun eritrositi ve 98 µl serum fizyolojik karıştırılarak %2'lik koyun eritrositi hazırlanmış oldu.

3) Bu basamakta Q humması monoklonal antikoru + hasta serumu + kompleman karıştırıldı. Bu amaçla:

i) 1. Kuyucuğa 100 µl serum fizyolojik, 2. kuyucuğa ise 25 µl serum fizyolojik kondu.

ii) 1. Kuyucuğa 25 µl hasta serumu konularak 1/5'lik tarama titresi elde edilmiş olur. Bunun 25 µl si 2. kuyucuğa kondu ve 75 µl si çöpe atıldı.

iii) 1. Kuyucuğa Q humması monoklonal antikorundan 25 µl kondu.

iv) 1. ve 2. Kuyucuğa 1/30'luk komplemandan 25 µl eklendi.

Mikroplate üzeri kapatılarak 36 °C'deki inkübatörde 30 dak. bekletilir.

Hasta serumunda antijen var ise antikor ile birleştirilmesi ve komplemanı bağlaması beklenir. Hasta serumunda antijen yok ise bu evrede kompleman serbest kalacak ve sonra eklenecek hemolitik sistem ile birleşerek koyun eritrositlerinin erimesine (lizis) ve homojen bir görünüme yol açacaktır.

4) KONTROL: Hemolitik sistem hazırlandı. Hazırlanması için aşağıdaki işlemler sırası ile uygulanmıştır:

i) İlk kuyucuk boş bırakıldı, diğer kuyucuklara 50 µl serum fizyolojik eklendi.

i) İlk ve ikinci kuyucuğa daha önceden 1/100 oranında hazırlanmış amboceptor ORLC25'den 50 µl eklendi.

ii) İkinci kuyucuktan 50 µl alındı ve yandaki kuyucuklara, son kuyucuk (kontrol kuyucuğu) hariç, sırayla titre (dilüe) etmek suretiyle eklendi.

iii) 50 µl 1/30'luk Hazırlanmış kompleman ORAY15 bütün kuyucuklara eklendi.

ii) 50 µl %2'lik hazırlanmış koyun eritrositi bütün kuyucuklara eklendi.

Bu işlemler tamamlandıktan sonra mikroplate üzeri kapatılarak 1 saat etüvde, 36 °C'deki inkübatörde 1 saat bekletildi.

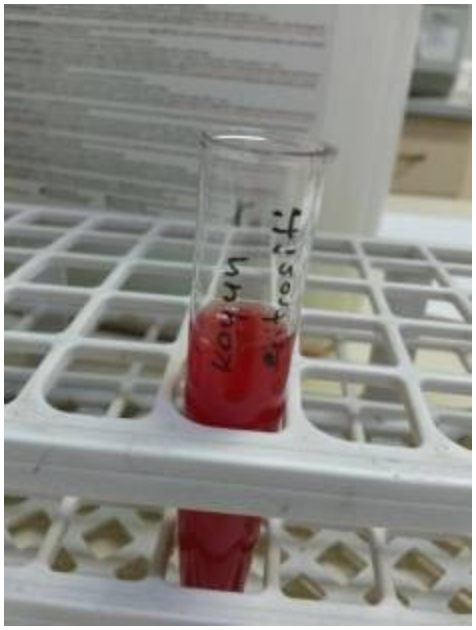
1 saat sonra inkübatörden çıkartıldı ve son kuyucuktan gözlemlemeye başlayarak en homojen olan kuyucuk belirlendi ve bu kuyucuğun titresi baz alındı.

(Hemolitik sistemde ilk kuyucuğun titresi eklenen amboceptor 1/100'luk olduğundan dolayı 1/100'luk kabul edilir ve sırasıyla 1/200, 1/400, 1/800 diye sıralanır.)

5) İlave Edilecek Olan Hemolitik Sistemin Hazırlanışı:

Her kuyucuk için hazırlanacak olan hemolitik sistemden ortalama 50 µL hacim gerekli olduğu baz alınırsa toplam 6 kuyucuk için 300 µl hacim gereklidir. Eksik olmaması için 100 µl de fazla eklendi. Toplam 400 µl'nin:

-Yarısı: 200 µl %2 lik koyun eritrositi hazırlandı



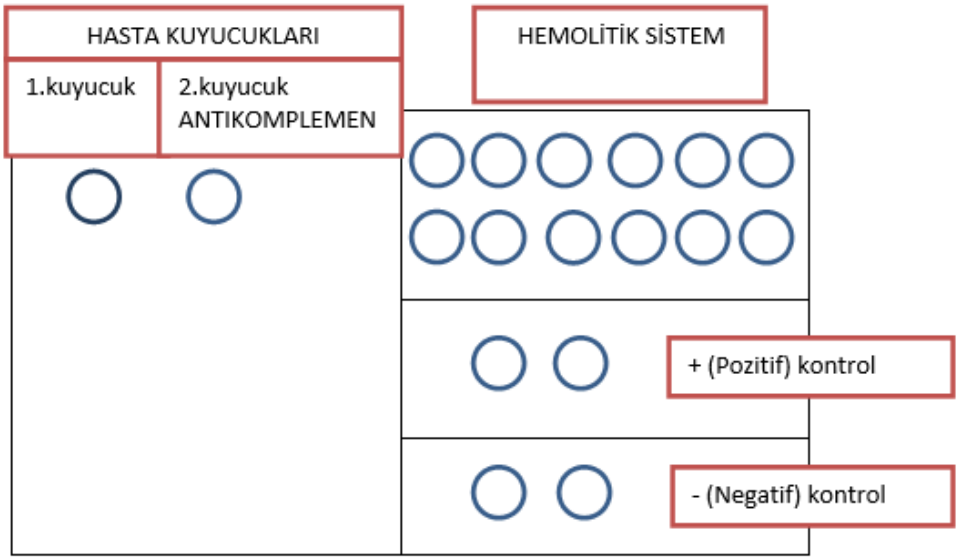
Şekil 3. 39. Koyun eritrositi

-Yarısı: titre 1/400'lük olduğu için (1'e 3 oranında) 50 µl 1/100 'lük amboceptor 150 µl serum fizyolojik karıştırıldı ve kontrol hemolitik sistem hariç, diğer bütün kuyucuklara ilave edildi. Tekrar üzeri kapatılarak 1 saat 36 °C'deki etüvde bekletildikten sonra değerlendirilir.

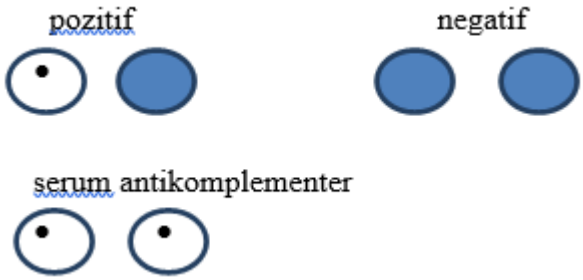
6) Pozitif ve negatif kontroller hazırlanarak testin doğru çalışıp çalışmadığına karar verir. Bunun için 3. basamakta yapılan işlemlerin aynısı uygulandı. Farklı olarak:
   - Pozitif kontrol için hasta serumu yerine Q humması olduğu kesin bilinen hastanın serumu kullanıldı.
   - Negatif kontrol için serum fizyolojik ya da Q humması olmadığı bilinen hasta serumu kullanıldı.

7) Sonuçların Değerlendirilmesinde:

Hasta serumunda özgül antikor ya da antijen varlığında kompleman fikse edilmiş olduğundan hemolitik sistem üzerine bir etkide bulunmaz eritrositler parçalanmaz ve dibe çöker, buna karşın özgül antikor ya da antijen yoksa kompleman serbest olduğundan hemolitik sisteme etki ederek eritrositleri parçalar. Homojen bir görünüm oluşur.



Şekil 3. 40. Kompleman Fiksasyon Testi Örnek Gösterimi



Şekil 3. 41. Pozitif (hastalığın olduğunun tespiti), negatif ve serum antikomplementerlerin gösterimi

şeklinde sonuç verilir.

- ✓ Antikomplementer kuyucuğuna antikor konmamış olduğundan kompleman bağlanmadan kalır ve bu nedenle hemolitik sistem eklendiğinde bu kuyucukta hemoliz olmalıdır

Antikomplementer kontrol kuyucuğu şeklinde olması gerekiyor

- ✓ Serumun kendi kendine (antijen ya da antikor söz konusu olmaksızın) komplemanı bağlama özelliği serum antikomplementer şeklinde sonuçlandırılır.

Not: Hasta serumları farklı şikayetlerden gelmiş yapılan araştırmalar sonucunda Q humması olduğu tespit edilmiş hastalardan elde kalan serumlardır.

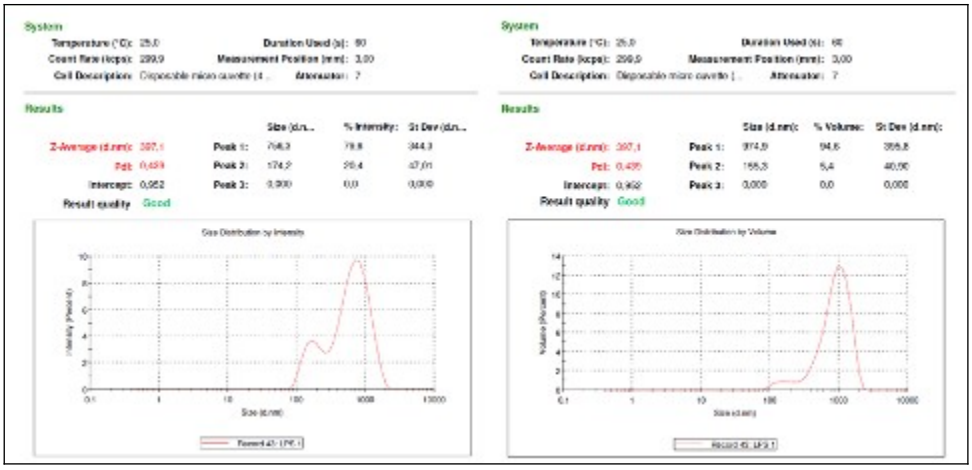
BÖLÜM 4

4.BULGULAR

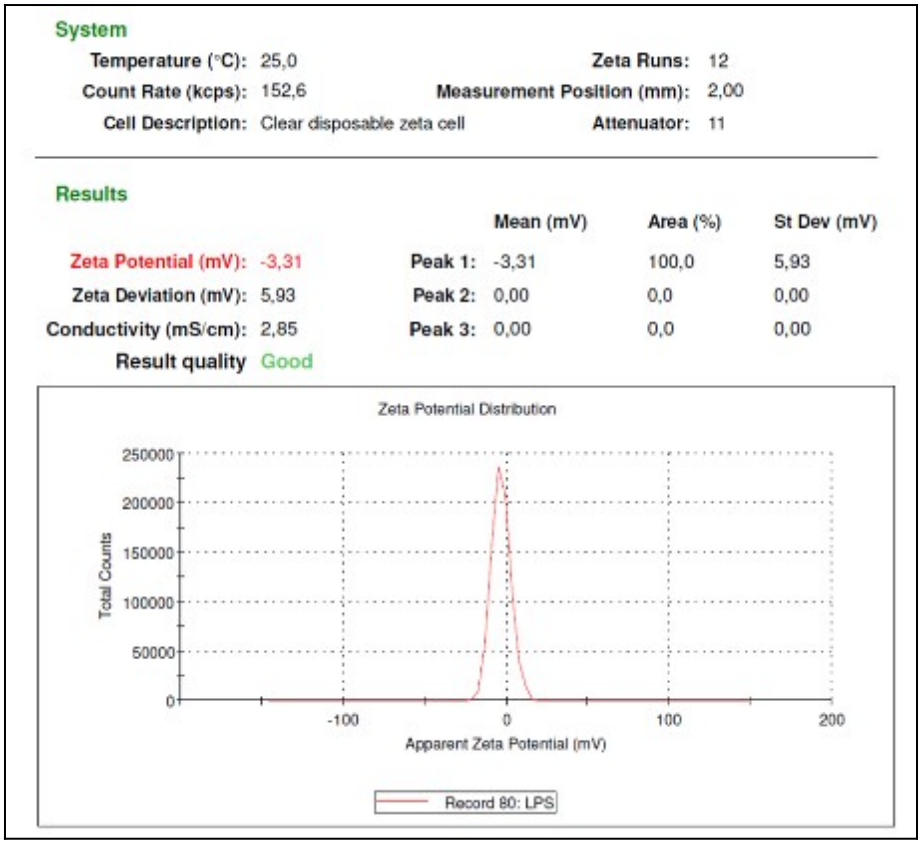
3.1 LPS nin izolasyonuna ve Karakterizasyonuna ait Sonuçlar

Kolorometrik deneyler LPS ‘in 95,10 nmol/mg Kdo, 137,20 nmol/mg fosfat, 291,40 nmol/mg hekzoamin içerdiğini göstermiştir. Nötral şekerin GC/MS analizi virenose (22,8 %), ksiloz (2,7 %), mannoz (28,3 %), galaktoz (0,4 %), glikoz (0,8 %), dihidrohidroksistreptose (19,9 %) ve L-glisero-D-manno-heptoz (25,1 %) bulunduğu ortaya çıkarılmıştır. Böylece, ham LPS de bulunan şekerlere ek olarak O-polisakkarit zincirindeki iki nadir şeker ünitesinide içerir. Virenose (6-deoksi-3-C-metilgüloz) ve dihidrohidroksistreptose [3-C-(hidroksimetil)likoz] diğer LPS lerde bulunmamıştır, ayrıca şekerlerin her ikisinin de yalnızca LPS’in terminal pozisyonlarında lokalize olduğunu bulunmuştur.

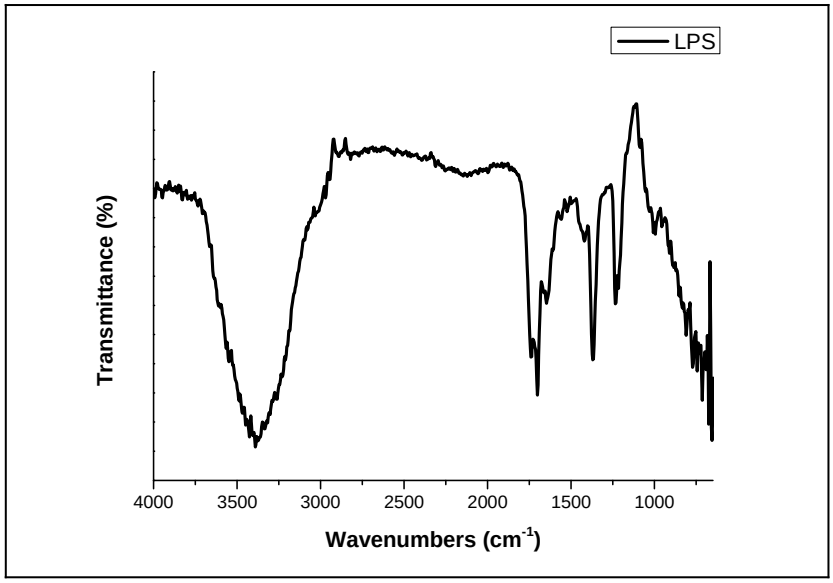
Ayrıca Türk araştırma grubu olarak daha sonraki araştırmalar için LPS’nin boyutu ve yükünü Zetasizer cihazı ile tespit edildi. Şekil 4.1 ve 4.2’de sırasıyla LPS’nin Z-Ave boyutu 397,1 nm ve Zeta potansiyel değeri (negatif) – 3,31 olarak gösterilmiştir. FTIR spektrumu Şekil 4.3’de gösterilmiştir.



Şekil 4. 1. LPS’nin sırasıyla Zetasizer şiddet ve hacim grafikleri



Şekil 4. 2. LPS’nin Zeta Potansiyel Grafiği



Şekil 4. 3. LPS'nin FTIR spektrumu

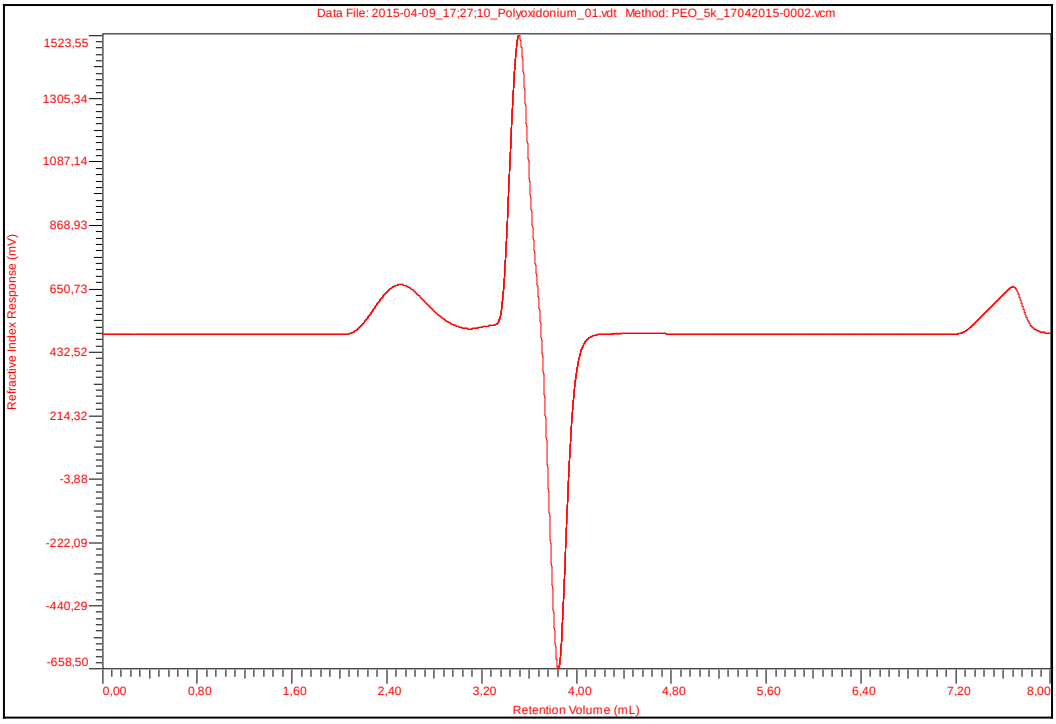
3.2 Polimerlerin Sentezine Ait Bulgular

Polioksidonyum ve Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) polimerlerinin sentezine ait deneysel sonuçlar bu bölümde verilmiştir.

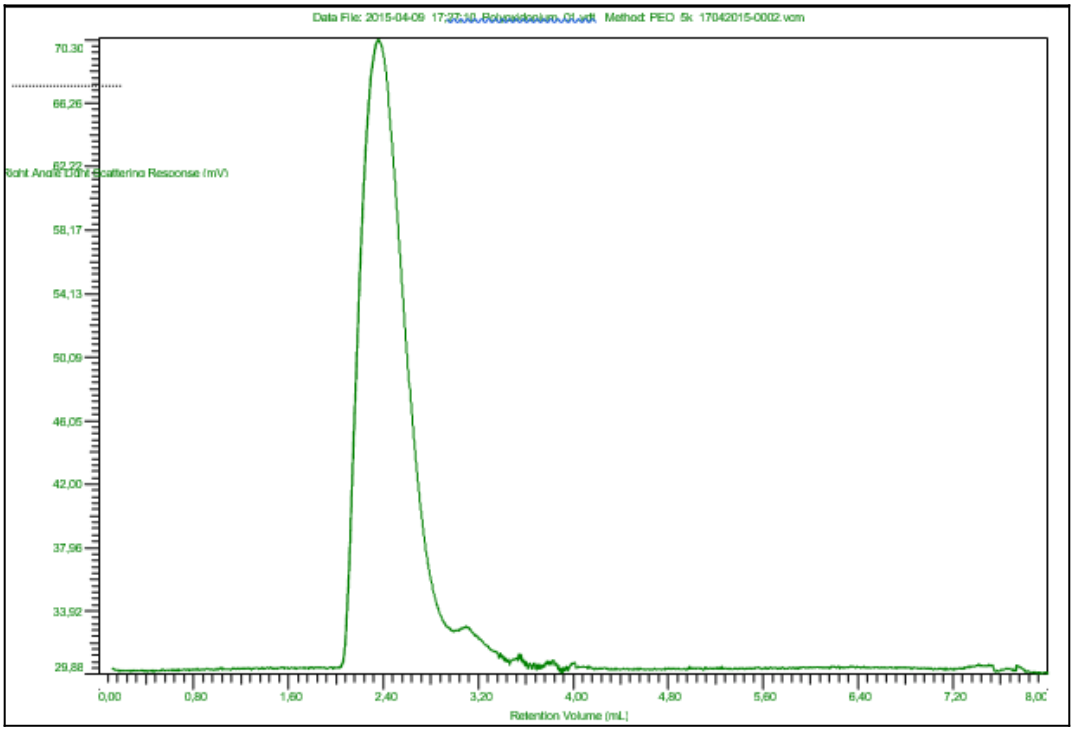
3.2.1 Polioksidonyum Polimerinin Sentezine ait Bulgular

3.2.1.1 GPC Analizi

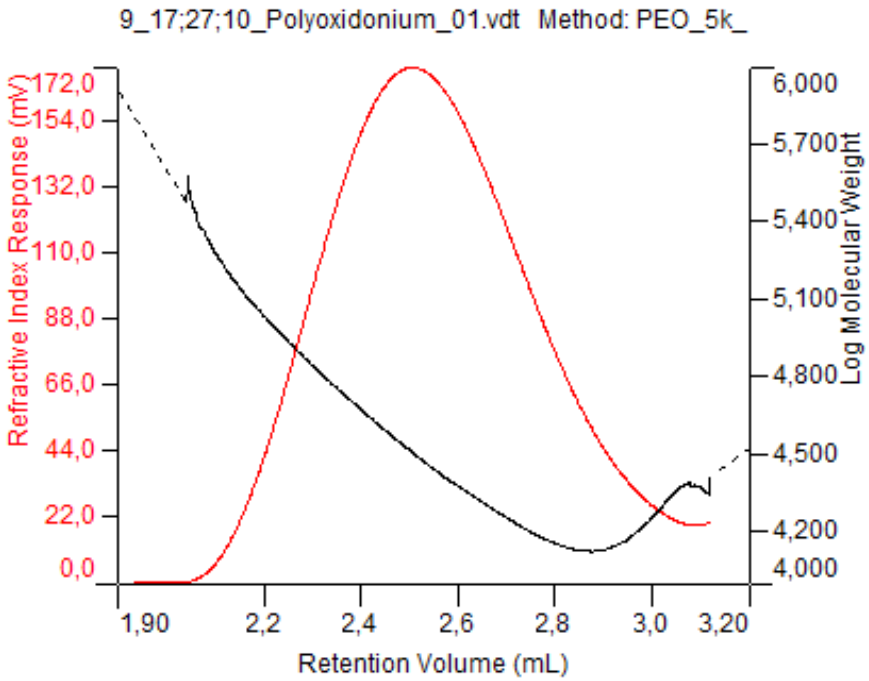
Polioksidonum polimerinin GPC analiz sonuçları Şekil 4.4-4.6'da verilmiştir. Molekül ağılığı ve PDI bilgileri Tablo 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4. 4. Sentezlenen polioksidonyum polimerinin GPC Kırılma İndisi kromatogramı



Şekil 4. 5. Sentezlenen polioksidonyum polimerinin GPC Işık Saçılması Kromatogramı



Şekil 4. 6. Sentezlenen polioksidonyum polimerinin GPC Kırılma İndisi Kromatogramına göre Molekül Ağırlığı Tayini

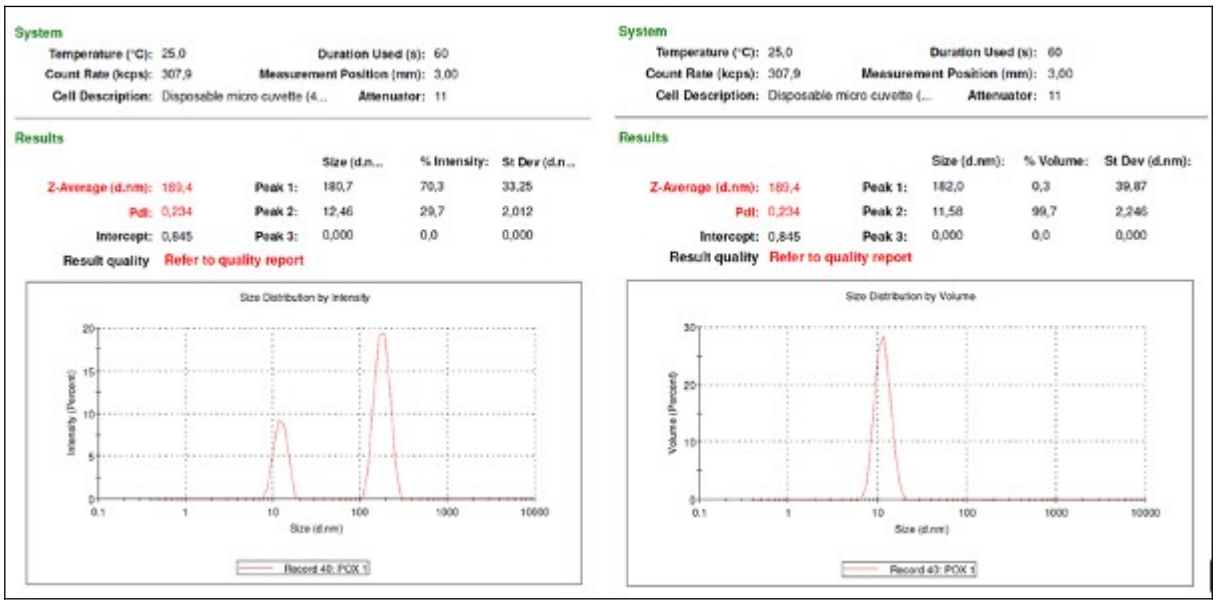
Tablo 4. 1. Sentezlenen polioksidonyum polimerinin GPC Kırılma İndisi Kromatogramına göre Molekül Ağırlığı Tayinine ait elde edilen veriler

Mn - (Daltons)	26.451	
Mw - (Daltons)	37.143	
Mz - (Daltons)	56.085	
Mp - (Daltons)	32.141	
Mw / Mn	1,404	
RI Area - (mvml)	90,80	
UV Area - (mvml)	0,00	
RALS Area - (mvml)	18,15	
LALS Area - (mvml)	0,00	
IVDP Area - (mvml)	0,00	
Sample Parameters	Input	Sample Parameters
Sample Conc - (mg/ml)	1,000	Sample Conc - (mg/ml)
Sample Recovery	0,000	Sample Recovery (%)

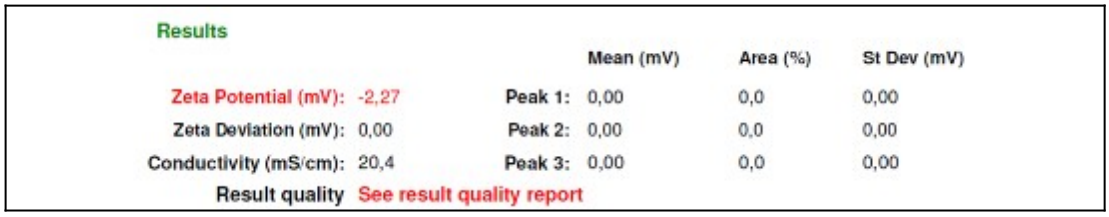
(%)		
dn/dc - (ml/g)	0,0000	dn/dc - (ml/g)
dA/dc - (ml/g)	0,0000	dA/dc - (ml/g)
Annotation		

3.2.1.2 ZetaSizer Analizi

Sentezlenen polioksidonum polimerinin ZetaSizer analiz sonuçları Şekil 4.7-4.8'de verilmiştir.



Şekil 4. 7. Sentezlenen polioksidonyum polimerinin Zetasizer sonuçlarının sırasıyla şiddet ve hacim grafikleri



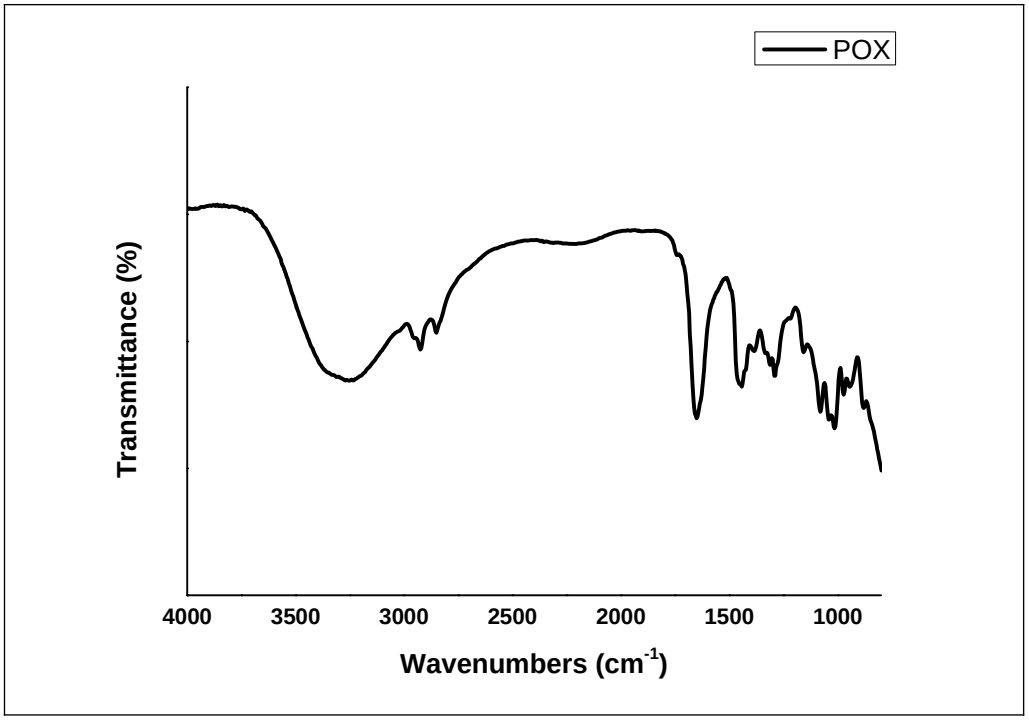
Results

			Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV):	-2,27	Peak 1:	0,00	0,0	0,00
Zeta Deviation (mV):	0,00	Peak 2:	0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm):	20,4	Peak 3:	0,00	0,0	0,00
Result quality	See result quality report				

Şekil 4. 8. Sentezlenen polioksidonyum polimerinin Zeta potansiyel değeri

3.2.1.3 FT-IR Analizi

Sentezlenen Polioksidonyum polimerinin Shimadzu IR-Prestige Furier Transform Infrared Spektrofotometre ile yapılan FTIR analizleri Şekil 4. 9'da gösterilmiştir.

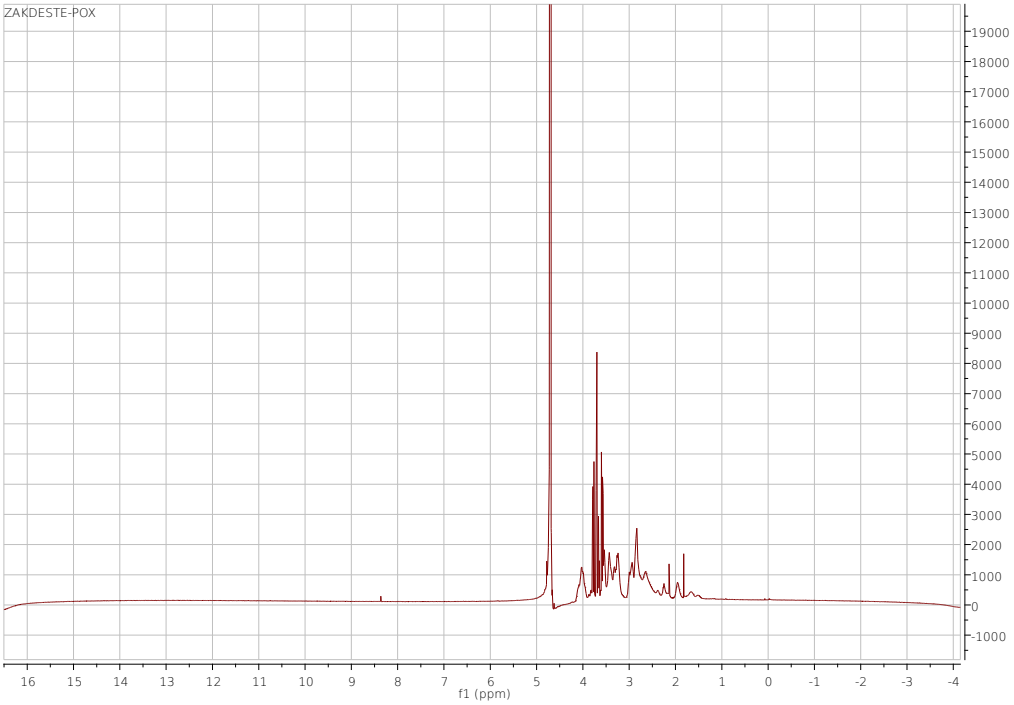


Şekil 4. 9. Polioksidonyumun FTIR spektrumu

Polioksidonyum polimerinin sentezini doğrulamak için alınan FT-IR spektrumunda 3300 cm^{-1} OH bandı ve 1650 cm^{-1} civarında C=O bantların görülmesi yapıyı doğrulamaktadır.

3.2.1.4 NMR Analizi

Sentezlenen Polioksidonyum polimerinin NMR analizi sonucu alınan NMR spektrumu Şekil 4. 10'da gösterilmiştir.

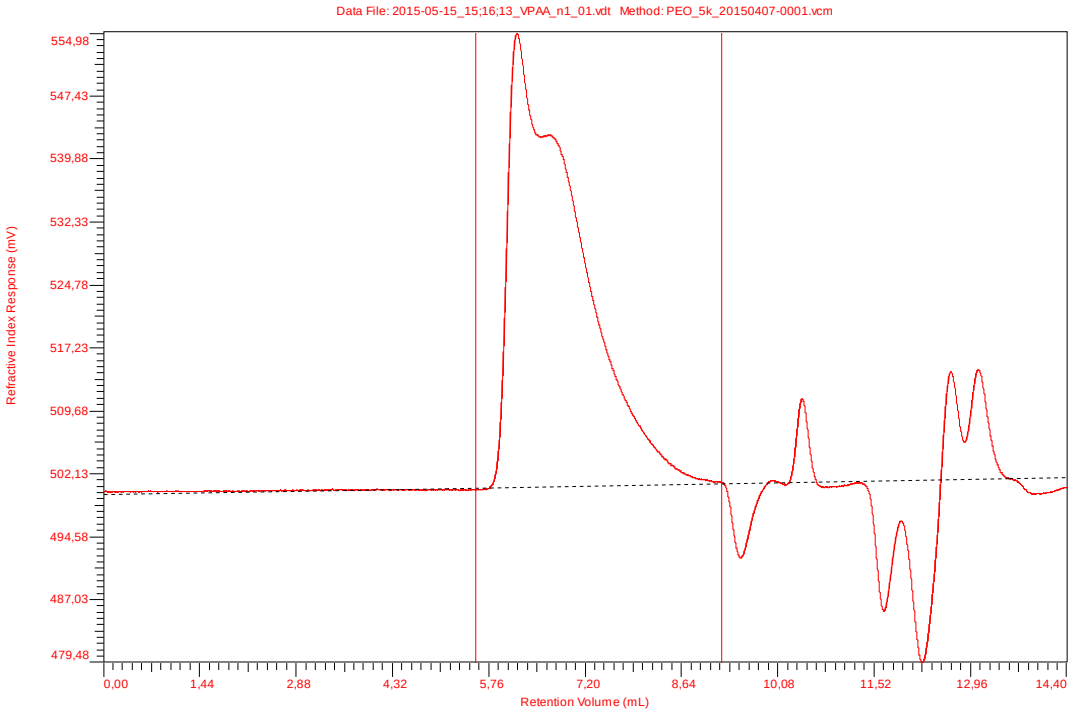


Şekil 4. 10 Poliokdisonyum polimerine ait NMR analizi sonucu

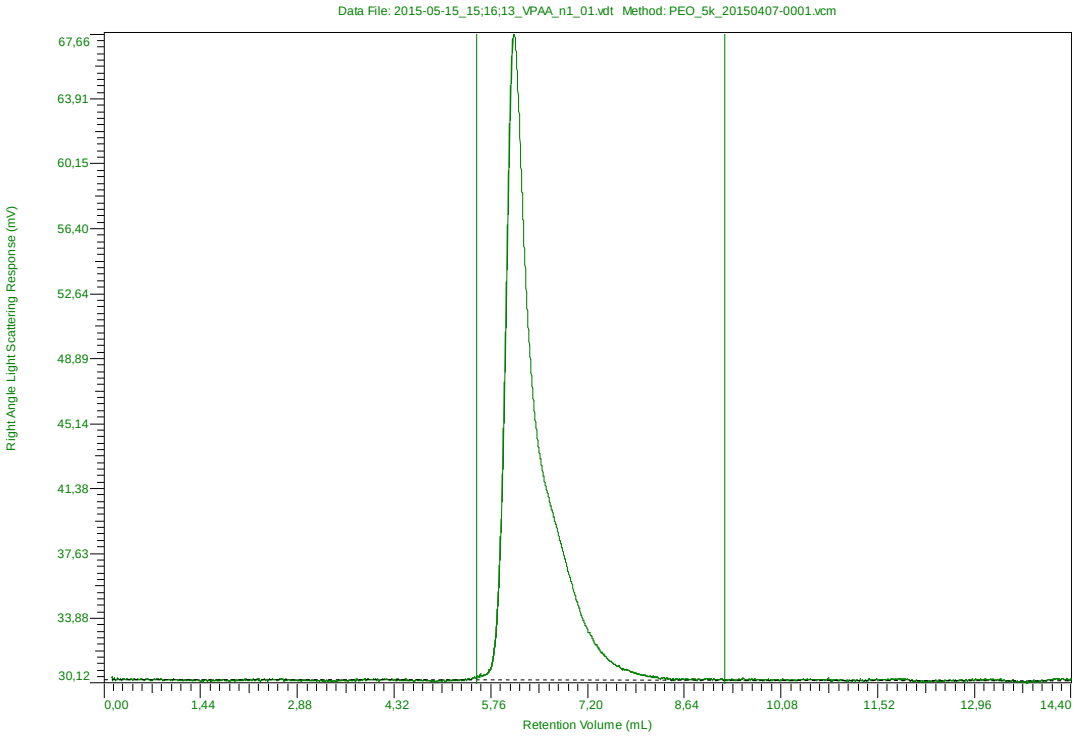
3.2.2 Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) Polimerinin Sentezine ait Bulgular

3.2.2.1 GPC Analizi

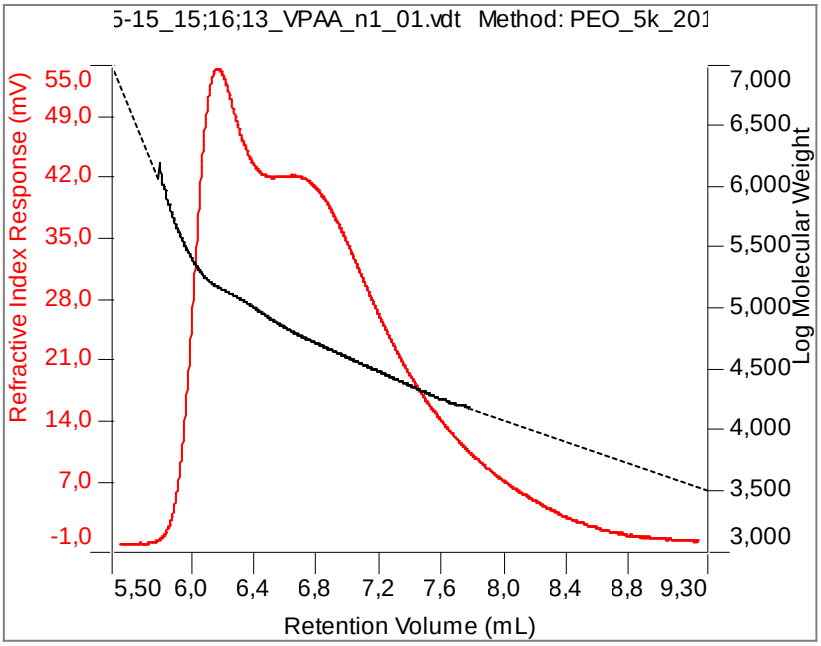
P(VP-co-AA) polimerinin farklı başlatıcı miktarlarında sentezlenen 5 oranına ait GPC analiz sonuçları Şekil 4.11-4.27'da verilmiştir. Molekül ağırlığı ve PDI bilgileri Tablo 4.2 - 4.3 - 4.4 - 4.5 - 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4. 11. Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,1** oranı için GPC Kırılma İndisi Kromatogramı (molekül ağırlığı tespiti için kullanılır)



Şekil 4. 12. Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,1** oranı için GPC Işık Saçılması Kromatogramı (molekülün boyutu, tek pik halinde monomerin olmadığı sadece polimerin pikinin görüldüğü durum)

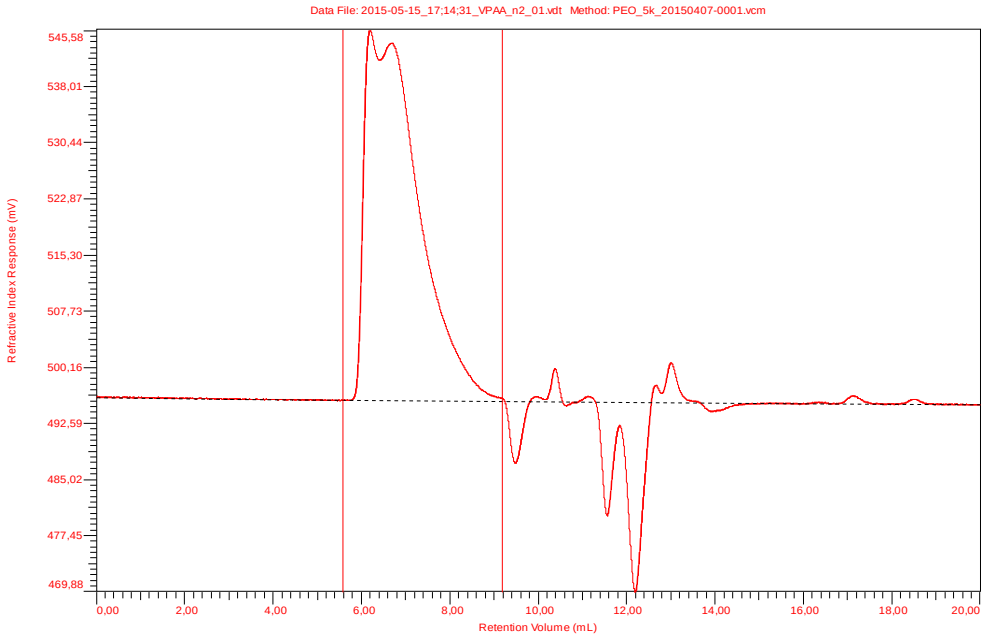


Şekil 4. 13. Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,1** oranı için GPC Kırılma İndisi Kromatogramına göre Molekül Ağırlığı Tayini

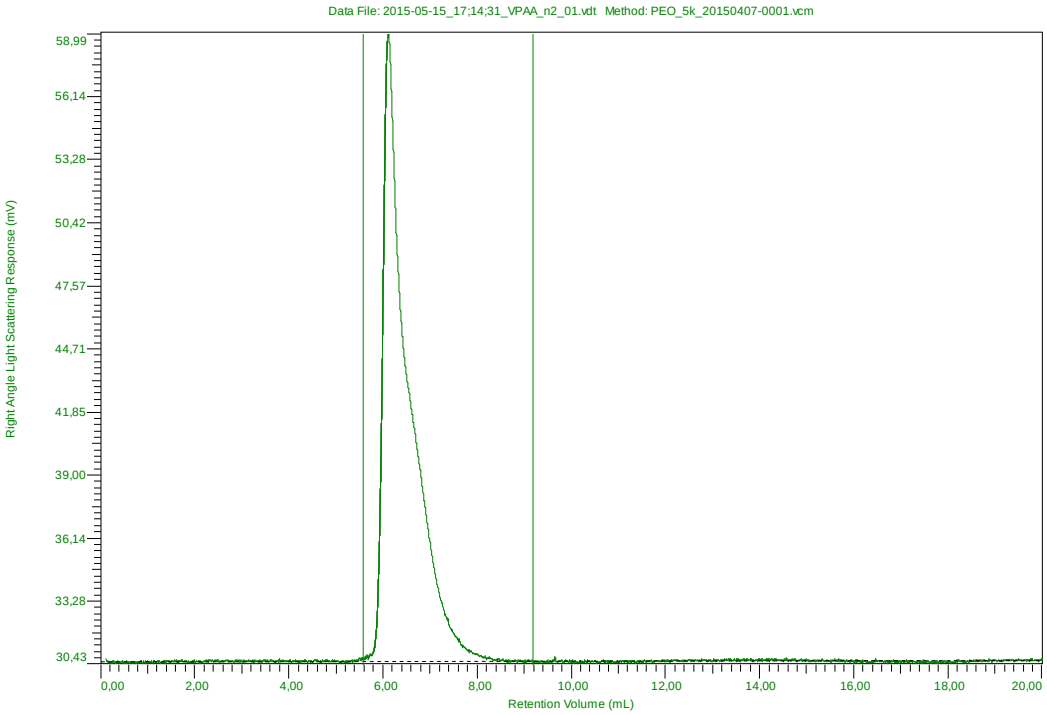
Tablo 4. 2. Sentezlenen Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,1** oranı için GPC Kırılma İndisi Kromatogramına göre Molekül Ağırlığı Tayinine ait elde edilen veriler

n=0,1 oranı için		
Mn - (Daltons)	62.617	
Mw - (Daltons)	81.965	
Mz - (Daltons)	155.662	
Mp - (Daltons)	147.107	
Mw / Mn	1,309	
RI Area - (mvml)	65,55	
UV Area - (mvml)	0,00	
RALS Area - (mvml)	20,71	
LALS Area - (mvml)	0,00	
IVDP Area - (mvml)	0,00	
Sample Parameters	Input	Calculated
		0,000
Sample Recovery	0,000	0,000

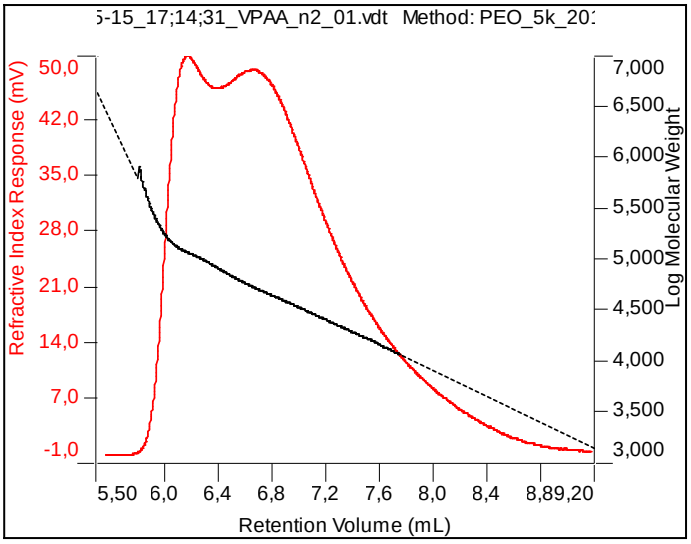
(%)		
dn/dc - (ml/g)	0,0000	0,1412
dA/dc - (ml/g)	0,0000	0,0000



Şekil 4. 14. Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,15** oranı için GPC Kırılma İndisi Kromatogramı



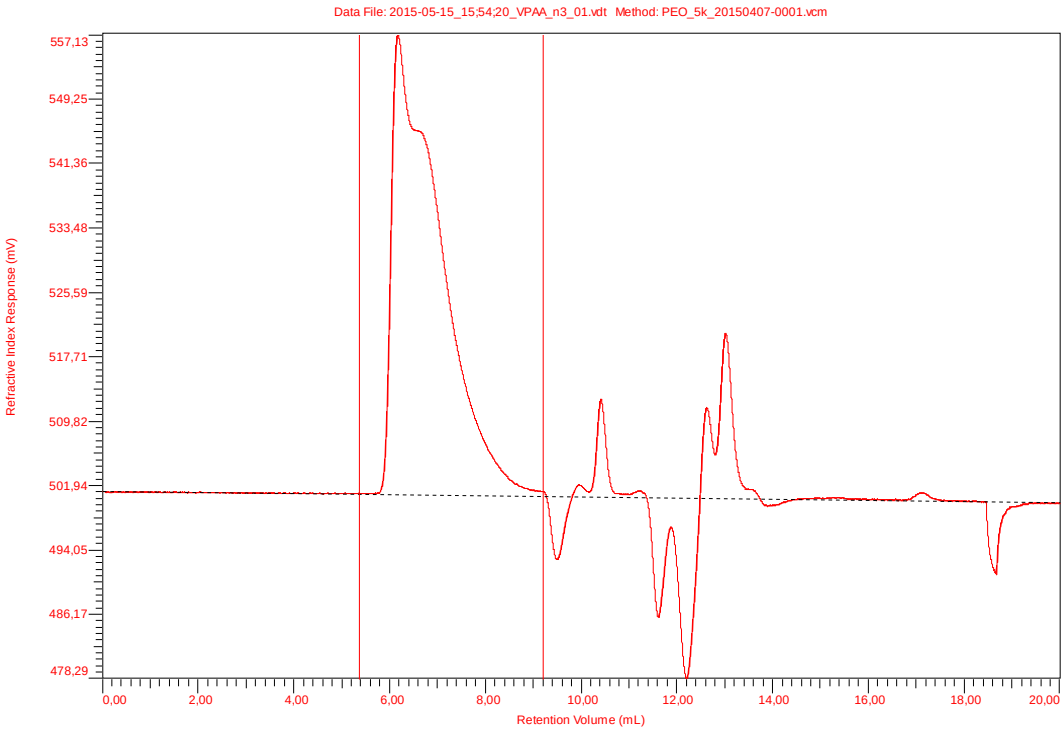
Şekil 4. 15. Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,15** oranı için GPC Işık Saçılması Kromatogramı



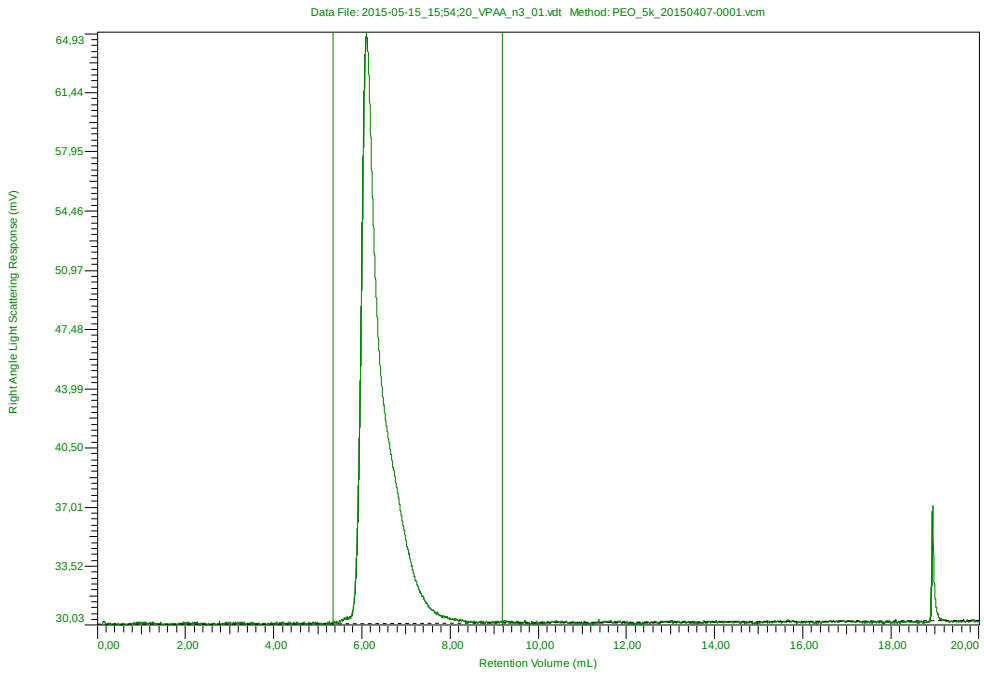
Şekil 4. 16. Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,15** oranı için GPC Kırılma İndisi Kromatogramına göre Molekül Ağırlığı Tayini

Tablo 4. 3. Sentezlenen Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) Polimerinin **n= 0,15** GPC Kırılma İndisi Kromatogramına göre Molekül Ağırlığı Tayinine ait elde edilen veriler

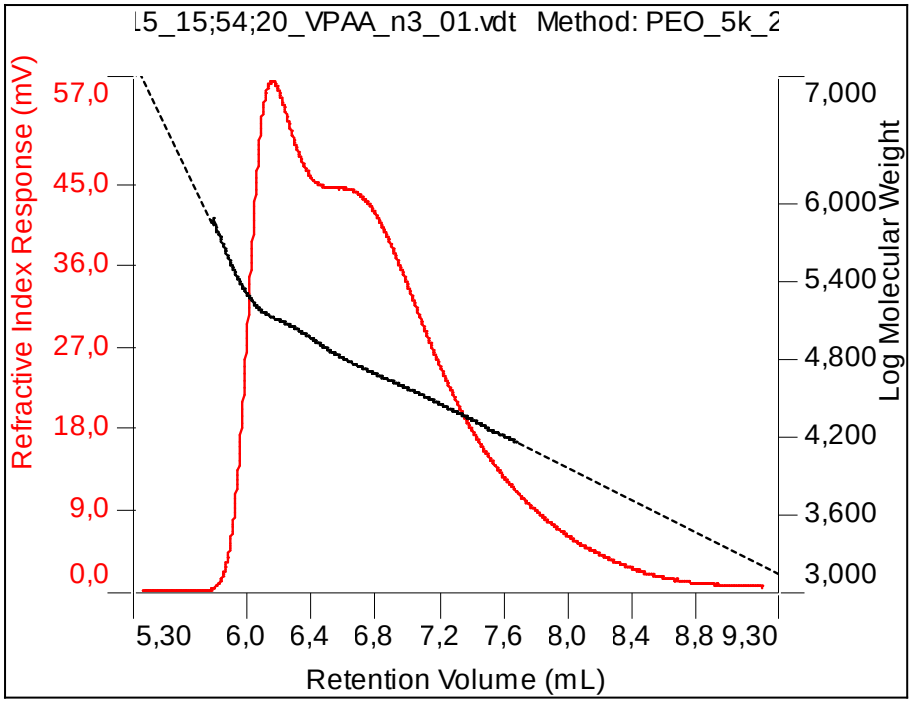
n=0,15 için;		
Mn - (Daltons)	27.238	
Mw - (Daltons)	60.754	
Mz - (Daltons)	100.918	
Mp - (Daltons)	115.409	
Mw / Mn	2,230	
RI Area - (mvml)	70,59	
UV Area - (mvml)	0,00	
RALS Area - (mvml)	17,78	
LALS Area - (mvml)	0,00	
IVDP Area - (mvml)	0,00	
Sample Parameters	Input	Calculated
Sample Conc - (mg/ml)	1,000	0,000
Sample Recovery (%)	0,000	0,000
dn/dc - (ml/g)	0,0000	0,1521
dA/dc - (ml/g)	0,0000	0,0000



Şekil 4. 17. Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,2** oranı için GPC Kırılma İndisi Kromatogramı



Şekil 4. 18. Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,2** oranı için GPC Işık Saçılması Kromatogramı

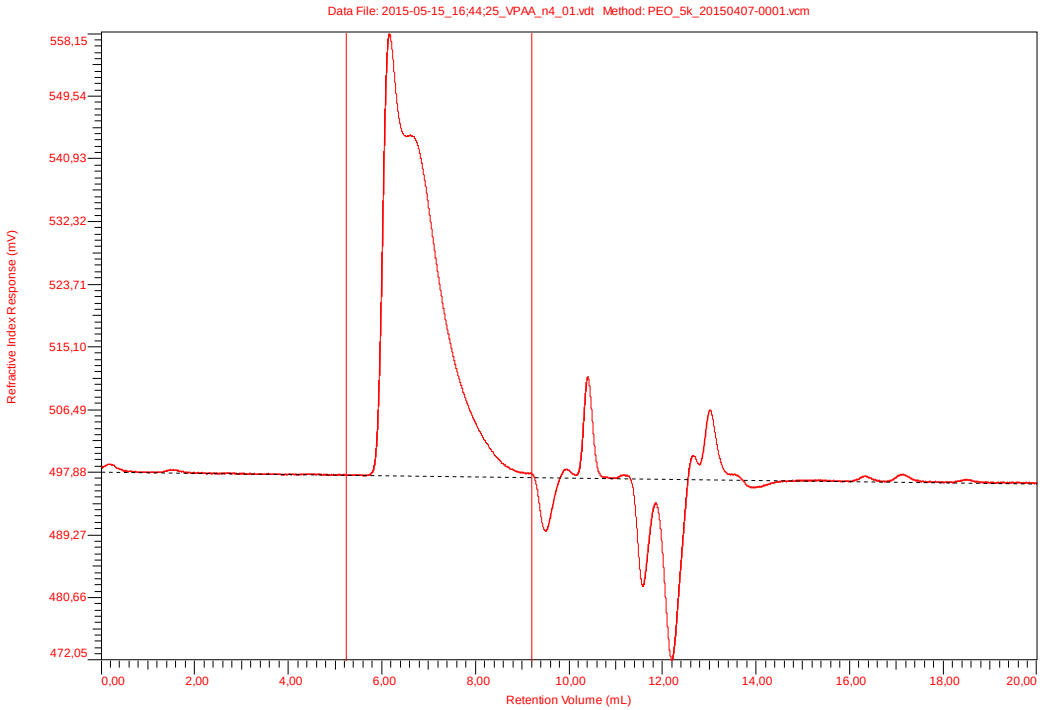


Şekil 4. 19. Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,2** oranı için GPC Kırılma İndisi Kromatogramına göre Molekül Ağırlığı Tayini

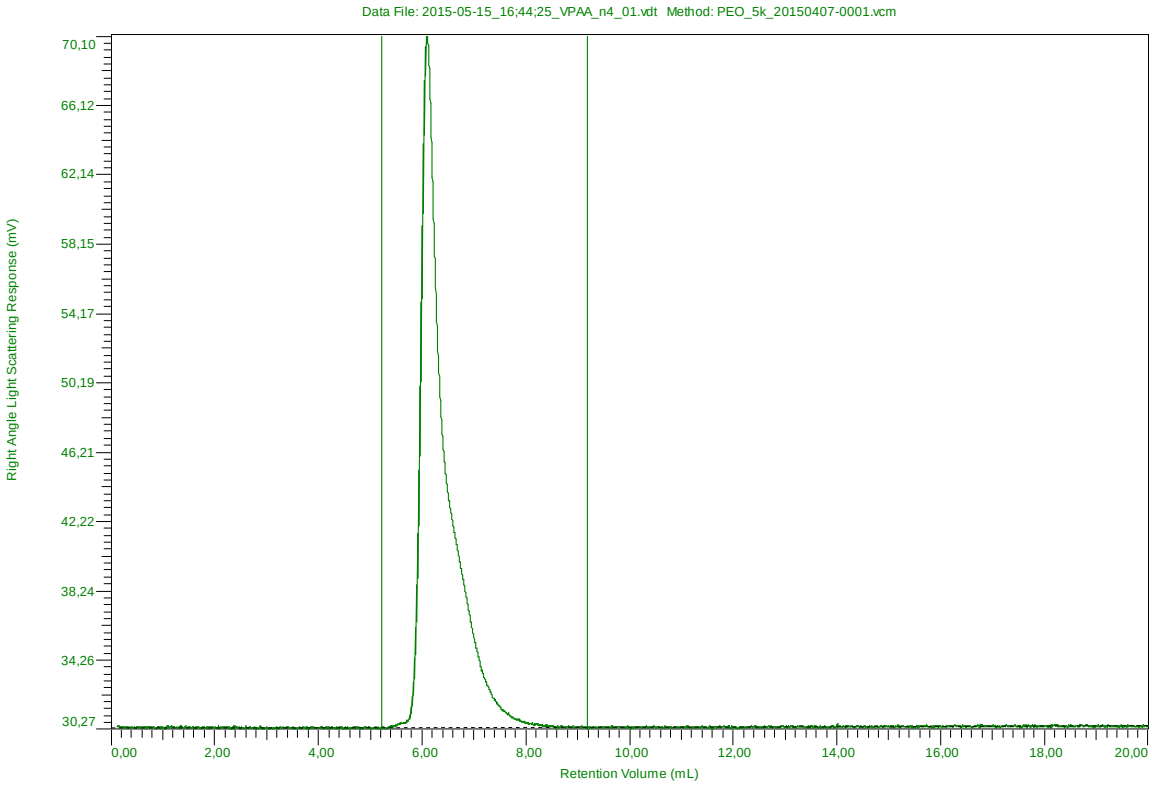
Tablo 4. 4. Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,2** oranı için GPC Kırılma İndisi Kromatogramına göre Molekül ğırlığı Tayinine ait elde edilen veriler

n=0,2 için;		
Mn - (Daltons)	33.608	
Mw - (Daltons)	75.079	
Mz - (Daltons)	122.468	
Mp - (Daltons)	132.828	
Mw / Mn	2,234	
RI Area - (mvml)	66,21	
UV Area - (mvml)	0,00	
RALS Area - (mvml)	19,37	
LALS Area - (mvml)	0,00	
IVDP Area - (mvml)	0,00	
Sample Parameters	Input	Calculated
Sample Conc -	1,000	0,000

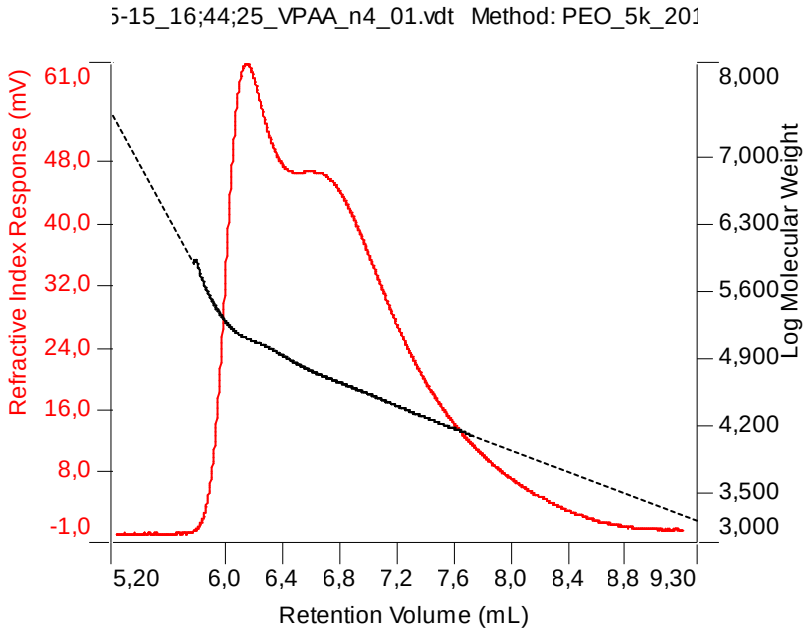
(mg/ml)		
Sample Recovery (%)	0,000	0,000
dn/dc - (ml/g)	0,0000	0,1426
dA/dc - (ml/g)	0,0000	0,0000



Şekil 4. 20. Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,25** oranı için GPC Kırılma İndisi Kromatogramı



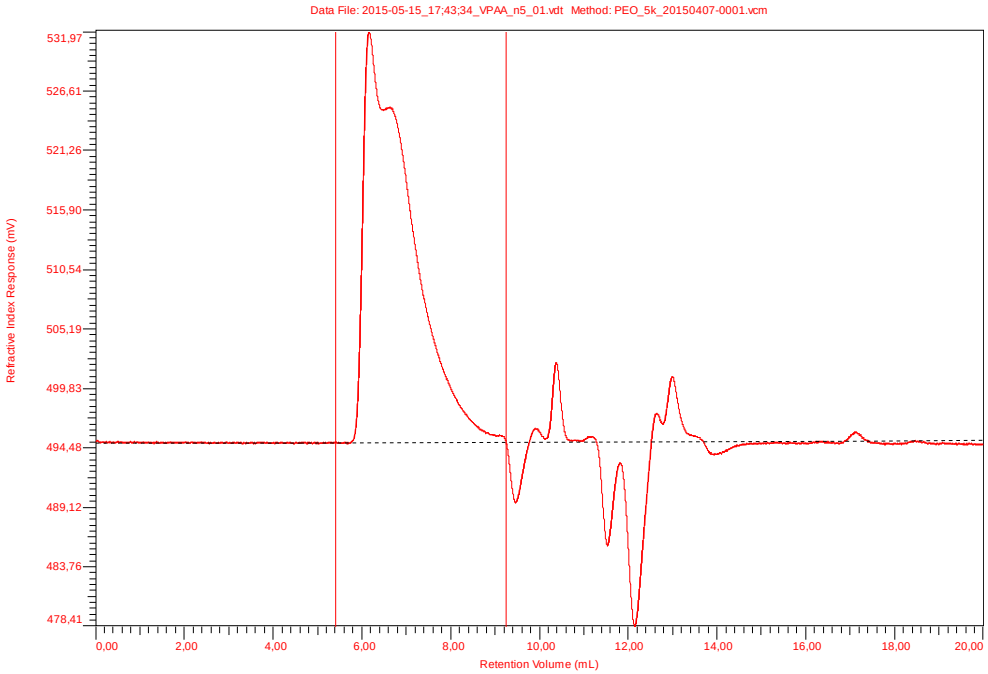
Şekil 4. 21. Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,25** oranı için GPC Işık Saçılması Kromatogramı



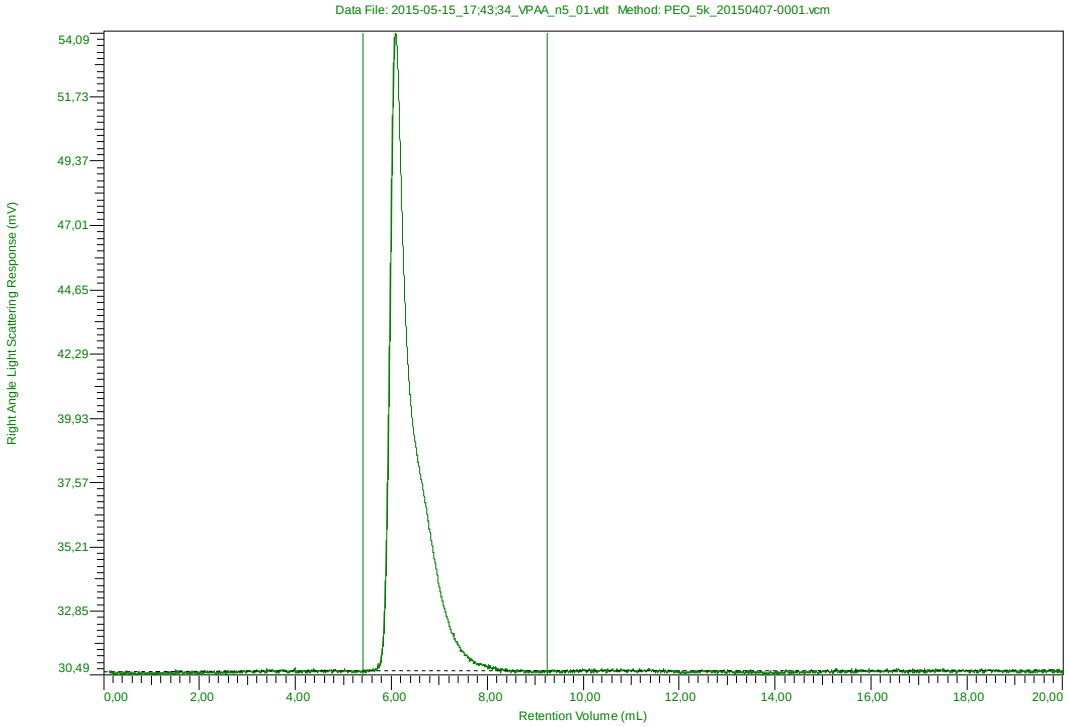
Şekil 4. 22. Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,25** oranı için GPC Kırılma İndisi Kromatogramına göre Molekül Ağırlığı Tayini

Tablo 4. 5. Sentezlenen Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,25** oranı için GPC Kırılma İndisi Kromatogramına göre Molekül ğırlığı Tayinine ait elde edilen veriler

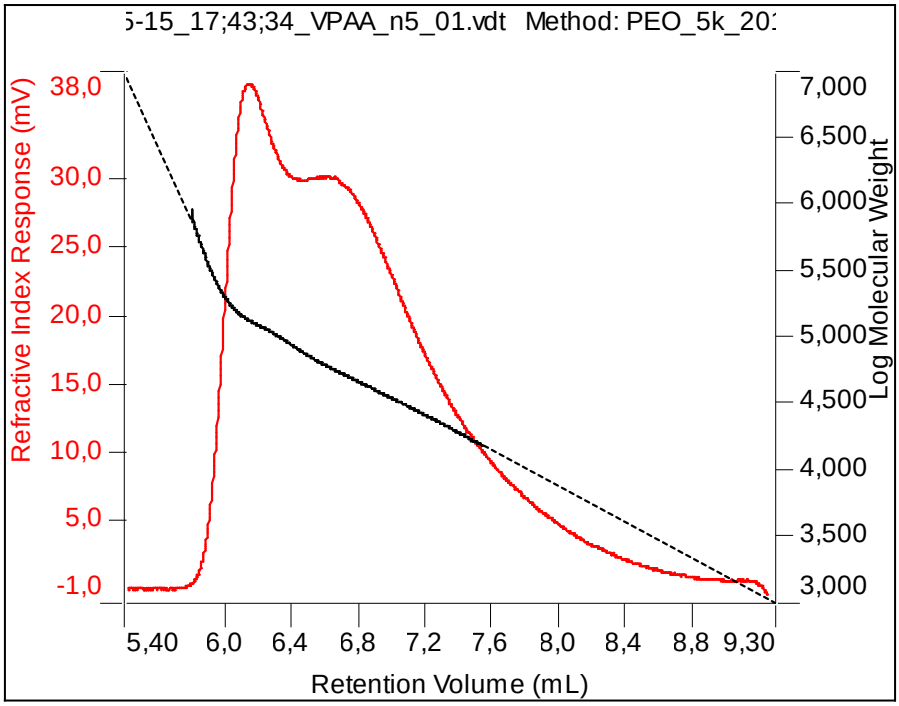
n=0,25 oranı için;		
Mn - (Daltons)	32.320	
Mw - (Daltons)	71.847	
Mz - (Daltons)	123.422	
Mp - (Daltons)	130.160	
Mw / Mn	2,223	
RI Area - (mvml)	71,53	
UV Area - (mvml)	0,00	
RALS Area - (mvml)	21,60	
LALS Area - (mvml)	0,00	
IVDP Area - (mvml)	0,00	
Sample Parameters	Input	Calculated
Sample Conc - (mg/ml)	1,000	0,000
Sample Recovery (%)	0,000	0,000
dn/dc - (ml/g)	0,0000	0,1541
dA/dc - (ml/g)	0,0000	0,0000



Şekil 4. 23. Poli(N-Vinil-2-pirolidon-co-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,3** oranı için GPC Kırılma İndisi Kromatogramı



Şekil 4. 24. Poli(N-Vinil-2-pirolidon-co-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,3** oranı için GPC Işık Saçılması Kromatogramı

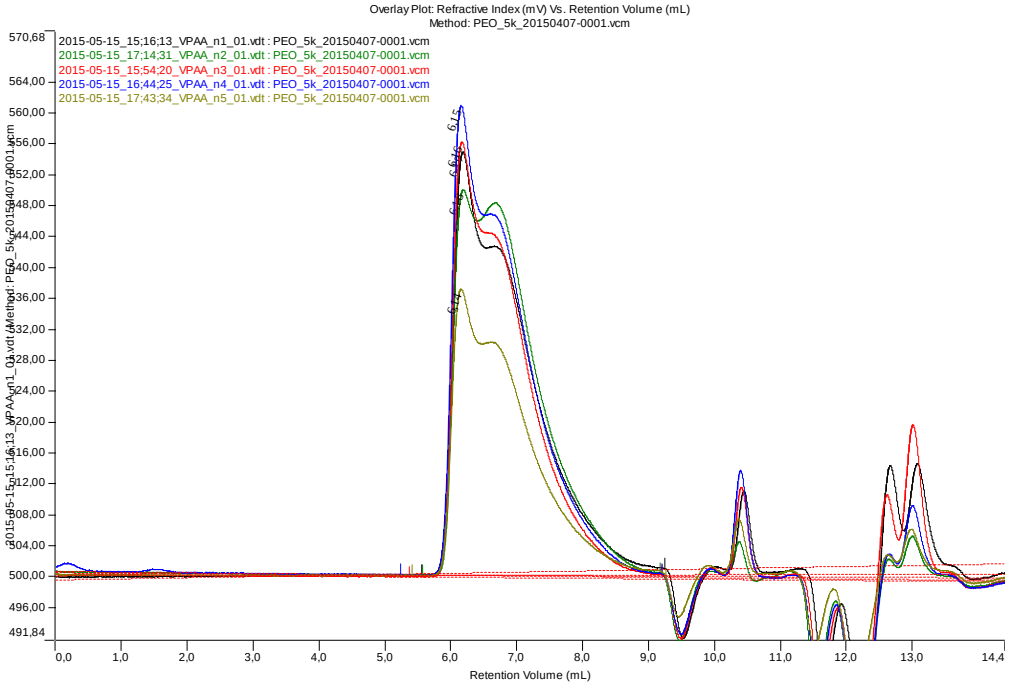


Şekil 4. 25. Poli(N-Vinil-2-pirolidon-co-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,3** oranı için GPC Kırılma İndisi Kromatogramına göre Molekül Ağırlığı Tayini

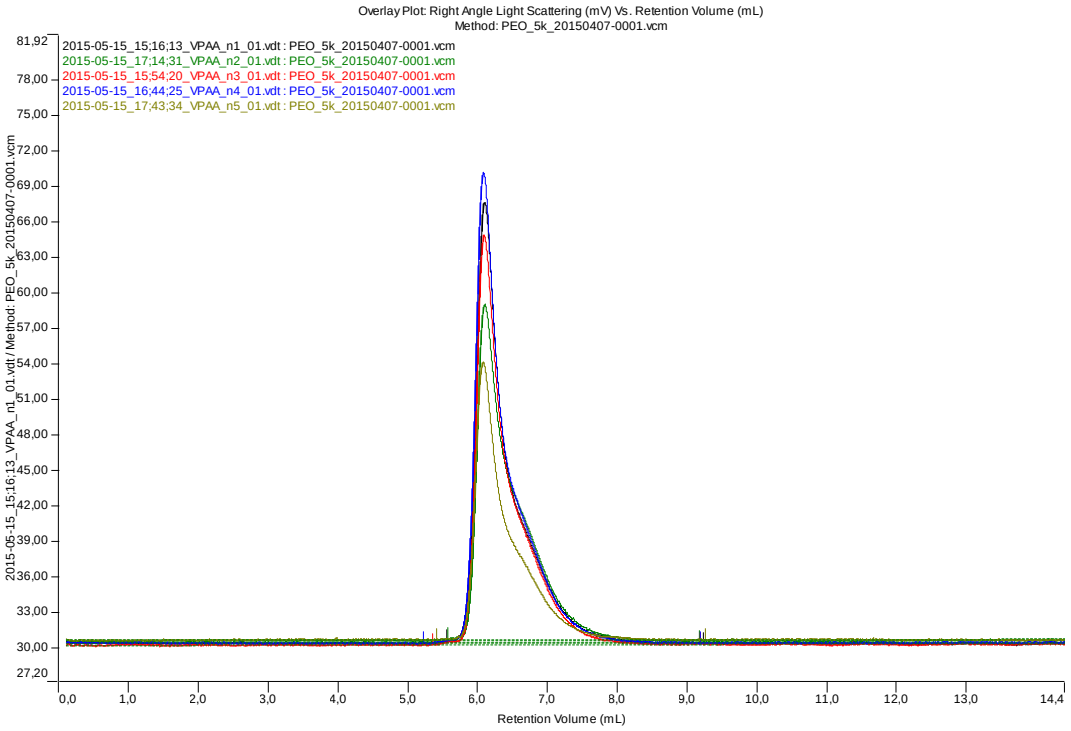
Tablo 4. 6. Sentezlenen Poli(N-Vinil-2-pirolidon-co-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,3** oranı için GPC Kırılma İndisi Kromatogramına göre Molekül ğırlığı Tayinine ait elde edilen veriler

n=0,3 oranı için;		
Mn - (Daltons)	27.010	
Mw - (Daltons)	70.768	
Mz - (Daltons)	124.658	
Mp - (Daltons)	131.194	
Mw / Mn	2,620	
RI Area - (mvml)	45,56	
UV Area - (mvml)	0,00	
RALS Area - (mvml)	12,92	
LALS Area - (mvml)	0,00	
IVDP Area - (mvml)	0,00	
Sample Parameters	Input	Calculated

Sample Conc - (mg/ml)	0,665	0,000
Sample Recovery (%)	0,000	0,000
dn/dc - (ml/g)	0,0000	0,1476
dA/dc - (ml/g)	0,0000	0,0000



Şekil 4. 26. Poli(N-Vinil-2-pirolidon-co-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3** oranları için karşılaştırılmalı GPC Kırılma İndisi Kromatogramları

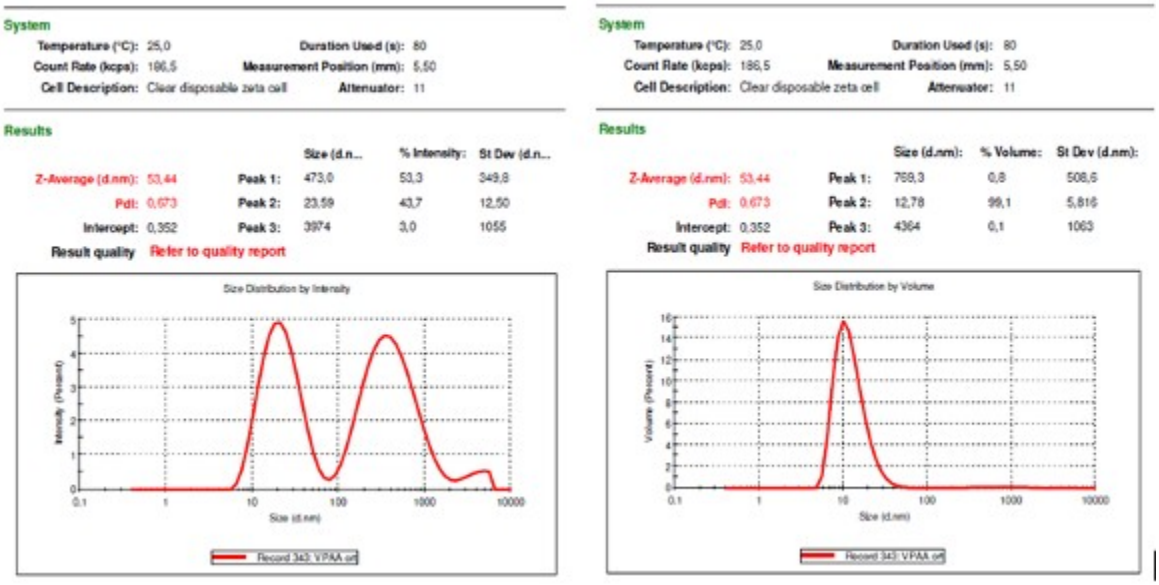


Şekil 4. 27. Poli(N-Vinil-2-pirolidon-co-Akrilik asit) Polimerinin **n=0,1 ; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3** oranları için karşılaştırılmalı GPC Işık Saçılması Kromatogramları

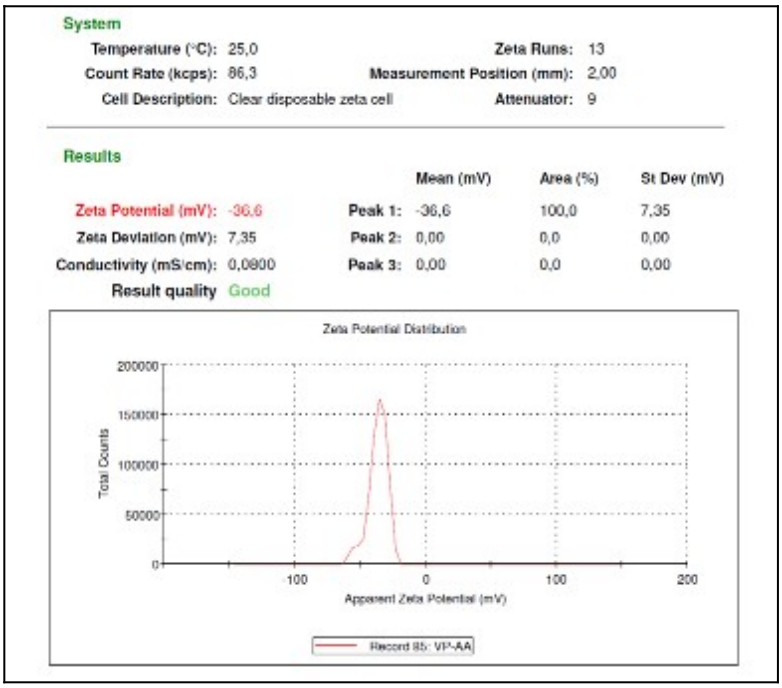
Yapılan GPC analizler sonucunda molekül ağırlığı ve PDI değerleri göz önünde bulundurularak n=0,1 oranındaki polimerle çalışılması uygun bulunmuştur.

3.2.2.2 ZetaSizer Analizi

Bunun üzerine sadece n=0,1 oranının Malvern ZEN 3600 Zetasizer Nano ZS Zetapotansiyel ve Parçacık boyut ölçüm cihazı ile yapılan ölçüm sonuçları Şekil 4.28 - 4.29'da verilmektedir.



Şekil 4. 28. Poli(N-Vinil-2-pirolidon-co-Akrilik asit) polimerinin sırasıyla Zetasizer şiddet ve hacim grafikleri

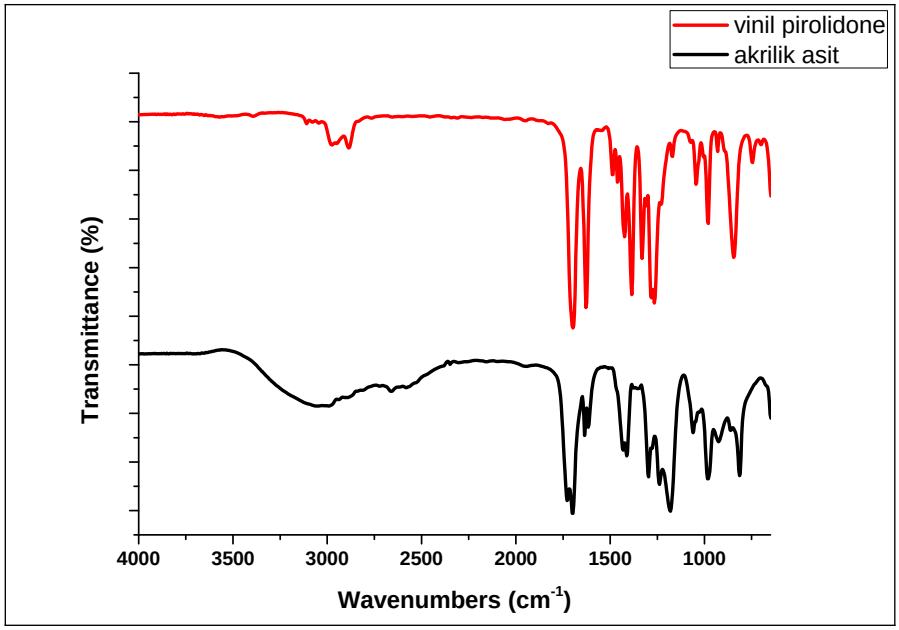


Şekil 4. 29. P(VP-co-AA) polimerine ait Zeta potansiyel grafiği

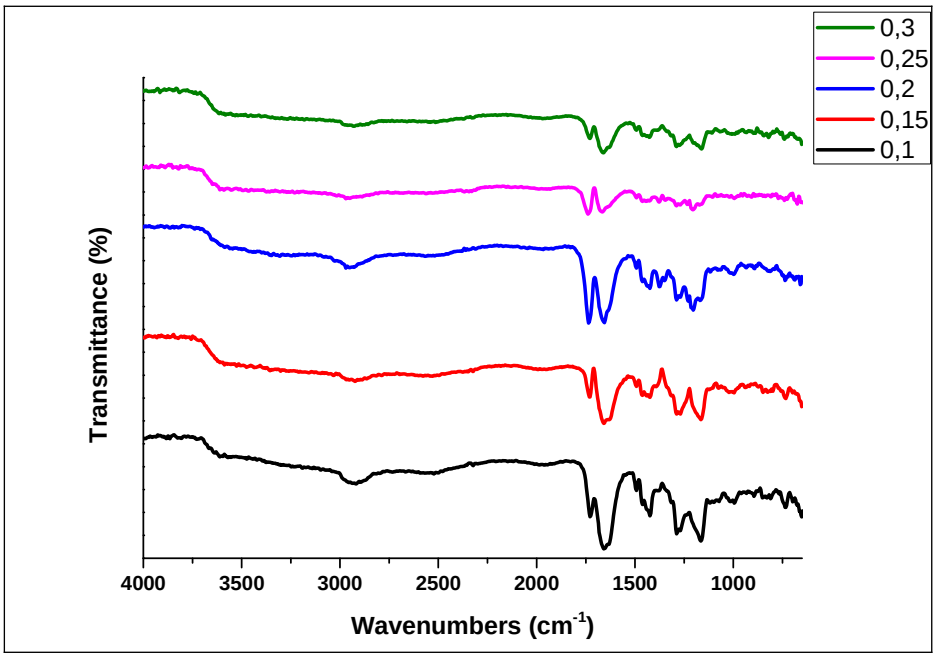
Polimerimizin Z-ave boyutu 53,44 nm şekil 31 de de gösterildiği gibi yükü (negatif) – 36,6 dır.

3.2.2.3 FTIR Analizi

Akrilik asit ve vinil pirolidon monomerlerine ait FTIR spektrumları Şekil 4.30'da; elde edilen 5 farklı molekül ağırlığındaki polimerlerin analizleri Şekil 4.31'de gösterilmektedir.



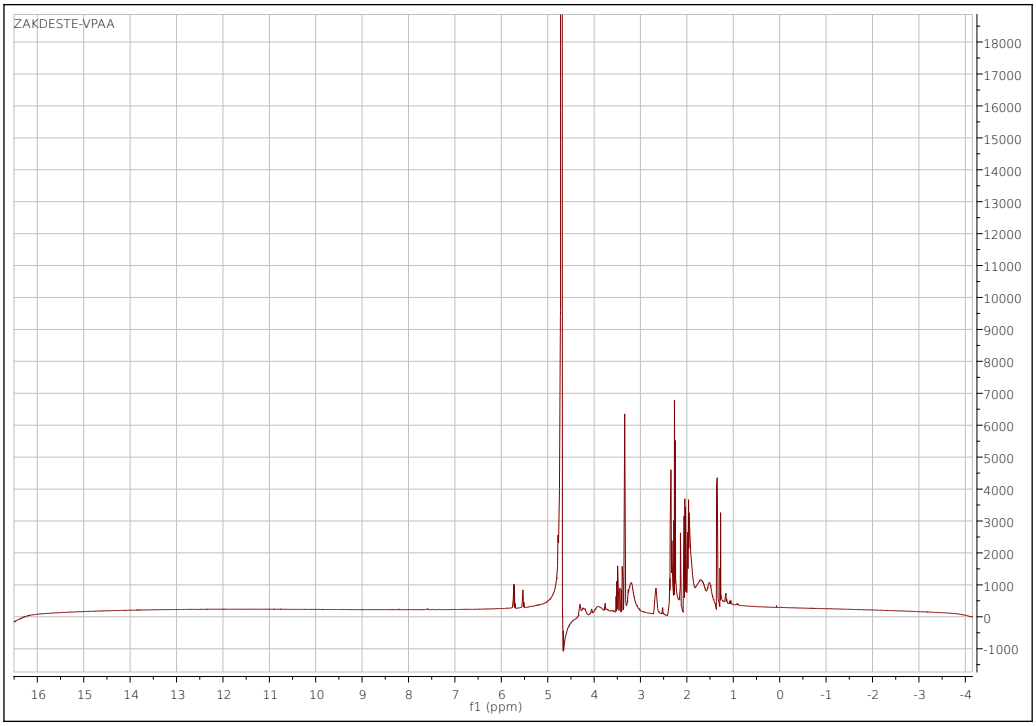
Şekil 4. 30. Akrilik asit ve vinil pirolidon monomerlerine ait FTIR spektrumları



Şekil 4. 31. Elde edilen 5 farklı molekül ağırlığındaki polimerlerin FTIR spektrumları

3.2.2.4 NMR Analizi

P(VP-co-AA) polimerine ait NMR spektrumu Şekil 4. 32'de verilmiştir.



Şekil 4. 32 P(VP-co-AA) polimerine ait NMR analizi sonucu

3.3 Komplekslerin ve Konjugatların Analizine Ait Bulgular

LPS biyomolekülünün P(VP-co-AA) polimeri ve polioksidonyum polimeri ile gerçekleştirilen kompleks ve konjugatlarına ait analiz sonuçları bu bölümde verilmektedir.

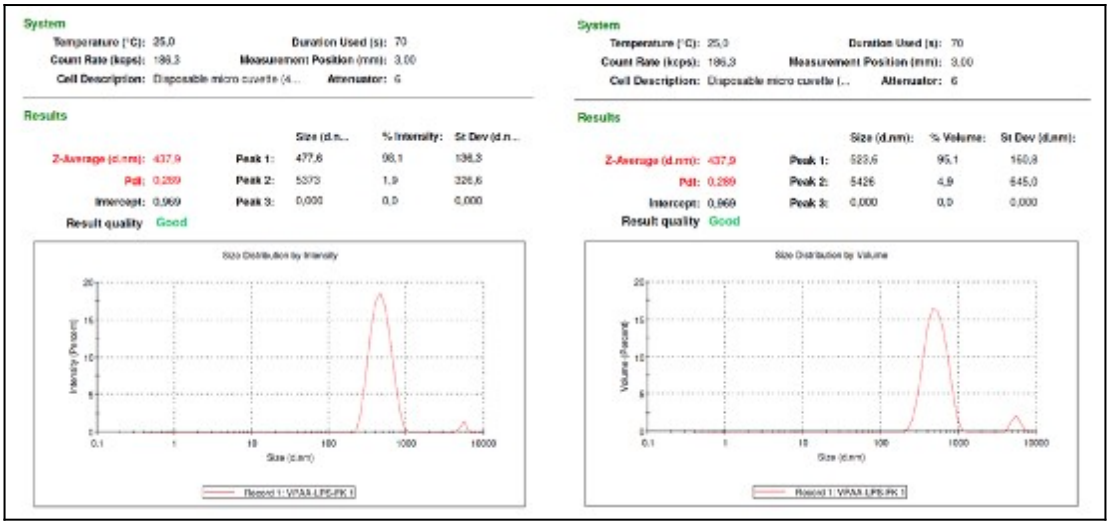
3.3.1 LPS ile Komplekslerin Analizine ait Bulgular

LPS biyomolekülünün P(VP-co-AA) ve polioksidonyum polimeri ile gerçekleştirdiği fiziksel kompleks ve metal iyonu varlığında gerçekleştirilen 3'lü LPS-Cu^{2+}-Polimer komplekslerinin analizine ait bulgular aşağıda verilmiştir.

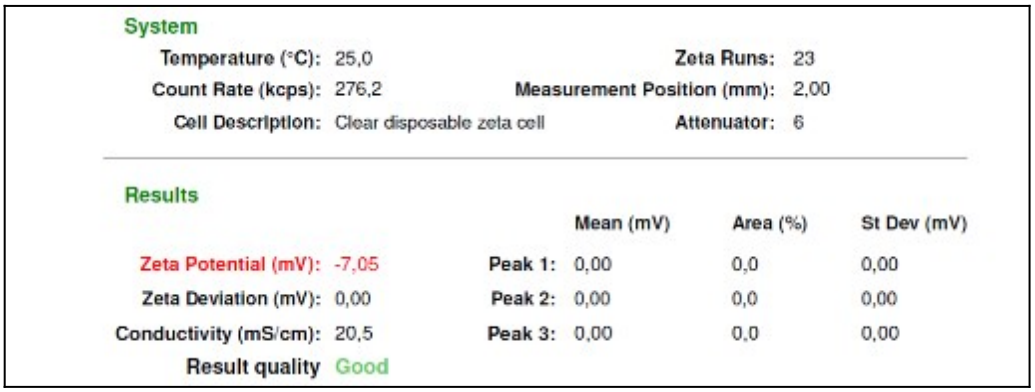
3.3.1.1 LPS-P(VP-co-AA) Fiziksel Komplekslerinin Analizine ait Bulgular

ZetaSizer Analizi

LPS-P(VP-co-AA) Fiziksel Komplekslerinin ZetaSizer şiddet ve hacim grafikleri sırasıyla Şekil 4.33' de gösterilmiştir. Zeta potansiyel değeri Şekil 4.34'de verilmiştir.



Şekil 4. 33. LPS-P(VP-co-AA) Fiziksel Komplekslerinin sırasıyla ZetaSizer şiddet ve hacim grafikleri

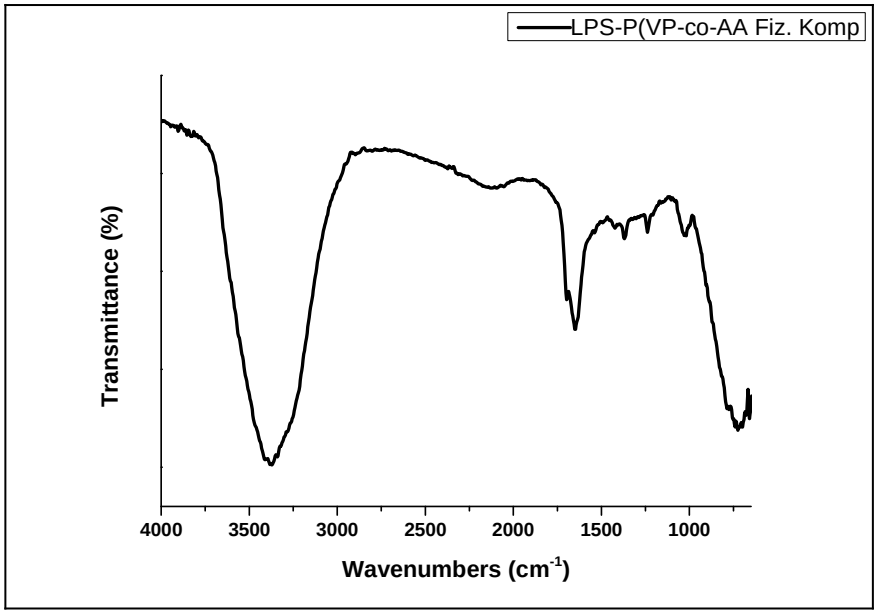


Şekil 4. 34. LPS-P(VP-co-AA) Fiziksel Komplekslerinin Zeta Potansiyeli

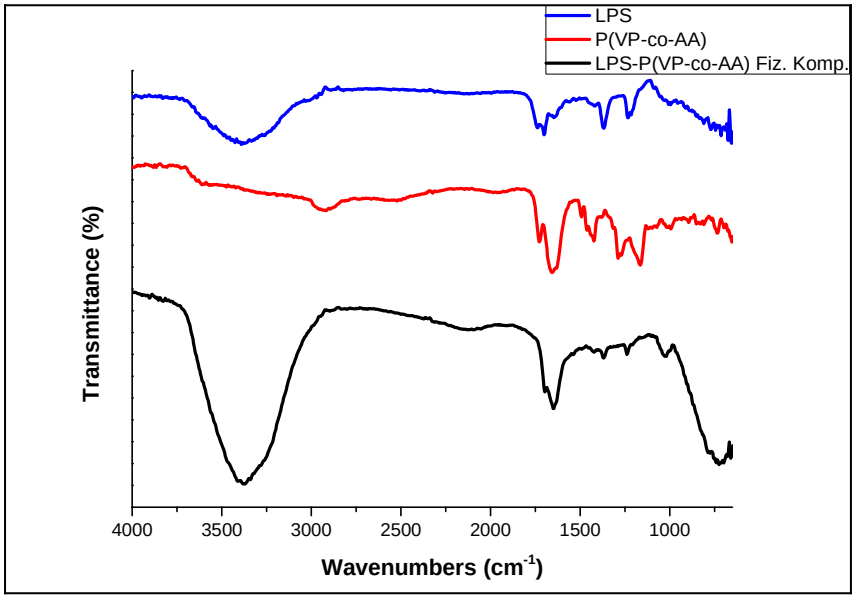
Fiziksel kompleksin hidrodinamik çapı 437,9 nm şekil 4.31'de gösterildiği gibi yükü (negatif) -7,05 dir.

FTIR Analizi

LPS-P(VP-co-AA) fiziksel kompleksine ait FTIR analizi Şekil 4.35'de; LPS, polimer ve kompleks kıyaslamalı FIR spektrumu şekil 4.36'da gösterilmektedir.



Şekil 4. 35. LPS-P(VP-co-AA) fiziksel kompleksine ait FTIR spektrumu

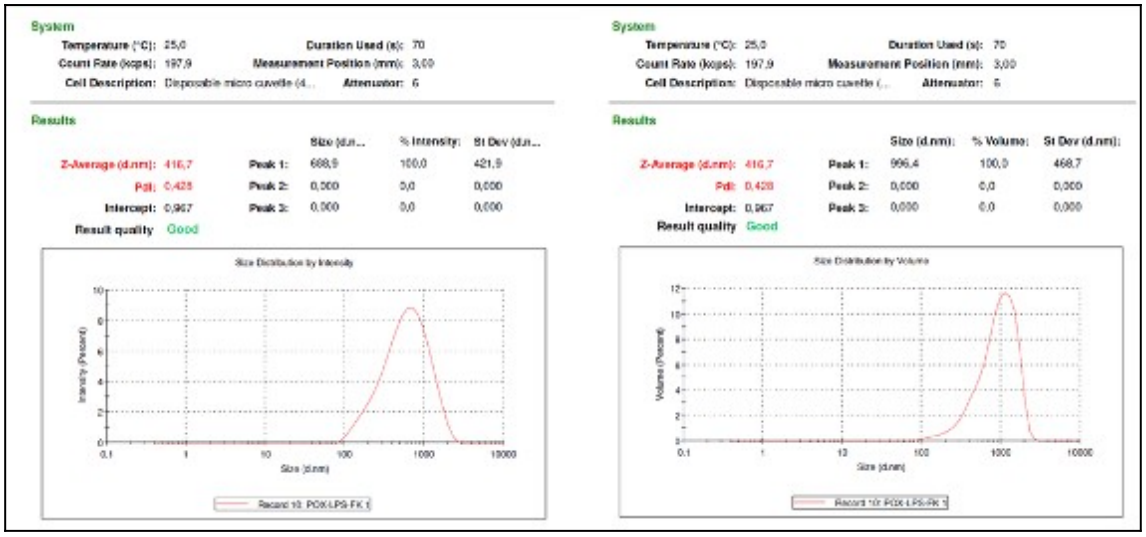


Şekil 4. 36. LPS, P(VP-co-AA) ve LPS-P(VP-co-AA) fiziksel kompleksine ait kıyaslamalı FTIR spektrumu

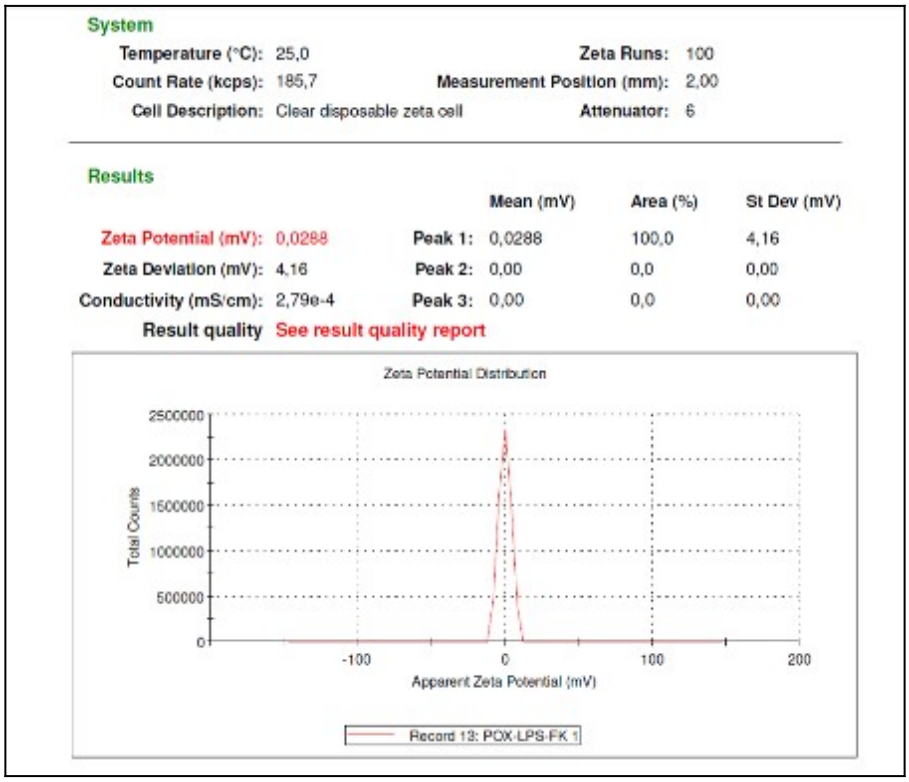
3.3.1.2 LPS-Polioksidonyum Fiziksel Komplekslerinin Analizine ait Bulgular

ZetaSizer Analizi

LPS-POX Fiziksel Kompleksinin ZetaSizer şiddet ve hacim grafikleri sırasıyla Şekil 4.37'de gösterilmiştir. Zeta potansiyel değeri Şekil 4.38' de verilmiştir.



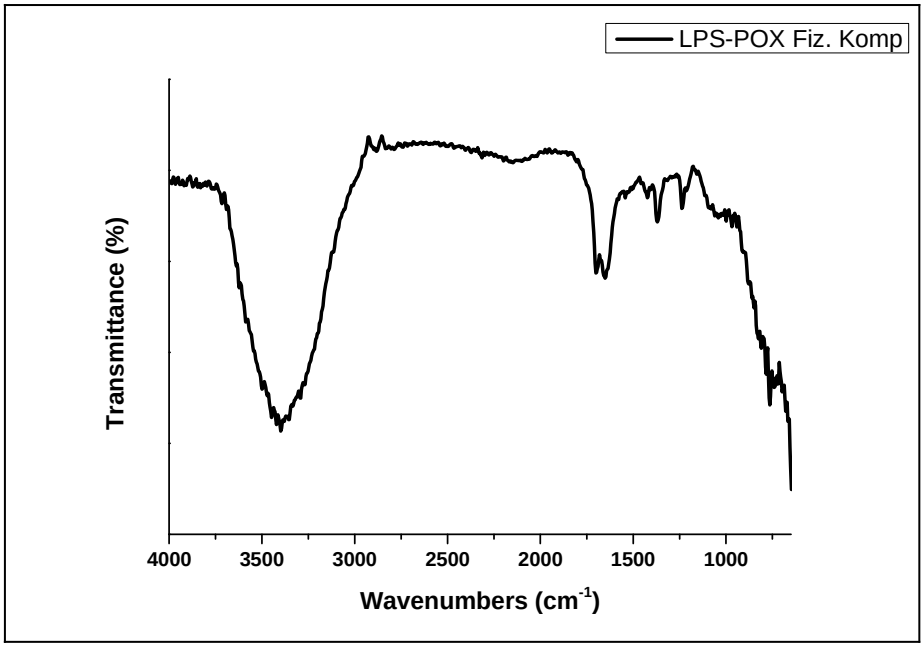
Şekil 4. 37. LPS-POX Fiziksel Komplekslerinin ZetaSizer şiddet ve hacim grafikleri



Şekil 4. 38. LPS-POX Fiziksel Komplekslerinin Zeta potansiyel grafiği

Analizi

LPS-POX fiziksel kompleksine ait FTIR spektrumu Şekil 4.39'da gösterilmektedir.

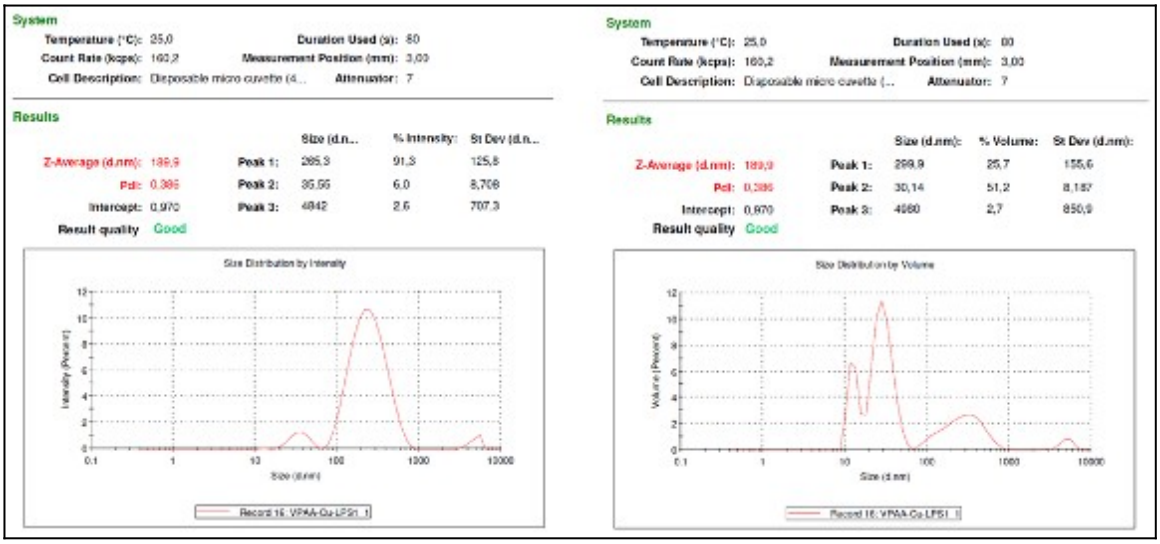


Şekil 4. 39. LPS-POX fiziksel kompleksine ait FTIR spektrumu

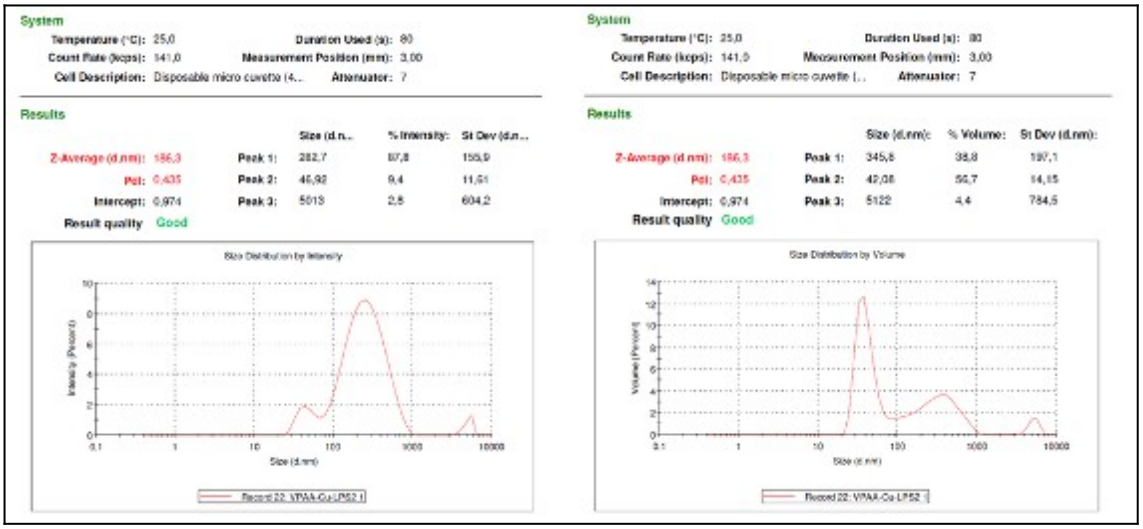
3.3.1.3 P(VP-co-AA)-Cu^{2+}-LPS Komplekslerinin Analizine Ait Bulgular

ZetaSizer Analizi

P(VP-co-AA)-Cu^{2+}-LPS-1 ve P(VP-co-AA)- Cu^{2+}-LPS-2 komplekslerine ait ZetaSizer boyut sonuçları sırasıyla Şekil 4.40-4.41'de ve zeta potansiyel sonucu Şekil 4.42-4.43'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 40. P(VP-co-AA)-Cu^{2+}-LPS-1 kompleksine ait sırasıyla ZetaSizer şiddet ve hacim grafikleri



Şekil 4. 41. P(VP-co-AA)-Cu^{2+}-LPS-2 kompleksine ait sırasıyla ZetaSizer şiddet ve hacim grafikleri

System

Temperature (°C):	25,0	Zeta Runs:	12
Count Rate (kcps):	368,7	Measurement Position (mm):	2,00
Cell Description:	Clear disposable zeta cell	Attenuator:	8

Results

			Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV):	-12,3	Peak 1:	0,00	0,0	0,00
Zeta Deviation (mV):	0,00	Peak 2:	0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm):	18,6	Peak 3:	0,00	0,0	0,00
Result quality	Good				

Şekil 4. 42. P(VP-co-AA)-Cu^{2+}-LPS-1 kompleksine ait zeta potansiyeli

System

Temperature (°C):	25,0	Zeta Runs:	12
Count Rate (kcps):	177,1	Measurement Position (mm):	2,00
Cell Description:	Clear disposable zeta cell	Attenuator:	7

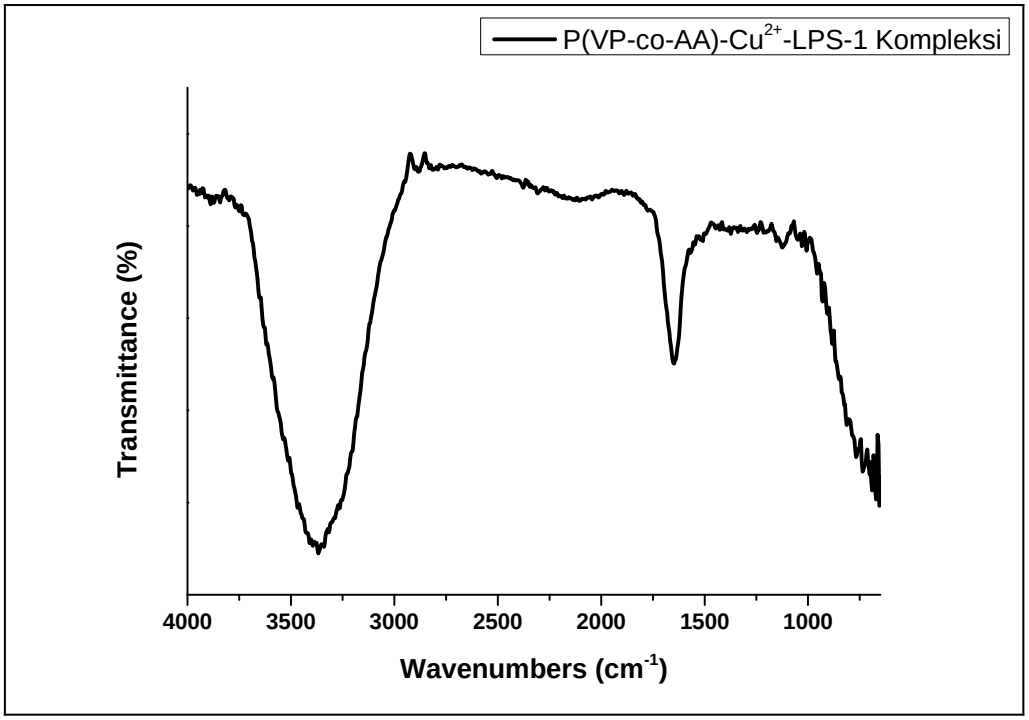
Results

			Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV):	-11,1	Peak 1:	0,00	0,0	0,00
Zeta Deviation (mV):	0,00	Peak 2:	0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm):	18,6	Peak 3:	0,00	0,0	0,00
Result quality	Good				

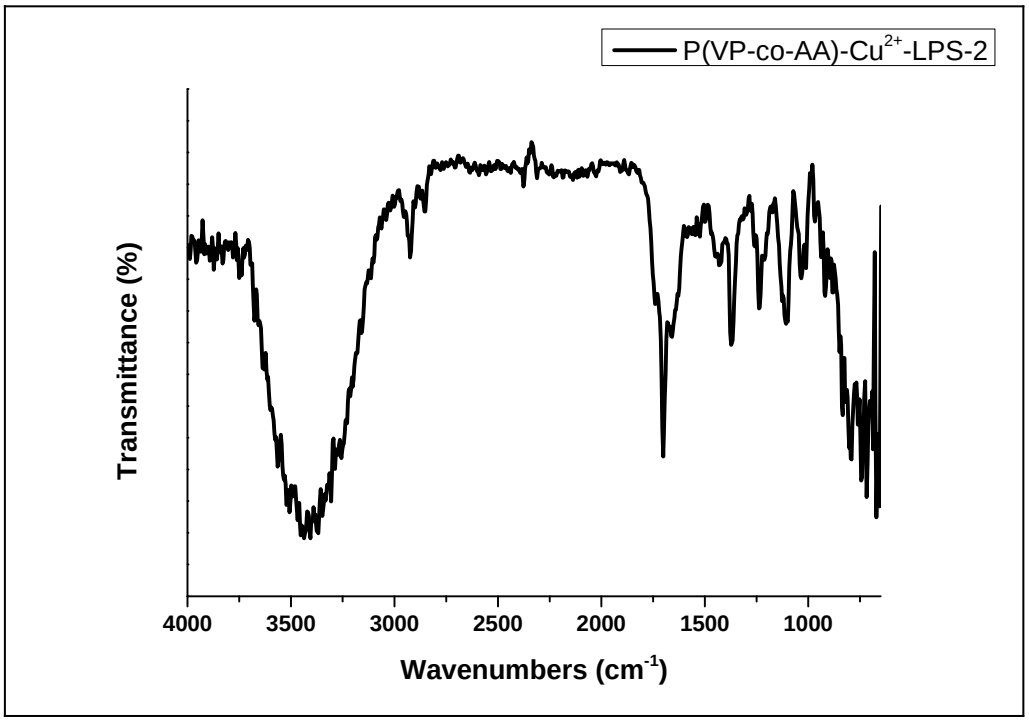
Şekil 4. 43. P(VP-co-AA)-Cu^{2+}-LPS-2 kompleksine ait zeta potansiyeli

FTIR Analizi

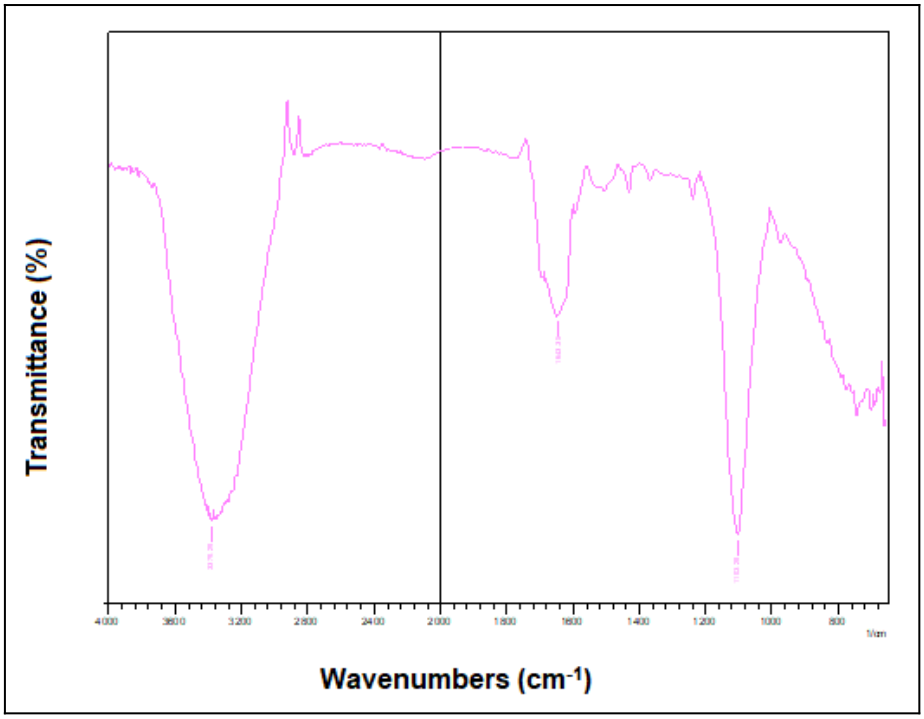
P(VP-co-AA)-Cu^{2+}-LPS-1 Kompleksine ait FTIR spektrumu Şekil 4.44' de, P(VP-co-AA)-Cu^{2+}-LPS-2 Kompleksine ait FTIR spektrumu Şekil 4.45' de verilmiştir. $CuSO_4.5H_2O$'a ait FT-IR spektrumu Şekil 4.46'da ve P(VP-co-AA)-Cu^{2+}-LPS-1, LPS ve $CuSO_4.5H_2O$'ın kıyaslamalı FTIR spektrumu Şekil 4.47'de verilmiştir.



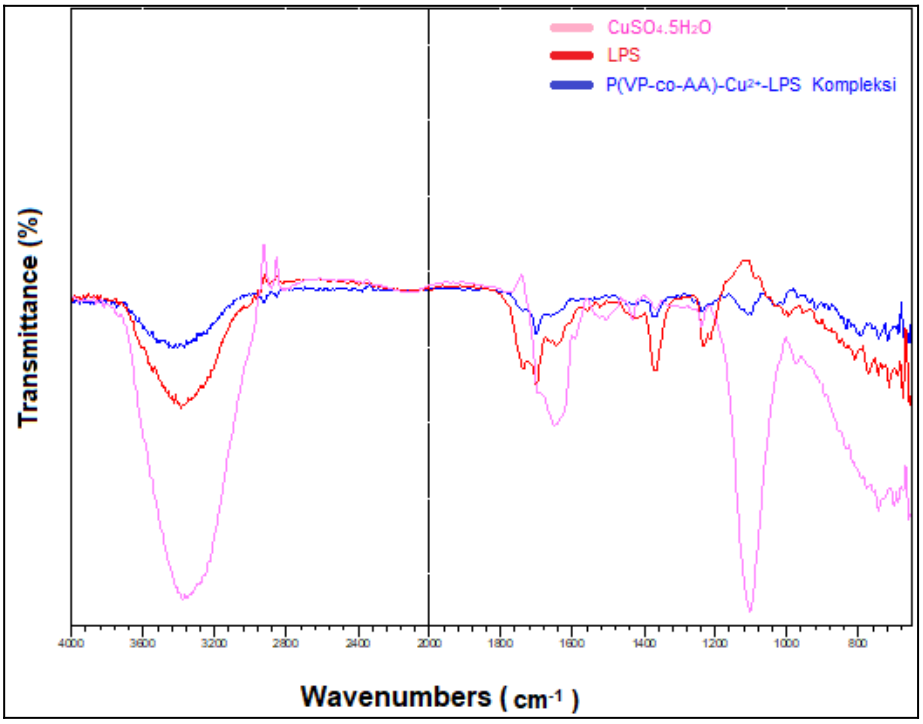
Şekil 4. 44. P(VP-co-AA)-Cu^{2+}-LPS-1 Kompleksine ait FTIR spektrumu



Şekil 4. 45. P(VP-co-AA)-Cu^{2+}-LPS-2 Kompleksine ait FTIR spektrumu



Şekil 4. 46. $CuSO_4.5H_2O$'a ait FTIR spektrumu

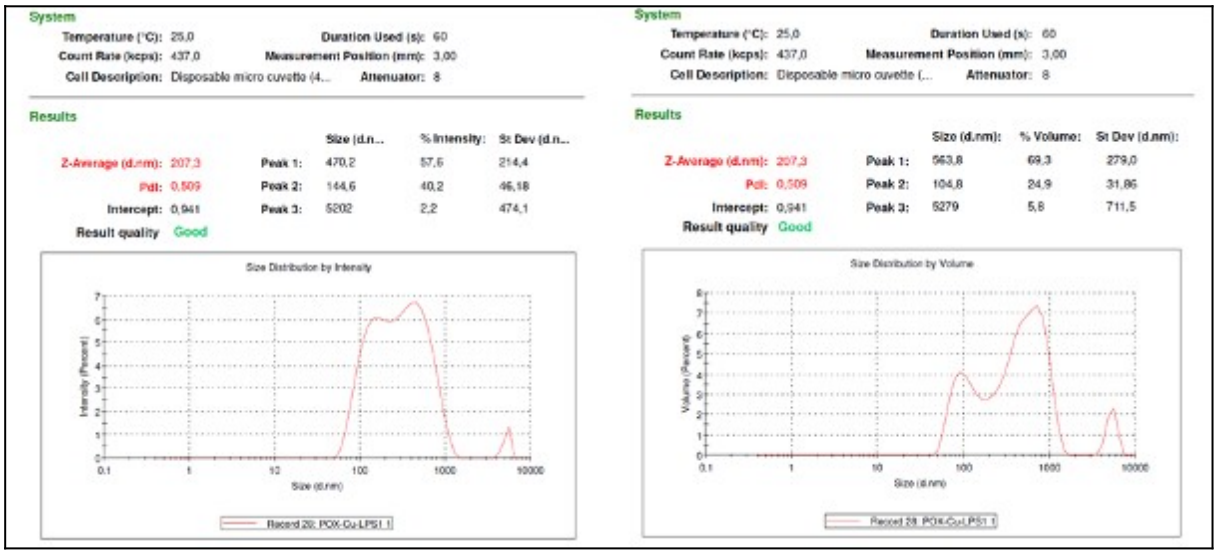


Şekil 4. 47. P(VP-co-AA)-Cu^{2+}-LPS-1 Kompleksi, $CuSO_4.5H_2O$ ve LPS'ye ait karşılaştırmalı FTIR spektrumu

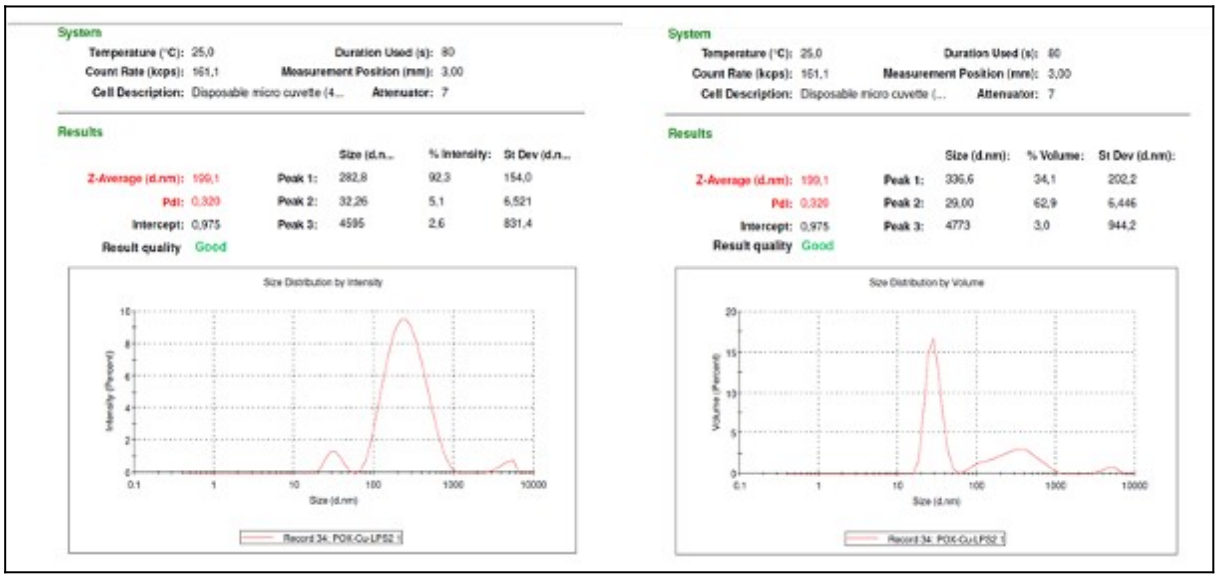
3.3.1.4 POX-Cu^{2+}-LPS Komplekslerinin Analizine Ait Bulgular

ZetaSizer Analizi

POX- Cu^{2+}-LPS-1 ve POX- Cu^{2+}-LPS-2 komplekslerine ait ZetaSizer boyut sonuçları sırasıyla Şekil 4.48-4.49'da ve zeta potansiyel sonucu Şekil 4.50-4.51'de gösterilmiştir.



Şekil 4. 48. Polioksidonyum-Cu^{2+}-LPS-1 kompleksine ait ZetaSizer şiddet ve hacim grafiği



Şekil 4. 49. Polioksidonyum-Cu^{2+}-LPS-2 kompleksine ait ZetaSizer şiddet ve hacim grafiği

System

Temperature (°C):	25,0	Zeta Runs:	100
Count Rate (kcps):	75,9	Measurement Position (mm):	2,00
Cell Description:	Clear disposable zeta cell	Attenuator:	6

Results

			Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV):	-2,85	Peak 1:	0,00	0,0	0,00
Zeta Deviation (mV):	0,00	Peak 2:	0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm):	19,2	Peak 3:	0,00	0,0	0,00

Result quality See result quality report

Şekil 4. 50. Polioksidonyum-Cu^{2+}-LPS-1 kompleksine ait zeta potansiyel değeri

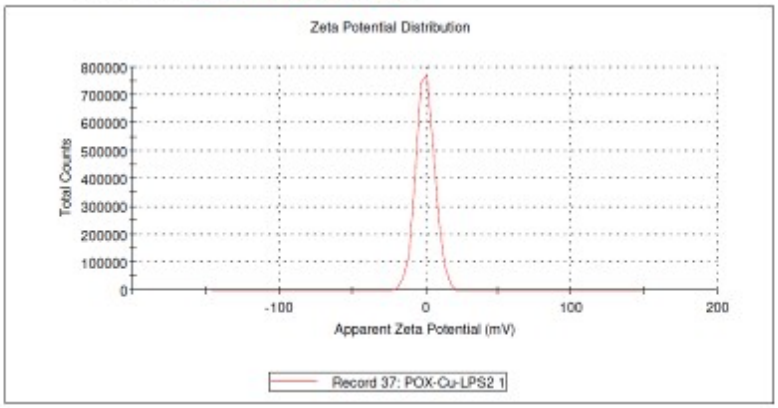
System

Temperature (°C):	25,0	Zeta Runs:	100
Count Rate (kcps):	173,9	Measurement Position (mm):	2,00
Cell Description:	Clear disposable zeta cell	Attenuator:	8

Results

			Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV):	-0,0386	Peak 1:	-0,0386	100,0	6,22
Zeta Deviation (mV):	6,22	Peak 2:	0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm):	3,86e-4	Peak 3:	0,00	0,0	0,00

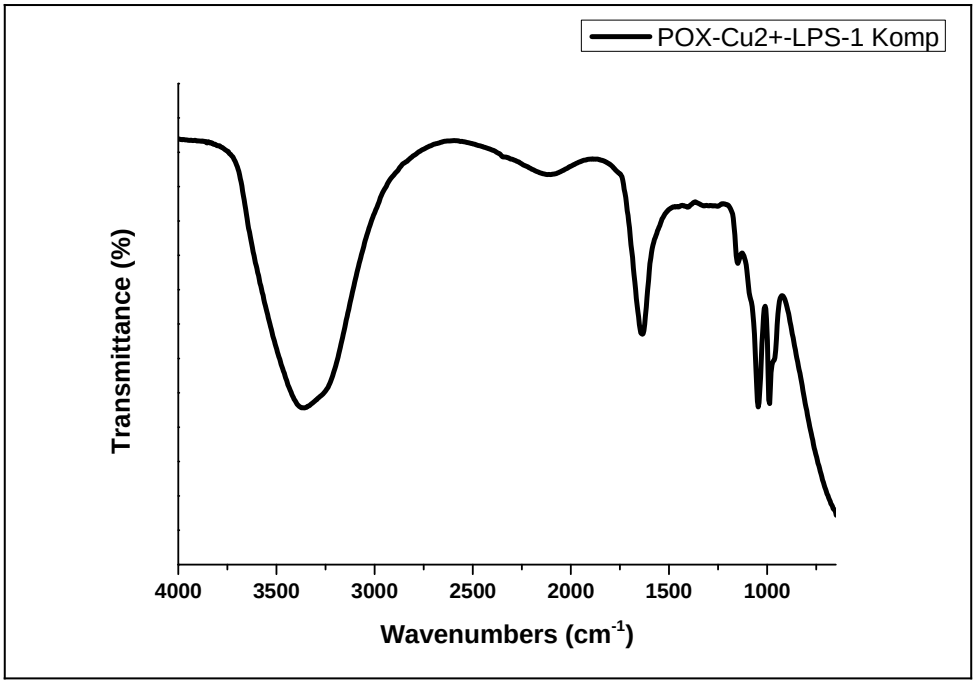
Result quality See result quality report



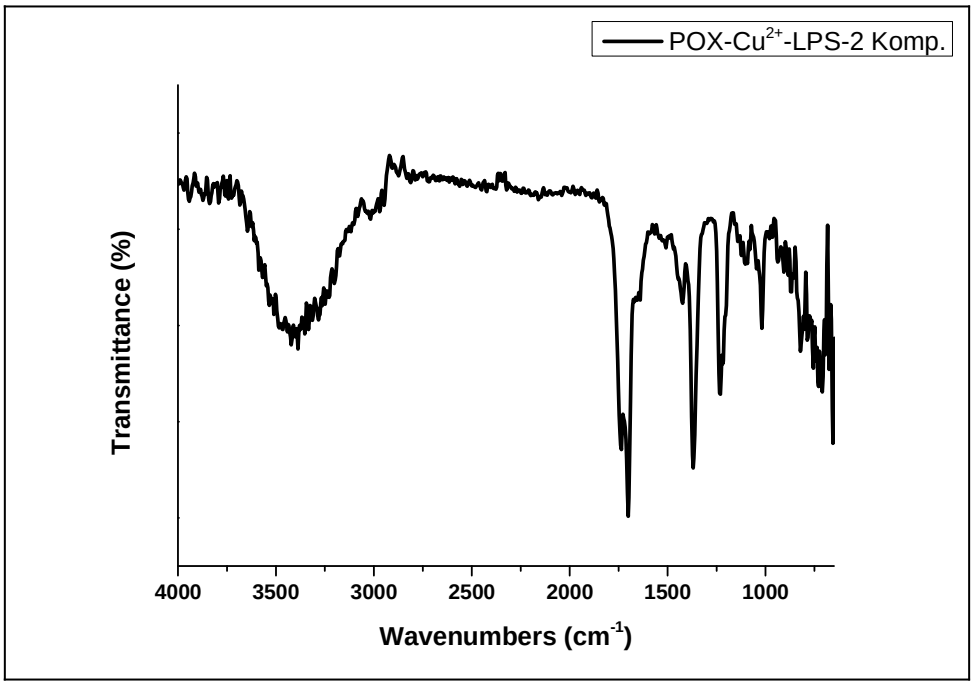
Şekil 4. 51. Polioksidonyum-Cu^{2+}-LPS-2 kompleksine ait zeta potansiyel değeri

FTIR Analizi

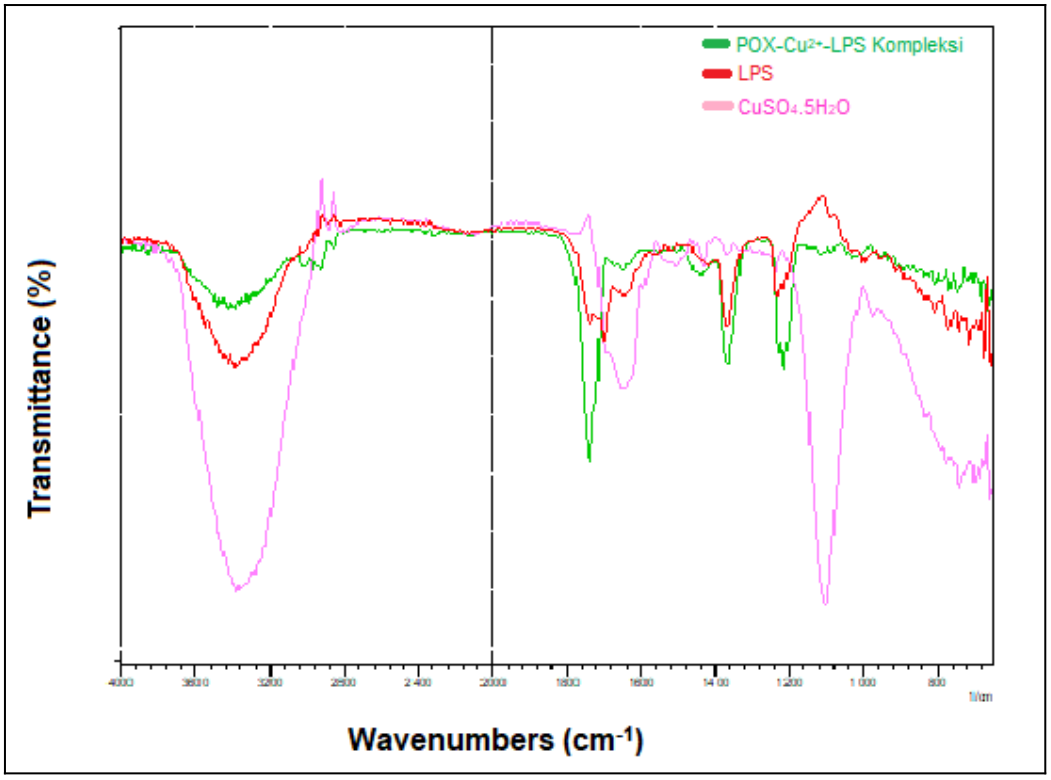
POX-Cu^{2+}-LPS-1 Kompleksine ait FTIR spektrumu Şekil 4.52' de, POX-Cu^{2+}-LPS-2 Kompleksine ait FTIR spektrumu Şekil 4.53'de verilmiştir. POX-Cu^{2+}-LPS-2, LPS ve $CuSO_4.5H_2O$'ın kıyaslamalı FTIR spektrumu Şekil 4.54'de verilmiştir.



Şekil 4. 52. POX-Cu^{2+}-LPS-1 Kompleksine ait FTIR spektrumu



Şekil 4. 53. POX-Cu^{2+}-LPS-2 Kompleksine ait FTIR spektrumu



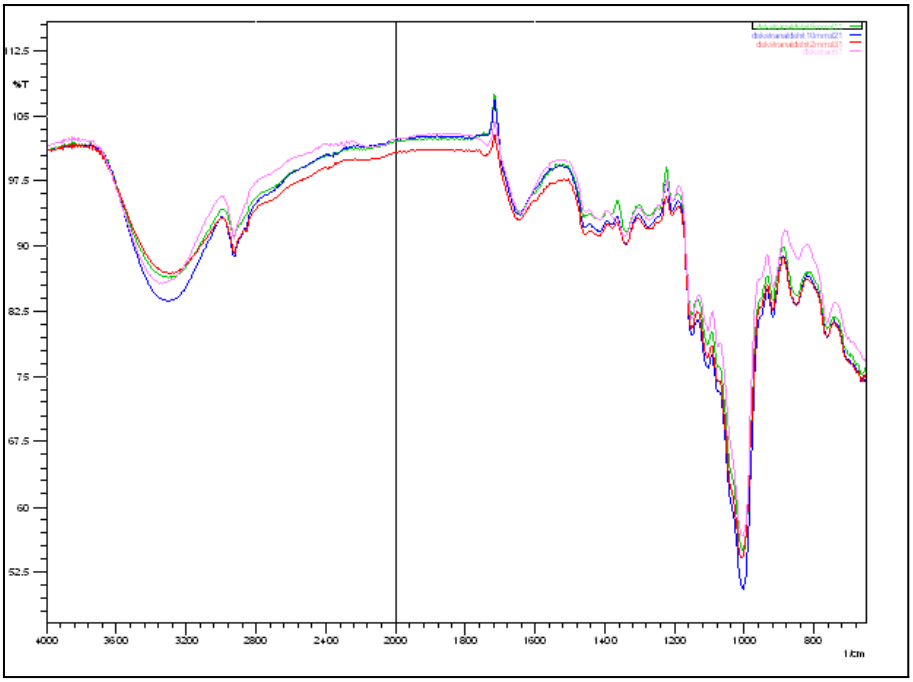
Şekil 4. 54. Polioksidonyum-Cu^{2+}-LPS2 Kompleksi, $CuSO_4.5H_2O$ ve LPS'ye ait karşılaştırmalı FT-IR spektrumu

3.3.1.5 Konjugatların Oluşturulmasına ait Bulgular

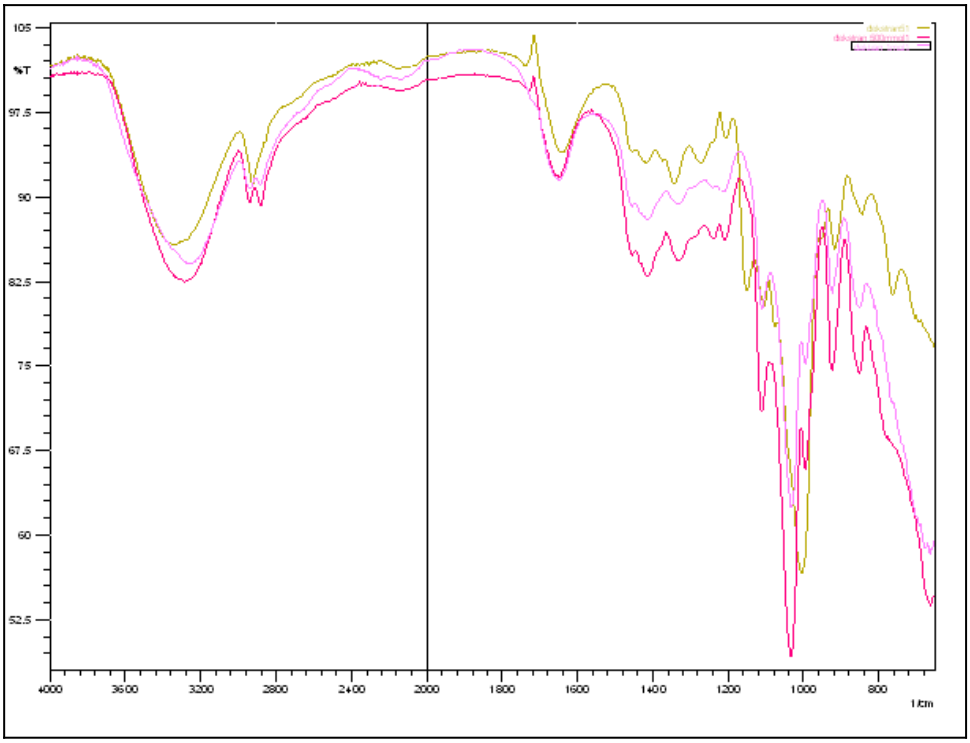
LPS'nin aldehit türevinin oluşturulması

Dekstranın Aldehit Türevinin oluşturulmasın ait Bulgular

LPS'nin periyodatla oksidasyonundan önce deneme amaçlı hazırlanan dekstran aldehit türevine ait bulgular Şekil 4.55 ve Şekil 4.56 'da verilmektedir.



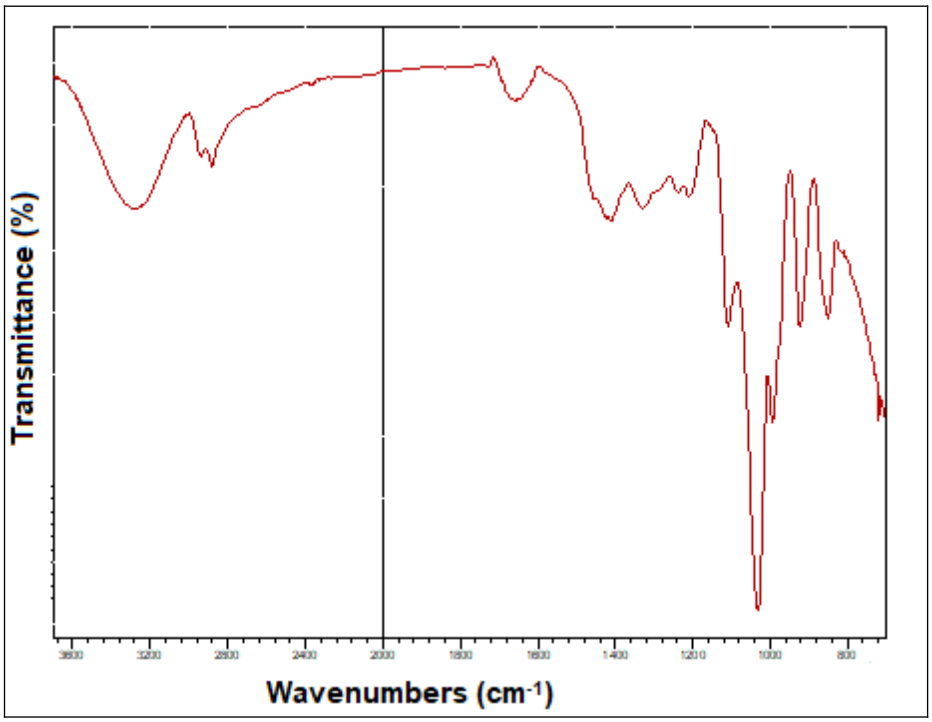
Şekil 4. 55. Dekstranın 2mM (♣), 5 mM (♣) ve 10mM (♣) $NaIO_4$ ile oksidasyonunun dekstran (♣) ile kıyaslamalı FTIR analizi



Şekil 4. 56. Dekstranın 500 mM (♣) ve 1 M (♣) $NaIO_4$ ile oksidasyonunun dekstranla (♣) kıyaslamalı FTIR analizi

LPS ‘nin aldehit türevinin oluşumuna ait Bulgular

LPS’nin periyodatla oksidasyonu sonucunda elde edilen LPS’nin aldehit türevine ait FTIR spektrumu şekil 4.57’de verilmiştir.



Şekil 4. 57. LPS’nin Aldehit türevinin (LPS-OH) (♣) FTIR spektrumu

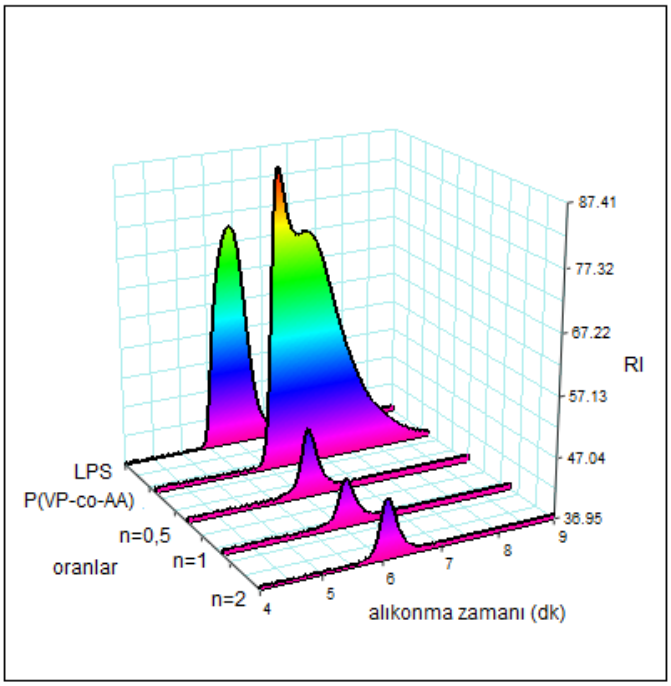
3.3.2 NH_2-LPS’nin Biyopolimerle Konjugasyonu

3.3.2.1 -NH_2-LPS’nin P(VP-co-AA) ile Biyokonjugatlarının Sentezi ve Karakterizasyonuna ait Bulgular

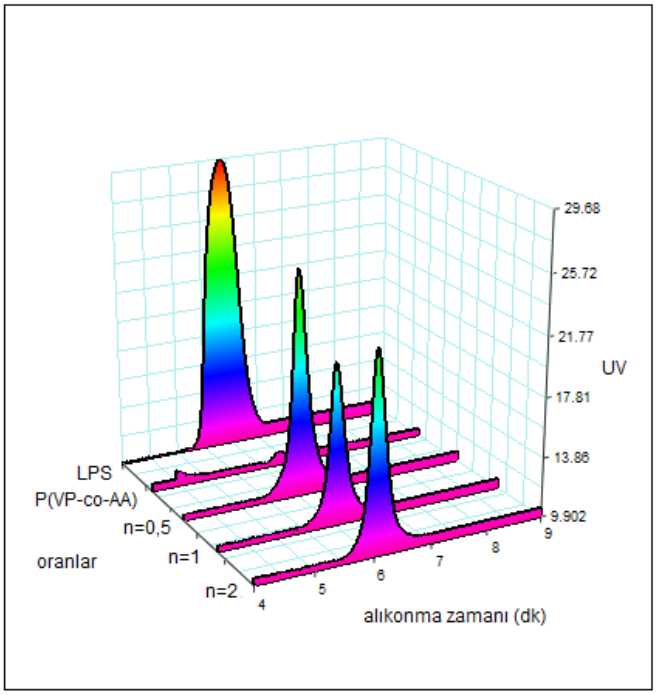
$n_{P(VP\text{-}co\text{-}AA)}/n_{LPS}$ oranları 0,5; 1 ve 2 olmak üzere EDC varlığında sentezlenen konjugatlar GPC, HPLC, FTIR ve ZetaSizer cihazları ile karakterize edilmiştir.

GPC Analizi

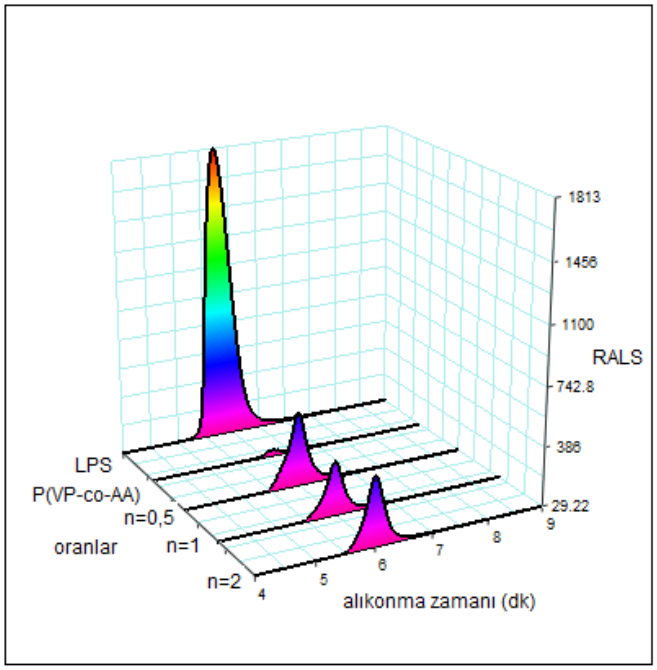
$n_{P(VP\text{-}co\text{-}AA)}/n_{LPS}$ oranları 0,5; 1 ve 2 olmak üzere EDC varlığında sentezlenen konjugatlar GPC cihazı ile analiz edildi ve elde edilen GPC kromatogramları LPS ve polimerin kromatogramları ile kıyaslamalı olarak Şekil 4.58-4.59-4.60’ da verildi.



Şekil 4. 58. $n_{P(VP\text{-}co\text{-}AA)}/n_{LPS}$ oranları 0,5; 1 ve 2 olan konjugatlara ait LPS ve polimer kıyaslamalı GPC Kırılma İndisi kromatogramı



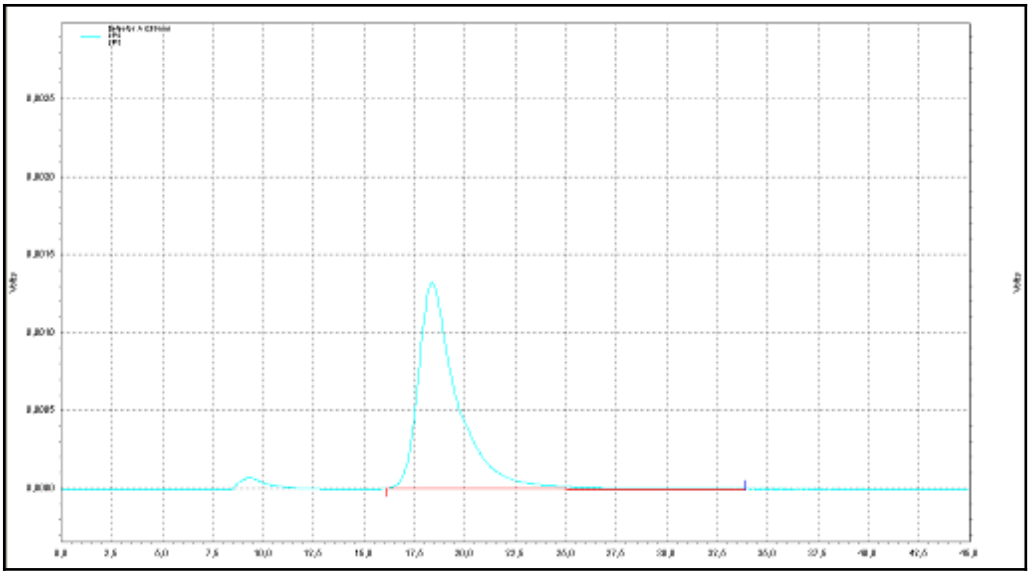
Şekil 4. 59. $n_{P(VP\text{-}co\text{-}AA)}/n_{LPS}$ oranları 0,5; 1 ve 2 olan konjugatlara ait LPS ve polimer kıyaslamalı GPC UV kromatogramı



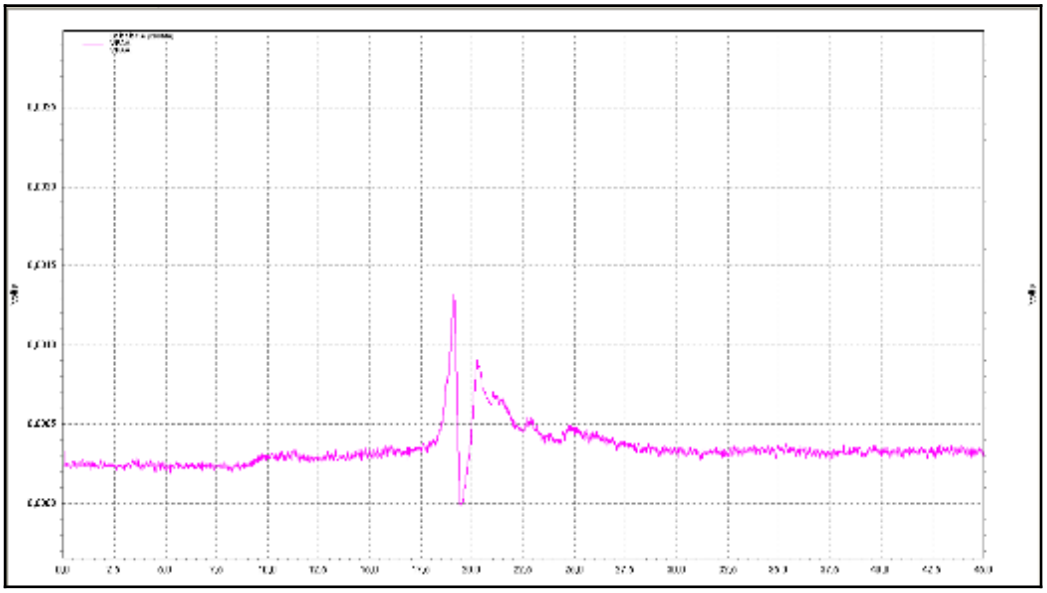
Şekil 4. 60. $n_{P(VP\text{-}co\text{-}AA)}/n_{LPS}$ oranları 0,5; 1 ve 2 olan konjugatlara ait LPS ve polimer kıyaslamalı GPC Işık Saçılması kromatogramı

HPLC Analizi

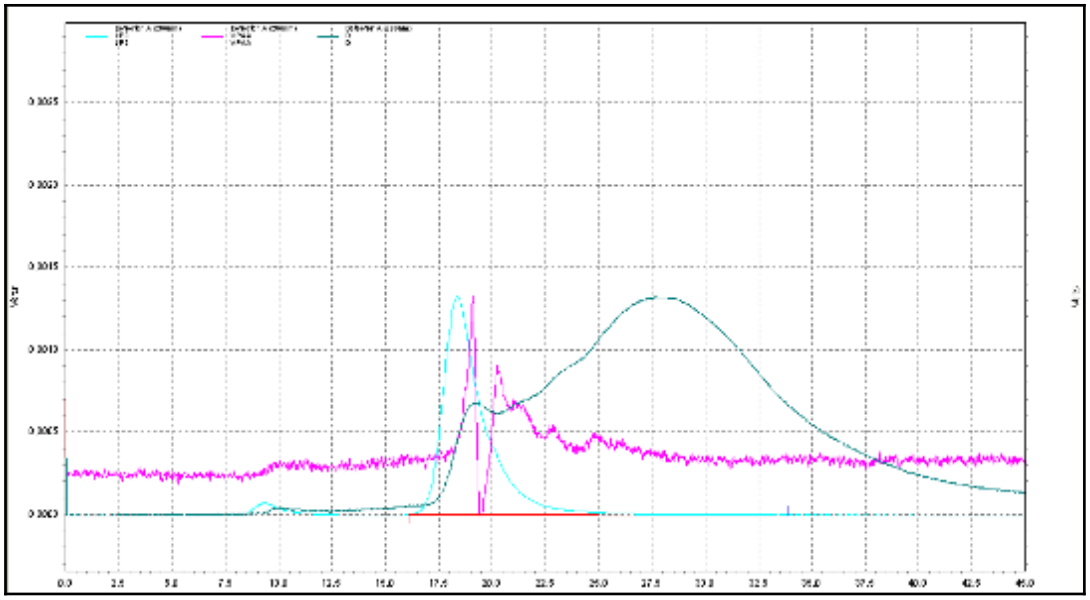
LPS'ye ait HPLC kromatogramı Şekil 4.61'de, P(VP-co-AA) polimerine ait HPLC kromatogramı Şekil 4. 62'de; pH 7'de hazırlanmış $n_{P(VP\text{-}co\text{-}AA)}/n_{LPS}$=0,5; 1; 2 oranlarındaki her bir konjugata ait HPLC kromatogramları, LPS ve polimer kıyaslamalı olarak Şekil 4.63-4.64-4.65'de gösterilmiştir. Şekil 4.66'da tüm oranlara ait HPLC kromatogramları LPS ve polimer kıyaslamalı olmak üzere toplu olarak gösterilmiştir.



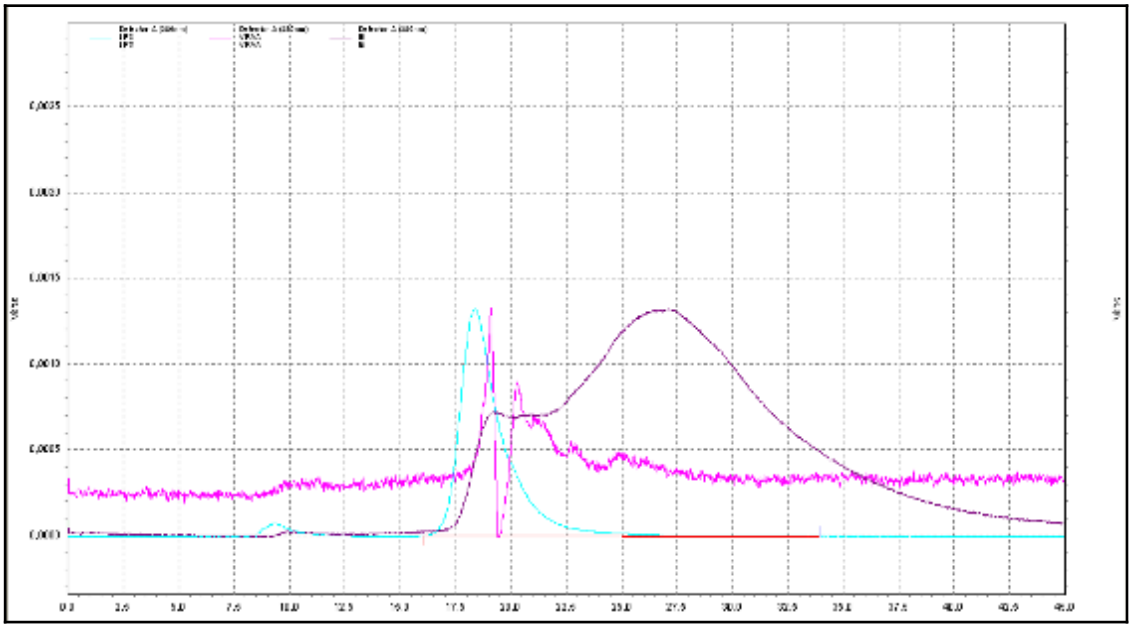
Şekil 4. 61. LPS'ye (♣) ait HPLC kromatogramı



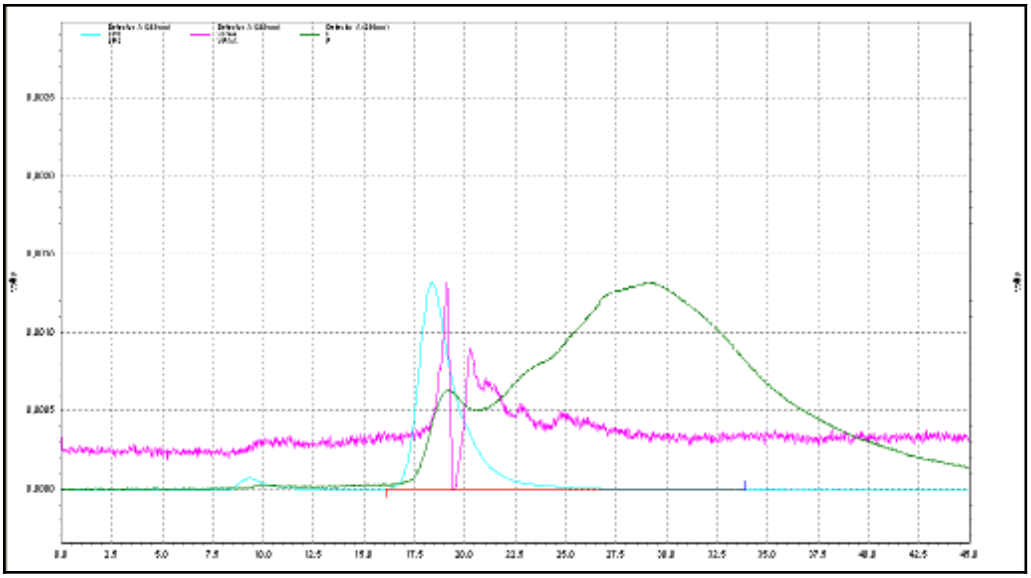
Şekil 4. 62. P(VP-co-AA)' ya (♣) ait HPLC kromatogramı



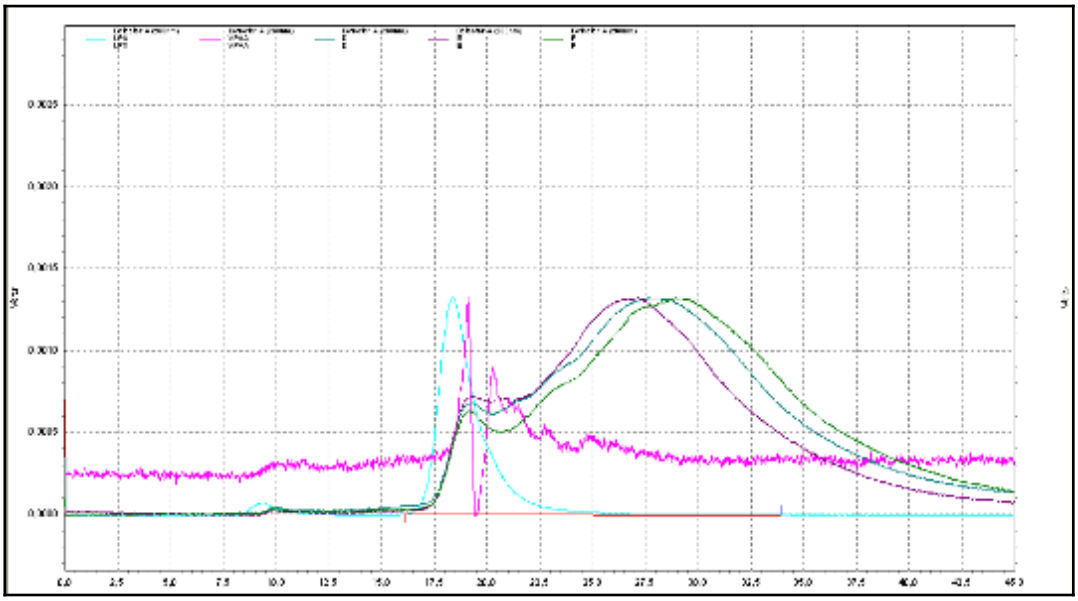
Şekil 4. 63. LPS (♣); P(VP-co-AA) (♣) ve n=0,5 oranındaki LPS- P(VP-co-AA) (♣) konjugatına ait kıyaslamalı HPLC Kromatogramı



Şekil 4. 64. LPS (♣); P(VP-co-AA) (♣) ve n=1 oranındaki LPS- P(VP-co-AA) (♣) konjugatına ait kıyaslamalı HPLC Kromatogramı



Şekil 4. 65. LPS (♣); P(VP-co-AA) (♣) ve n=2 oranındaki LPS- P(VP-co-AA) (♣) konjugatına ait kıyaslamalı HPLC Kromatogramı

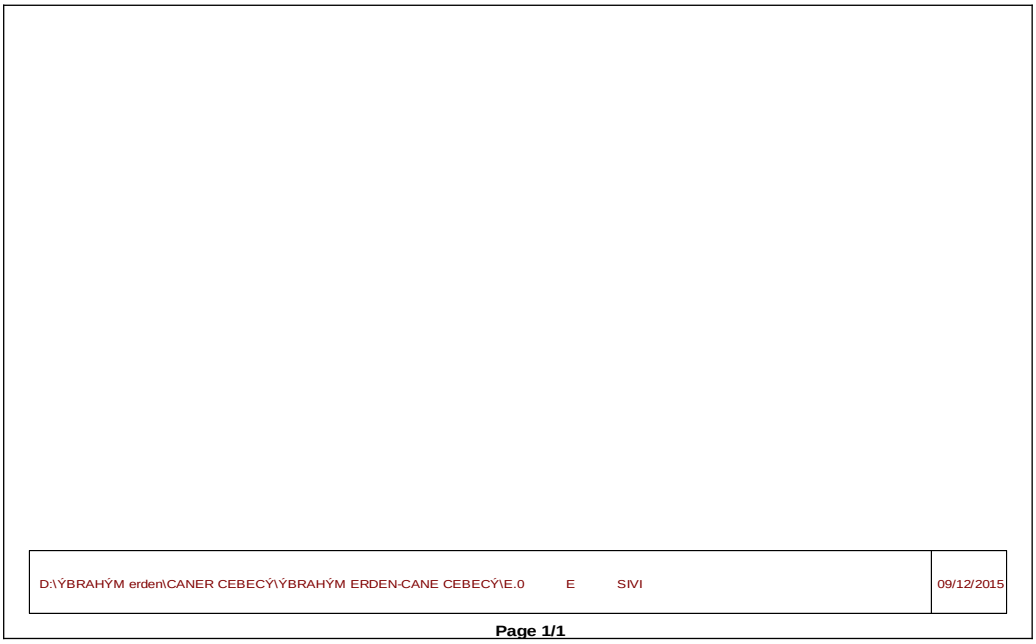


Şekil 4. 66. LPS (♣); P(VP-co-AA) (♣); LPS- P(VP-co-AA) oranlarına ait n=0,5 (♣); n=1(♣); n=2(♣); ait kıyaslamalı HPLC Kromatogramı

FTIR Analizi

Şekil 4.67-4.68-4.69'da $n_{P(VP\text{-}co\text{-}AA)}$ /n_{LPS} oranları 0,5; 1; 2 olan konjugatlarına ait FTIR spektrumları verilmiştir. Şekil 4.70'de üç oranın FTIR spektrumları birbirleriyle karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Şekil 4. 67. Karbodiimid yöntemiyle sentezlenmiş olan $n_{P(VP\text{-}co\text{-}AA)}$/$n_{LPS}$ =0,5 oranındaki konjugatın FTIR Analiz Sonucu



Şekil 4. 68. Karbodiimid yöntemiyle sentezlenmiş olan $n_{P(VP\text{-}co\text{-}AA)}$ /n_{LPS} =1 oranındaki konjugatın FTIR Analiz Sonucu

D:\ÝBRAHÝM erden\CANER CEBECÝ\ÝBRAHÝM ERDEN-CANE CEBECÝ\F.0	F	SIVI	09/12/2015

Page 1/1

Şekil 4. 69. Karbodiimid yöntemiyle sentezlenmiş olan $n_{P(VP\text{-}co\text{-}AA)}/n_{LPS}$ =2 oranındaki konjugatın FTIR Analiz Sonucu

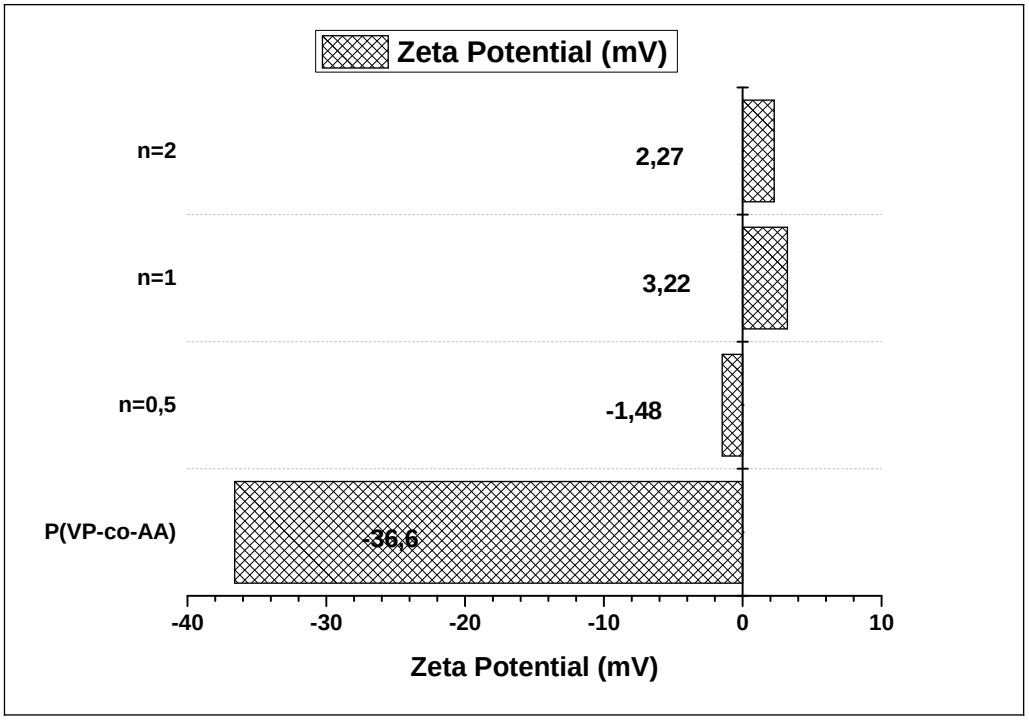
D:\ÝBRAHÝM erden\CANER CEBECÝ\ÝBRAHÝM ERDEN-CANE CEBECÝ\D.1	D	SIVI	09/12/2015
D:\ÝBRAHÝM erden\CANER CEBECÝ\ÝBRAHÝM ERDEN-CANE CEBECÝ\E.1	E	SIVI	09/12/2015
D:\ÝBRAHÝM erden\CANER CEBECÝ\ÝBRAHÝM ERDEN-CANE CEBECÝ\F.1	F	SIVI	09/12/2015

Page 1/1

Şekil 4. 70. Karbodiimid yöntemiyle sentezlenmiş olan $n_{P(VP\text{-}co\text{-}AA)}/n_{LPS}$ =0,5 (♣); 1(♣); 2(♣) oranlarındaki konjugatların karşılaştırmalı FTIR Analiz Sonucu

ZetaSizer Analizi

Karbodiimid yöntemi ile hazırlanan $n_{P(VP\text{-}co\text{-}AA)}$ /n_{LPS}= 0,5; 1; 2 oranlarındaki konjugatlar Zetasizer cihazı ile analiz edildi ve elde edilen zeta potansiyel değerleri polimer ile kıyaslamalı olarak Şekil 4.71'de verildi.



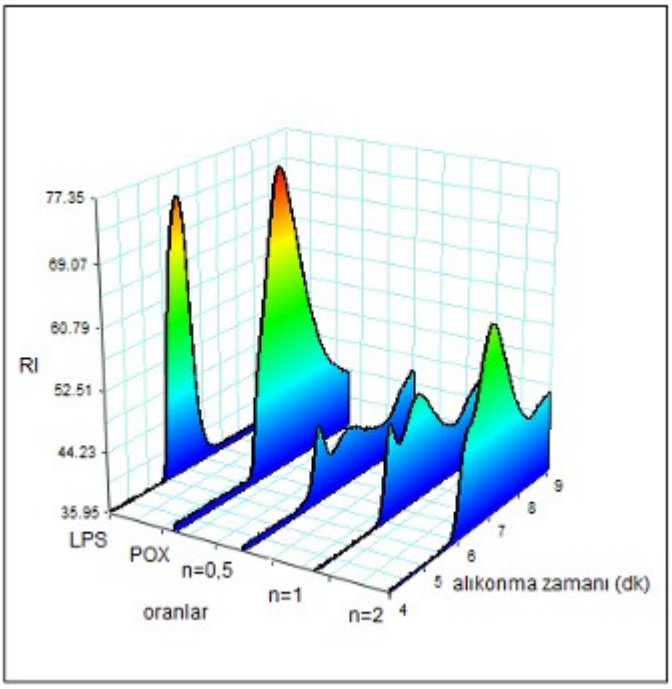
Şekil 4. 71. $n_{P(VP\text{-}co\text{-}AA)}/n_{LPS}$= 0,5; 1; 2 oranlarındaki konjugatlar ait polimer kıyaslamalı zeta potansiyel değerlerinin (mV cinsinden) grafik olarak gösterimi

3.3.2.2 -NH_2-LPS'nin Polioksidonyum Polimeri ile Biyokonjugatlarının Sentezi ve Karakterizasyonuna ait Bulgular

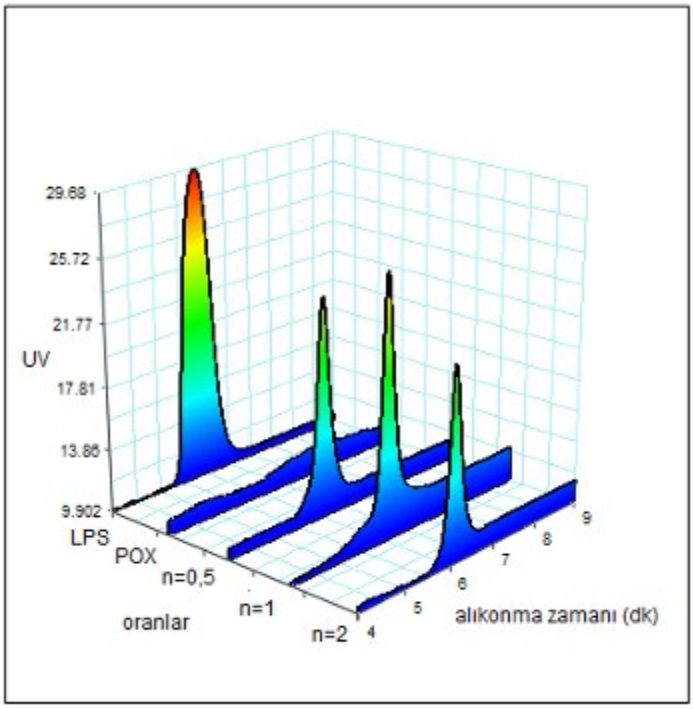
-OH grupları NH_2'ye modifiye edilmiş LPS (NH_2-LPS) ve Polioksidonyum polimerinin EDC çapraz bağlama reaktifi kullanılarak Polimer / LPS oranları 0,5; 1 ve 2 olacak şekilde polimerin artan oranlarında sentezlenen konjugatları GPC, HPLC, FTIR ve ZetaSizer cihazları ile karakterize edilmiştir.

GPC Analizi

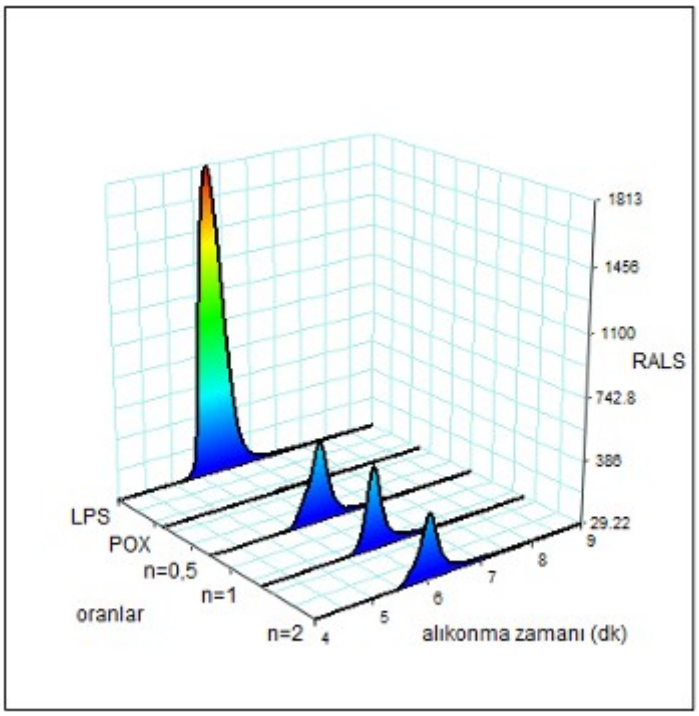
n_{POX}/n_{LPS} oranları 0,5; 1 ve 2 olmak üzere EDC varlığında sentezlenen konjugatlar GPC cihazı ile analiz edildi ve elde edilen GPC kromatogramları LPS ve polimerin kromatogramları ile kıyaslamalı olarak Şekil 4.72-4.73-4.74'de verildi.



Şekil 4. 72. n_{POX}/n_{LPS} oranları 0,5; 1 ve 2 olan konjugatlara ait LPS ve polimer kıyaslamalı GPC Kırılma İndisi kromatogramı



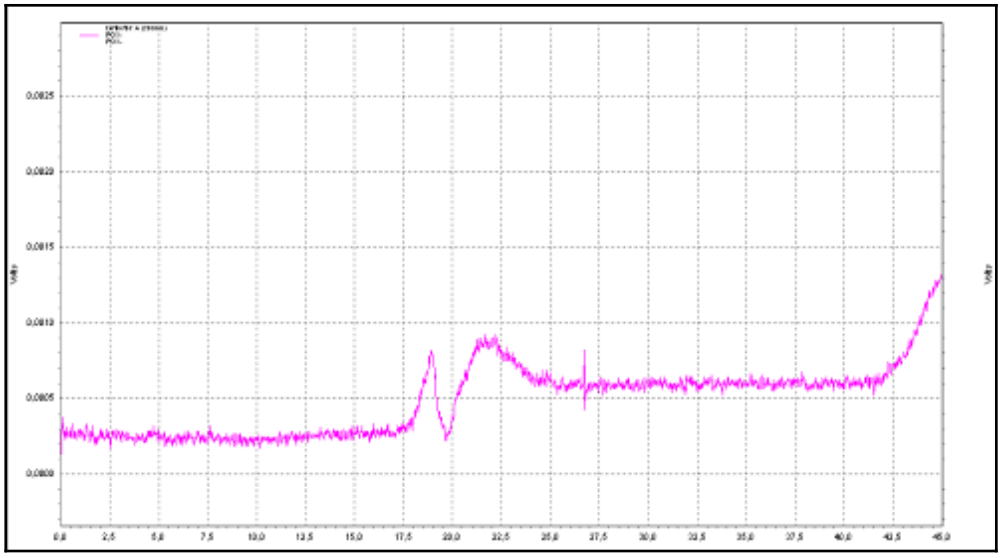
Şekil 4. 73. n_{POX}/n_{LPS} oranları 0,5; 1 ve 2 olan konjugatlara ait LPS ve polimer kıyaslamalı GPC UV kromatogramı



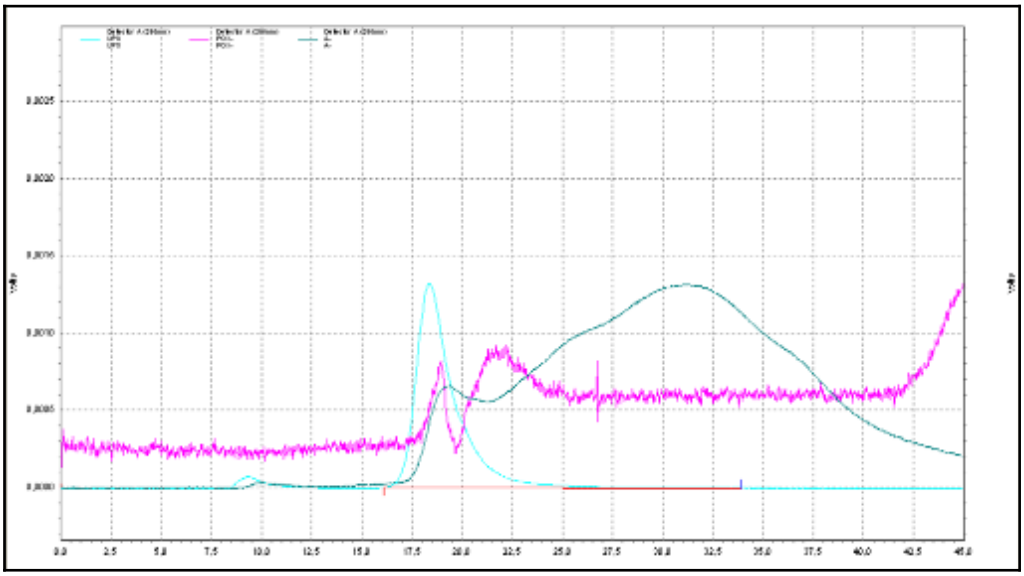
Şekil 4. 74. n_{POX}/n_{LPS} oranları 0,5; 1 ve 2 olan konjugatlara ait LPS ve polimer kıyaslamalı GPC Işık Saçılması Kromatogramı

HPLC Analizi

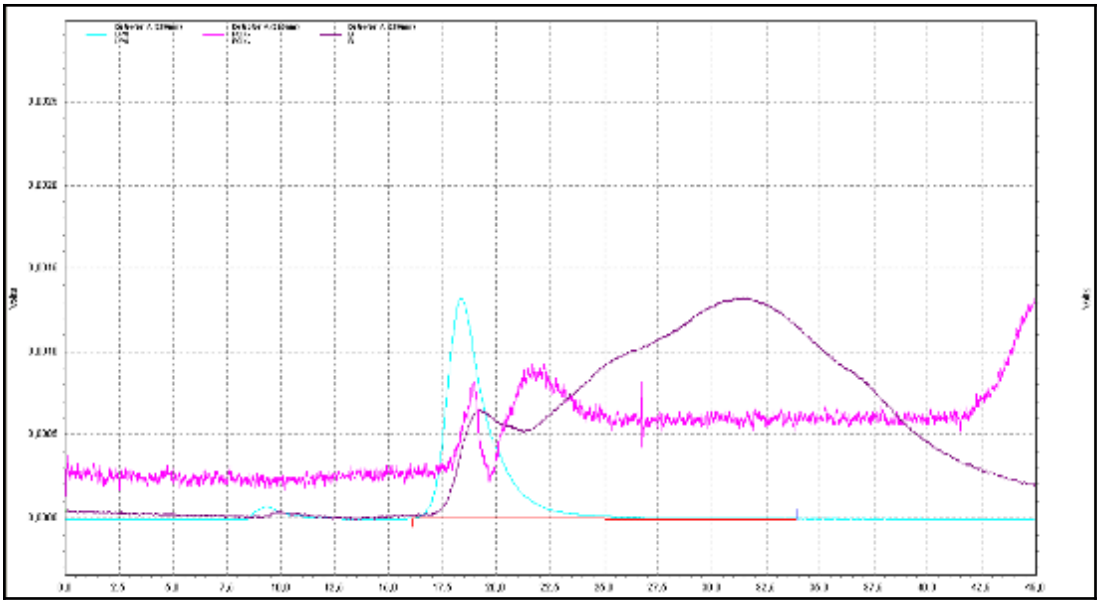
POX polimerine ait HPLC kromatogramı Şekil 4.75'de, pH 7'de hazırlanmış $n_{P(VP\text{-}co\text{-}AA)}$ /n_{LPS}=0,5; 1; 2 oranlarındaki her bir konjugata ait HPLC kromatogramları, LPS ve polimer kıyaslamalı olarak Şekil 4.76-4.77-4.78'de gösterilmiştir. Şekil 4.79'da tüm oranlara ait HPLC kromatogramları LPS ve polimer kıyaslamalı olmak üzere toplu olarak gösterilmiştir.



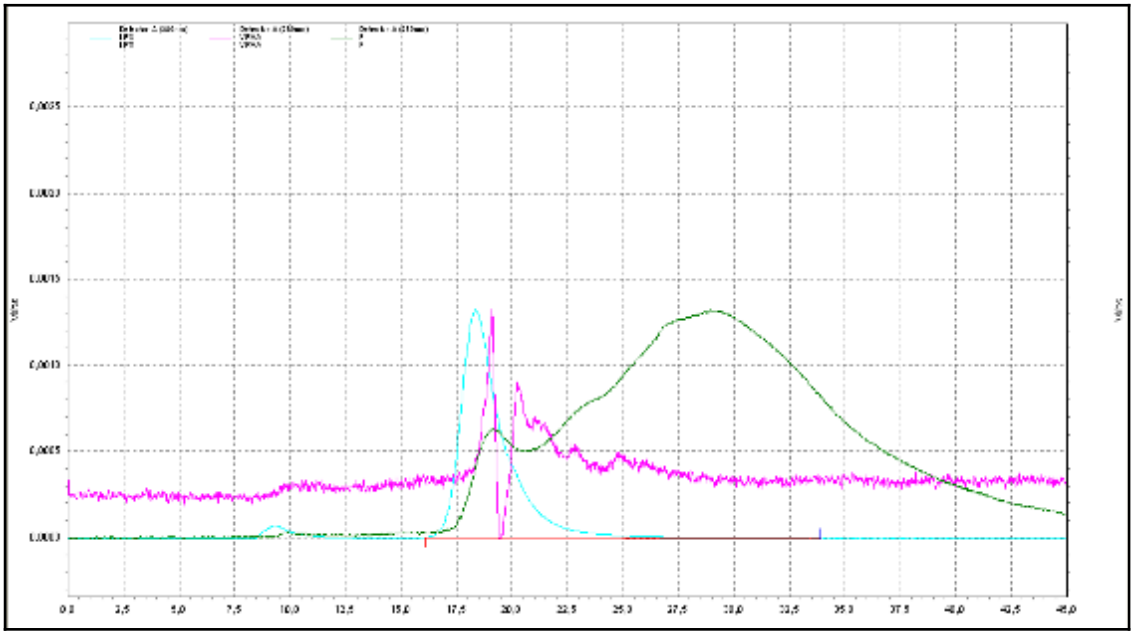
Şekil 4. 75. Polioksidonyuma (♣) ait HPLC kromatogramı



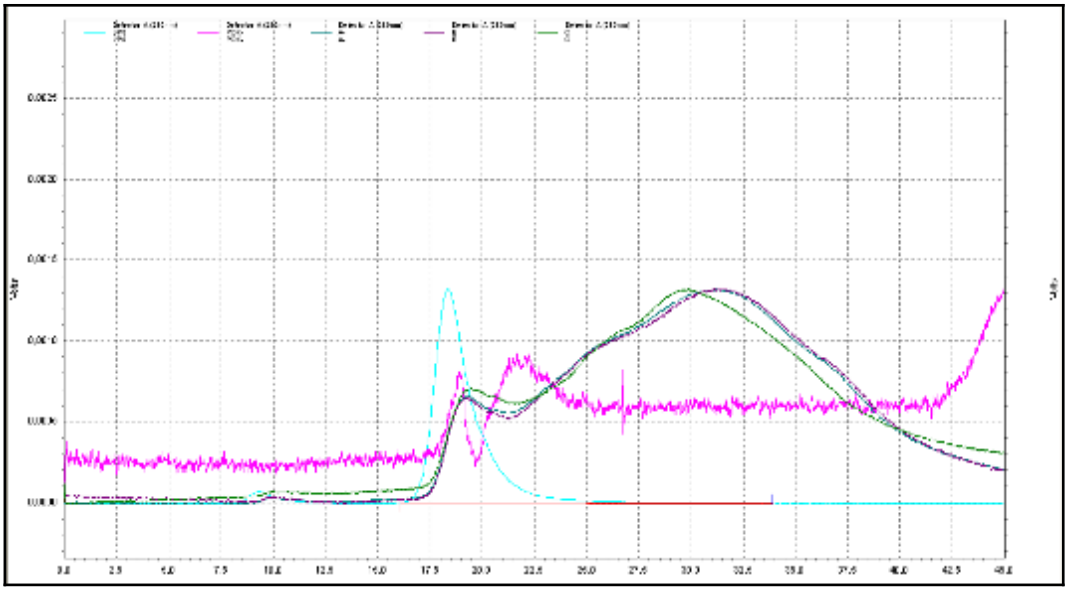
Şekil 4. 76. LPS (♣); POX (♣) ve n=0,5 oranındaki LPS-POX (♣) konjugatına ait kıyaslamalı HPLC Kromatogramı



Şekil 4. 77. LPS'ye (♣); POX (♣) ve n=1 oranındaki LPS-POX (♣) konjugatına ait kıyaslamalı HPLC Kromatogramı



Şekil 4. 78. LPS (♣); POX (♣) ve n=2 oranındaki LPS-POX (♣); konjugatına ait kıyaslamalı HPLC Kromatogramı



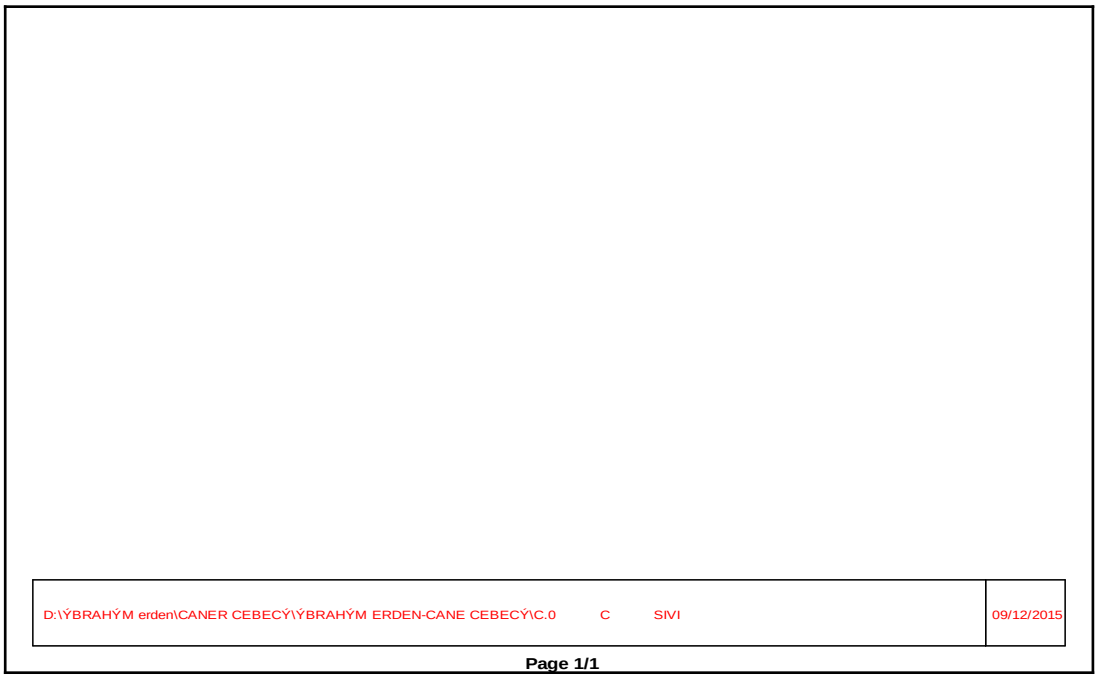
Şekil 4. 79. LPS (♣); POX (♣); LPS-POX konjugatının n=0,5 (♣); n=1(♣); n=2(♣) oranlarına ait kıyaslamalı HPLC Kromatogramı

FTIR Analizi

Şekil 4.80-4.81-4.82'de sırasıyla n_{POX}/n_{LPS} oranları 0,5; 1; 2 olan konjugatlara ait FT-IR spektrumları Şekil 4.83'de n_{POX}/n_{LPS} oranları 0,5; 1; 2 olan konjugatlara ait FT-IR spektrumları toplu olarak verilmiştir.

Şekil 4. 80. Karbodiimid yöntemiyle sentezlenmiş olan n_{POX}/n_{LPS} =0,5 oranındaki konjugatın FTIR Spektrumu

Şekil 4. 81. Karbodiimid yöntemiyle sentezlenmiş olan n_{POX}/n_{LPS} =1 oranındaki konjugatın FTIR Spektrumu



Şekil 4. 82. Karbodiimid yöntemiyle sentezlenmiş olan n_{POX}/n_{LPS} =2 oranındaki konjugatın FTIR Spektrumu

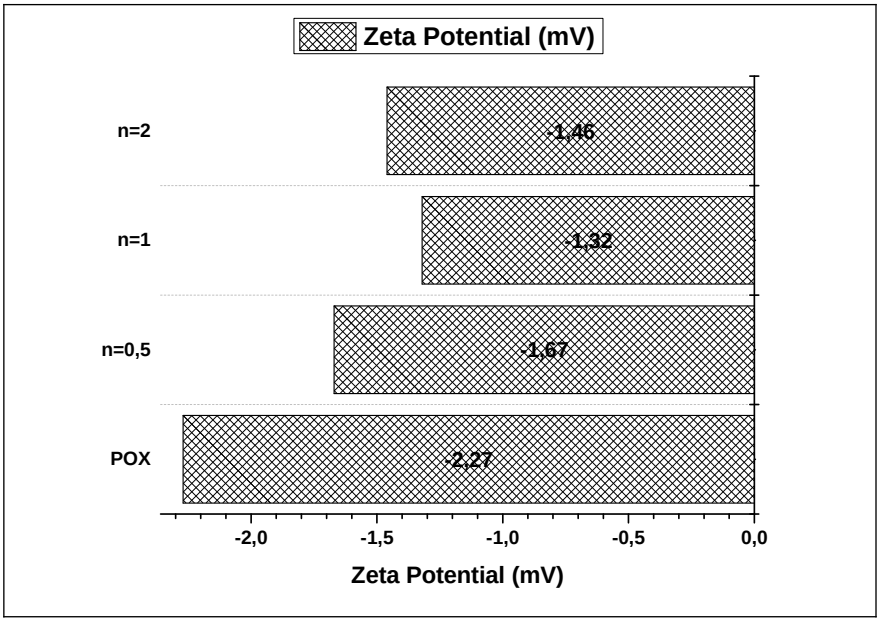
D:\ÝBRAHÝM erden\CANER CEBECÝ\ÝBRAHÝM ERDEN-CANE CEBECÝ\A.1	A	SIVI	09/12/2015
D:\ÝBRAHÝM erden\CANER CEBECÝ\ÝBRAHÝM ERDEN-CANE CEBECÝ\B.1	B	SIVI	09/12/2015
D:\ÝBRAHÝM erden\CANER CEBECÝ\ÝBRAHÝM ERDEN-CANE CEBECÝ\C.1	C	SIVI	09/12/2015

Page 1/1

Şekil 4. 83. Karbodiimid yöntemiyle sentezlenmiş olan n_{POX}/n_{LPS} =0,5 (♣); 1(♣); 2(♣) oranlarındaki konjugatların karşılaştırmalı FTIR Analiz Sonucu

ZetaSizer Analizi

Karbodiimid yöntemi ile hazırlanan n_{POX}/n_{LPS}= 0,5; 1; 2 oranlarındaki konjugatlar Zetasizer cihazı ile analiz edildi ve polimer ve konjugatlara ait zeta potansiyel sonuçları Şekil 4.84'de verilmiştir.



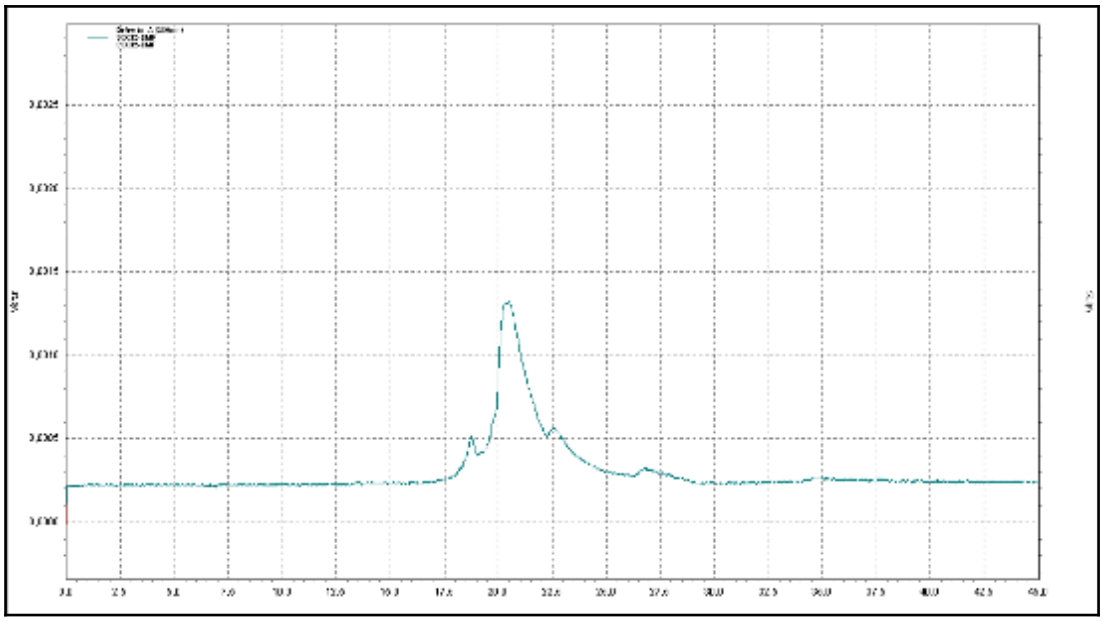
Şekil 4. 84. Polioksidonyum-LPS Konjugatlarına ait polimer ve LPS kıyaslamalı zeta potansiyel değerleri (mV cinsinden)

3.3.2.3 LPS-P(VP-co-AA) konjugatlarının $SOCl_2$ yöntemi ile Konjugasyonuna ait Bulgular

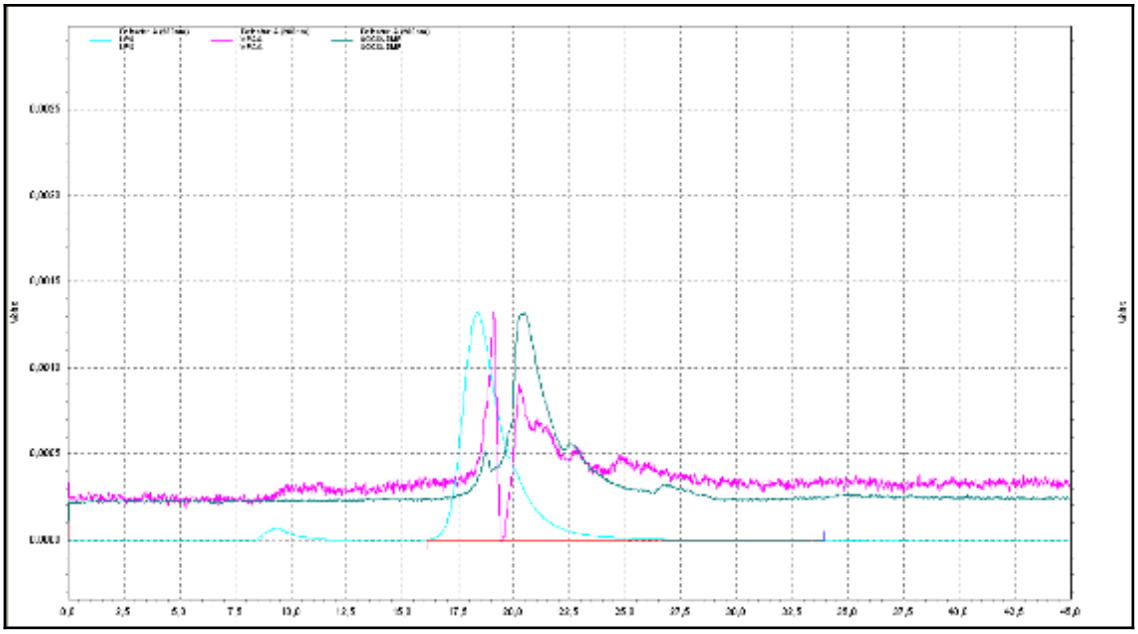
$SOCl_2$ varlığında sentezlenen LPS-P(VP-co-AA) konjugatının n=0,5 oranının HPLC ve FTIR analizleri gerçekleştirilmiştir.

HPLC analizi

$SOCl_2$ varlığında sentezlenen LPS- P(VP-co-AA) konjugatına ait HPLC kromatogramı Şekil 4.85'de; LPS, P(VP-co-AA) ve $SOCl_2$ yöntemi ile sentezlenmiş LPS-P(VP-co-AA) konjugatına ait kıyaslamalı HPLC Kromatogramı Şekil 4.86'da verilmiştir.

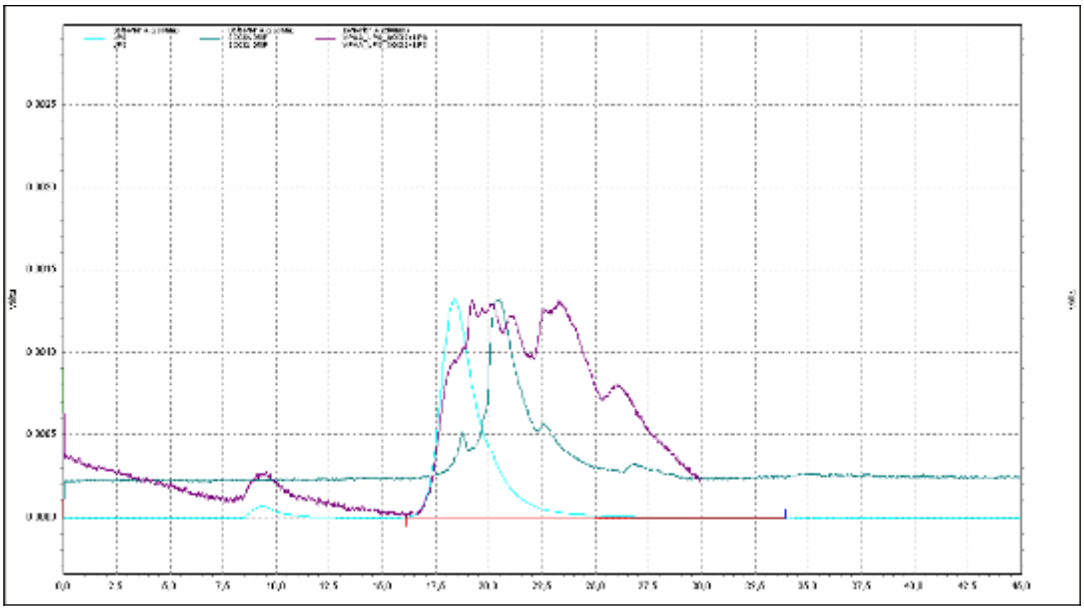


Şekil 4. 85 $SOCl_2$ varlığında sentezlenen LPS- P(VP-co-AA) Konjugatına (♣) ait HPLC sonucu



Şekil 4. 86. LPS (♣); P(VP-co-AA) (♣) ve $SOCl_2$ yöntemi ile sentezlenmiş n=0,5 oranındaki P(VP-co-AA) (♣) konjugatına ait kıyaslamalı HPLC Kromatogramı

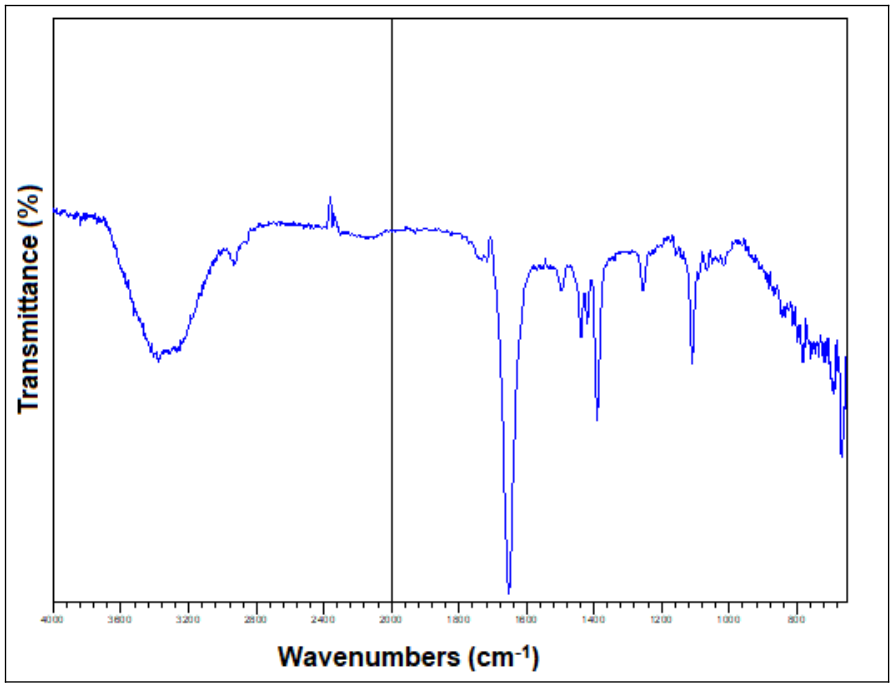
Bu iki HPLC kromatogramına göre 18-20. dakikalar arasındaki konjugat pikinin yanındaki ufak pikin reaksiyona girmemiş LPS olduğu düşünülerek emin olmak amacıyla konjugattan alınan bir miktar örnek üzerine LPS çözeltisi eklenerek konjugat örneğindeki LPS miktarı arttırılmıştır ve tekrar HPLC analizi yapılmıştır.



Şekil 4. 87. LPS (♣); $SOCl_2$ yöntemi ile sentezlenmiş n=0,5 oranındaki LPS- P(VP-co-AA) (♣) konjugatı ve LPS çözeltisi ilave edilen n=0,5 oranındaki LPS- P(VP-co-AA) (♣) konjugatına ait kıyaslamalı HPLC Kromatogramı

FTIR Analizi

Tiyonil Klorür yöntemi ile sentezlenmiş P(VP-co-AA) -LPS konjugatına ait FTIR spektrumu Şekil 4.88'de gösterilmiştir.

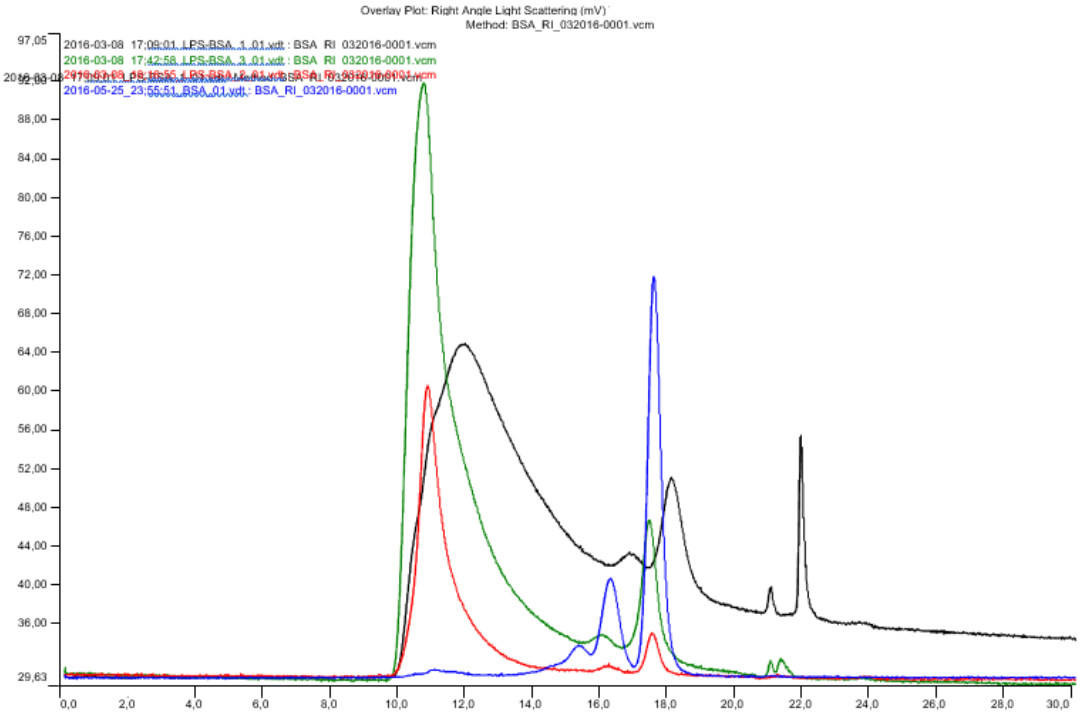


Şekil 4. 88. Tiyonil Klorür Yöntemi ile Sentezlenmiş P(VP-co-AA) -LPS Konjugatına ait Analizi

3.4 ELİSA DENEYLERİNE AİT BULGULAR

3.4.1 ELİSA Kaplamada kullanılması için gerçekleştirilen Konjugatlara ait Bulgular

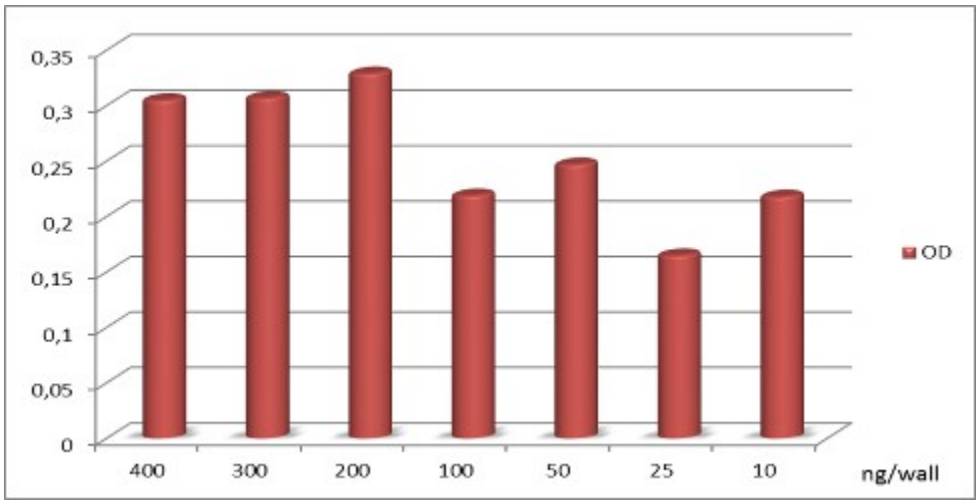
ELİSA platelerinde yüksek immun yanıt alabilmemiz için antijenin plağa kaplanmasını sağlamak amacıyla LPS'nin tek başına olduğu plakların yanında LPS-BSA konjugatları ile kaplanan plaklarda denenmiştir. ELİSA kaplamada kullanılması amacıyla en hızlı ve verimli yöntemin kullanılması amacıyla 3 farklı yöntemle sentezlenmiş LPS-BSA konjugatlarına ait GPC ışık saçılması kromatogamı Şekil 4.89'da verilmiştir.



Şekil 4. 89. 1.Yöntemle sentezlenmiş LPS-BSA Konjugatı (♣), 2. Yöntemle sentezlenmiş LPS-BSA konjugatı (♣), 3. Yöntemle sentezlenmiş LPS-BSA konjugatı (♣), BSA proteini (♣) ne ait GPC Işık Saçılması Kromatogramı

3.4.2 ELİSA Platelerine LPS Kaplamada Standardizasyon çalışması

Kaplanacak LPS miktarının standardizasyonu açısından; 400 ng, 300 ng, 200 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 10 ng olmak üzere 7 miktar denenmiştir. Şekil 4.90'da X ekseni Elisa plaklarına kaplanan LPS miktarını gösterirken y ekseninde Elisa okuyucuda 405 nm'de okunan değerler verilmektedir.

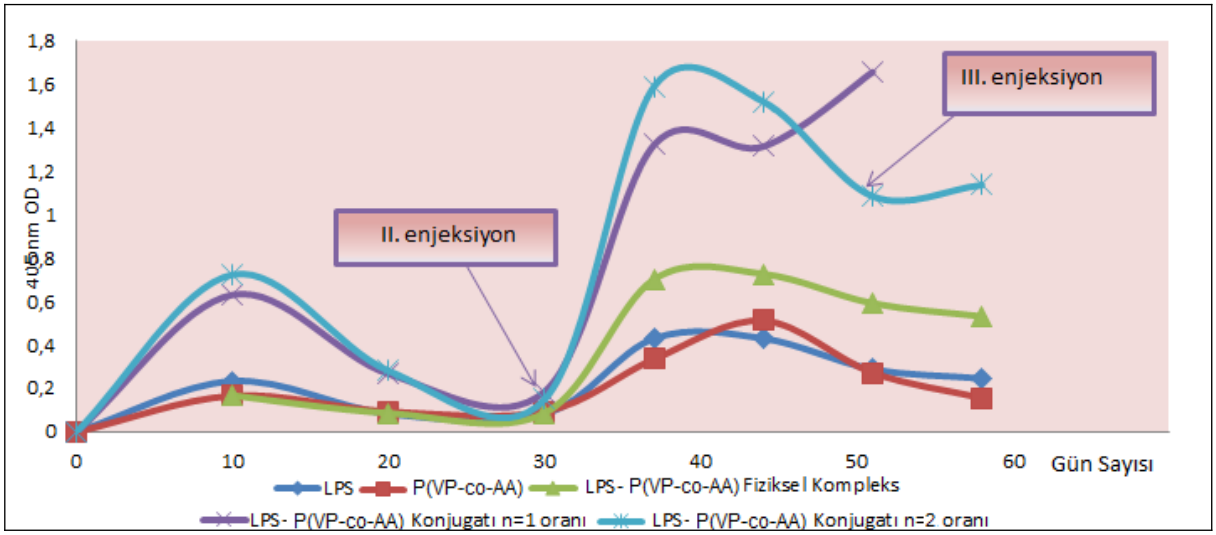


Şekil 4. 90. ELİSA platelerinin LPS ile kaplanma standardizasyonu

3.4.3 Dolaylı yoldan Enzim Bağlı İmmün Assay (ELİSA) Yöntemi Kullanılarak Farelerden Alınan Serum Örneklerinde Fiziksel Kompleks, Metal Kompleksleri ve Biyokonjugatlara Karşı Oluşan Antikor Miktar Tayini Sonuçları

3.4.3.1 LPS-P(VP-co-AA) Fiziksel Kompleks ve Konjugatlarına Karşı Oluşan Antikor Miktar Tayini Sonuçları

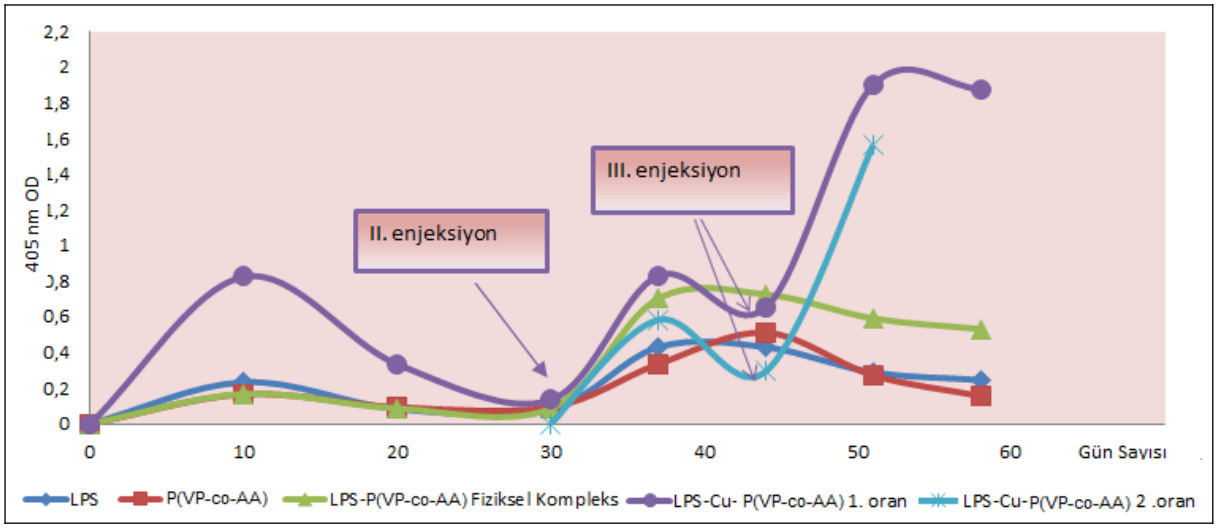
LPS-P(VP-co-AA) fiziksel kompleks (100 µg LPS ve 100 µg P(VP-co-AA)) ve LPS ile P(VP-co-AA)' nın EDC çapraz bağlayıcısı varlığında konjugatları (n=1 için 100 µg LPS ve 100 µg P(VP-co-AA); n=2 için 100 µg LPS ve 200 µg P(VP-co-AA)) 500 µl olacak şekilde hazırlandı. Sentezlendikten sonra saflaştırılmış olan fiziksel kompleks ve biyokonjugatlar Balb/c farelere intraperitonal olarak enjekte edildi. Analizlerde kompleksin ve konjugatın etkisini gözlemleyebilmek için tek başına LPS bir grup fareye enjekte edildi. Yine tek başına polimerlerin doğrudan spesifik immun yanıta sebep olmadığını teyit edebilmek için bir grup fareye intraperitoneal olarak P(VP-co-AA) kopolimeri enjekte edildi. 58 gün boyunca belirli aralıklarla alınan tüm fare serumlarındaki antikor miktarı kontrol grubunun serumu ile karşılaştırıldı. Karşılaştırmalı sonuçlar Şekil 4.91'de verilmiştir.



Şekil 4. 91. LPS (♦), P(VP-co-AA) (■), LPS- P(VP-co-AA) Fiziksel Kompleksi (▲), LPS-P(VP-co-AA) Konjugatı n=1 oranı (x) ve LPS- P(VP-co-AA) Konjugatı n=2 oranı (+) enjekte edilen farelerden 58 gün boyunca aralıklarla alınan serumlar daki antikor miktarlarının karşılaştırılması

3.4.3.2 LPS-P(VP-co-AA) Fiziksel Kompleks ve LPS-Cu^{2+}-P(VP-co-AA) 3'lü kompleksine Karşı Oluşan Antikor Miktar Tayini Sonuçları

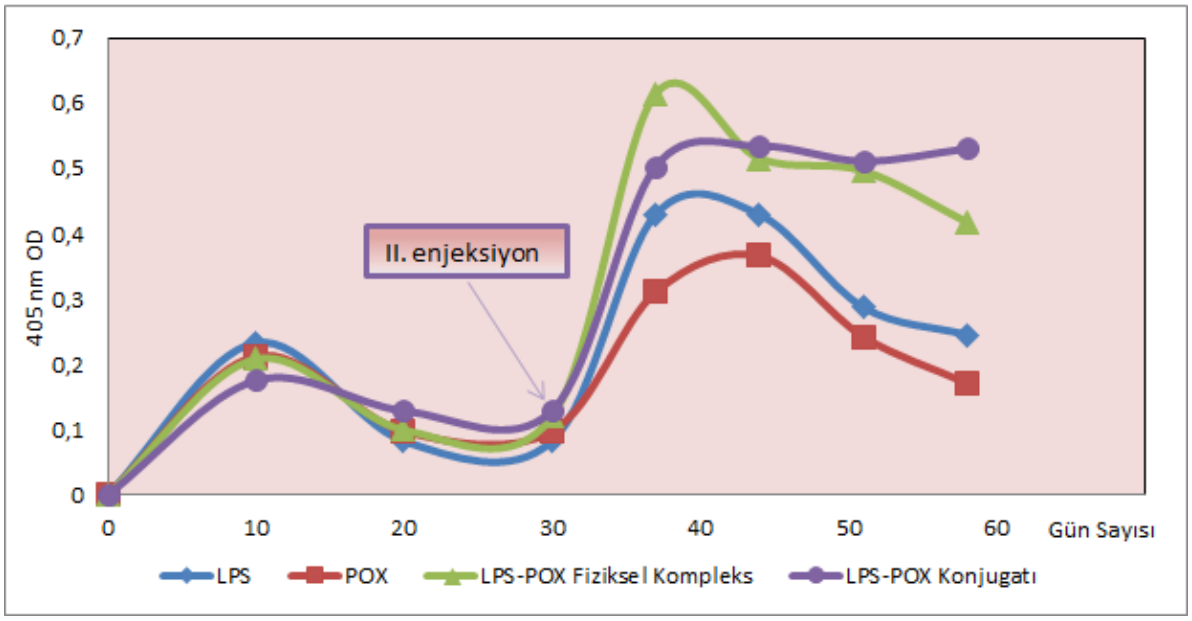
LPS-P(VP-co-AA) fiziksel kompleks (fare başına 100 µg LPS ve 100 µg P(VP-co-AA)) ve LPS-Cu^{2+}- P(VP-co-AA) kompleksi 1. oran (100 µg LPS-100 µg P(VP-co-AA) ve 12 µl $CuSO_4.5H_20$ çözeltisi (150mg/10ml saf su)) LPS-Cu^{2+}- P(VP-co-AA) Kompleksi (100 µg LPS-100 µg P(VP-co-AA) ve 6 µl $CuSO_4.5H_20$ çözeltisi (150mg/10ml saf su)) fare başına 500 µl olacak şekilde hazırlandı. Sentezlendikten sonra saflaştırılmış olan fiziksel kompleksler Balb/c farelere intraperitonal olarak enjekte edildi. Analizlerde komplekslerin etkisini gözlemleyebilmek için tek başına LPS bir grup fareye enjekte edildi. Yine tek başına polimerlerin doğrudan spesifik immun yanıta sebep olmadığını teyit edebilmek için bir grup fareye intraperitoneal olarak P(VP-co-AA) kopolimeri enjekte edildi. 58 gün boyunca belirli aralıklarla alınan tüm fare serumlarındaki antikor miktarı kontrol grubunun serumu ile karşılaştırıldı. LPS-Cu^{2+}-P(VP-co-AA) 2. oran fare grubu 30. günde 8 haftalık 28-32 g ağırlığında erkek Balb/c türü fareden oluşmak üzere oluşturularak diğer gruplara 2. Enjeksiyon yapılırken 30. günde ilk enjeksiyonu ve 44. günde 2. hatırlatma enjeksiyonu yapılmıştır. Karşılaştırmalı sonuçlar Şekil 4.92'de verilmiştir.



Şekil 4. 92. LPS (♦), P(VP-co-AA) (■), LPS- P(VP-co-AA) fiziksel Kompleksi (▲), LPS-Cu^{2+}-P(VP-co-AA) Kompleksi 1. oranı (●) ve LPS-Cu^{2+}- P(VP-co-AA) Kompleksi 2. oranı (+) enjekte edilen farelerden 58 gün boyunca aralıklarla alınan serumlardaki antikor miktarlarının karşılaştırılması

3.4.3.3 LPS-POX Fiziksel Kompleks ve Konjugatlarına Karşı Oluşan Antikor Miktar Tayini Sonuçları

LPS-POX fiziksel kompleks (100 µg LPS ve 100 µg POX) ve LPS ile POX'un EDC çapraz bağlayıcısı varlığında konjugatları (100 µg LPS ve 100 µg POX) 500 µl olacak şekilde hazırlandı. Sentezlendikten sonra saflaştırılmış olan fiziksel kompleks ve biyokonjugatlar balb/c farelere intraperitonal olarak enjekte edildi. Analizlerde kompleksin ve konjugatın etkisini gözlemleyebilmek için tek başına LPS ve tek başına POX birer grup fareye intraperitoneal enjekte edildi. 58 gün boyunca belirli aralıklarla alınan tüm fare serumlarındaki antikor miktarı kontrol grubunun serumu ile karşılaştırıldı. Karşılaştırmalı sonuçlar Şekil 4.93' de verilmiştir.

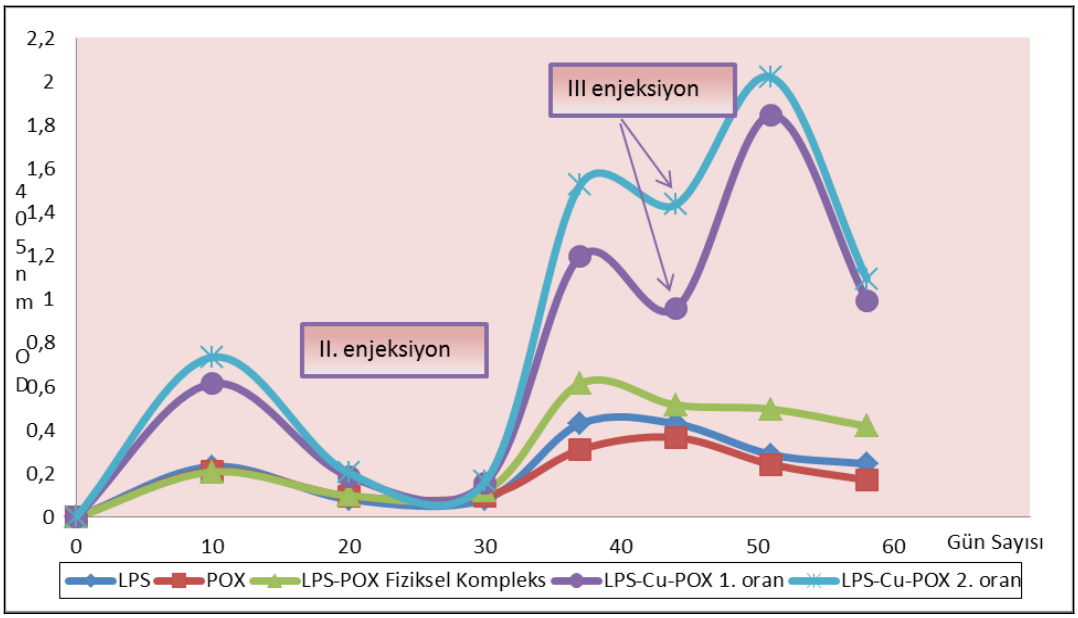


Şekil 4. 93. LPS (♦), POX (■), LPS-POX Fiziksel Kompleksi (▲), LPS-POX Konjugatı (●) için enjekte edilen farelerden 58 gün boyunca aralıklarla alınan serumlardaki antikor miktarlarının karşılaştırılması

3.4.3.4 LPS-POX Fiziksel Kompleks ve LPS-Cu^{2+}-POX Kompleksine Karşı Oluşan Antikor Miktar Tayini Sonuçları

LPS-POX fiziksel kompleks (fare başına 100 µg LPS ve 100 µg POX) , LPS-Cu-POX 1. oranı (100 µg LPS-100 µg POX ve 6 µl $CuSO_4.5H_20$ çözeltisi [150mg/10ml saf su)] LPS-Cu-POX Kompleksi 2. oranı (100 µg LPS-100 µg POX ve 12 µl $CuSO_4.5H_20$ çözeltisi [150mg/10ml saf su)] fare başına 500 µl olacak şekilde hazırlandı. Sentezlendikten sonra saflaştırılmış

olan fiziksel kompleks ve kompleksler Balb/c farelere intraperitonal olarak enjekte edildi. Analizlerde komplekslerin etkisini gözlemleyebilmek için tek başına LPS ve tek başına POX birer grup fareye intraperitoneal enjekte edildi 58 gün boyunca belirli aralıklarla alınan tüm fare serumlarındaki antikor miktarı kontrol grubunun serumu ile karşılaştırıldı. Karşılaştırmalı sonuçlar Şekil 4.94'de verilmiştir.

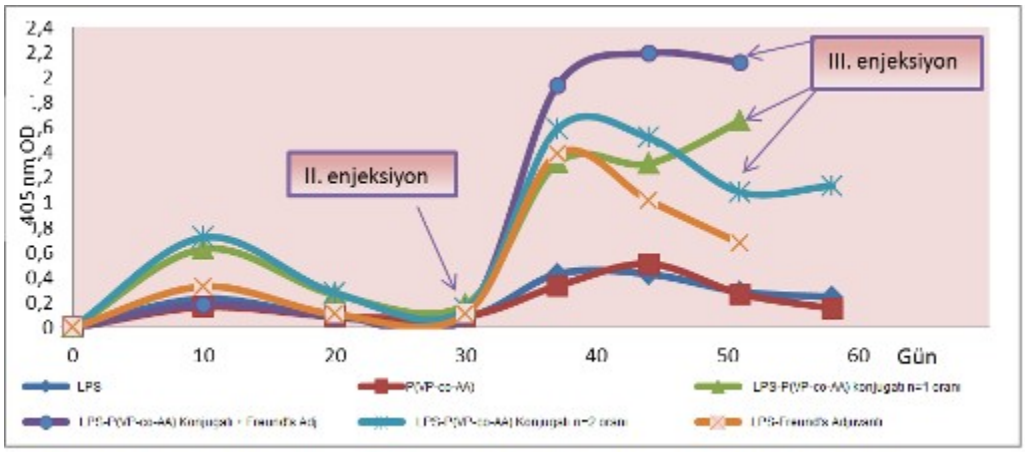


Şekil 4. 94. LPS (♦), POX (■), LPS-POX Fiziksel Kompleksi (▲), LPS-Cu^{2+}-POX Konjugatı (●) için LPS-Cu^{2+}-POX Kompleksi 2. oranı (+) enjekte edilen farelerden 58 gün boyunca aralıklarla alınan serumlardaki antikor miktarlarının karşılaştırılması

3.4.3.5 LPS-P(VP-co-AA) Konjugatlarına ve LPS-P(VP-co-AA)-Freund's Adjuvantına Karşı Oluşan Antikor Miktar Tayini Sonuçları Kıyaslanması

Klasik adjuvanlara alternatif olarak etkin immün ve koruma yanıtlarının alındığı polimerik adjuvantların kullanılması son yıllarda aşı sistemlerinin etkinliğinin geliştirilmesi açısından dikkat çekmekte ve kullanımı genişlemektedir. Bu amaçla kıyaslama yapabilmek amacıyla LPS ile P(VP-co-AA)'nın EDC çapraz bağlayıcısı varlığında konjugatları [n=1 için 100 µg LPS ve 100 µg P(VP-co-AA); n=2 için 100 µg LPS ve 200 µg P(VP-co-AA)] 500 µl ve LPS- P(VP-co-AA)-Freund's adjuvantı 100 µg LPS ve 200 µg P(VP-co-AA) ve fare başına 200 µl incomplete Freund's adjuvantı olacak şekilde hazırlandı. Sentezlendikten sonra saflaştırılmış olan biyokonjugatlar Balb/c farelere intraperitonal olarak enjekte edildi. Analizlerde kompleksin ve konjugatın etkisini gözlemleyebilmek için tek başına LPS, LPS+Freund's adjuvantı ve tek başına P(VP-co-AA) polimeri için 3 fareden oluşan birer grup fareye intraperitoneal enjekte edildi. 58 gün boyunca belirli aralıklarla alınan tüm fare serumlarındaki

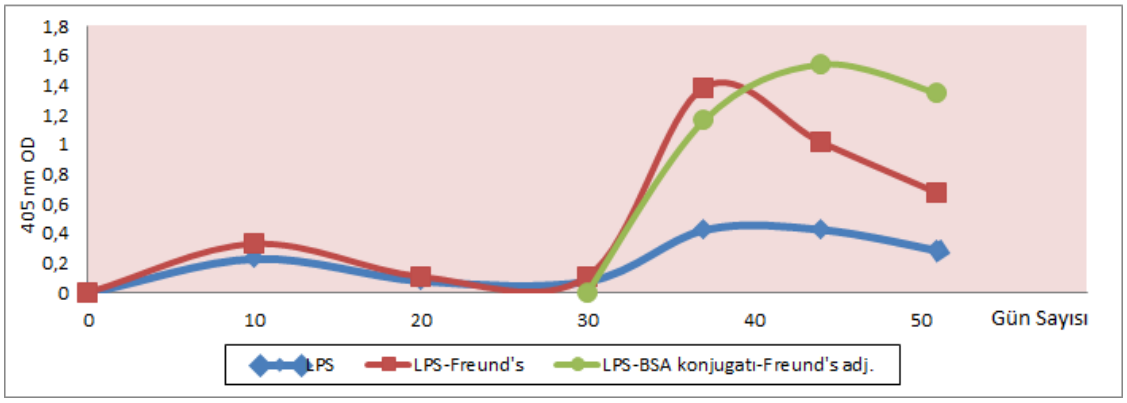
antikor miktarı kontrol grubunun serumu ile karşılaştırıldı. Karşılaştırmalı sonuçlar Şekil 4.95' de verilmiştir.



Şekil 4. 95. LPS (♦), P(VP-co-AA) (■),LPS- P(VP-co-AA) Konjugatı n=1 oranı (▲), LPS-P(VP-co-AA) Konjugatı n= 2 oranı(●) ve LPS- P(VP-co-AA) -Freund's Adjuvantı (+), LPS+ Freund's Adjuvantı (X) enjekte edilen farelerden 58 gün boyunca aralıklarla alınan serumlardaki antikor miktarlarının karşılaştırılması

3.4.3.6 LPS-BSA-Freund's Konjugatlarına Karşı Oluşan Antikor yanıtları

Tek başına LPS (100 µg), LPS-Freund's adjuvantı (100 µg LPS+200 µl incomplete Freund's adjuvantı ve 1:1 oranında 200 µg LPS-BSA konjugatı+200 µl incomplete Freund's adjuvantı hazırlandı. Kontroller ve konjugatlar Balb/c farelere intraperitonal olarak enjekte edildi. İlk 3 hafta ELiSA plate kaplamaların da LPS-BSA konjugatlarının deneme açısından kullanılması sebebiyle herhangi bir fareye enjeksiyonu gerçekleştirilmedi. 30. günde 4 fareden oluşan gruba ilk adjuvanlı LPS-BSA konjugatı intraperitonal olarak enjekte edildi. Kontrol gruplarına 30. günde ikinci hatırlatma enjeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Karşılaştırmalı sonuçlar Şekil 4.96'da verilmiştir.



Şekil 4. 96. LPS (♦), LPS-Freund's (■), LPS- BSA-Freund's Adjuvantı (●) enjekte edilen farelerden 58 gün boyunca aralıklarla alınan serumlardaki antikor miktarlarının karşılaştırılması

3.5 Hibridoma Teknolojisi ile Monoklonal Antikor Eldesine ait Bulgular

Hibridoma teknolojisi ile monoklonal antikor eldesi amacıyla, yüksek immun cevap aldığımız seçilen 7K SAK isimli Balb/c füzyon çalışmalarında kullanılmıştır.

Tablo 4. 7. Füzyon için seçilen fareler ve Füzyondan önce son immunizasyonda enjekte edilen maddelerin içerikleri

Kafes ve Balb/c Adı	Füzyondan önce son immunizasyonda enjekte edilen maddenin içeriği
7. Kafes-7K SAK	100 µg LPS-100 µg P(VP-co-AA), 13 µl $CuSO_4.5H_20$ çözeltisi (150mg/10ml saf su) içeren LPS-Cu^{2+}-P(VP-co-AA) Kompleksi

3.5.1 Hücrelerin Sayımına Ait Bulgular

Çoğaltılan F0 hücrelerinin ve füzyonda kullanılan 7K SAK isimli Balb/c nin dalak ve lenf düğümlerinden elde edilen hücrelerinin sayısı aşağıda belirtilmiştir.

F0 hücrelerinin sayımı için 25 karedeki hücreler tek tek sayılmıştır, başka bir sayım yöntemi kullanılmamıştır.

Toplam hücre sayısının hesaplanması için [10^4(Sabit katsayı) X Hücre Hacmi (ml) X Sayılan Hücre Miktarı= Toplam Hücre Sayısı] formülü kullanılmıştır.

F0 hücrelerinin sayısı:

Sayılan Hücre Sayısı: 134

Boya sulandırma: 2

Kare sabit sayısı: 10^4

Toplam sıvı miktarı: 50 ml verileri formülde yerine konularak 134 milyon olarak hesaplanmıştır.

Dalak hücrelerinin sayımı için 20 µl dalak hücresi + 20 µl boya ilk olarak mikroskop alında bakıldı, hücre yoğunluğundan dolayı bir kez daha boya ile seyreltme yapıldı. Hücre sayımı için 4 köşe kare + 1 orta kare yöntemi ile sayım yapıldı.

23				27
		28		
26				21

Şekil 4. 97. Dalak hücrelerinin mikrosop altında görülen hücre sayısının sayımı

Dalak hücrelerinin sayısı:

Sayılan Hücre Sayısı: 125

Kare sayımı için: 5

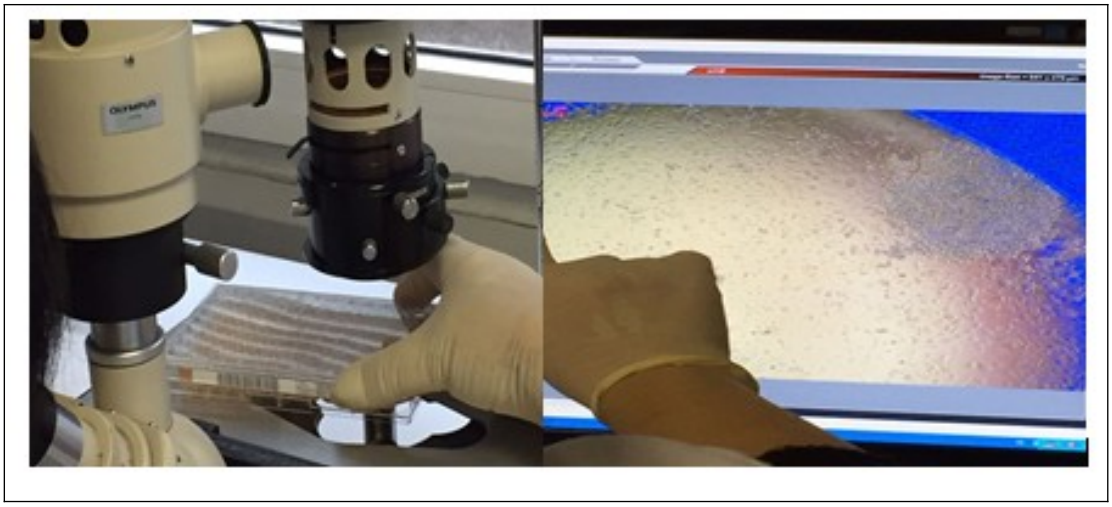
Boya sulandırma: 4

Kare sabit sayısı: 10^4

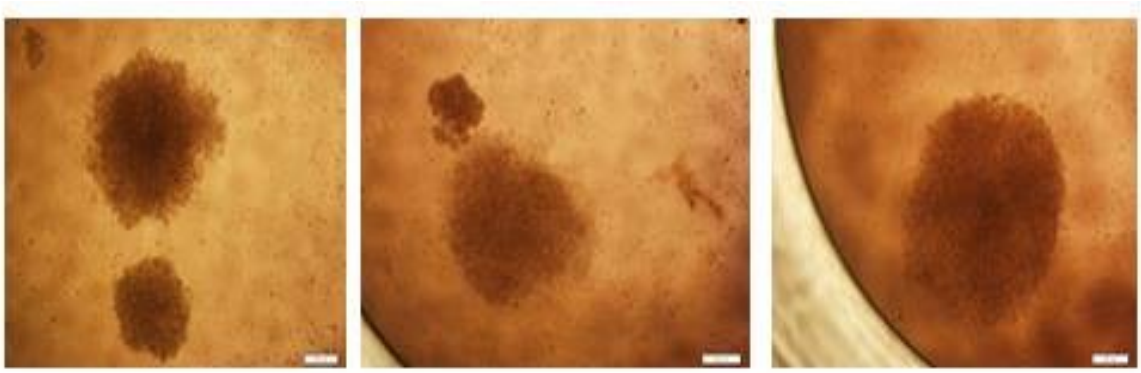
Toplam sıvı miktarı: 50 ml verileri formülde yerine konularak 1 milyar 250 milyon dalak hücresi hesaplanmıştır.

3.5.2 Klonların tespiti

Füzyondan sonraki 10. günde 10 adet plağın her 96 kuyusu da mikroskop altında incelenmiş ve klon oluşumu gözlenen kuyucuklar tespit edilmiştir.



Şekil 4. 98. Füzyondan sonra 10. günde klon oluşumunun tespitine dair fotoğraflarımız



Şekil 4. 99. Füzyondan sonra 10. günde oluşan kolanlara ait mikroskop görüntülerimiz

3.5.3 Spesifik Antikor Üreten Hibrit Hücrelerinin ELİSA ile Belirlenmesine ait Bulgular

Klon tespiti işleminden sonra belirlenen kuyular ELİSA yöntemi ile tespit edilmiştir. Pozitif kontrol olarak daha önce füzyon Balb/c nin kalbinden alınan kandan elde edilen serum kullanıldı (1/50+, 1/100+, 1/1000+ olarak belirtilmiştir). ELİSA plağının kaplanmasında daha önceden kaplama standardizasyonunda belirlenen kuyu başına 200 ng olacak şekilde LPS kullanılmıştır.

Üst sıvılarına ELİSA yapılan olan klonlar önce plak numarası, sonra kuyu numarası olacak şekilde Şekil 4.100'de verilmiştir.

	1	2	3	4	5	6
A	1 D7	3 D3	6 B8	7 E2	8 G2	PBS
B	1 E9	3 E3	6 D7	7 E9	9 D3	PBS
C	1 E12	3 G2	6 E7	7 G2	9 D8	PBS
D	1 G10	4 A10	6 H9	7 G9	10 A6	PBS
E	2 B2	4 B2	7 A10	7 H3	10 D6	PBS
F	2 D3	4 C3	7 C2	8 E2	10 E9	1/50+
G	2 E1	4 D10	7 D9	8 F8	10 F8	1/100+
H	2 E6	5 F8	7 D10	8 F10	10 G3	1/1000+

Şekil 4. 100. ELİSA yapılan klonlar ve plaktaki kuyuları

	1	2	3	4	5	6
A	1,766	0,239	0,087	0,103	0,092	0,091
B	0,108	0,515	0,642	0,248	0,329	0,39
C	0,674	0,635	2,266	0,718	0,891	0,216
D	0,646	0,369	0,495	2,642	0,588	0,093
E	0,38	0,386	0,411	0,423	0,406	0,291
F	0,76	0,686	0,724	0,631	0,272	1,672
G	0,22	0,345	0,379	0,513	0,898	2,061
H	1,872	0,191	0,212	0,182	0,342	2,185

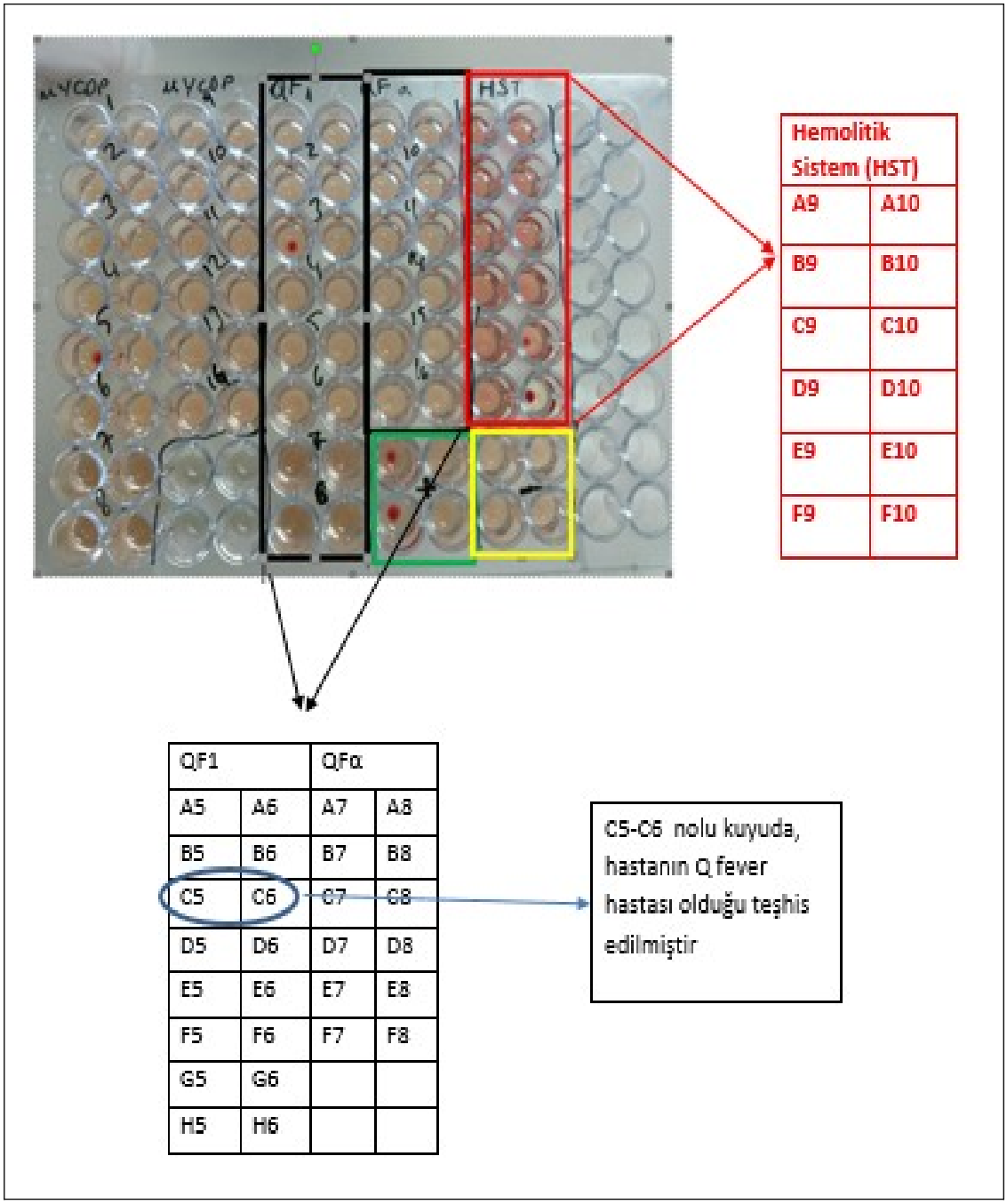
Şekil 4. 101. Tespit edilen klonların üst sıvılarından gerçekleştirilen ELİSA testi sonuçları

1 D7, 2 E6, 6 E7, 7 G9 kuyuları hibrit hücre olarak tespit edilmiştir ve alt klonlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu hücreler, pipet yardımı ile tüplere alındı ve hücre sayımı yapılarak 96 kuyuluk kültür kaplarında tek hücre olacak şekilde dağıtıldı. Sonuç olarak Hizmet alımı olarak Tübitak-MAM ve Üsküdar Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarlarının ortak çalışması sonucu saf monoklonal antikor elde edilerek tarafımıza teslim edildi.

3.6 Kompleman Fiksasyon Testine ait Bulgular

Kompleman fiksasyon testi (KFT) Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Laboratuvarlarında ve mycoplasma, Q humması ve ornitozis için yapılmaktadır. Hasta serumunda bu hastalıklara karşı oluşan antijen aranmaktadır. Yani başka tanılarla hastanın Q humması olduğu ve olmadığı örneklerde bizim yöntemimizin karşılaştırılması yapılarak sistemin çalışıp çalışmaması kontrol edilmiştir.

Şekil 4.102'de ise yalnızca mycoplasma ve Q humması için çalışılan komplement fiksasyon testi görülmektedir. Mycoplasma için 14 hasta, Q humması için ise yine 14 hasta serumu çalışıldı. Kuyulara verilen numaralar ELİSA plağındaki 96 kuyucuktan 8 dikey ve 12 yatay kuyucuğa göre isimlendirilmiştir. 8 dikey kuyucuk (A-B-C-D-E-F-G-H) olarak yanına yatay sıradaki 12 kuyucuğun numarası konularak kodlanmıştır. Şekil üzerinde siyah dikdörtgen içine alınan kısım Q humması için ayrılmıştır. Yeşil ile gösterilen alan mycoplasma ve Q humması için pozitif kontrol kısmıdır. Sarı ile gösterilen alan mycoplasma ve Q humması için negatif kontrol kısmıdır. Sonuçta da bu 14 hastadan Q humması hastalığına yakaldığı tespit edilen hastaya (C5 ve C6 nolu kuyuda) bizim yöntemimizi uyguladığımızda yine hastanın Q humması olduğu başarı ile teşhis edildi.



Şekil 4. 102. Mycoplasma ve Q fever için çalışılan komplement fiksasyon testi. Daha önce hastalık tespiti yapılmış serumdaki hastalık antijeni başarıli bir şekilde teşhis edildi

BÖLÜM 5

5.TARTIŞMA / SONUÇ

4.1 LPS nin izolasyonuna ve Karakterizasyonuna ait Tartışma

LPS'nin boyutu ve zeta potanisiyel Zetasizer cihazı ile tespit edildi. Şekil 4.1 ve 4.2'de sırasıyla LPS'nin Z-Ave boyutu 397,1 nm ve Zeta potansiyel değeri (negatif) –3,31 olarak gösterilmiştir. Şekil 4.3'de gösterilen FTIR spektrumunda LPS'nin 3300 cm^{-1} civarındaki geniş -OH bandı belirgin olarak görülmektedir.

4.2 Polimerlerin Sentezine ve Karakterizasyonuna Ait Tartışma

4.2.1 Polioksidonyum Polimerinin Sentezine ait Tartışma

Sentezlenilen polioksidonyumun molekül ağırlığı GPC cihazında hesaplandı ve Mw= 37.143 Da olan (molekül ağırlığı min. 30.000 Da ile max. 100.000 Da olması çalışmalarımıza uygun olduğunu gösterir) ve ayrıca molekül ağırlık dağılımı (PDI) Mw/Mn: 1,404 olarak bulundu. Bu bizim kullanabileceğimiz özellikte bir polimer olduğu için başka oranlarda denenmesine gerek kalmadı ve sonuç olarak polioksidonyum polimerimizi sentezlemiş olduk.

Sentezlenen Polioksidonyumun ZetaSizer analizi sonuçlarına göre Z-Ave değeri 189,4 (d.nm) ve zeta potansiyel değeri -2,27 olarak ölçülmüştür (bu değerler yapılan komplekslerde karşılaştırma için kullanılacaktır).

Polioksidonyum polimerinin sentezini doğrulamak için alınan FT-IR spektrumunda 3300 cm^{-1} OH bandı ve 1650 cm^{-1} civarında C=O bantların görülmesi yapıyı doğrulamaktadır.

4.2.2 Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) Polimerinin Sentezine ait Tartışma

Çalışma kapsamında 5 farklı başlatıcı oranında sentezlenen 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,3 oranlarındaki polimerlerin GPC kırılma indisi kromatogramlarına göre molekül ağırlıkları ve PDI değerleri hesaplanmıştır. Bu sonuçlar ışığında, molekül ağırlığı Mw: 81.965 Da olan (molekül ağırlığı min. 30.000 Da ile max. 100.000 Da olması çalışmalarımıza uygun

olduğunu gösterir) ve ayrıca molekül ağırlık dağılımı (PDI) Mw/Mn: 1,31 olan 0,1 oranının bundan diğer çalışmalarımız açısından uygun olduğu kanısına varıldı.

Çalışmalarımızda kullanılacak olan Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) in sentezlenen 0,1 oranının ZetaSizer analizi sonuçlarına göre Z-Ave değeri 53,44 (d.nm) ve zeta potansiyel değeri -36,6 olarak ölçülmüştür (bu değerler yapılan komplekslerde karşılaştırma için kullanılacaktır).

Poli(N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit)in P(VP-co-AA) polimerine ait polimerizasyonunun gerçekleştiğini tespit etmek için yapılan FT-IR analizinde elde edilen spektrumlarda (Şekil 4.29) her iki monomerde (Şekil 4.28) mevcut olan bantlar görülmüştür. 1600-1750 cm^{-1}, 1170-1350 cm^{-1} ve 1400 cm^{-1}'de oluşan pikler kopolimerizasyonun gerçekleştiğini kanıtlayan en önemli piklerdir. Karboksilik gruplarında yer alan C=O' a ait pik 1717 cm^{-1}' de görülürken, pirolidon halkasında yer alan C-C' a ait pikler 1423 cm^{-1}'de görülmektedir. Analiz sonuçları Akrilik Asit monomeri ile Vinil Pirolidon monomerinin polimerleşmesinin gerçekleştiğini göstermektedir.

4.3 Komplekslerin ve Konjugatların Analizine Ait Tartışma

LPS biyomolekülünün P(VP-co-AA) polimeri ve polioksidonyum polimeri ile gerçekleştirilen kompleks ve konjugatlarının analiz sonuçlarına ait tartışma bu bölümde verilmektedir.

4.3.1 LPS ile Komplekslerin Analizine ait Bulgular

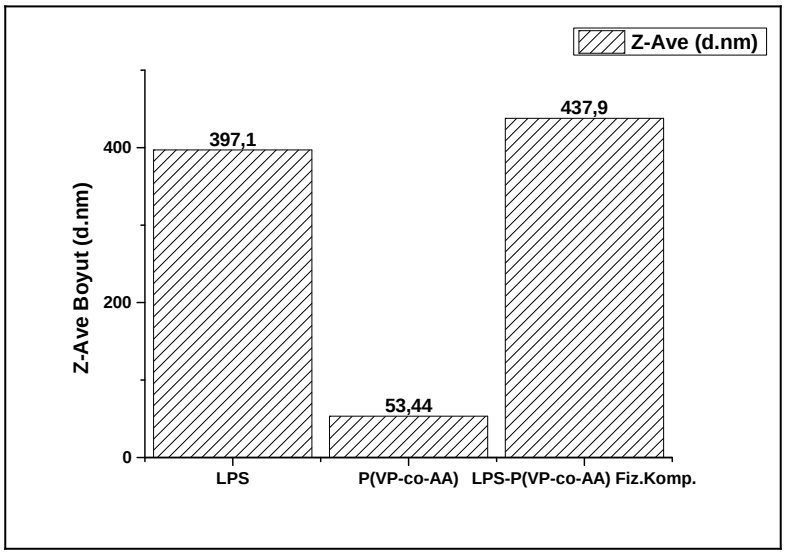
LPS biyomolekülünün P(VP-co-AA) ve polioksidonyum polimeri ile gerçekleştirdiği fiziksel kompleks ve metal iyonu varlığında gerçekleştirilen üçlü LPS-Cu^{2+}-Polimer komplekslerinin analizine ait tartışma aşağıda verilmiştir.

4.3.1.1 LPS-P(VP-co-AA) Fiziksel Komplekslerinin Sentezi ve Analizine ait Tartışma

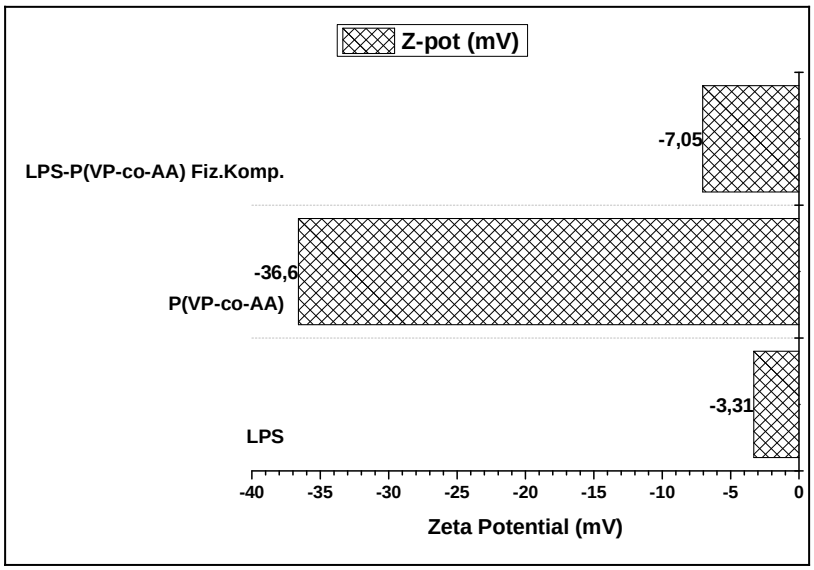
LPS'nin Z-Ave değeri 397,1 d.nm, P(VP-co-AA) polimerinin Z-ave değeri 53,44 d.nm ve LPS-P(VP-co-AA) fiziksel kompleksinin hidrodinamik çapı Z-ave: 437,9 d.nm olarak kıyaslamalı olarak Şekil 5.1'de verilmiştir. LPS-P(VP-co-AA) nin boyutu; LPS ve P(VP-co-AA) nın boyutları ile kıyaslandığında oluşturulan kompleksin boyutunun biyomolekülden ve polimerden daha büyük olduğu görülmektedir. Bu da kompakt bir hal almadan polimer ile lipopolisakkaritin fiziksel bir kompleks oluşturduğunu göstermektedir. Hazırlanan LPS-P(VP-co-AA) zeta potansiyel değeri (yükü), (negatif) – 7,05 mV, LPS'nin zeta potansiyel değeri -3,31 mV ve P(VP-co-AA) polimerinin zeta potansiyel değeri -36,6 olduğu kıyaslamalı olarak Şekil 5.2'de gösterilmiştir. Ayrıca P(VP-co-AA) nın negatif yük oluşturan grupları ile

lipopolisakkarit araasındaki elektroststik etkileşim sebebiyle polimerin -36,6 olan yükü, fiziksel kompleksin oluşması ile -7,05 olarak daha pozitife kaymıştır ve bu durum kompleksin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.

FT-IR spektrumuna bakıldığında sentezlenen P(VP-co-AA) kopolimerine ait 1400 cm^{-1} ve 1650-1700 cm^{-1} civarındaki bant şiddetlerinin azalması polimerin LPS ile fiziksel kompleks oluşturduğunu göstermektedir (3300 cm^{-1} lerdeki pik ise sulu sistemde çalışıldığı için -OH grubundan kaynaklanmaktadır).



Şekil 5. 1. LPS, P(VP-co-AA) ve LPS-P(VP-co-AA) Fiziksel Kompleksinin Z-Ave değerlerinin kıyaslamalı grafiği



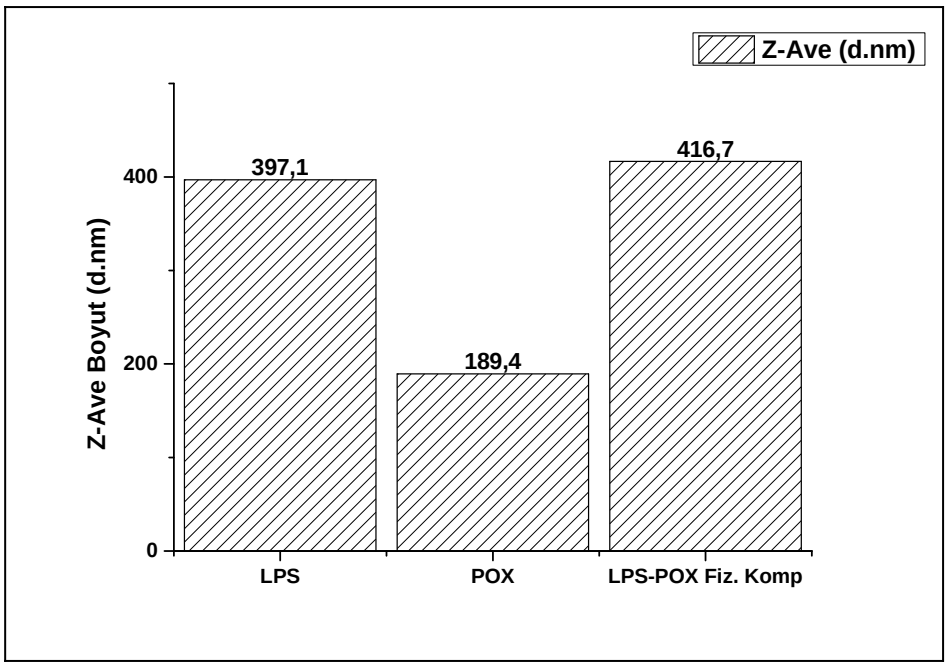
Şekil 5. 2. LPS, P(VP-co-AA) ve LPS-P(VP-co-AA) Fiziksel Kompleksinin Zeta Potansiyel değerlerinin kıyaslamalı grafiği

4.3.1.2 LPS-Polioksidonyum Fiziksel Komplekslerinin Sentezi ve Analizine ait Tartışma

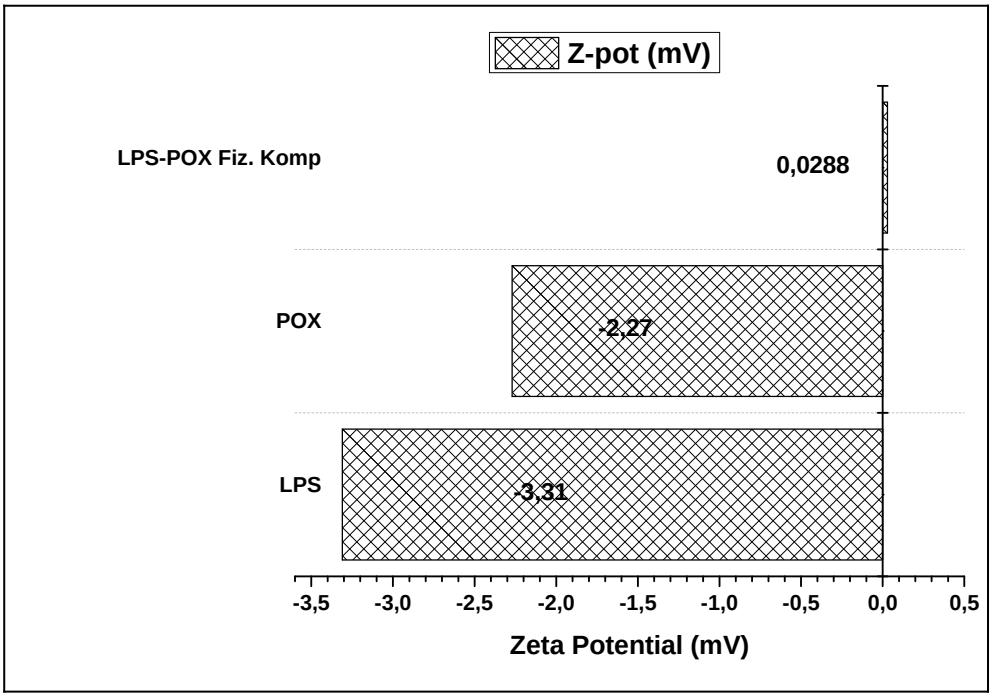
LPS'nin Z-Ave değeri 397,1 d.nm, POX polimerinin Z-Ave değeri 189,4 (d.nm) ve LPS-POX fiziksel kompleksinin hidrodinamik çapı Z-Ave: 416,7 d.nm bulguları kıyaslamalı olarak Şekil 5.3'de verilmiştir. LPS-POX Fiziksel kompleksin boyutu; LPS ve POX un boyutları ile kıyaslandığında oluşturulan kompleksin boyutunun biyomolekülden ve polimerden daha büyük olduğu görülmektedir. Bu da kompakt bir hal almadan polimer ile lipopolisakkaritin fiziksel bir kompleks oluşturduğunu göstermektedir.

LPS'nin Zeta potansiyel değeri -3,31 mV, POX polimerinin Zeta potansiyel değeri -2,27 mV ve LPS-POX fiziksel kompleksinin zeta potansiyel değeri 0,0288 mV bulguları kıyaslamalı olarak Şekil 5.4'de verilmiştir. Polimer ve lipopolisakkaritin fiizksel kompleks oluşturması ile negatif yük değerinin pozitife doğru gittiği, yani negatif yüklerin kompleks oluşturduğu görülmektedir.

Polimerin yapısındaki C=O grubuna ait 1600-1700 cm^{-1} civarındaki bandın şiddetindeki azalmaya bakılarak Polioksidonyum-LPS fiziksel kompleksinin oluştuğu Şekil 4.9 POX FTIR spektrumu ve Şekil 4.39 POX-LPS fiziksel kompleksine ait FTIR spektrumu karşılaştırıldığında anlaşılmaktadır)3300 cm^{-1} de suya ait -OH piki görünmektedir).



Şekil 5. 3 LPS, POX ve LPS-POX Fiziksel Kompleksinin Z-Ave değerlerinin kıyaslamalı grafiği

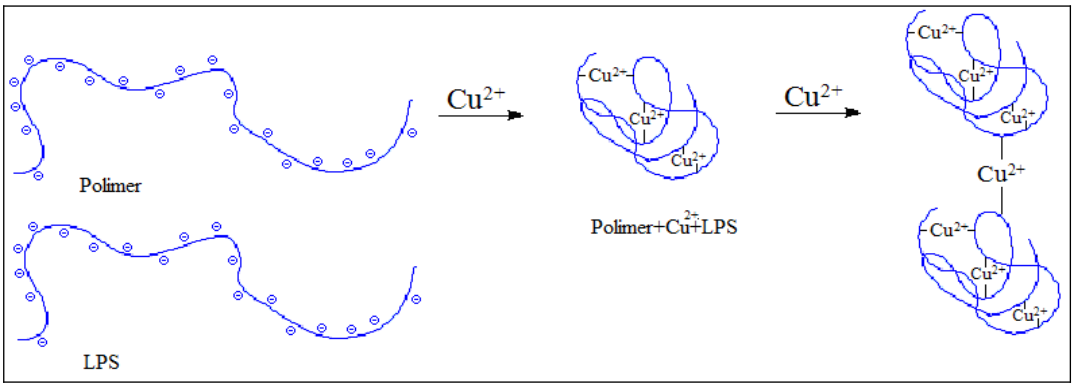


Şekil 5. 4 LPS, POX ve LPS-POX Fiziksel Kompleksinin Zeta Potansiyel değerlerinin kıyaslamalı grafiği

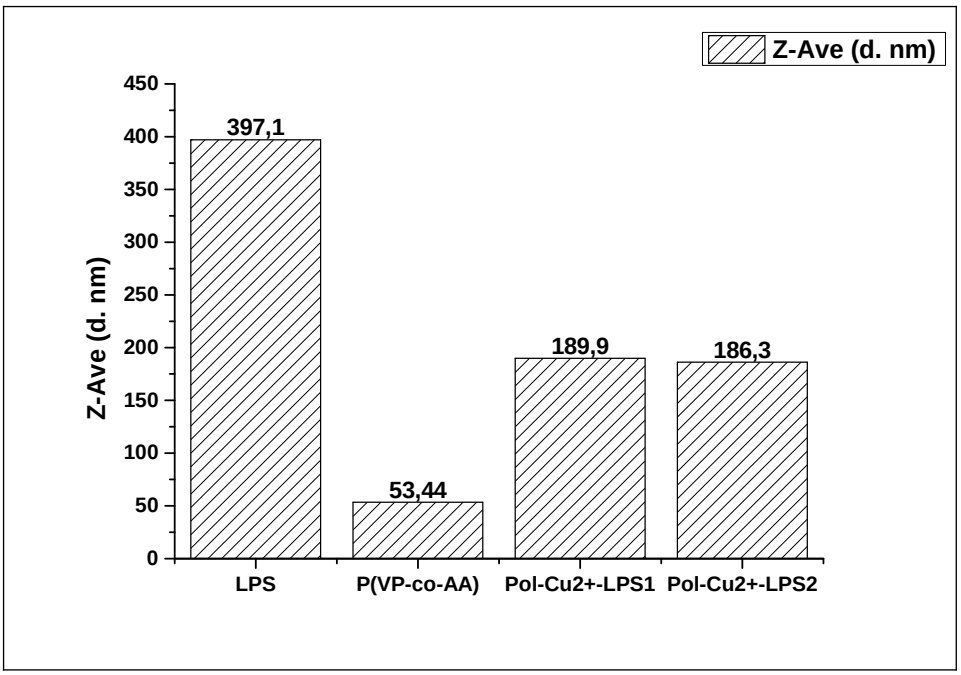
4.3.1.3 P(VP-co-AA)-Cu^{2+}-LPS Komplekslerinin Sentezine ve Analizine Ait Tartışma

LPS nin hidrodinamik çapı (Z-Ave) 397,1 d.nm, P(VP-co-AA) polimerinin Z-ave değeri 53,44 d.nm, P(VP-co-AA)-Cu^{2+}-LPS-1 kompleksinin Z-ave değeri 189,9; P(VP-co-AA)-Cu^{2+}-LPS-2 kompleksinin Z-ave değeri 186,3 d.nm değerleri Şekil 5.5'te kıyaslamalı olarak gösterilmektedir. Bakır metali varlığındaki fiziksel karışımda bağlanma gerçekleştiği için 3'lü polimer-Cu^{2+}-LPS fiziksel karışımınlarında kompleksler kompakt hal alarak oluşmuştur ve oluşturulan komplekslerin hidrodinamik çapı LPS' ye göre daha küçük, polimerin çapına göre ise daha büyüktür. Bunun sebebi bakır metalleri hem P(VP-co-AA) ile LPS arasında bağlanmayı sağlarken hem de bu bağlanan P(VP-co-AA)-Cu^{2+}-LPS leri de birbirine bağlamasıdır.

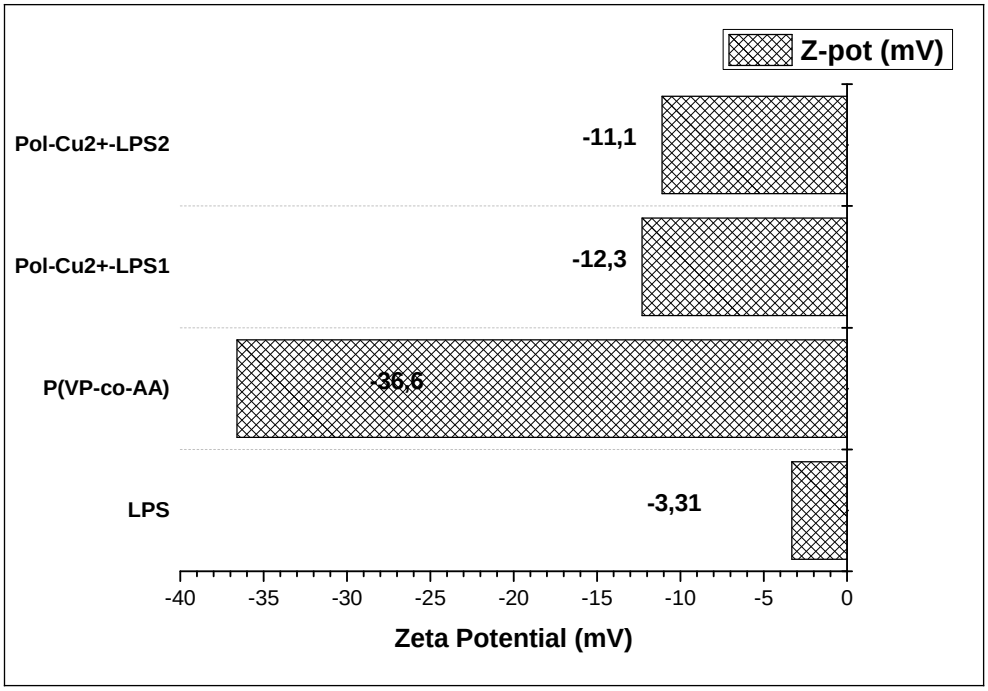
Ayrıca P(VP-co-AA)' nın negatif yük oluşturan grupları bakır metali aracılığı ile polimere bağlandığı için -36,6 olan yük, 3'lü kompleksin oluşturulması sonucunda 1. kompleks için -12,3; 2. kompleks için -11,1 olmak üzere daha pozitif değerlere kayma göstermiştir. 2. komplekste, 1. komplekse göre 2 kat fazla bakır kullanılması ile Z-ave ve zeta potansiyel değerlerinin birbirine yakın olduğu görülmekle birlikte; daha fazla bakır kullanılan 2. komplekste boyutun 1. komplekse göre biraz daha küçük olduğu görülmektedir.



Şekil 5. 5. LPS ile polimerin bakır metali varlığında oluşturduğu kompakt yapının şematik gösterimi



Şekil 5. 6. LPS, P(VP-co-AA) ve P(VP-co-AA)-Cu^{2+}-LPS-1 ve P(VP-co-AA)-Cu^{2+}-LPS-2 Kompleksinin Z-Ave değerlerinin kıyaslamalı grafiği



Şekil 5. 7. LPS, P(VP-co-AA) ve P(VP-co-AA)-Cu^{2+}-LPS-1 (Pol-Cu^{2+}-LPS1) ve P(VP-co-AA)-Cu^{2+}-LPS-2 (Pol-Cu^{2+}-LPS2) Kompleksinin Zeta potansiyel değerlerinin kıyaslamalı grafiği

FT-IR spektrumlarına bakıldığında (Şekil 4.54) $CuSO_4.5H_2O$'ün 1100 cm^{-1} civarındaki pikinin (P(VP-co-AA)-Cu^{2+}-LPS kompleksinde tamamen kaybolması, $CuSO_4.5H_2O$'ın kompleks oluşumunda kullanıldığını ve komplekslerin istenilen şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Sulu sistemde çalışıldığı için 3300 cm^{-1}' lerde -OH grubuna ait pikler görünmektedir.

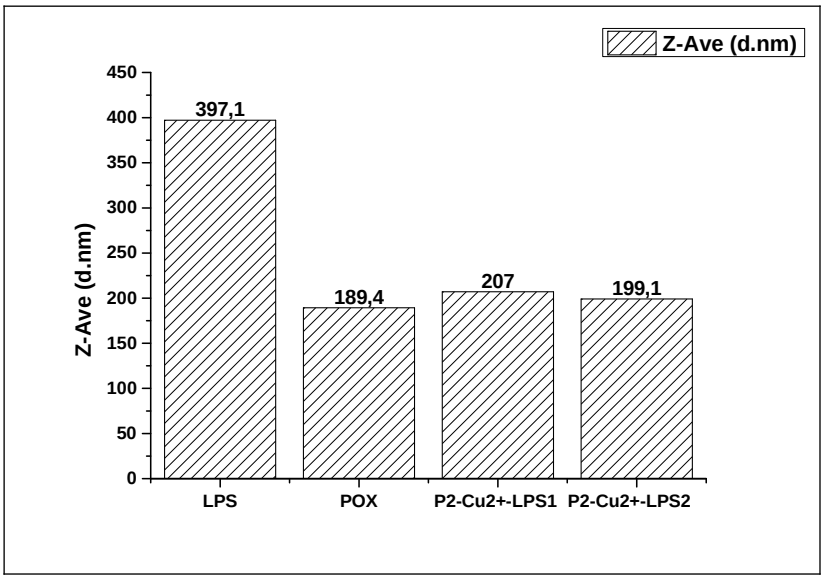
P(VP-co-AA)-LPS fiziksel kompleks ve P(VP-co-AA)-Cu^{2+}-LPS komplekslerini karşılaştırırsak; bakır metali ile oluşturulan 3'lü komplekslerin yapısı boyutları göz önünde bulundurularak (Z-ave: 189,9 ve 186,3 d. nm) fiziksel kompleksin yapısına oranla boyutları göz önünde bulundurularak (437,9 nm) daha kompakt yapıdadır, bu sebeple hidrodinamik çap bakır komplekslerinde daha küçük bulunmuştur.

LPS- P(VP-co-AA) fiziksel kompleksinin zeta potansiyel değeri -7,05 mV; 1. kompleks için -12,3 mV; 2. kompleks için -11,1 mV'dir. Bunun sebebi bakır metalleri hem P(VP-co-AA) ile LPS arasında bağlanmayı sağlarken hem de bu bağlanan P(VP-co-AA)-Cu^{2+}-LPS leri de birbirine bağlamasıdır. Bu sebepten dolayı negativite artmaktadır.

4.3.1.4 POX-Cu^{2+}-LPS Komplekslerinin Analizine Ait Tartışma

LPS nin hidrodinamik çapı (Z-Ave) 397,1 d.nm, Polioksidonyum polimerinin Z-ave değeri 189,4 d.nm, POX-Cu^{2+}-LPS-1 kompleksinin Z-ave değeri 207,3 d.nm; POX-Cu^{2+}-LPS-2 kompleksinin Z-ave değeri 199,1 d.nm değerleri Şekil 5.8'de kıyaslamalı olarak

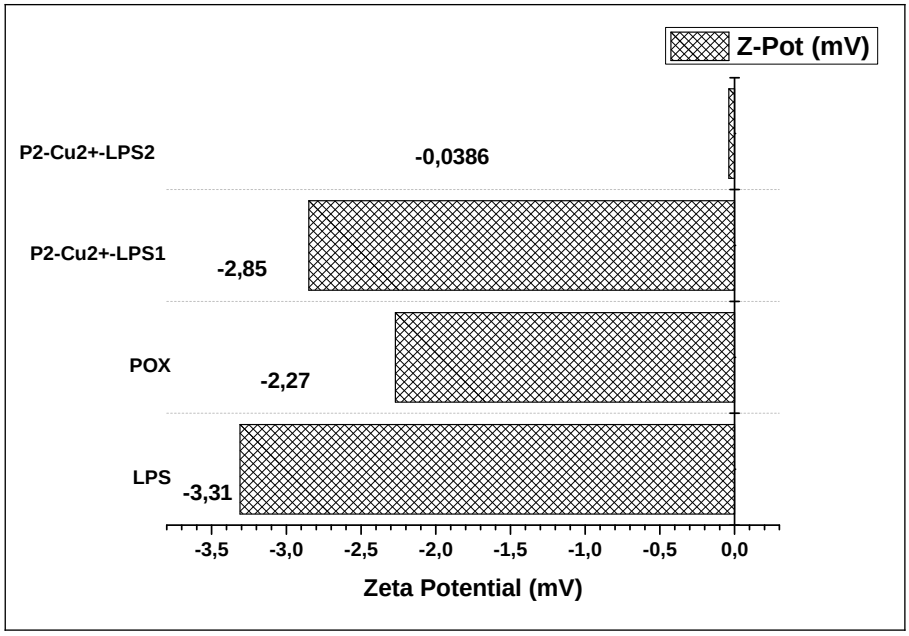
gösterilmektedir. Komplekslerin boyutu LPS nin boyutundan küçük, polimerin boyutundan biraz daha büyük olarak ölçülmüştür, bunun sebebi bakır metali varlığında oluşturulan üçlü komplekslerin kompakt hal alarak oluşmuş olmasıdır.



Şekil 5. 8. LPS, POX, POX-Cu^{2+}-LPS1 (P2-Cu^{2+}-LPS1) ve POX-Cu^{2+}-LPS2 (P2-Cu^{2+}-LPS2) kıyaslamalı Z-Ave (d.nm) değerleri

LPS nin zeta potansiyeli -3,31 mV, POX polimerinin zeta potansiyeli -2,27 mV, POX-Cu^{2+}-LPS-1 kompleksinin zeta potansiyeli -2,85 mV ve POX-Cu^{2+}-LPS-2 kompleksinin zeta potansiyeli -0,0386 mV değerleri Şekil 5.9'da kıyaslamalı olarak gösterilmektedir. LPS-Cu^{2+}-POX kompleksinin zeta potansiyelinin en yüksek negatif yüke sahip olan LPS' ye göre pozitife kayma görülmektedir.

FT-IR spektrumlarına bakıldığında (Şekil 4.54); $CuSO_4.5H_2O$'ün 1100 cm^{-1} civarındaki pikinin Polioksidonyum-Cu^{2+}-LPS kompleksinde kaybolması, $CuSO_4.5H_2O$'ın kompleks oluşumunda kullanıldığını ve komplekslerin istenilen şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Ayrıca Şekil 4.52'de kompleksin oluşumu, $CuSO_4.5H_2O$ ve LPS ile karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Sulu sistemde çalışıldığı için 3300 cm^{-1}' lerde -OH grubuna ait pikler görünmektedir.



Şekil 5. 9. LPS, POX, POX-Cu^{2+}-LPS1 (P2-Cu^{2+}-LPS1) ve POX-Cu^{2+}-LPS2 (P2-Cu^{2+}-LPS2) kıyaslamalı zeta potansiyel değerleri (mV)

Polioksidonyum-LPS fiziksel karışım ve Poliksidonyum-Cu^{2+}-LPS komplekslerini karşılaştırırsak; bakır metali ile oluşturulan komplekslerin fiziksel karışıma (688,9 nm) karşı daha kompakt yapıda olduğu görülmektedir. Ancak yük olarak daha negatif, bunun sebebi olarak ta bakır metalleri hem polioksidonyum ile LPS arasında bağlanmayı sağlarken hem de bu bağlanan Polioksidonyum-Cu^{2+}-LPS leride birbirine bağlamaktadır. Dolayısıyla P(VP-co-AA)-Cu^{2+}-LPS kompleksinde olduğu gibi negativite artmaktadır.

4.3.2 Konjugatların Oluşumuna ait Tartışma

4.3.2.1 Dekstran Aldehit Türevinin Eldesine ait Tartışma

Yapılan denemelerin sonuçları Şekil 4.55'de ve Şekil 4.56'da verilmiştir. Yapılan denemeler sonucunda, literatür araştırmasında görülen 2, 5 ve 10 mM $NaIO_4$ kullanılarak gerçekleştirilen dekstranın aldehit türevlerinin FTIR' larında gözle görülen bir değişiklik olmamıştır (Maia vd., 2005). Literatürde de ifade edilen FTIR' larda aldehit oluşumunun görülmesini sağlayacak olan 500 mM ve 1M $NaIO_4$ ile oksidasyon işlemi yapılmıştır. Dekstran ve dekstran-aldehit türevinin FT-IR spektrumları incelendiğinde, dekstran-aldehite ait FT-IR spektrumunda 1650 cm^{-1}'de –C=O gerilmesine ait bir pikin oluştuğu görülmektedir. 2841 ve 2875 cm^{-1}'de aldehit gerilmeleri ikili pik olarak görülmektedir. Bu bize dekstran aldehitin oluşturulduğunu ispat etmektedir.

Elde edilen bulgular yöntemin başarılı olduğu görülmektedir. Ancak yüksek mM $NaIO_4$ kullanmanın LPS'nin moleküler yapısını değiştirerek antijenik karakterine zarar verme olasılığı lüteratürde belirtilmiştir (Topuzogullari vd., 2013). Bu sebeple LPS'nin antijenik karakterinde herhangi bir değişikliğe sebep olmaması açısından yapı değişikliğini en aza indirmek için oksidasyon aşamasında 5 mM $NaIO_4$ kullanılmıştır.

4.3.2.2 LPS'nin aldehit türevinin oluşumuna ait Tartışma

LPS'nin aldehit türevine ait FTIR spektrumu Şekil 4.57'de gösterilmiştir. 1640-1650 cm^{-1} arasında karbonil grubu piki görülmektedir. Ayrıca 2800-2900 cm^{-1} arasındaki ikili pik aldehit oluştuğunu kanıtlar niteliktedir.

4.3.2.3 NH_2-LPS'nin Biyopolimerle Konjugasyonu

-NH_2-LPS'nin P(VP-co-AA) ile Biyokonjugatlarının Sentezi ve Karakterizasyonuna ait Bulgular

$n_{P(VP\text{-}co\text{-}AA)}/n_{LPS}$ oranları 0,5; 1 ve 2 olmak üzere EDC varlığında sentezlenen konjugatlar GPC, HPLC, FTIR ve ZetaSizer cihazları ile karakterize edilmiştir.

GPC UV kromatogramında P(VP-co-AA) polimerinin baseline'a yakın bir elüsyon profili sergilediği ve 5 ve 7. dakikalar arasında LPS'nin ve konjugatların uv pikleri görülmektedir. Polimer oranının artması ile konjugatlar arasında lineer bir artış görülmemiştir.

Işık saçılması kromatogramına göre polimer pik büyüklüğünün LPS pikinin yanında daha ufak kaldığı ve LPS- P(VP-co-AA) konjugatlarının oluşturulması ile oluşan konjugatların piklerinin LPS pikine göre daha küçük bir değer aldığı görülmektedir.

HPLC kromatogramlarına bakıldığında 17,5-22,5 dakikalar arasındaki pik LPS'ye; 18-20.dakikalar arasındaki pik polimere ait piktir. LPS'nin polimerle konjugasyonu sonucu oluşan yapının 22,5-37,5 dakikalar arasındaki geniş pik konjugat pikidir. Polimer oranının değiştirilmesiyle konjugat piklerinde fazla değişiklik olmadığı ifade edilebilir. LPS-polimer konjugatlarının HPLC analizi kromatogramlarında LPS ve polimerden farklı dakikalarda pik vermiş olması LPS-polimer konjugatlarının sentezlendiğini göstermiştir.

Konjugatların FTIR spektrumları göz önüne alındığında, polimerden gelen 3300 cm^{-1} civarındaki OH bandının ve polimerin karboksilik asit grubuna ait kuvvetli 1760-1650 cm^{-1} deki bandının kaybolarak 1550-1650 cm^{-1} civarı (C=O) amidlere ve 1450-1550 cm^{-1} civarında (N-H bandı) amidlere ait piklerin oluşması konjugasyon mekanizmasının başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.

P(VP-co-AA) ve EDC yöntemi kullanılarak oluşturulan $n_{P(VP\text{-}co\text{-}AA)}/n_{LPS}$ =0,5 1, 2 oranlarındaki biyokonjugatlarının zeta potansiyel değerleri Zetasizer cihazında ölçülmüş ve şekil 2.32 'de verilmiştir. Bu değerlere göre sırasıyla P(VP-co-AA) (-36,6 mV), $n_{P(VP\text{-}co\text{-}AA)}/n_{LPS}$ =0,5 (-1,48 mV); 1 (3,22 mV); 2 (2.27 mV) olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlar ışığında; polimer üzerindeki negatif yüklü karboksil gruplarının (-COOH); NH_2-LPS üzerindeki amino grupları (-NH_2) ile konjugasyonu sonucunda polimer ve lipopolisakkaritin bağlanarak amid bağı oluşturması, bunun neticesinde de negatif yüklerin kaybolması ile açıklanmaktadır.

-NH_2-LPS'nin Polioksidonyum ile Biyokonjugatlarının Sentezi ve Karakterizasyonuna ait Bulgular

GPC UV kromatogramında Polioksidonyum polimerinin baseline'a yakın bir elüsyon profili sergilediği ve konjugatların 5 ve 7. dakikalar arasında LPS'nin ve konjugatların uv pikleri görülmektedir. Polimer oranının artması ile konjugatlar arasında lineer bir artış görülmemiştir.

Işık saçılması kromatogramına göre polimerin pikinin büyüklüğünün LPS pikinin yanında daha ufak kaldığı ve LPS-POX konjugatlarının oluşturulması ile oluşan konjugatların piklerinin boyutlarının LPS 'ye göre daha ufak; polimerin pikine göre daha büyük bir değer aldığı görülmektedir. LPS-POX konjugatlarının HPLC sonuçları EDC çapraz bağlama reaktifleri ile bağlanması sonucu konjugat oluşumu sağlandığını göstermektedir.

HPLC kromatogramları göz önünde bulundurulduğunda 17,5-22,5 dakikalar arasındaki pik LPS'ye; 18-22. Dakikalar arasındaki pik polimere ait piktir. LPS'nin polimerle konjugasyonu sonucu oluşan yapı 22,5-37,5 dakikaları arasında görülen geniş piktir. Polimer oranının değiştirilmesiyle konjugat piklerinde fazla değişiklik olmadığı ifade edilebilir.

FTIR spektrumlarına bakıldığında Polimerden gelen 3300 cm^{-1} civarındaki OH bandının ve polimerin karboksilik asit grubuna ait kuvvetli 1760-1650 cm^{-1} deki bandının kaybolarak 1620 cm^{-1} civarı (C=O) amidlere ve 1560 cm^{-1} civarında (N-H bandı) amidlere ait piklerin oluşması konjugasyon mekanizmasının başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.

Zeta potansiyel değerleri kıyaslandığında bu değerlere göre sırasıyla POX (-2,27 mV), n_{POX}/n_{LPS} =0,5 (-1,67 mV); 1 (-1,32 mV); 2 (-1,46 mV) olarak ölçülmüştür. Polimer üzerindeki negatif yüklü grupların; NH_2-LPS üzerindeki amino grupları (-NH_2) ile konjugasyonu sonucunda polimer ve lipopolisakkaritin bağlanarak amid bağı oluşturması, bunun neticesinde de negatif yüklerin kaybolması ile açıklanmaktadır. Bu sonuçlar ışığında; n_{POX}/n_{LPS} 'nin tüm oranlarında GPC ve HPLC sonuçlarına dayanarak konjugat oluşumu sağlanmıştır.

4.3.2.4 LPS-P(VP-co-AA) konjugatlarının $SOCl_2$ yöntemi ile Konjugasyonuna ait Tartışma

$SOCl_2$ varlığında sentezlenen konjugatlar koyu jel kıvamındanır ve suda çözünürlüğü düşüktür. Şekil 4.85'de görülen 20-25 dakikalar arasındaki pik konjugat piki; 17,5-22,5 dakikalar arasındaki pik LPS'ye ait piktir. 18-20. Dakikalar arasındaki konjugat pikinin yanındaki ufak pik reaksiyona girmemiş olan LPS'den gelmektedir. Bu pikin LPS'den geldiğini belirlemek amacıyla, konjugattan alınan bir miktar örnek üzerine LPS çözeltisi eklenerek konjugat örneğindeki LPS miktarı arttırılmıştır ve sonucunda 18-20.dakikalar arasındaki bu pikte artma olduğu görülmüştür. Şekil 4.87'de bu çalışmamızla ilgili kromatogram yer almaktadır.

Tiyonil Klorür yöntemi ile sentezlenmiş P(VP-co-AA)-LPS konjugatına ait FTIR spektrumu Şekil 4.86'da gösterilmiştir. 1650 cm^{-1} civarında çok kuvvetli C=O gerilme titreşimleri; 3230-3550 arası zayıf-orta geniş, intermoleküler H bağlarına ait pik; 1420 cm^{-1} civarında esterden gelen zayıf veya orta CH_2 simetrik deformasyon titreşimleri; 1100 cm^{-1} civarında da ester gruplarına ait C-O-C asimetrik gerilme titreşimleri görülmektedir. Bu pikler bize ester oluşumunu dolayısıyla P(VP-co-AA)-LPS konjugatının oluştuğuna dair kanıt teşkil etmektedir.

4.4 ELİSA Deneylerine ait Tartışmalar

4.4.1 ELİSA Kaplamada kullanılması için gerçekleştirilen Konjugatlara ait Tartışma

Şekil 4. 89'da GPC Işık Saçılması Kromatogramında, daha önceki yapmış olduğumuz çalışmalar ışığında 17-18. dakikalar arasında BSA pikinden ve 6-8.dakikalar arasında LPS pikinden farklı olarak, 10 ve 14. dakikalarda konjugat piklerinin oluştuğu görülmüştür. Piklerin alanları göz önünde bulundurularak 1 ve 3. yöntemle sentezlenmiş olan LPS-BSA konjugatlarının 2. Yöntemle sentezlenen LPS-BSA konjugatına göre daha başarılı olduğu söylenebilmektedir.

İlk 3 ELİSA'da 3 farklı kaplama antijeni birbirleri ile kıyaslanmalı olarak denenmiştir. LPS, LPS-BSA konjugatı(1.Yöntem) ve LPS-BSA konjugatı (3. Yöntem) yapılan kıyaslamalar sonucunda 3 kaplamanın da benzer sonuçlar verdiği; yalnız LPS ve LPS-BSA (3. Yöntem) konjugatlarının kaplanması sonucu alınan ELİSA yanıtlarının daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bir kez daha sadece bu 2 kaplama denenerek birbirine çok yakın sonuçlar alındığı, sadece LPS kaplandığında alacağımız sonuçların yeterli olduğu görülmüştür. Sonuç olarak literatür de de genel olarak belirtildiği gibi LPS'yi tek başına proteinle konjuge etmeden plaklara kaplayarak ELİSA deneylerine devam edilmesine karar verilmiştir.

4.4.2 ELİSA Platelerine LPS Kaplamada Standardizasyon çalışmasına ait Tartışma

Farklı miktarda LPS ile kaplanan kuyulara 7. Kafes NK faresinin serumu 1:500 dilüede eklenmiştir. 0,2 µg LPS/kuyu miktarının kaplama için uygun olduğu görülmüştür. Tüm çalışmalarda bu standardizasyona göre kaplama yapılmıştır.

4.4.3 Dolaylı yoldan Enzim Bağlı İmmün Assay (ELİSA) Yöntemi Kullanılarak Farelerden Alınan Serum Örneklerinde Fiziksel Karışım, Metal Kompleksleri ve Biyokonjugatlara Karşı Oluşan Antikor Miktar Tayini Sonuçlarına Ait Tartışma

4.4.3.1 LPS-P(VP-co-AA) Fiziksel Kompleks ve Konjugatlarına Karşı Oluşan Antikor Miktar Tayini Sonuçları

Şekil 4.91'de görüldüğü üzere bu gruptaki en yüksek titre LPS-P(VP-co-AA) konjugatı n=2 oranından alınmıştır. İlk enjeksiyondan 30 gün sonra titre seviyesinin düşmesiyle 1. enjeksiyonla aynı dozda 2. enjeksiyon hatırlatma olarak yapılmıştır ve serumlardaki antikor titrelerinin 37 ve 44. günlerde maksimum seviyelere ulaştığı görülmektedir. Daha sonraki hafta LPS-P(VP-co-AA) konjugatı n=1 oranının OD değeri daha da yükselmişken, LPS-P(VP-co-AA) konjugatı n=2 oranının OD değerlerinde çok küçük bir düşme görülmesine karşın iki oranın da kontrollere göre yüksek antikor yanıt verdiği görülmektedir. Monoklonal antikor çalışmalarının devamı için yüksek antikor seviyesini kaybetmemek açısından 3. kez ilk dozla aynı oranda hatırlatma enjeksiyonu yapılmıştır.

4.4.3.2 LPS-P(VP-co-AA) Fiziksel Kompleks ve LPS-Cu^{2+}-P(VP-co-AA) 3'lü kompleksine Karşı Oluşan Antikor Miktar Tayini Sonuçları

Şekil 4.92'de görüldüğü üzere en yüksek titrede antikor yanıtları LPS-Cu^{2+}- P(VP-co-AA) 3'lü kompleksinin 1.oranının enjekte edildiği fare grubundan elde edilmiştir 30. gün birinci enjeksiyonla aynı dozda 2. enjeksiyon tüm farelere hatırlatma olarak uygulanmıştır. LPS-Cu^{2+}- P(VP-co-AA) kompleksi için 37. günde antikor yanıtının arttığı ancak 44. Günde ufak bir düşme görülmektedir. Bu sebeple 3. enjeksiyon 44. günde yapılmıştır. 52. ve 58. günlerde en yüksek titrin bu gruptan alındığı, titre seviyesinin yaklaşık 2,00 OD civarına ulaştığı gözlenmiştir. Monoklonal antikor çalışmalarının devam ettirilmesi için seçilen fareler arasında bu gruptaki 3 fare ile de devam edilmiştir.

4.4.3.3 LPS-POX Fiziksel Kompleks ve Konjugatlarına Karşı Oluşan Antikor Miktar Tayini Sonuçları

Şekil 4.93'de görüldüğü üzere LPS-POX fiziksel kompleksi ve LPS-POX konjugatlarının ilk enjeksiyondan sonra kontrollerle yakın sonuçlar verdiği görülmektedir. 30. günde gerçekleştirilen 1. enjeksiyonla aynı dozda gerçekleştirilen 2. enjeksiyondan sonra bu gruptaki en yüksek titre LPS-POX fiziksel kompleksinden 37. günde alınmakla beraber diğer haftalarda hafif bir düşme görülmektedir. LPS-POX konjugatının enjekte edildiği grupta 2. enjeksiyonun gerçekleştiği 30. günden itibaren 37 günde antikor yanıtının arttığı ve 44, 51 ve 58. günlerde birbirine yakın antikor titreleri alındığı gözlemlenmiştir.

4.4.3.4 LPS-POX Fiziksel Kompleks ve LPS-Cu^{2+}-POX Kompleksine Karşı Oluşan Antikor Miktar Tayini Sonuçlarına ait Tartışma

Şekil 4. 94'de görüldüğü üzere ilk enjeksiyondan sonra belirtilen 5 grup içinde en yüksek antikor titri Bakır komplekslerinde görülmektedir. 30. günde 405 nm'deki OD değerlerinin düşmesi ile 1. enjeksiyon ile aynı dozda 2. enjeksiyon hatırlatma amacıyla gerçekleştirilmiştir. 37. günde en yüksek artış LPS-Cu^{2+}-POX 2. Oran ve 1. oran grubunda yakındır ve 44. Günde hafif bir düşme görülmesi ile III. Enjeksiyon hatırlatması yapılarak 51. günde yaklaşık 2.00 OD değerlerde yanıt aldığı görülmektedir. Ancak 58.günde okunan antikor yanıtlarındaki düşme yine de 1,00 üzerinde olmakla beraber yüksek yanıt olarak kabul edilebilmekle beraber, monoklonal antikor çalışmalarına devam edebilmek için yanıtlardaki yükselme ve düşmeler tutarsız görülmekte ve bu gruptaki farelerle devam edilmemesine karar verilmiştir.

4.4.3.5 LPS-P(VP-co-AA) Konjugatlarına ve LPS-P(VP-co-AA)-Freund's Adjuvantına Karşı Oluşan Antikor Miktar Tayini Sonuçları Kıyaslanmasına ait Tartışma

Şekil 4.95'e bakıldığında ilk enjeksiyondan sonra Freund's adjuvantı içermeyen LPS-P(VP-co-AA) konjugatlarının her iki oranının da kontrol gruplarına göre yüsek antikor yanıt verdiği görülmektedir. 30. günde 2. hatırlatma enjeksiyonunun yapılması ile 37.ve 44. günlerde alınan antikor yanıtlarının oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Monoklonal antikor için uygun yanıtları koruyabilmek açısından 3. enjeksiyon 51. günde gerçekleştirilmiştir. Alternatif adjuvan etkisini gözlemleyebilmek için yapılan bu çalışma sonucunda, Freund's adjuvantı içeren ve içermeyen konjugatlar arasında çok büyük bir fark görülmemektedir. Tek başına LPS ye göre LPS+Freund's adjuvantının yüksek titre verdiği görülmekte, Freund's adjuvantı içeren ve içermeyen konjugatlar arasında çok büyük bir fark olmadığı söylenebilmektedir.

Sonuç olarak, konjugatlarımızdaki P(VP-co-AA) kopolimerinin uygun bir adjuvant olduğu görülmektedir.

4.4.3.6 LPS-BSA-Freund's Konjugatlarına Karşı Oluşan Antikor yanıtlarına ait Tartışma

Şekil 4.96'da görüldüğü üzere Adjuvanlı LPS-BSA konjugatlarının antikor yanıtlarının kontrole oranla hatırlatma enjeksiyonu olmaksızın yüksek olduğu görülmektedir.

4.5 Hibridoma Teknolojisi ile Monoklonal Antikor Eldesine ait Bulgular

Hibridoma teknolojisi ile monoklonal antikor eldesi amacıyla, yüksek immun cevap aldığımız seçilen 7K SAK isimli Balb/c füzyon çalışmalarında kullanılmıştır. 134 milyon F0 hücresi ve 1 milyar 250 milyon dalak hücresi ile füzyon yapılmıştır. F0 hücrelerinin dalak hücrelerine oranı yaklaşık 1:10 olacak şekilde füzyona girilmiştir. 10. gün sonunda 40 kuyuda büyük klonlar görülmüştür. Bu klonların üst sıvılarından ELİSA metodu ile spesifik antikor üreten hibritlerin tespiti yapıldı. İlk etapta 4 klonun üst sıvılarından alt klonlama işlemi gerçekleştirildi. Alt klonlama işlemi hücreler 96 kuyulu platelere tek düşürüldü. 7 G9 daki kolonilerden elde edilen hibritlerden çalışmaya devam edildi ve Q humması hastalığına spesifik monoklonal antikor üretilmiş oldu, bu monoklonal antikorlar komplement fiksasyon testinde kullanılmıştır.

4.6 Komplement Fiksasyon Testine ait Tartışma

Komplement fiksasyon testi hızlı sonuç vermesi, pratik olması ve ekonomik olması açısından sıklıkla tercih edilen bir testtir. Bu sebeple projemiz kapsamında elde edilen monoklonal antikor ile hastalık teşhisi için deneme olarak bu test seçilmiştir.

Şekil 4. 102'de yalnızca mycoplasma ve Q humması çalışılmıştır. Mycoplasma için 14 hasta, Q humması için ise yine 14 hasta serumu çalışıldı. Daha öncesinde bu 14 hastadan 3. hastada Q humması tespit edilmiş ve Komplement fiksasyon testimizde Q humması için ayrılan kısma bakılırsa her hasta için yan yana iki kuyucuk bulunmakta ve sadece yine aynı 3. hastada (C5 ve C6 kuyuları) pozitiflik saptanmış olup diğer 13 hastada sonuç negatiftir.

Yeşil ile gösterilen plate alanında (G7, G8 ve H7, H8) mycoplasma ve Q humması için pozitif kontrol kısmı olup doğru çalışmıştır. Sarı ile gösterilen plate alanında (G9, G10 ve H9, H10 kuyuları) mycoplasma ve Q humması için negatif kontol kısmı olup doğru çalışmıştır.

Plate üzerinde kırmızı ile gösterilen alanda Hemolitik sistemde (HST) (12 kuyucuklu) amboceptor (koyun eritrositlerine karşı tavşan serumunda elde edilmiş antikor), koyun

eritrositi ve kompleman bulunmaktadır, hasta serumu bulunmamaktadır. Hemolitik sistem için ayrılmış kuyucukların sırası: F9-E9-D9-C9-B9-A9-A10-B10-C10-D10-E10-F10 şeklindedir. Amboceptor F10 kuyucuğu hariç ilk kuyucuktan itibaren titre edilir. Burada amaç komplemanın en iyi bağlandığı amboceptor titresini bulmaktır. (Amboceptor+KE, antijen antikor kompleksi oluşturur ve kompleman da bu komplekse bağlanıp KE'ni hemoliz eder. Hemolizin olduğu yani homojen olan en son kuyucuğun titresi burada baz alınır) F10. kuyucuğa amboceptor konmadığı için sadece KE ve kompleman bulunmaktadır. Kompleman antijen-antikor kompleksi oluşmadığı için KE'ne bağlanamaz ve hemoliz edemez. Bu nedenle F10. kuyucukta dibe çöken eritrositleri görürüz. E10. kuyucukta ise amboceptor miktarı titrasyondan dolayı çok az miktarda olduğundan dolayı yine aynı mekanizma ile bir miktar KE'i dibe çökmüş görürüz.

Daha önceden Q humması hastalığı olduğu tespit edilen hastanın serumunda bizim yöntemimizle yaptığımız analiz sonucunda bu hastalığa sahip olduğunu tespit ettik.

Projemizin Sonucu olarak;

1. 7. kafeste bulunan 100 µg LPS-100 µg P(VP-co-AA), 13 µl $CuSO_4.5H_20$ çözeltisi (150mg/10ml saf su) içeren LPS-Cu^{2+}- P(VP-co-AA) kompleksi en fazla antikor elde edildiği için Q humması için yapılacak aşı sistemleri için prototip işlevini görmektedir.
2. Elde ettiğimiz monoklonal antikorun Q humması hastalığının teşhisinde tanı kiti olarak kullanılabileceğini başarılı bir şekilde kanıtlamış oldu.

Projemizin başlangıcındaki hedeflerimizden olan aşı ve tanı kiti prototipleri gerçekleştirilmiştir. Bundan sonra ki hedefimiz ise ülkemizin ihtiyacı olan aşı ve tanı kitlerinin bu proje model alınarak üretiminin sağlanması olacaktır.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Yrd. Doç. Dr. MESUT KARAHAN
Proje No:	113Z938
Proje Başlığı:	Development of Lipopolysaccharide-Biopolymer Complex and Conjugates Against the Q Fever Disease For Application Purpose of Vaccine Prototype and Diagnostic Kit
Proje Türü:	Uluslararası
Proje Süresi:	36
Araştırmacılar:	EMİNE KARAKUŞ, KORKUT ULUCAN, ZEYNEP AKDESTE, SEZCAN SAĞLAM
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	ÜSKÜDAR Ü. MÜHENDİSLİK VE DOĞA BİLİMLERİ F. BİYOMÜHENDİSLİK B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/06/2014 - 15/09/2017
Onaylanan Bütçe:	305805.0
Harcanan Bütçe:	253711.21
Öz:	Biyopolimerlerin lipopolisakkarit, protein ve diğer biyomoleküllerle kompleks ve konjugasyonu tıp, eczacılık, biyoteknoloji ve biyomühendislik alanlarında uygulamalar için çeşitli yenilikler getirmektedir. Son zamanlarda polimer-biyomolekül kompleks ve konjugatları proteinlerin saflaştırılması, enzim kararlılığının arttırılması, yeni nesil aşı sistemleri, tanı kitleri, biyosensör üretimi kontrollü ilaç salımı ve doku mühendisliğinde kullanılmaktadırlar. Q hummanın etiyolojik ajanı lipolisakkarit yapısındaki Coxiella burnetii dir. Q humması Dünya da en sık görülen riketsiyal kaynaklı zoonotik bir hastalıklardandır. İnsanlarda meydana getireceği kalıcı enfeksiyonlar Q hummasının kronik formuna yol açabilir ve sıklıkla ölümcül olabilmektedir. Ancak bu hastalığa karşı sentetik aşı geliştirilmesine zemin hazırlayacak olan Polimer-Lipopolisakkarit kompleks ve konjugatları geliştirilmesi ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Projemiz kapsamında ilk 6 aylık aşamada Slovakya tarafından Coxiella burnetii lipopolisakkaritinin izolasyonu gerçekleştirilmiş, karakterizasyonu ve fonksiyonel özellikleri incelenerek tarafımıza saf bir şekilde verilmiştir. Türkiye tarafında ise, bu ilk 6 aylık dönemde polimerlerin [Polioksidonyum, Poli(vinilpirolidon-co-akrilikasid)] sentezi yapılmıştır. Daha sonraki 1 yıllık aşamada; Biyopolimerler ve lipopolisakkarit kullanılarak, (1)fiziksel karışımla Polimer-lipopolisakkarit kompleksleri, (2)Bakır metal iyonu aracılığı ile üçlü Polimer-Bakır-lipopolisakkarit kompleksleri ve (3)çapraz bağlayıcıyla konjugatlar oluşturulmuş ve karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. İkinci 1,5 yıllık bir sürede hazırlanan bu kompleks ve konjugatlar Balb/c farelere enjekte edilerek ELİSA metoduyla antikor seviyeleri saptanmıştır. Alınan en iyi antikor seviyesi oranındaki kompleks ve konjugatımızın aşı prototipi olarak tespiti yapılmıştır. En yüksek düzeyde antikor ürettiği tespit edilen Balb/c Hibridoma teknolojisi ile monoklonal antikor eldesi çalışmalarında kullanılmıştır. Coxiella burnetii ye karşı elde edilen bu monoklonal antikorla tanı kiti denemesi gerçekleştirilmiş ve hastanın serumundan hastalık başarılı bir şekilde tespit edilmiştir. Projemizden elde edilen çıktılar ile yeni tip aşı ve tanı kiti prototipleri üretilmiştir. Gelecekteki aşamada destek bulunarak patentlerinin alınmasıyla Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği tekniklerini kullanarak yapılan ilklerden olan aşı ve teşhis amaçlı bir kit olarak ticarileştirme çalışmalarının yapılması planlanmaktadır. Yapılan bu çalışmanın farklı hastalıklar için de üretilecek aşı ve tanı kitlerinin yapımına alt yapı, bilgi, birikim açısından büyük katkısı olacağını ve ülkemizin dışa bağımlılığını ortadan kaldırılacağını düşünmekteyiz.
Anahtar Kelimeler:	Q Humması, Lipopolisakkarit, Aşı, Tanı Kiti, ELİSA, Balb/c
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır

TÜBİTAK

Projeden Yapılan Yayınlar:	1- Q Humması Hastalığının Antijenik Peptidinin Sentezi ve Karakterizasyonu (Makale - Diğer Hakemli Makale), 2- Arayıcı P.P., Acar T., Karahan M.,Toman R., Mustafaeva A.Z., Q Humması Hastalığına Karşı LPS-Polioksidonyum Aşı Prototipinin Geliştirilmesi (Bildiri - Ulusal Bildiri - Poster Sunum), 3- Arayici, P. P., Karahan, M., Frimmelova M., Toman, R., Mustafaeva, Z. A. "Lipopolysaccharide-poly (N-vinyl-2-pyrrolidoneco- acrylic acid) complex synthesis for development of diagnostic kit for Q fever" (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum), 4- Arayıcı, P.P., Karahan, M., Acar, T., Mustafaeva, A. Z., Frimmelova M., Toman, R, ?Development of New Age Vaccine Models Against Q Fever? (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum), 5- Karahan, M.; Arayıcı, P. P.; Acar, T.; Mustafaeva, A. Z.; Frimmelova, M.; Toman, R. `Development Of Lipopolysaccharide-Polyoxidonium Complex As A Candidate Vaccine Against Q Fever. (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum), 6- A New Approach Based on Polymers for Developing Polymeric Vaccine Against Q fever (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Sözlü Sunum),

TÜBİTAK