



HEMOGLOBİN A1C'NİN TAYİNİ İÇİN YENİ BİR
İMMÜNOASSAY YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ

M. Özge Karaşallı

Yüksek Lisans Tezi

Biyokimya Anabilim Dalı

Temmuz-2017

HEMOGLOBİN A1C'NİN TAYİNİ İÇİN YENİ BİR İMMÜNOASSAY YÖNTEMİNİN
GELİŞTİRİLMESİ

M. Özge KARAŞALLI

Dumlupınar Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği Uyarınca
Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Derya KOYUNCU ZEYBEK

Temmuz-2017

KABUL VE ONAY SAYFASI

M. Özge KARAŞALLI'nın yüksek lisans tezi olarak hazırladığı “Hemogloblin A1c'nin tayini için yeni bir immünoassay yönteminin geliştirilmesi” başlıklı bu çalışma jürimizce Dumlupınar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim, Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir

27/07 /2017

Üye: Yrd. Doç. Dr. Derya KOYUNCU ZEYBEK (Danışman)

Üye: Yrd. Doç. Dr. Ferda ÖZMAL

Üye: Yrd. Doç. Dr. Hülya SİLAH

Fen Bilimleri Enstitüsünün Yönetim Kurulu'nun/...../2017 gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hasan GÖÇMEZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Bu tezin hazırlanmasında Akademik kurallara riayet ettiğimizi, özgün bir çalışma olduğunu ve yapılan tez çalışmasının bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olduğunu, çalışma kapsamında teze ait olmayan veriler için kaynak gösterildiğini ve kaynaklar dizininde belirtildiğini, Yüksek Öğretim Kurulu tarafından kullanılmak üzere önerilen ve Dumlupınar Üniversitesi tarafından kullanılan İntihal Programı ile tarandığını ve benzerlik oranının % 14 çıktığını beyan ederiz. Aykırı bir durum ortaya çıktığı takdirde tüm hukuki sonuçlara razı olduğumuzu taahhüt ederiz.

Yrd. Doç. Dr. Derya KOYUNCU ZEYBEK

İmzası

M. Özge KARAŞALLI

İmzası

HEMOGLOBİN A1C'NİN TAYİNİ İÇİN YENİ BİR İMMÜNOASSAY YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ

M. Özge KARAŞALLI

Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2017

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Derya KOYUNCU ZEYBEK

ÖZET

Bu tez kapsamında, diabetes mellitus'un (DM) tanısı ve tedavisinde altın parametre olarak nitelendirilen, hemoglobin A1c (HbA1c), için Zaman Gecikmeli Floroimmünoassay (TR-FIA) tekniğine dayanan yeni bir immünoassay yöntemi geliştirildi. Bu amaçla, ilk olarak 4,4''-Bis(4,4,5,5,6,6,6-heptafloro-1,3-dioksiheksil)-o-terpenil-4'-sülfonil klorür (BHHCT) ligandının Eu(III) kompleksi oluşturuldu ve bu kompleksin çalışmalarda etiket olarak kullanımı test edildi. Çalışmanın ikinci kısmında, antikor miktarları, antikor-antijen etkileşim süreleri, Eu(III) etiket seyreltme oranı gibi çalışma koşulları optimize edildi ve uygun immünoassay prosedürü oluşturuldu. Optimize edilen koşullarda hazırlanan immunoassay prosedürü ile HbA1c molekülü için çalışma aralıkları 0,05-9200 ng/mL ve % 0-25 olarak belirlendi. Bunun yanında yöntemin inter assay ve intra assay tekrarlanabilirliği çalışıldı ve yöntemin oldukça tekrarlanabilir olduğu sonucuna varıldı. Tezin son kısmında ise, hazırlanan immünoassay prosedürünün analitik uygulanabilirliği kan numunelerinde % HbA1c tayini yapılarak araştırıldı. Elde edilen sonuçlar referans bir yöntem olan ELISA ile elde edilenlerle karşılaştırıldı ve % BSS ve % geri kazanım değerleri hesaplandı.

Anahtar Kelimeler: Diabetes mellitus, Eu(III) etiket, Hemoglobin A1c, Zaman Gecikmeli Floroimmünoassay

DEVELOPMENT OF A NOVEL IMMUNOASSAY METHOD DETERMINATION OF HEMOGLOBIN A1C

M. Özge KARAŞALLI

Biochemistry Department, Master Thesis, 2017

Thesis Supervisor: Assist. Prof. Dr. Derya KOYUNCU ZEYBEK

SUMMARY

In this thesis, a new assay method based on Time Resolved Fluoroimmunoassay (TR-FIA) for hemoglobin A1c (HbA1c), known as a gold parameter in the diagnosis and treatment of diabetes mellitus (DM) was developed. For this purpose, firstly, the Eu (III) complex of 4,4'-Bis(4,4,5,5,6,6,6-heptafluoro-1,3-dioxyhexyl)-o-terphenyl-4'-sulfonyl chloride (BHHCT) ligand was formed and the complex was tested for use as a label in studies. In the second part of the study, working conditions such as antibody amounts, antibody-antigen interaction times, and dilution ratio of Eu (III) label were optimized and appropriate immunoassay procedure was established. The linear range was from 0.05 to 9200 ng/mL and 0 to 25% for the HbA1c via the immunoassay procedure prepared in the optimized conditions. In addition, inter assay and intra assay reproducibility were studied and the method was highly reproducible. At the end of the study, the analytical application of the prepared immunoassay procedure was investigated by performing % HbA1c assay on blood samples. The obtained results were compared with those obtained by ELISA, a reference method, and the % RSD and % recovery values were calculated.

Key Words: Diabetes mellitus, Eu(III) label, Hemoglobin A1c, Time Resolved Fluoroimmunoassay

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca sahip olduğu bilgi ve deneyimle bana yol gösteren, sabırla tüm bilgilerini sunan, örnek aldığım, çok değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Derya KOYUNCU ZEYBEK'e sonsuz teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

Bütün süreç boyunca bilgilerini esirgemeyen, tez çalışmamın gerçekleşmesinde büyük katkıları olan Doç. Dr. Bülent ZEYBEK'e teşekkürlerimi sunarım.

Gerek eğitim sürecim gerekse hayatım boyunca beni destekleyen aileme ve çalışmalarında beni yalnız bırakmayan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tez dönemim boyunca Z214093 numaralı 1001 kodlu Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı Yüksek Lisans Burs kapsamında beni maddi olarak destekleyen TÜBİTAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
SUMMARY	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. İmmünite	3
2.1.1. Antijen (Ag)	3
2.1.2. Antikorlar (Ab)	6
2.2. İmmünoassay	10
2.2.1. İmmünoassay yöntemlerinin sınıflandırılması	12
2.2.2. İmmünoassayde kullanılan etiket tipleri	14
2.3. Lantanit Lüminesans	15
2.4. Zaman Gecikmeli Floresans İmmünoassay (TR-FIA) Tekniği	16
2.5. Diabetes Mellitus	19
2.5.1. Tip 1 diyabet	20
2.5.2. Tip 2 diyabet	20
2.6.1 Glikozillenmiş hemoglobin (HbA1c)	22
2.7. 3,4bis[4-(4,4,5,5,6,6,6-heptafloro-1,3dioksoheksil)fenil]benzensülfonilklorür	24
2.8. Kaynak Araştırması	26
2.8.1. TR-FIA ile yapılan çalışmalar	26
2.8.2. BHHCT ve diğer β -diketonat esaslı ligantlar ile yapılan çalışmalar	27
2.8.3. HbA1c için yapılan çalışmalar	29
3. MATERYAL VE YÖNTEM	31
3.1. İmmünoassay Sistemi ve Yöntemler	31
3.2. Mikroplateler	31
3.3. Kullanılan Diğer Cihazlar	31
3.4. Kullanılan Kimyasallar	32

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.5. Kullanılan Çözeltiler	33
3.5.1 Kaplama tamponu	33
3.5.2. Yıkama tamponu	33
3.5.3. Bloke edici tampon.....	34
3.5.4. Diyaliz tamponu	34
3.5.5. Etiket tamponları.....	34
3.5.6. Sonlandırma çözeltisi	35
3.5.7. Kan numuneleri.....	35
3.6. Eu (III) Kompleksi İle Etiketlenmiş SA(BSA)-BHHCT Konjugatının Hazırlanması	35
3.7. Eu (III) Kompleksi İle Etiketlenmiş SA-BSA Konjugatının Karakterizasyonu	36
3.8. İmmünoassay Formatının Hazırlanışı	36
3.9. SA(BSA)-BHHCT-Eu(III) Etiket Çözeltisinin Seyreltme Oranının Optimizasyonu	37
3.10.Mikrotiter Platelere İlgili Antikorların Bağlanması Ve HbA1c-Ab1 (Ab1) Ve B- HbA1c-Ab2 (Ab2) Derişimlerinin Optimizasyonu	38
3.11. HbA1c-Ab1 ile HbA1c Antijeninin Etkileşim Süresinin Optimizasyonu	39
3.12. B-HbA1c-Ab2 İle HbA1c Antijeninin Etkileşim Süresinin Optimizasyonu	39
3.13.TR-FIA Yöntemi ile HbA1c (ng/mL) Tayini için Doğrusal Çalışma Aralığının Belirlenmesi .40	
3.14. TR-FIA Yöntemi ile %HbA1c Tayini İçin Doğrusal Çalışma Aralığının Belirlenmesi.....41	
3.15. %HbA1c Tayini için Tekrarlanabilirlik Çalışması	41
3.16. ELISA Yöntemi ile % HbA1c Tayini İçin Doğrusal Çalışma Aralığının Belirlenmesi	41
3.17. Kan Numunelerinde %HbA1c Tayininin Yapılması	43
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	45
4.1.Hazırlanan SA(BSA)-BHHCT Konjugatının UV-Vis Spektrofotometre ile Karakterizasyonu..45	
4.2. Optimizasyon Çalışmaları	46
4.2.1. SA(BSA)-BHHCT-Eu(III) etiket çözeltisinin seyreltme oranının optimizasyonu.....46	
4.2.2. HbA1c-Ab1 (Ab1) ve B- HbA1c-Ab2 (Ab2) derişimlerinin optimizasyonu	48
4.2.3. HbA1c-Ab1 ile HbA1c antijeninin etkileşim süresinin optimizasyonu	50
4.2.4. B-HbA1c-Ab2 İle HbA1c antijeninin etkileşim süresinin optimizasyonu	51
4.3. TR-FIA Yöntemi ile HbA1c (ng/mL) Tayini İçin Doğrusal Çalışma Aralığının Belirlenmesi...52	
4.4. TR-FIA Yöntemi ile %HbA1c Tayini İçin Doğrusal Çalışma Aralığının Belirlenmesi	54
4.5 %HbA1c Tayini için Tekrarlanabilirlik Çalışması.....57	
4.6 ELISA Yöntemi ile % HbA1c Tayini İçin Doğrusal Çalışma Aralığının Belirlenmesi	57

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.7. Kan Numunelerinde % HbA1c Tayininin Yapılması	59
5. SONUÇLAR.....	61
KAYNAKLAR DİZİNİ	62
ÖZGEÇMİŞ	



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Antikoru yapıları.....	7
2.2. İmmünoassay yönteminin genel gösterimi.	10
2.3. Aşamalı olarak immünoassay basamakları.....	12
2.4. İmmünoassay tipleri (a: Homojen yarışmalı b: Homojen yarışmasız c: Heterojen yarışmalı d: Heterojen yarışmasız).....	14
2.5. DELFIA (Dissociation Enhanced Lanthanide Fluoroimmunoassay) tekniği ile biyomolekül ölçümü.	18
2.6. DLCLLA (Direct Lanthanide Chelate Label-Based Luminescence Assay) tekniği ile biyomolekül ölçümü.	18
2.7. 4,7-Bis-(klorosülfenil)-1,10-fenantroline-2,9-dikarboksilik (BCPDA) asit.	19
2.8. Sağlıklı bireylerdeki mevcut hemoglobin türleri ve yaklaşık olarak bulunma miktarları.	22
2.9. Hemoglobin ve glukoz arasındaki kimyasal reaksiyonlar.	23
2.10. BHHCT'nin kimyasal yapısı.	25
3.1. FLUOstar Omega immünoassay cihazı ve 96 kuyucuklu polistiren opak plate.	31
3.2. SA(BSA)-BHHCT-Eu ³⁺ etiketinin hazırlanma prosedürü.	36
3.3. TR-FIA yöntemi ile oluşturulan immünoassay formatı.	36
3.4. ELISA yöntemi ile oluşturulan immunoassay formatı.	42
4.1. (a) SA-BSA konjugatı, (b) Saf BHHCT, (c) SA(BSA)-BHHCT'nin absorpsiyon spektrumları.	45
4.2. SA(BSA)-BHHCT-Eu(III) etiket çözeltisinin seyreltme oranı (1:5, 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 ve 1:500) optimizasyonu (Hata çubukları 3 ölçüm sonrası elde edilmiştir).	47
4.3. (A) HbA1c'nin derişiminin optimizasyonu. (B) B-HbA1c-Ab2'nin derişiminin optimizasyonu (Hata çubukları 3 ölçüm sonrası elde edilmiştir).	49
4.4. Farklı inkübasyon süreleri altında Anti-HbA1c & Ag etkileşimine bağımlı floresans yoğunlukları (Hata çubukları 3 ölçüm sonrası elde edilmiştir).	51
4.5. Farklı inkübasyon süreleri altında Anti-HbA1c & Ag etkileşimine bağımlı floresans yoğunlukları (Hata çubukları 3 ölçüm sonrası elde edilmiştir).	52
4.6. HbA1c biyomolekülü için kalibrasyon grafiği (Hata çubukları 5 ölçüm sonrası elde edilmiştir).	53
4.7. HbA1c biyomolekülü için 4-parameter fit kalibrasyon grafiği.	54
4.8. HbA1c biyomolekülü için TR-FIA yöntemi ile % kalibrasyon grafiği (Hata çubukları 4 ölçüm sonrası elde edilmiştir).	55
4.9. (A) HbA1c biyomolekülü için ELISA yöntemi ile % kalibrasyon grafiği (Hata çubukları 4 ölçüm sonrası elde edilmiştir). (B) HbA1c biyomolekülü için ELISA yöntemi ile 4-PL kalibrasyon grafiği.	58

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Çalışmada kullanılan kimyasalların isimleri ve temin edildikleri firmalar.	32
4.1. Elde edilen sonucun diğer çalışmalar ile karşılaştırılması.....	56
4.2. Tekrarlanabilirlik çalışmaları.....	57
4.3 Kan numunelerinde standart bir yöntem ile karşılaştırmalı % HbA1c analizi.....	60



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	Yüzde
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
ng	Nanogram
L	Litre
M	Molar
mL	Mililitre
nm	Nanometre
°C	Santigrat derece
t	Zaman

Kısaltmalar

Açıklama

HbA1c-Ab1	Anti-HbA1c, birincil antikor
HbA1c	Hemoglobin A1c
Hb-Ab1	Anti-Hb, birincil antikor
B- HbA1c -Ab2 (B-Ab2)	Biyotinlenmiş ikincil antikor
HbA1c -Ag (Ag)	Antijen
BSA	Sığır serum albümin
SA	Streptavidin
BHHCT	4,4''-Bis(4,4,5,5,6,6,6-heptafloro-1,3-dioksiheksil)-o-terpenil-4'-sülfonil klorür
GA	Glutaraldehit
TR-FIA	Zaman gecikmeli floroimmünoassay
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
Hb	Hemoglobin
HbA1c	Hemoglobin A1c
DM	Diabetes mellitus
ADA	Amerikan Diyabet Derneği
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
DCCT	Diyabet kontrol ve komplikasyonları
% BSS	Bağıl standart sapma

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Şeker hastalığı olarak bilinen Diabetes mellitus (DM), günden güne artan evrensel bir sağlık problemidir. Bununla birlikte, DM, insülin hormonunun kısmen veya tamamen eksik olmasına bağlı olarak gelişen, kan glukozunun yüksekliği (hiperglisemi) ile karakterize edilen kronik sendromlar grubudur. İnsülin eksikliğinin yanı sıra, insüline karşı gelişen direnç, DM gelişiminde rol oynamakta ve karbohidrat, lipid ve protein metabolizmasını da etkilemektedir. DM vakalarının çoğu 2 gruba ayrılabilir;

-Tip 1 (insüline bağımlı DM)

-Tip 2 (insüline bağımlı olmayan DM) (Harvey ve Ferrier, 2007).

Toplumun %5-10'unda görülen ve hastaların %80'inden fazlasının 40 yaşı üstü olduğu tip 2 DM'de, insülin salgısı normal veya normalden fazla olduğu halde, glukozun organizmaya alınması sonucu artan plazma glukoz düzeylerine insülin cevabında azalma olmaktadır. Kontrol altına alınmamış ve yüksek seyreden kan şekeri uzun vadede çeşitli komplikasyonların ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Tip 2 diyabet ile birlikte obezite, kalp-damar hastalıkları, böbrek yetmezliği ile sonuçlanan nefropati, sinir sistemi hastalığı nöropati, körlüğe kadar götüren retinopati ve ayak ülserleri gibi uzun vade komplikasyonları sonucu felç, gangren veya koroner hastalıkların meydana gelmesi riskini artırmaktadır (Halifeoğlu vd., 2005).

Ağır sonuçlar doğurabilecek bu hastalığın takibinin yapılması gerekmektedir. Günümüzde DM takibinde, rutin olarak, açlık kan şekeri ve 2. saat sonundaki kan şekeri seviyeleri izlenir. Ancak bu yaklaşımda belirlenen kan glukoz seviyeleri, günlük dalgalanmalardan, diyetten ve stres gibi koşullardan etkilenebilen bir glukoz seviyesini yansıtır. Bunun için günlük dalgalanmalardan etkilenecek bir başka parametreye ihtiyaç duyulmuş ve Amerikan Diyabet Derneği (ADA) önerisiyle, DM tanısı için bir glikozillenmiş hemoglobin türevi olan hemoglobin A1c (HbA1c) laboratuvar testlerine eklenmiştir (Fernandeza vd., 2015).

DM tanı ve izlenmesinde altın standart olarak tanımlanan hemoglobin A1c (HbA1c) molekülü, kanda oksijeni taşımakla görevli olan hemoglobin molekülünün bir türevidir ve hemoglobin molekülüne glukozun bağlanmasıyla oluşmaktadır. HbA1c seviyesinin belirlenmesi, 8-12 haftalık süre içindeki glisemik indeksi yansıtır ve günlük dalgalanmalardan etkilenebilir. Bu yüzden DM teşhisinde, izlenmesinde ve tedavi sürecinde kullanılabilir. HbA1c molekülünün tayini için elektroforez, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi, iyon değişimli kromatografi, boronat afinite kromatografisi, sıvı kromatografisi-kütle spektroskopisi (LC-

MSMS), florimetri, kalorimetri ve *immünoassay* gibi bir dizi yöntem mevcuttur (Westra vd., 2013, Pundir ve Chawla, 2014).

Antikor-antijen molekülleri arasındaki spesifik etkileşimler üzerine temellenen immunoassay (immünoölçüm) yöntemi, antijen moleküllerinin güvenilir ve hızlı bir şekilde ölçülmesini sağlayan analitik bir yöntemdir. Yöntemde kullanılan antikor ve antijen molekülleri kendi başına tayin edilebilir olmadıklarından, ölçümde bazı etiketlerin kullanılması gerekir. Bu etiketler arasında radyoizotoplar, enzimler ve floresans özellik gösteren etiketler sıklıkla kullanılanlardır (Yakovleva ve Emneus 2008).

İmmünoassay yöntemlerinde geleneksel olarak kullanılan floresans etiketlerle karşılaşılan en önemli problem zemin girişim etkisidir. Bunun önlemenin bir yolu, zaman gecikmeli floresans mantığını kullanarak floresans etiketin uyarım ve emisyon dalga boyları arasında bir boşluk oluşturmaktır. Bu yaklaşım, lantatit komplekslerinin özellikle de Eu(III) komplekslerinin etiket olarak kullanıldığı Zaman Gecikmeli Floroimmünoassay (TR-FIA) tekniğinin temelini oluşturur. Eu(III) komplekslerinin en önemli avantajları, uzun Stokes kayması, uzun floresans ömrü, dar ve keskin bir emisyon bantı göstermeleri olarak sayılabilir (Yan vd., 2005; Darwish vd., 2006; Jiang vd., 2010).

Bu tez çalışmasında, dünya çapında bir sağlık problemi olan DM hastalığının tanısında kullanılan bir parametre olan HbA1c tayini için TR-FIA tekniğine dayanan yeni bir immünoassay yöntemi geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Bunun için ilk olarak ticari olarak temin edilen 4,4''-Bis(4,4,5,5,6,6,6-heptafloro-1,3-dioksiheksil)-o-terpenil-4'-sülfoniklorür (BHHCT) ligandının Eu(III) kompleksi oluşturuldu ve etiket olarak kullanıldı. Yapılan literatür araştırmaları ışığında, HbA1c biyomolekülünü ölçmede, bu tez çalışmasında hazırlanan Eu(III) kompleksinin etiket olarak kullanıldığı çalışmalara rastlanılmamıştır. Bu bağlamda yapılan çalışma tamamen orijinal bir çalışmadır. Hazırlanan immunoassay prosedürü optimize edildikten sonra HbA1c için çalışma aralığı belirlendi. Çalışmanın son kısmında ise yöntemin gerçek numunelerde HbA1c'nin tayini için kullanılabilirliği test edildi ve sonuçlar ELISA yöntemi ile elde edilenlerle karşılaştırıldı.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. İmmünite

Canlıların yabancı olan maddelere (antijenlere) karşı gösterdiği reaksiyonlara immün cevap adı verilir. Yani immünite, mikroorganizmalardan ve zararlı kimyasallardan korunabilmek için var olan mevcut immün sistem kapasitesidir. Başlıca görevleri aşağıda sıralanmıştır (Abbas ve Lichtman, 2003);

- Virüsler ve bakterilere karşı vücudu savunur,
- Yıpranmış hücreleri ya da hastalık sonucu oluşmuş doku artıklarını ortadan kaldırır,
- Anormal veya mutant hücreleri tanıyıp imha etmesiyle kansere karşı birincil savunma mekanizması geliştirir,
- Yabancı hücreleri reddetmesi sebebiyle organ nakline izin vermeyebilir,
- Normalde zararsız olan maddelere tepki verebilir, alerjiler en belirgin örneğidir.

İmmünite, spesifik (kazanılmış) ve spesifik olmayan (doğal) immünite olarak ikiye ayrılmaktadır. Spesifik olmayan immünite, herhangi bir özel tanıma mekanizması olmaksızın bütün zararlılara karşı savunma oluşturmaktadır ve bu olay yabancı maddeler vücuda girmeden önce başlatılır. Ayrıca bu mekanizma, zarar görmüş dokuları, yaraları ve yara sonrası oluşan artıkları temizler. Spesifik immün cevap ise diğerinin aksine lenfositler aracılığı sebebiyle yüksek oranda seçicidir. Bu hücreler, vücuda giren yabancı antigenleri tanımak için dizayn edilmiş yapılardır (Wang ve Zhang, 2017). Spesifik immünite bir antigenik unsur, doğal bağışıklıktan kaçtığında ve organizma buna karşı antikor üretmeye başladığında tetiklenir. Spesifik antigenik unsurları ya da bu unsurlarla enfekte olmuş hücreleri hatırlaması gibi görevleri mevcuttur. Spesifik immünite; seçicilik, çeşitlilik, hafıza ve kendine tolerans gibi özelliklere sahiptir (Kılıçturgay, 1994; Hughes, 1976).

2.1.1. Antijen (Ag)

Organizmaya girdiğinde kendisine karşı bir bağışık yanıt oluşmasına yol açan ve aldığı cevap sonucunda oluşan ürün ile spesifik olarak birleşebilen maddelere antijen denir. ‘Ag’ şeklinde gösterilirler ve immünojen olarak da adlandırılırlar. Bir maddenin antigenik özellik gösterebilmesi için bazı niteliklere sahip olması gerekir (Guyton ve Hall, 2006):

- i. *Yabancılık* Bir madde, girdiği organizmanın yapısına yabancı ise antigenik özellik gösterebilir. Kimyasal bir bileşiğin yabancılığından söz edilirken, molekülün üç boyutlu yapısı

kastedilmektedir. Çünkü her canlı yaşamını ve neslini sürdürebilmek için kendi vücut maddelerini sentezler ve bu maddeler hemen her canlıda protein, yağ, karbonhidrat, nükleik asit denilen aynı temel maddelerden oluşmuştur. Bu temel maddelerin ince yapısı ise her canlıda aynıdır. Örneğin protein her canlıda amino asit dizilerinden oluşur, lipitler yağ asitleri zincirlerinden oluşur. Ancak bu temel maddelerin üç boyutlu molekül yapıları canlı türleri arasında önemli farklılıklar gösterir. Bunu bir örnekle açıklayacak olursak; kobay ve tavşanda çeşitli proteinler sentezlenir. Her ikisi de protein olmasına rağmen, kobay proteini tavşan için yabancı bir maddedir ve tavşana verilecek olursa, kobay proteinine karşı özgül bir bağışık yanıt meydana gelir. Burada iki türe ait proteinler arasındaki fark, proteinleri oluşturan amino asitlerin dizilişleri, üç boyutlu olarak duruşları ve elektron yükleri bakımından gösterdikleri farklılıktan ileri gelmektedir. Farklılıkların temeli canlıların ayrı genetik yapılarda olmasına dayanmaktadır. İki canlı evrimsel akrabalık yönünden birbirinden ne kadar uzaksa o kadar iyi antijenik özellik gösterirler. Akrabalık ne kadar yakınsa antijen özelliği zayıflar. Ancak bağışıklık mekanizması bozulursa, canlı içinde kendine karşı da bağışık yanıt oluşur ve bu durum hastalıkla sonuçlanır (otoimmün hastalıklar).

- ii. *Molekül büyüklüğü* Bir maddenin iyi bir antijen olabilmesi için molekül ağırlığının büyük olması gerekir. Genellikle molekül ağırlığı 10 kDa'dan daha büyük olan maddeler iyi antijenlerdir. En kuvvetli antijenlik gösterenler ise molekül ağırlığı 100 kDa'dan fazla olan protein molekülleridir. Ancak bu kurala uymayan maddeler de vardır. Glukagon, 3,6 kDa molekül ağırlığında olmasına rağmen oldukça iyi antijenite gösterir. Diğer yandan molekül ağırlığı 51 kDa olan dektron iyi antijen özelliği göstermez.
- iii. *Kompleks kimyasal yapı* Bir molekül ne kadar karışık yapı gösterirse antijenitesi o kadar artar. Örneğin tek bir çeşit amino asitten sentezlenen sentetik polipeptid zincirleri, molekül ağırlıkları büyük de olsa iyi antijenik özellik göstermezler. Eğer iki veya üç çeşit amino asitten oluşturulmuşsa, biraz daha aktif olabilirler.
- iv. *Molekülün yapısal sertliği* Bir maddenin lenfositler tarafından antijen olarak tanınabilmesi için değişmez bir yapı göstermesi gerekir. Lipid ve jelatin gibi belirli bir sertliği olmayan moleküller bu nedenle iyi antijenite gösteremezler.
- v. *Çözünürlük ve metabolize edilebilme* Antijenik maddenin, girdiği organizmada çözünmesi ve metabolize edilebilmesi gücünü etkiler. Örneğin, keratin gibi hidrolitik

enzimlere dayanıklı olup metabolize edilemeyen, parçalanamayan maddeler antijenik değildirler. Benzer şekilde naylon, teflon, polistiren ve poliakrilamid gibi maddeler makromolekül olmasına karşın metabolize edilemezler ve antijen özellik göstermezler. Bunlara karşı bağışık yanıt oluşmaz ve böylelikle doku içine yerleştirilen protezlerin çoğu bu maddeden yapılmıştır.

- vi. *Emilim ve atılım hızı* Antijenik maddenin immün sistemi uyarabilecek bir süre organizmada kalabilmesi antijenitesini etkiler. Genellikle yavaş emilen ve organizmadan yavaş atılan maddelerin immün sistemle etkileşimi daha iyi olduğundan antijeniteleri de daha güçlüdür. Emilim ve atılım hızı yüksek olan antijenler iyi antijenik özellik göstermemektedirler.
- vii. *Elektrik Yükü* İyi bir antijenik madde elektrik yükü taşımalıdır. Çünkü elektrik yüklü gruplar moleküle, sulu ortamda çözünabilirlik kazandırarak çevre ile daha iyi temas etmelerini dolayısıyla immün sistem hücrelerine daha kolay girmelerini sağlayan hidrofilik nitelik kazandırır.
- viii. *Diğer Özellikler* Genetik yapı, tür ve yaş gibi faktörler antijenin verildiği canlıya ait olan bu özellikler maddenin antijen özelliğini etkiler. Bir salgında kişilerin hastalığı hafif veya ağır geçirmeleri de bağışık yanıtın gücü ile yakından ilgilidir (Yeğen, 1990; Gülmezoğlu ve Ergüven, 1994; Guyton ve Hall, 2006).

Antijenlerin Yapıları

Antijen, girdiği organizmada immün yanıt oluşturup ilgili antikor ile spesifik olarak birleşir. Bu iki biyomolekülün birleşmesi kimyasal bir temele dayanır; ancak antijenlerin tamamı birleşmeye katılmaz. Antijenin yüzeyinde bulunan ve kendisi için spesifik olan antikorlarla birleşmenin sağlandığı kimyasal uçlar bulunur, bu gruplar determinant grup veya epitop olarak adlandırılır. Antijen yüzeyinde farklı kimyasal yapıda birçok epitop bulunabilir ve böylece tek bir antijen birden fazla antijen gibi davranabilir. Yani farklı yapıda olan herbir epitop kendine has antikorla birleşebilir. Türler arasındaki bu birleşme hali anahtar kilit uyumuna benzetilebilir. Uyum ne kadar fazlaysa bağların gücü de o ölçüde artacağından dolayı birleşme daha sağlam olacaktır. Ancak bunun düşük enerjili ve zayıf bağlardan oluşan birleşme olduğu unutulmamalıdır, bağlanma kimyasal olarak gerçekleşmemektedir (Guyton ve Hall, 2006; Benjamini vd., 1996).

Antijen Çeşitleri ve Hapten

Kimyasal bileşiklerden proteinler en iyi antijen özelliği gösteren kimyasal bileşiklerdir. Bunun yanında polisakkaritler gibi yüksek molekül ağırlığına sahip bazı karbonhidratlar antijenik özellik gösterirler ve saf polisakkarit antijenlere karşı IgM sınıfı antikorlar sentezlenir. Ancak mono ve disakkarit gibi küçük moleküller antijen özelliğinde değildir; bunlar haptent özelliği gösterirler. Lipitler tek başlarına antijen gibi davranmamalarına rağmen lipoprotein ve lipopolisakkarit formları antijen özellik gösterir. Nükleik asitlerin sadece nükleoprotein formları antijen özelliği gösterir. Küçük molekül ağırlıklı ve basit kimyasal formda olmalarına rağmen pek çok ilaç ve kimyasal maddeye karşı immün yanıt oluşmaktadır. Bu olay canlı vücudunda proteinlerin yahut bazı kan hücrelerinin yüzeyine yapışmaları ile gerçekleşir.

Düşük molekül ağırlıklı ve basit kimyasal yapıda bazı maddeler gerçekte antijen olmamalarına rağmen taşıyıcı bir proteine bağlandıklarında antijen niteliği kazanırlar ve kendileri için sentezlenen antikor ile birleşebilirler. Bu maddelere haptent denir ve antijendeki epitoplara gibi davranırlar. Gerçekleşen bağlanmada spesifik olan haptentdir ve antikorlar taşıyıcı protein yerine haptent için oluşurlar. Bu antikorlar taşıyıcı molekül olmadığı zaman da sadece haptent ile birleşebilir. Ayrıca bazı ilaçlarda organizmaya girdiklerinde, haptent gibi davranarak taşıyıcı bir moleküle tutunup antijenik uyarıma neden olabilirler (Guyton ve Hall, 2006; Benjamini vd., 1996; Kılıçturgay, 1994).

2.1.2. Antikorlar (Ab)

Antikorlar ya da diğer bir deyişle immünoglobülinler (Ig), plazma hücre lenfositleri tarafından yabancı bir maddeye (antijen) tepki olarak üretilirler ve immün sistem tarafından yabancı moleküllerin tanınmasında ve parçalanmasında kullanılırlar. İmmünoglobülinler serum proteinlerinin elektroforezlenmesi sonucunda, genellikle gamma globülin kısmında yer almalarına rağmen beta globülin ve alfa globülin kısımlarında da bulunurlar. İmmünolojik etkinlikleri sebebiyle Dünya Sağlık Örgütü'nün de kabulüyle immünoglobülinler olarak bilinmektedir. Genellikle Y şekilli glikoprotein yapısında olan moleküllerdir. Total plazmanın % 20'sini oluşturmakla birlikte, kanda vücut sıvılarında, insanda ve diğer omurgalılarda bulunurlar. Plazmada yahut kanda pıhtılaşma olursa serumda yer alırlar. Belirli bir antijene karşı antikor bulunan serum, antiserum olarak adlandırılır. Monoklonal ve poliklonal olarak ayrılırlar. Monoklonal antikorlar sadece bir epitopa karşı reaksiyon gösterirken, poliklonal antikorlar her bir epitop çeşidi için farklı reaksiyon gösterir (Yakovleva ve Emneus 2008).

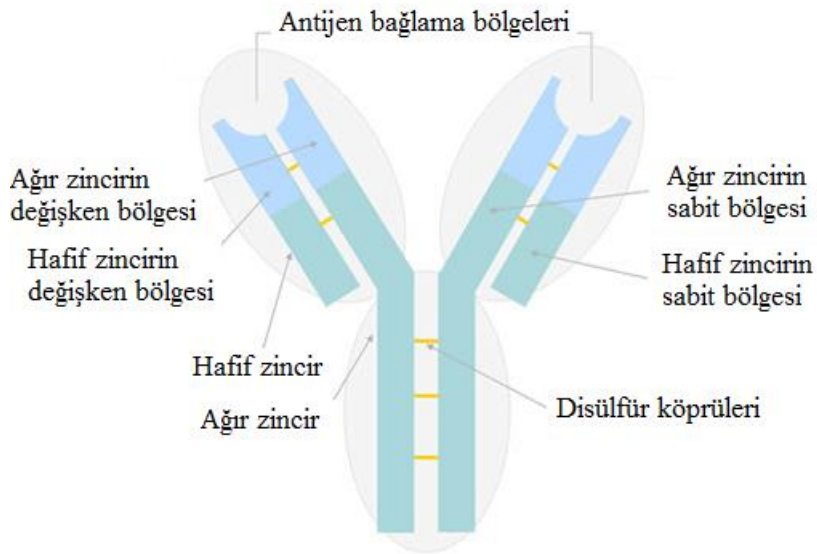
İmmünoglobülinler, fiziksel kimyasal ve immünolojik özelliklerine ve görevlerine göre farklı olmalarına rağmen, temelde aynıdırlar. Bahsedilen farklılıklar molekül ağırlığı, molekülün karbonhidrat miktarı, elektroforez hızları, aminoasit yapıları ve yapıda bulunan ağır

polipeptid zinciri gibi faktörlere dayanmaktadır. Bu sebeple birbirinden farklı beş immunoglobulin yapısından bahsedilmektedir:

- İmmünoglobülin G (Ig G)
- İmmünoglobülin A (Ig A)
- İmmünoglobülin M (Ig M)
- İmmünoglobülin D (Ig D)
- İmmünoglobülin E (Ig E) (Roit vd., 1998; Geisberger vd., 2006).

Antikorların Moleküler Yapıları

Bütün immünoglobülinler bir takım yapısal özelliklere sahiptir. Her biri yaklaşık 25 kDa molekül ağırlığında olan iki hafif polipeptit zinciri ve yine her biri 50 kDa olan iki ağır polipeptid zincirine sahiptirler. Dört polipeptid zinciri disülfür bağları ve kovalent olmayan etkileşimlerle bir arada tutulur. Ig molekülündeki hafif zincirler merkezi bir simetri eksenini olan Y harfi şeklindeki molekülün kol kısımlarında bulunurken ağır zincirler hem kol hem de gövde de bulunurlar. Hafif ve ağır zincirlerde her polipeptid zincirinde olduğu gibi NH_2 ile sonlanan amino terminal uç ve $-\text{COOH}$ ile sonlanan bir karboksi terminal uç bulunur. Antijenlerin bağlandığı kısım Y harfinin kollarının uçlarında bulunan amino terminal uçlardır. Bu zincirlerin amino terminal uca yakın olan kısımlarındaki amino asit dizilimi değişiklik gösterebildiği için bu bölgeler değişken bölge olarak adlandırılır. Bu kısım antijene uyumlu olacak nitelikte sentezlenir. Peptit zincirinin geri kalan kısmı amino asit diziliminde farklılıklar gözlenmediği için sabit bölge adı verilir (Şekil 2.1) (Benjamini vd., 1996).



Şekil 2.1. Antikoru yapı.

Ig molekülünü oluşturan polipeptid zincirlerinde, disülfür bağları ile tutulan kıvrım şeklindeki yapılara domen denir. Ig'lerin birçok fonksiyonu domenlerle ilişkilidir. Hem hafif hem de ağır zincirler amino asit sekansındaki değişikliğe bağlı olarak sabit (C) ve hareketli (V) domenler olarak ikiye ayrılırlar. Hafif zincirlerde tek bir sabit domen (C_L) ve tek bir değişken (V_L) domen bulunur. Ağır zincirlerde ise tek hareketli domen (V_H) bulunurken sabit domen sayısı (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}) üçtür. Değişken domenler her iki zincir tipi içinde antijen-antikor bağlanma etkileşimleri açısından en önemli bölgelerdir. Antikoru, antijenin bağlanacağı bölgeye olan özgüllüğü, amino asit dizisinin bir fonksiyonudur. V_L ve V_H domenlerinde hiperdeğişken olarak bilinen farklı alt bölgeler bulunmaktadır. Her bir hafif ve ağır zincirde üçer tane vardır, bunlar belirleyici bölgeler olarak bilinen altı hiperdeğişken döngüyle antijen bağlama bölgesini oluştururlar. Bu bölgedeki çeşitlilik, yüksek afiniteli antikorların hemen hemen her antijene karşı üretilmesine olanak tanır. Temel moleküler bir yapıdan 10^8 özgül antikor üretilebileceği tahmin edilmektedir, olası bir çapraz reaktivite olmasına rağmen, antikor yalnızca tek bir antijeni tanıyacaktır. Bir antikor (Ab) ile antijen (Ag) arasındaki bağlanma afinitesi genel olarak bir denge ifadesi ile tanımlanır:

$$Ab + Ag \rightleftharpoons Ab - Ag$$

$$K = \frac{[Ab-Ag]}{[Ab].[Ag]}$$

Eşitlikte verilen K değeri 10^6 ile 10^{12} L mol⁻¹ aralığındadır. Sadece yüksek bir K değeri ($>10^8$ L mol⁻¹) veren antikorlar düşük çapraz reaktivite sergileyecektir. Bu özelliklerin sayesinde, immünoassay dizaynında birçok antikor ideal biyolojik tanıma bileşeni haline gelir (Fowler vd., 2008).

Antikorların İzotipleri

- i. *İmmünoglobülin G (Ig G)* normal insan serumundaki immünoglobülinlerin büyük bir bölümünü oluşturur. Y harfi şeklinde 150 kDa ağırlığında monomer yapısındadır. En önemli özelliği plesenta yoluyla anneden fetüse geçebilen tek immünoglobülin olmasıdır ve bu sayede doğal pasif bağışıklık sağlanır (Kılıçturgay, 1994).
- ii. *İmmünoglobülin M (Ig M)* en büyük immünoglobülin olması sebebiyle makroglobulin olarak da bilinirler ama bu özelliği sebebiyle damardan geçemezler. Pentamer yapısında olup molekül ağırlığı 900 kDa olan 5 temel birimden oluşur. Plesentadan geçememelerine rağmen

doğumdan itibaren sentezlenmeye başlarlar. Diğer önemli bir özelliği ise her türlü antijenik uyarım için bağışıklık sisteminde daima ilk sentezlenen Ig olmasıdır (Geisberger vd., 2006).

- iii. *İmmünoglobülin A (Ig A)* genel yapısı itibarıyla Ig G ile benzerlik gösterse de yapısal olarak sadece monomer değil dimer formları da bulunmaktadır. En çok bulunan Ig olarak bilinmektedir. Solunum, sindirim, genital sistem salgıları ile tükürük, gözyaşı ve sütte bulunması sebebiyle çeşitli mikroorganizmalar tarafından oluşturulan enzimleri etkisiz hale getirmesi ve anne sütü aracılığı ile bebekte pasif bağışıklığı sağlaması başlıca görevlerindendir (Kılıçturgay, 1994).
- iv. *İmmünoglobülin E (Ig E)* kanda en düşük derişimde bulunan, molekül ağırlığı 190 kDa olan monomer yapılı bir immünoglobülinidir. Üretim ve salınımı, lenfoid dokulardaki plazma hücreleri tarafından gerçekleşir. Diğer Ig'ler ile karşılaştırıldığında ısıya hassasiyet gösterirler. En önemli özelliği özel reseptör bulunduran mast hücrelerine ve bazofillere bağlanabilmesi ile stoplazmalarındaki granülleri boşaltmalarıdır. Bu sayede açığa çıkan maddeler alerjik reaksiyonları ortaya çıkarır (Geisberger vd., 2006).
- v. *İmmünoglobülin D (Ig D)* B lenfositlerin üzerinde antijen olarak yerleşen, molekül ağırlığı 180 kDa olan monomer yapısındaki bir immünoglobülinidir. Isı ve enzimlere duyarlı olduğu için kolayca parçalanır ve serumda saptanamaz (Gülmezoğlu, 1994; Fowler vd., 2008).

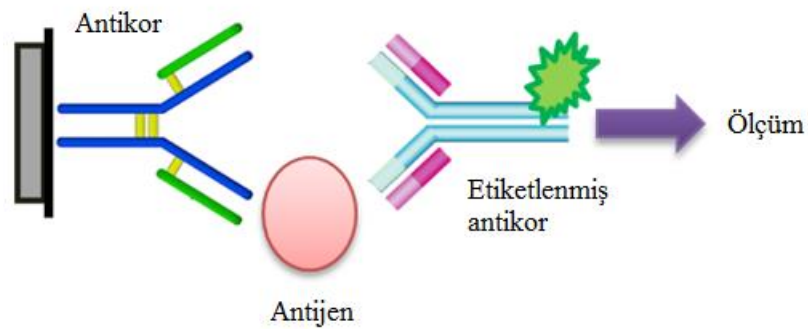
Antikorların Fonksiyonları

- i. *Antijene Bağlanma* Antikorların en temel görevi antijenlere bağlanmaktır, antikor izotiplerinin hepsinde (Ig G, Ig A, Ig D, Ig E, Ig M) bu kapasite mevcuttur. Bu sayede antijen-antikor immünokompleks oluşturarak fagositozla dolaşımdan kaldırılmalarını sağlarlar.
- ii. *Antikora bağlı hücre sitotoksitesi* Hücre öldürme kapasitesi olarak da bilinir. Ig izotiplerinden sadece Ig G'de bu özellik mevcuttur.
- iii. *Opsonizasyon* Vücuda giren yabancı maddelerin lezzetli hale getirilmesi olayıdır, amaç makrofajların fagositozunu kolaylaştırmaktır.
- iv. *Plasental Transport* Tek bir izotip (Ig G) plasentayı geçerek anneden bebeğe aktarılır, amaç maternal immüniteyi bebeğe aktarabilmektir.
- v. *Tamamlayıcı Yolak* Ig G ile Ig M, bir antijene bağlandığında pek çok kan proteinini içeren biyokimyasal bir kaskat başlatır. Bu olay patojenlerin öldürülmesini sağlar.
- vi. *Olgun B Hücre Reseptörleri* Ig D ve Ig M monomerlerinin olgun B hücre yüzeyindeki antijen reseptörleri gibi hizmet edebilmesidir.
- vii. *Hafıza B Hücre Reseptörleri* Ig G, Ig A, Ig E antikorları, bu reseptörler gibi davranabilirler.

- viii. *Mast Hücresinin Degranülasyonu* Bir alerjen iki ya da daha fazla Ig G antikorlarına bağlanırsa (mast hücre yüzeyine) degranilasyonu aktive eder, bu durumda granüller ve hormonal medyatörler salınmasıyla alerjik reaksiyon oluşturulur (Yakovleva ve Emneus, 2008; Fowler vd., 2008; Geisberger vd., 2006).

2.2. İmmünoassay

İmmünoassay, kanda yer alan protein veya özel bir kimyasal maddenin tayini için, antikorun özgüllüğünü kullanarak, yapılan ölçümlerin genel adıdır. İmmünoassay çalışmaları genellikle, klinik laboratuvarlar, araştırma laboratuvarları veya sanayi laboratuvarlarında tayini istenilen türün ölçümünde kullanılırlar. Yapılması istenilen ölçüm, katı bir fazın (kuyucuk, manyetik partikül, boncuk vb.) üzerine antikor kaplanmasıyla gerçekleşir. Kaplamada kullanılacak antikor, bağlanmanın gerçekleşebilmesi için tayin edilmek istenilen türe özgü olmak zorundadır. İmmünoassay yönteminin amacı çoğunlukla antikor ile antijen arasındaki bağlanmanın ve bağlanmış yahut bağlanmamış antijen arasındaki farklılığın araştırılmasıdır. Bütün immünoassaylerin en belirgin özelliği, ilgili antijen ile kompleks oluşturma yeteneğine sahip spesifik antikorların kullanılmasıdır. Antikorlar, memelilerde antijen olarak adlandırılan yabancı maddelerin varlığına karşı cevap olarak sentezlenirler. Antikor, spesifik antijenine $10^8 - 10^{10} \text{ L M}^{-1}$ olan ortalama afinite sabiti (antikor-antijen bağlanması ve ayrılması için hız sabitleri arasındaki oran) ile karakterize edilen yüksek bir ilgiyle bağlanma yeteneği gösterir (Dickson vd., 1995; Gerald vd., 2004; Yakovleva ve Emneus 2008) (Şekil 2.2).

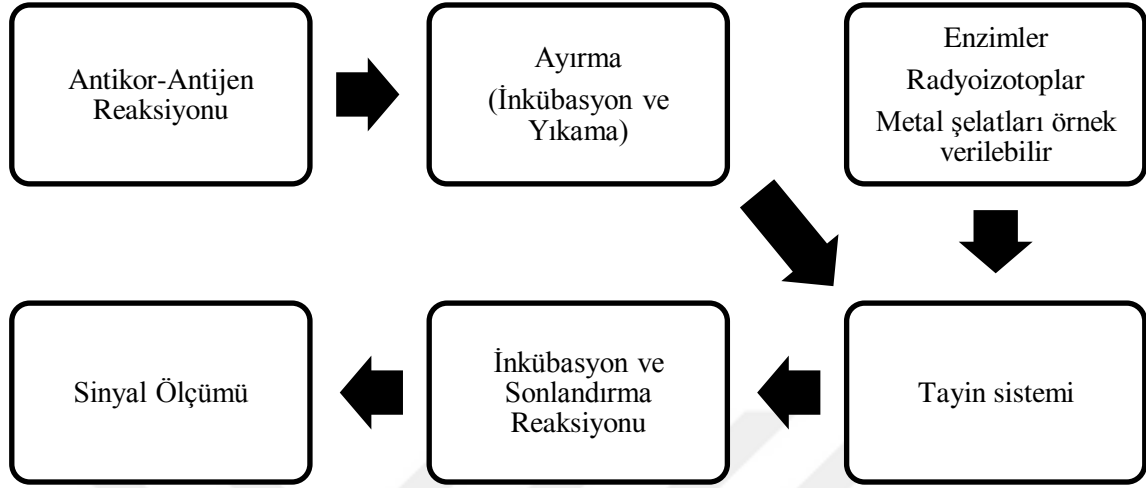


Şekil 2.2. İmmünoassay yönteminin genel gösterimi.

Antikor-antijen etkileşiminin kullanılması ilk kez 1959 yılında R. S. Yalow ve S.A. Berson tarafından, insülin hormonunun radyoimmünoassay (RIA) yöntemi ile tayin edilmesiyle gösterilmiştir. Daha sonra R.P. Ekins tiroksin için benzer bir RIA yöntemi önermiş ve bu iki

katkı yeni bir analitik yöntem olan immunoassay yönteminin önünü açmıştır. İmmünoassay yöntemleri, hastalıkların tanısı, terapotik ilaç analizleri, ilaç tasarımı ve ilaç endüstrisindeki farmokinetik ve biyoeşdeğerlik çalışmaları ve çevre analizleri gibi alanlarda geniş oranda kullanılmaya başlanmıştır. Bu alanlardaki analizler genellikle düşük molekül ağırlıklı ilaçların, farmasötik önemi olan biyomoleküllerin, hormonların, toksinlerin, enfeksiyon ajanlarının, tümör işaretleyicilerin, diğer bazı proteinlerinin ve metabolitlerin serumdan ve diğer biyolojik sıvılardan çok düşük derişimli nicel tayini için kullanılabildiği gibi nitel ve yarı nicel tayini için de kullanılabilir (Yakovleva ve Emneus 2008).

Antikor ve antijen arasındaki spesifik etkileşim üzerine temellenen immunoassay yönteminde, bu moleküller kendi başına tayin edilebilir olmadıklarından dolayı etiket adı verilen yapıların kullanımı gerekir. İmmünoassay yönteminde herhangi bir immünoanalitik reaktife (analit ya da antikor) bağlanabilen ve hızlı bir şekilde tayin edilebilir etiketler (örneğin radyoizotoplar, enzimler ve Eu(III) kompleksleri gibi lantanit şelatlar) kullanılır. İmmünoassaylerde bu gibi etiketlerin kullanılması yüksek duyarlılık ve düşük tayin sınırı ile sonuçlanır. İmmünoassay yöntemi için gerekli reaktifler antikorlar, sinyal oluşturan etiketler ve ayırma matriksleridir. Antikorlar poliklonal ya da monoklonal olabilirler. Bazı alanlarda, analite karşı daha yüksek afinite ve özgüllük gösterdiği için monoklonal antikorlar tercih edilmektedir. İmmünoassayde sinyal oluşturan etiketler radyoaktif atomları (^{125}I , ^3H ve ^{14}C) içerebildikleri gibi pek çok avantajından dolayı enzimler, floresan proplar, kemilüminesans bileşikler, metaller ve metal şelatları ve lipozomlar gibi alternatif radyoaktif olmayan etiketler de kullanılmaktadır. Kömür, polietilen glikol, ikinci bir antikor, mikrobuncuklar ya da her bir kuyucuğu ayrı bir tüp olarak fonksiyon gösteren 96-kuyucuklu mikroplateleri içeren matriksler immünoanalitik reaksiyonların bir sonucu olarak oluşan immün komplekslerinin ayrılması için kullanılır. Antijen ya da antikor bu plate kuyucuğuna kaplanır ve kuyucuk yüzeyinde immün kompleks meydana gelir, Şekil 2. 3'de immünoassay basamakları gösterilmiştir (Darwish vd., 2006).



Şekil 2.3. Aşamalı olarak immünoassay basamakları.

2.2.1. İmmünoassay yöntemlerinin sınıflandırılması

İmmünoassay yöntemleri, ayırma basamakları gerektirmeyen (homojen) ve gerektiren (heterojen) assayler olarak sınıflandırılabilirler.

Homojen Assay Prosedür olarak kullanılan en basit assay formatıdır. Tayin reaktifleri hacmi bilinen örnek çözeltisine eklenir ve analit derişimiyle ilişkili bir sinyal oluşur. Bu assayde bağlanma reaksiyonu etiketin özelliklerini değiştirir ve tayin sistemi genellikle 10^{-9} mol L⁻¹ seviyesinin altındaki değerlerde çalışmaya izin vermez. Ayrıca, antikörlerin spesifik bağlanma reaksiyonları ayırma basamakları olmaksızın bağlı ve bağlı olmayan tayin reaktifleri arasında ayırma izin vermeyeceği gibi biyolojik örneklerde bulunabilecek muhtemel girişimlerin de assay formatını etkileyeceğinin düşünülmesi homojen formatın kullanımını sınırlar (Wang vd., 2001).

Heterojen Assay En çok kullanılan assay yöntemidir. Ayırma basamakları içermesi sebebiyle daha güvenilir sonuçlar verir. Antikörün katı bir faza spesifik bağlanma prosesiyle ya da adsorpsiyon/kimyasal reaksiyonla immobilize edildiği bir yöntemdir. Spesifik olarak antijene bağlanan etiketlenmiş tayin reaktifleri ilave edildikten sonra bağlanmamış fazla tayin reaktifleri yıkama ile uzaklaştırılır. Homojen assay yöntemi ile karşılaştırıldığında, olası girişimlerin

uzaklaştırılmasına bağlı olarak genellikle daha güvenilir ve daha duyarlı bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır (Dickson vd., 1995).

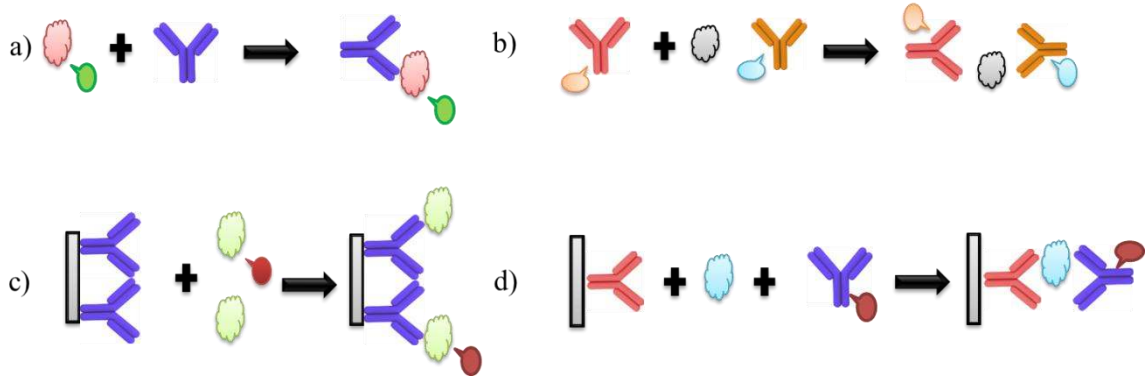
Yukarıda anlatılan her iki format, yarışmalı ve yarışmasız immünoassay sistemleri olarak da karşımıza çıkabilir:

Yarışmasız format (non kompetitif) Sandviç assay olarak da adlandırılan bu yöntem, molekül üzerinde birden fazla tanıma epitopu bulunan büyük antijenlerin tayininde kullanılır. Analit molekülü üzerinde birbiri ile örtüşmeyen epitoplara bağlanan iki antikor gereklidir. Antikorlardan biri katı faza bağlanırken, diğer antikor etiketlenir ve tayin için kullanılır. Örnek antijenin, immobilize edilmiş antikora bağlanmasına izin verilir. Yıkama sonunda, antijen-antikor kompleksini içeren katı destek, antijen molekülünün geri kalan epitoplarına bağlanacak olan etiketli ikincil antikorun fazla miktarı ile inkübe edilir. Yıkama işlemi tekrarlanır ve katı desteğe bağlı etiketin aktivitesi ölçülür. Oluşan sinyal analit derişimi ile doğru orantılı olacaktır.

Heterojen non kompetitif formatta yukarıda anlatıldığı üzere katı yüzey üzerine bir bağlanma olayı mevcut olup sonrasında ise oluşan sinyal analit derişimi ile doğru orantılı olacaktır.

Homojen non kompetitif formatta ise destek materyali olmadan gerçekleşen bir bağlanma söz konusudur ve oluşan sinyal analit derişimi ile ters orantılıdır.

Yarışmalı Format (kompetitif); Küçük moleküller için homojen ya da heterojen formatta olabileceği gibi antijen yakalayan ya da antikor yakalayan tipleri de mevcuttur. Bu formatta, örnekteki antijen ve etiketlenmiş antijen arasında katı destek üzerine kaplanmış anti-antijen antikorunun sınırlı miktarına bağlanmak için bir yarışma vardır. Ayırma basamağı sonrasında, katı faz üzerindeki etiket aktivitesi ölçülür (Dickson vd., 1995). Heterojen formatın kullanıldığı deneylerde ölçüm sonucu elde edilen sinyal antijenin derişimiyle ters orantılı olur. Yukarıda anlatılan immunoassay tipleri Şekil 2.4’de özetlenmektedir.



Şekil 2.4. İmmünoassay tipleri (a: Homojen yarışmalı b: Homojen yarışmasız c: Heterojen yarışmalı d: Heterojen yarışmasız).

2.2.2. İmmünoassayde kullanılan etiket tipleri

i. *Radyoizotop Etiketler* β ve γ partiküllerini emit eden ^{125}I , ^{32}P , ^3H gibi radyoaktif izotoplardır. Spesifik olarak bağlanma reaktiflerindeki radyoaktif olmayan atomlar yerine kullanılabilirler. Bu durum bağlanma afinitelerinde herhangi bir kayıp oluşturmaz. Radyoizotop etiketler genellikle ultrahassas biyoassaylerde kullanılır. Etiketinin etkinliği, düşük zemin sinyali ve spesifik bağlanma reaktifinin duyarlılığı analitin tayin sınırını ($\sim 10^{-18}$ mol/L) düşürür. Bununla beraber izotopik yöntemlerin tercih edilmemesinde pek çok sebep vardır;

- Çevre dostu değildirler,
- Kullanılması zor ve potansiyel tehlike kaynağıdır,
- Sönmeye bağlı olarak etiketlenmiş reaktiflerin ömrü kısa olabilir,
- Yöntem en yüksek duyarlılığı desteklemez (izotopik etiketler ömrü boyunca sadece bir tane tayin edilebilir sinyal oluşturur) (Mikkelsen ve Corton, 1960).

ii. *Kemilüminesans Etiketler* Bir kimyasal reaksiyon ile tetiklendiği zaman uyarılmış floresan bir moleküle dönüşen organik moleküller içerirler. Depolama kararlılığı olan ve düşük zemin sinyalleri elde edilen etiketlerdir ve her bir etiket için tek bir tayin yapılabilir (Mikkelsen ve Corton, 1960; Hawcroft vd., 1984).

iii. *Enzim Etiketler* Enzimler (Alkalen fosfataz-ALP, Horseradish peroksidaz-HRP ve β -galaktosidaz) geniş oranda etiket olarak kullanılırlar. Bir enzim molekülü substratıyla çok kısa bir zaman içerisinde ürün oluşturmak için reaksiyona girer. Oluşan ürünler karakteristik floresans, kemilüminesans ya da ışık absorpsiyon özelliklerine bağlı olarak tayin edilebilir. Her bir enzim etiketi birden fazla tayin edilebilir olay oluşturma özelliği gösterebilir. Bu özellik

sinyal amplifikasyonu gelişmiş bir tayin sınırı ile sonuçlanır. Arkaplan sinyalleri genellikle sinyal tayin metoduyla ve spesifik bağlanma reaktiflerinin spesifik olmayan bağlanmalarıyla ilişkilidir. Kararlılık konusunda ise enzimler farklılık gösterebilir (Mikkelsen ve Corton, 1960; Price ve Newman, D., 1991).

iv. Floresans Etiketler Floresansta molekül tarafından ışığın tek bir fotonu absorbe edilir (ekstinksiyon) ve tekrar daha düşük enerjili, daha uzun dalgalı olarak yayılır. Teorik olarak, absorpsiyon kemilüminesans ya da radyoizotopik sönüm ile karşılaştırıldığında en hassas tayin yöntemi olmalıdır. Tek bir etiket kısa bir ölçüm aralığı boyunca birden fazla ölçüme olanak verir, böylelikle tayin edilebilirlik artar. Floresans emisyonun yeterli hassasiyeti sayesinde tek bir molekülün tayini de söz konusudur. Bunlara ek olarak, floresans olarak etiketlenmiş reaktifler oldukça kararlıdır ve etikete ilave olarak örnekteki bazı türlerde floresans emisyonu oluşturabilir, böylelikle bazı durumlarda spesifik olmayan zemin akımları spesifik sinyalleri alt edebilir. Floresans etiketlere, metal iyonuna bağlı organik moleküller olan metal şelatları (lantanit şelatlar) örnek verilebilir. Bunlar, organik etiketlere göre avantajlara sahiptir. Farklı emisyon özellikleri sayesinde seçici tayin mümkün kılınır ve zemin sinyali engellenir. (Mikkelsen ve Corton, 1960; Price ve Newman, D., 1991; Dandliker vd., 1973).

2.3. Lantanit Lüminesans

Lüminesans, genel olarak herhangi bir cismin dış bir kaynaktan enerji absorplayarak elektronik olarak uyarılmış bir molekülün fazla enerjisinden kurtulurken bu enerjinin bir kısmını daha uzun dalga boylarında elektromanyetik ışıyım olarak salması olayıdır. Lüminesans, uyarılma sırasında kullanılan enerjinin kaynağına göre sınıflandırılır.

Uyarılmış singlet bir sistemden temel haldeki singlete geçiş sırasında yayılan ışığa floresans denir. Uyarılmış singlet halden uyarılmış triplet hale geçebilme sistemler arası geçiş olarak adlandırılırken, uyarılmış triplet halden temel singlet hale geçilmesiyle yayılan ışığa fosforesans denir. Uyarılma (eksitasyon) ortadan kalkınca floresans olayı 10^{-10} - 10^{-6} ; fosforesans ise 10^{-6} - 10^2 saniye sürer.

Floresans ve fosforesans uyarılmanın fotonların absorpsiyonu ile olması bakımından benzerlik gösterebilir de, floresanstan sorumlu elektronik enerji aktarımının elektronun spininde bir değişiklik oluşturmaması sebebiyle floresans, fosforesanstan ayrılır. Bunun bir sonucu olarak, floresans hemen yok olan ($< 10^{-5}$ s) bir lüminesans olup kısa ömürlüdür. Buna karşılık fosforesans emisyonları ile ilişkili elektron spinindeki bir değişme, ışınlamanın bitmesinden

sonra kolayca tespit edilebilir bir süre kadar, genellikle birkaç saniye veya daha uzun, ışımanın sürmesine sebep olur. Lüminesans yöntemlerin en cezbedici özelliklerinden birisi, absorpsiyon spektroskopide karşılaşılan bir ila üç ondalık mertebesinde daha küçük gözlenebilme sınırları sağlayan kendine özgü duyarlılıklarıdır (Skoog vd., 1998; Hagan ve Zuchner, 2011).

Günümüzde lantanitlerin fosforesans özellikleri sayesinde kullanımları oldukça yaygındır. Lantanitler, geçiş metallerinin bir alt serisini oluştururlar, 51 ile 71 atom numaraları arasındaki elementler bu seriye dahildir. La'dan Lu'a kadar uyarılmış elektronik konfigürasyonları $[Xe]4f^05d^16s^2$ ile başlayıp $[Xe]4f^{14}5d^16s^2$ ile biten 15 element vardır. 14 elektron f orbitallerine çeşitli düzensizliklerle girerken Ln^{+3} iyonlarında $4f^1$ 'den $4f^{14}$ 'e kadar mükemmel düzenlilikte orbitale dolarlar. Lantanit iyonlarındaki bu özel elektronik konfigürasyon, lantanitlerin iyonik çap, redoks potansiyelleri, oksidasyon basamakları gibi fiziksel ve kimyasal özelliklerin kararlılığından sorumludur. Bu elementlerdeki 4f elektronları $5s^2$ ve $5p^6$ elektronlarınca perdelenir ve böylelikle komplekslerde 4f elektronları nadiren ligantlar ile kovalent etkileşime girer. Bir $Ln(III)$ -ligant bağının kovalent karakteri %5-7 arasındadır. Bu perdeleme neticesinde f-f geçişlerinin dipol güçleri çok küçüktür zaten bu geçişler aynı zamanda Laporte yasaklıdır. Bu yüzden bahsedilen geçişler hem absorpsiyon hem de emisyon bakımından zayıftırlar. Yüksek lüminesans malzemelerde bile lazerle uyarmadıkça $4f$ 'leri doğrudan uyarmak son derece güçtür. Yani $Ln(III)$ iyonları UV ışığı absorplayarak floresans yapamazlar (Hemilia ve Laitala, 2005). Bu yüzden anten vazifesi görecektir ve ışığı toplayarak uygun bir mekanizma ile lantanit iyonunun 5D_3 enerji seviyesine aktaracak floresans ligantlara diğer bir deyişle duyarlaştıracılara ihtiyaç vardır.

Ln^{+3} iyonları kompleksleştirildiğinde lantanit iyonlarının uyarılmış hallerinin uzun ömürlü olması (0,2-1,5 ms), büyük Stokes kaymalarına sahip olması (200 nm'den fazla), görünür bölgede emisyon yapması, emisyon bantlarının dar ve keskin olması sebebiyle geniş bir uygulama alanına sahiptirler. Biyomedikal sensör, diagnostik, ilaç keşifleri ve optik görüntüleme yoğun lüminesans uygulamaları örnek olarak verilebilir. Genellikle çalışılan iyonlar $Eu(III)$ ve $Tb(III)$ 'dir (Richardson, 1982; Hemilia, 1985; Dickson vd., 1995a, 1995b; Handl ve Gillies, 2005; Hemilia ve Laitala 2005; Armaleo vd., 2010).

2.4. Zaman Gecikmeli Floresans İmmünoassay (TR-FIA) Tekniği

Zaman Gecikmeli Floresans İmmünoassay (TR-FIA) tekniği, floroimmünoassay'ın ayrı bir grubudur. TR-FIA'da lantanit iyonları özellikle de Europiyum, $Eu(III)$; Terbiyum, $Tb(III)$; Samaryum, $Sm(III)$ ve Disprozyum, $Dy(III)$ iyonları etiket olarak kullanılmaktadırlar (Ankelo vd., 2003).

Bu yöntemin ilk uygulamaları 1983 yılında rapor edilmiş ve daha sonra DELFIA sistemi, FIAgen sistemi ve Trace sistemi gibi ticari uygulamalarda özellikle klinik ve biyoteknoloji alanlarında kullanım alanı bulmuştur (Yan vd., 2005; Jiang vd., 2010). Bu komplekslerin kullanılmasının temel sebeplerinden biri lantanitlerin uyarılmış ömürlerinin uzun olmasıdır ve bu durum lantanitten gelen sinyal ile lantanit kaynaklı olmayan sinyallerin zamansal olarak ayrılmasına izin verir. Ölçüm sırasında plateden, ortamdaki hücre ve reaktiflerinden gelen zemin floresans için tipik ömür pikosaniyeden mikrosaniyeye kadardır. Oysa lantanitlerin uyarılmış hallerinde ömürleri 0,2-1,5 milisaniyedir. Bu uyarılmış etiket olan lantanit için bir avantajdır çünkü ölçümün gecikmesi ile zemin floresans sinyalleri tamamen söner ve sonra lantanitten gelen emisyon sinyalleri toplanır. Bu gecikme periyodu hiper duyarlı ve özel sinyali zaman avantajlı olarak kaydetmeye izin verir. Ultraviyole ışığı ile lantanitlerin (Eu ve Sm için 340; Tb ve Dy için 320 nm) uyarılması ile görünür bölgede Eu ve Sm için kırmızı 615 ve 642 nm, Dy için sarı 572 nm ve Tb için yeşil 545 nm emisyonları elde edilir. Yayılan ışığın dalga boyu absorbe edilen ışığın dalga boyundan daha büyüktür bu da daha düşük enerjili olması anlamına gelir. Çünkü enerjinin bir kısmı titreşimler sebebi ile kaybolmaktadır. Dalga boyundaki bu kayma Stokes kayması olarak adlandırılır. Lantanit iyonları için bu stokes kayması 200 nm'den daha büyük olabilir ve bu kaymaya zemin floresansın katkısı çok küçük olduğundan uyarma ve emisyon sinyalleri arasındaki karışma minimum olur. Ek olarak emisyon pikleri de 4f orbitallerinin ligantla etkileşmesi çok keskindir (Dickson vd., 1995). Bu komplekslerden Eu (III) kompleksleri daha çok tercih edilmektedir sebebi ise daha yüksek duyarlılık sağlamasıdır (Wu vd., 2002; Yakovleva ve Emneus 2008).

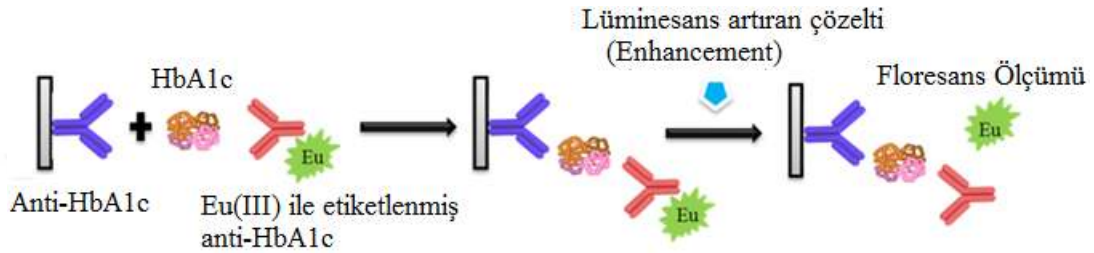
Eu (III) kompleksleri bazı ayırt edici özellikler gösterirler;

- i. Eu (III) kompleksleri UV bölgesinde (yaklaşık 330 nm) absorpsiyon maksimumu göstermesi, yaklaşık 615 civarında ise güçlü bir floresans yayması,
- ii. Emisyon bantının çok dar olması,
- iii. Bu komplekslerin uyarılmış triplet hallerinin çok uzun ömre sahip olması ($> 100 \mu s$),
- iv. Düşük zemin sinyali göstermeleri,
- v. Keskin emisyon piklerine sahip olmaları,
- vi. Radyoizotop kirliliklerinin olmamasıdır (Yuan vd., 1998).

Biyotiket özelliği gösteren bu moleküller mevcut durumda biyomolekülleri TR-FIA tekniği ile iki farklı şekilde ölçmektedir.

Dolaylı Yöntem

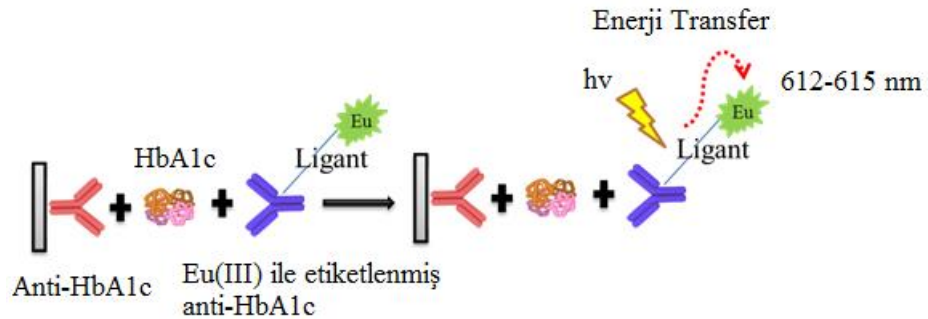
Perkin-Elmer firması tarafından geliştirilen DELFIA sistemidir. Eu(III) ile birleştiğinde floresans olmayan ancak anten vazifesini gören ligantlarla çalışır. Liganttan Eu(III)'e enerji aktarımı gerçekleştikten sonra kompleks parçalanır ve Eu(III)'ün floresansı bir lüminesans artırıcı çözelti ile birlikte okunur. Bu sebeple dolaylı bir yöntem olarak bilinir (Şekil 2.5) (Hemilia vd., 1985).



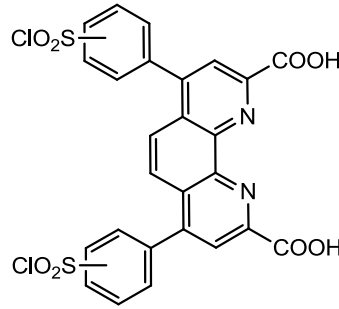
Şekil 2.5. DELFIA (Dissociation Enhanced Lanthanide Fluoroimmunoassay) tekniği ile biyomolekül ölçümü.

Direkt Yöntem

Tez kapsamında çalışılan yöntem DLCLLA (Direct Lanthanide Chelate Label-Based Luminescence Assay) yöntemidir. Burada ligant anten görevi görür ve yüksek floresans özellik gösterir, bu sebeple floresans artırıcı bir çözeltiye ihtiyaç duyulmadan doğrudan okuma yapılabilir. Sistemin çalışma prensibi Şekil 2.6'te şematize edilmiştir. Bu sistemde sentezlenen ilk ticari ligant 4,7-Bis-(klorosülfenil)-1,10-fenantroline-2,9-dikarboksilik (BCPDA) asit olup yapısı Şekil 2.7'de verilmiştir (Lin, 2004).



Şekil 2.6. DLCLLA (Direct Lanthanide Chelate Label-Based Luminescence Assay) tekniği ile biyomolekül ölçümü.



Şekil 2.7. 4,7-Bis-(klorosülfenil)-1,10-fenantroline-2,9-dikarboksilik (BCPDA) asit.

Ayrıca tez kapsamında, sinyal amplifikasyonunun sağlanması amacıyla **biyotin-streptavidin** bağlanma ilişkisi kullanılmıştır. Biotin-streptavidin kompleksi bilinen en büyük bağlanma sabitine (10^{15}) sahiptir. Ayrıca bu kompleks organik çözücülere, denatüre edici kimyasallara, deterjanlara, uç pH ve sıcaklık değerlerine dayanıklıdır. Tüm bu sebeplerden dolayı biyotin-streptavidin konjugatı immunoassay prosedürlerinde sıklıkla kullanılmaktadır (Gonzalez, vd., 1997).

2.5. Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus (DM), şeker hastalığı olarak bilinen, genellikle kalıtsal ve çevresel sebeplerin etkisi sonucu oluşan, kan glukoz seviyesinin yükselmesi (hiperglisemi) ile karakterize olan metabolik bir bozukluktur (Tierney vd., 2002). DM pankreasın yeterli insülin hormonu üretememesi veya vücudun ürettiği insülini etkili bir şekilde kullanamaması durumlarında yaşam süreci boyunca devam eden kronik bir hastalıktır. DM sonucu yetişkinlerde gözlenen körlük ve amputasyonların en sık karşılaşılan nedeni ve böbrek yetmezliği, kalp krizi ve felcin başlıca sebebidir (Rother, 2007).

DM, iki gruba ayrılabilir; tip 1 (insüline bağımlı DM) ve tip 2 (insüline bağımlı olmayan DM). 1921 yılından itibaren insülin kullanımı ile diyabet tedavisi başlamıştır. İnsülin çeşitli yöntemler ile vücuda enjekte edilir ve Tip 1 diyabet için en temel tedavi yöntemidir. Tip 2 diyabetin tedavisi ise diyet, şeker düşürücü ilaçlar, insülin takviyesi ya da bunların bir arada kullanılması ile mümkündür. Dünyada diyabetik nüfus sürekli artmakta ve bu sayı 2012 yılında 371 milyon civarındayken, 2030 yılında 552 milyona ulaşması beklenmektedir (Chen vd., 2011). Ayrıca, dünyadaki tüm ölümlerin % 5'ine diyabetin neden olduğu ve bu sayının hızla artmakta olduğu bilinmektedir. Mevcut tedavi yöntemlerinin varlığından söz edilse de bu yöntemler pek çok komplikasyonlara yol açabilir. İnsülin yetersizliği ve hipergliseminin sonucu olarak, diyabetli hastalarda, ölçülen kan glukoz seviyesi 80–120 mg/dL olan normal değerlerden daha yüksek olur ve bu hastalar koroner kalp hastalıkları, kalp yetmezliği, böbrek bozuklukları

ve körlük gibi ciddi komplikasyon riskleri de taşırlar. Kan glukoz seviyelerinin izlenmesi yoluyla, Diabetes Mellitus etkili bir şekilde yönetilebilir ve kontrol edilebilir. Bunun yanında hastalar, olası tedavi yöntemlerin yanında kendi yaşam standartları iyileştirerek (sigarayı bırakma, spor ve diyet gibi) olası komplikasyonların oluşturduğu riskleri azaltabilirler (Ayodele vd., 2004; Park, 2012).

2.5.1. Tip 1 diyabet

Tip 1 vakası, pankreasın β hücrelerinin ağır bir otoimmün atak nedeniyle hasarlanması ve insülinin tamamen eksikliği ile karakterizedir. Tip 1 diyabet pankreasta bulunan ve insülin üreten beta hücrelerinin otoimmün bir süreç sonunda zedelenmesi ile oluşur. Hastalar ömür boyu dışarıdan (enjeksiyon yoluyla) vücutlarına insülin almak zorundadırlar. Bu nedenle diyabetin bu formu, *insüline bağımlı diyabet* (Insulin Dependent Diabetes; IDDM) olarak da isimlendirilir. Genel olarak toplumdaki diyabet vakalarının %10'u bu formda olup, kuzey ülkelerinde daha sık görülmektedir (Raile vd., 2007).

Tip 1 diyabetin ortaya çıkışı tipik olarak çocuklukta olur ve semptomlar hızlı gelişir. Bu hastalar genellikle aniden ortaya çıkan poliüri (sık idrara çıkma), polidipsi (aşırı susama) ve polifaji (aşırı iştah) ile tanınır, sıklıkla başka bir hastalık ve ya stres ile tetiklenir. Semptomlar genellikle halsizlik, kilo kaybı ve güçsüzlükle birliktedir.

Tanı açlık kan glukozunun 126 mg dL^{-1} 'den yüksek olması ile kesinleşir. Tip 1 diyabet hastalarında β hücre fonksiyonu yoktur ve bu nedenle dolaşımdaki yakıt değişikliklerine yanıt veremez ve bazal insülin reaksiyonunu sürdüremezler. Bu formda hiperglisemi ve ketoasidozun kontrolü için ciltaltı eksojen insülin enjeksiyonu uygulanmalıdır (Harvey ve Ferrier, 2007).

2.5.2. Tip 2 diyabet

Tip 2 Diabetes Mellitus (Tip 2 DM), Türkiye'de ve dünyada, hasta sayısının öngörülenden daha hızlı artması nedeniyle son yıllarda en çok tartışılan ve çözüm üretilmeye çalışılan kronik ve yaygın metabolizma hastalığıdır. Hastalığın bu kadar hızlı artmasında popülasyon ve kentleşme artışı, yaşlanma, obezite ve fiziksel inaktivite prevalansındaki artış önemli faktörlerdir (Uysal ve Akpınar, 2013).

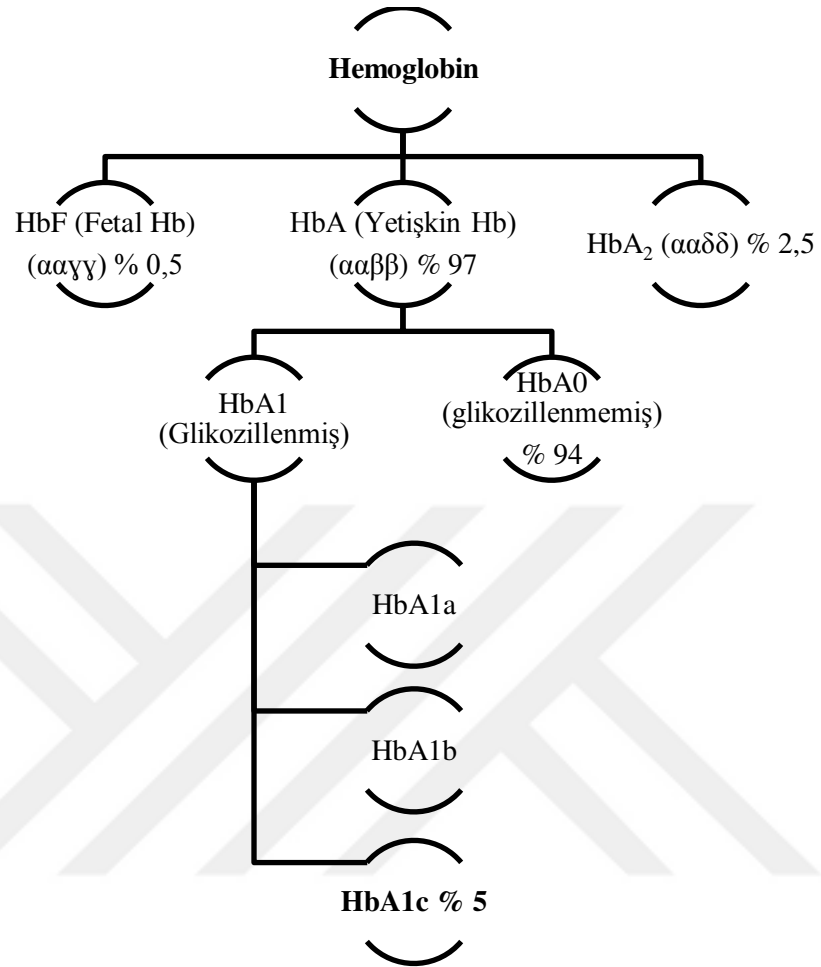
Tip 2 diyabet, tip 1 diyabetin gösterdiği semptomlardan bazılarını göstermektedir; ancak bu hastalık yıllar içinde yavaş gelişme göstereceğinden dolayı hastalık rutin tarama testleri sırasında saptanır. Tip 2 diyabetli hastalarda insülin direnci ve β -hücre difonksiyonu birarada bulunur. Bazı hastalarda hipergliseminin kontrolünde insülin gerekse de, yaşamın devamı için insüline gerek yoktur. Bu formda gözlenen metabolik değişiklikler hastalığın insüline bağımlı

formuna göre daha ılımlıdır. Hastalık neredeyse tamamen genetik faktörler tarafından belirlenir ve tanı en sık olarak kan glukoz derişiminin 126 mg dL^{-1} 'nin üzerinde olan hipergliseminin varlığıyla konur.

Tip 2 diyabet tedavisindeki hedef, kan glukoz derişimlerini normal sınırlar içerisinde tutmak ve hastalığın uzun vadede komplikasyon geliştirmesini önlemektir (Harvey ve Ferrier, 2007).

2.6. Hemoglobin (Hb)

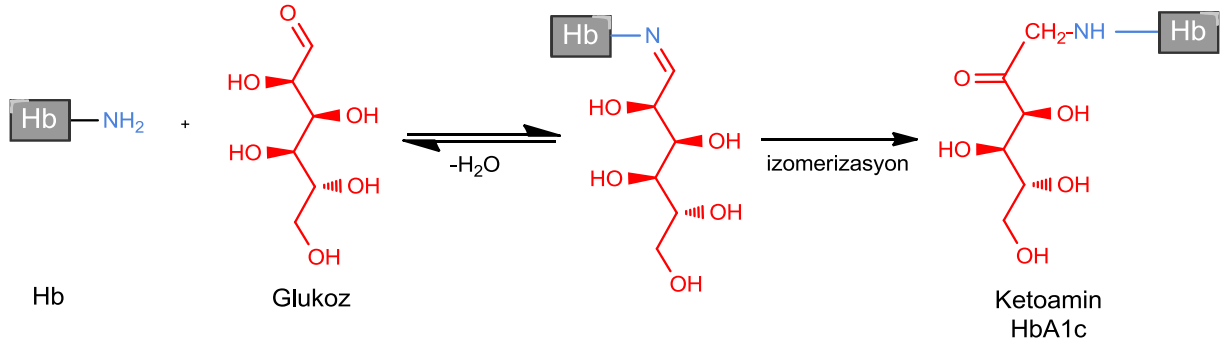
Hemoglobin (Hb), insanda en çok bulunan iki hemproteinden birisidir ve geri dönüşümlü olarak oksijen bağlamadan sorumludur. 67 kDa molekül ağırlığında olup yapısında demir içermektedir. Yetişkin bir insan eritrositinde yaklaşık $7,5 \times 10^{21}$ tane Hb molekülünün varlığı bilinmektedir (Hu ve Rusling, 1997). Hemoglobin, dört globin zincirinden oluşur. Yetişkin hemoglobini olarak bilinen HbA en çok bulunan form olup, iki α ve iki β zincirlerinden oluşur. Doğumda mevcut baskın tür olan fetal hemoglobin de (HbF) iki α ve iki β zincirlerinden oluşur ve normal yetişkinlerde minör form olarak bulunur. HbA₂, doğumdan sonra minör Hb olup, iki α ve iki δ zincirlerinden oluşur. Dünyada en çok bulunan hemoglobin varyantları yaygınlık sırasına göre HbS, HbE, HbC, HbD'dir. Bu hemoglobinlerin tümü, β zincirinde tekli amino asit süstitüentlerine sahiptir. Amerika Birleşik Devletleri'nde HbC ikinci en yaygın varyanttır ve onu üçüncü olarak HbE takip eder (Weykamp vd., 1993; Mongia vd., 2008; Randie ve William 2009; Lenters-Westra vd., 2013). Sağlıklı bireylerdeki mevcut hemoglobin türleri ve yaklaşık olarak bulunma miktarları Şekil 2.8'de verilmektedir.



Şekil 2.8. Sağlıklı bireylerdeki mevcut hemoglobin türleri ve yaklaşık olarak bulunma miktarları.

2.6.1 Glikozillenmiş hemoglobin (HbA1c)

Glikozillenmiş hemoglobin (HbA1c) hemoglobinin β zincirinin valin N-ucuna D-glukozun non-enzimatik bağlanmasıyla oluşan bir glikoproteindir. Birinci reaksiyon geri dönüşümlü olmasına rağmen, son üründe tersinmez ve kararlı bir ketoamin yapısı oluşur (Şekil 2.9) (Lenters-Westra vd., 2013; Pravatmuang vd., 2001; Keltanen vd., 2013).



Şekil 2.9. Hemoglobin ve glukoz arasındaki kimyasal reaksiyonlar.

HbA1c'nin oluşumu kan glukoz derişimi ve kırmızı kan hücrelerinin ömrüne bağlıdır. Bazı durumlarda değışmekle birlikte kırmızı kan hücrelerinin ömrü ortalama 100-120 gün kadardır. Bu sebepten HbA1c seviyesi yaklaşık 2-3 aylık dönem boyunca ortalama kan glukoz seviyesi hakkında bilgi verir (Chopra, vd., 2013). Kan glukoz seviyesinin yüksek olması (hiperglisemi) ile karakterize edilen diyabet, karbonhidrat, lipit ve protein metabolizmalarını da içine alan kronik bir hastalıktır. Bu hastalık uzun dönemlerde kalp hastalıkları, böbrek hastalıkları, nöropati, gangren, mide felci, körlük ve sinir hasarları gibi pek çok komplikasyonlara neden olmaktadır. Uluslararası Diyabet Federasyonunun 2012 verilerine göre 371 milyon diyabetli insan mevcutken bu sayının 2030 yılında 552 milyon olması beklenmektedir. Bu sebepten diyabet hastalığının tanısında ve önlenmesinde kan glukoz seviyelerinin belirlenmesi gerekmektedir.

Diyabet hastaları için, geleneksel olarak, açlık kan şekeri ve ikinci saat sonundaki kan şekeri değerlerinin ölçümü en çok kullanılan yöntemlerdir. Bununla beraber, bu yaklaşımda belirlenen kan glukoz değerleri, dalgalanabilen ve günlük diyetten etkilenebilen bir glukoz seviyesini yansıtır ve düzenli aralıklarla ölçümü yapılmalıdır (Pundir ve Chawla, 2014). HbA1c seviyesi, HbA1c derişimi ve toplam hemoglobin derişimi arasındaki oran, kan glukoz seviyesinin ölçümü yanında diyabet hastaları için faydalı bir tanı parametresidir ve kan glukoz seviyesi ile karşılaştırıldığında, HbA1c seviyesi diyabetin tanısı ve uzun dönemli kontrolü için daha kararlı ve doğru bir tanı sağlar. HbA1c seviyesi, 2-3 aylık dönem boyunca ortalama kan glukoz seviyesini yansıtır ve glukoz seviyesinin mevcut dalgalanmalarından etkilenmez. Sonuç olarak, HbA1c seviyesi sadece diyabetin tanısı için kullanılmayıp, glisemik kontrol, uygulanacak tedavinin yönü ve muhtemel komplikasyonların kestirilmesi gibi amaçlarla da kullanılan bir parametredir. HbA1c seviyesinin klinik olarak referans değerleri % 5-20 aralığında kabul edilmekte ve normal değerleri % 4-6 arasında değışmektedir (Pribly ve Skladal,

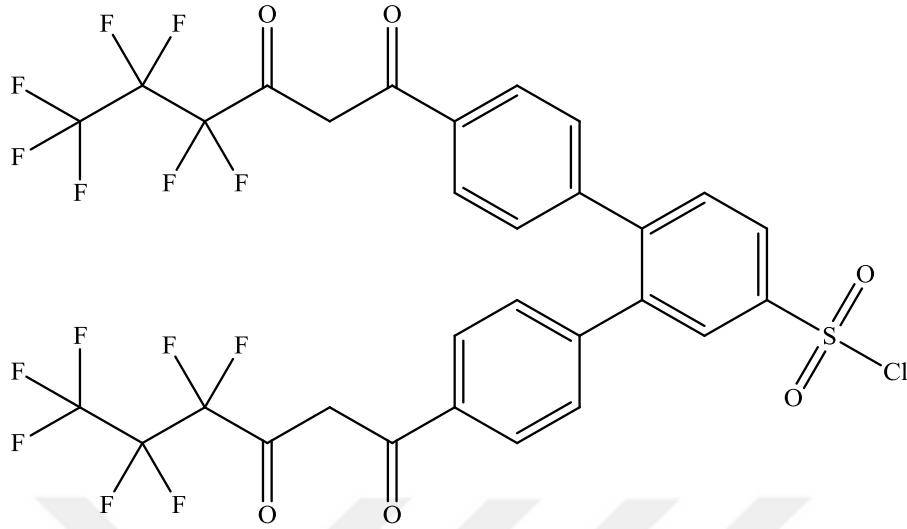
2006; Liu vd., 2008; Braga vd., 2011; Chawla ve Pundir, 2012; Lyons ve Basu, 2012; Pundir ve Chawla, 2014).

Diyabet tanısı için altın standart olarak kabul edilen HbA1c molekülünün tayini için iki farklı prensibe dayanan yöntemler geliştirilmiştir. Bunlardan yük farkına dayanan prensip, iyon değişim kromatografisi ve elektroforez gibi yöntemleri içerirken, ikinci prensip yapısal farklılığa dayanır ve boronat afinite kromatografisi ve immünoassay yöntemlerini içerir. Bunlar arasında immünoassay yöntemi antijen-antikor etkileşimine dayandığı için oldukça kesin ve güvenilir sonuçlar sunar. Bu yöntemin diğer bir avantajıda diğer hemoglobinin varyantlarının sonucunu interfere etmemesidir. Ayrıca immünoassay yöntemleri küçültülebilme, basitlik ve maliyetin düşük olmasına bağlı olarak, özellikle hasta başı cihazların geliştirilmesi için, daha uygun yöntemler olarak görülmektedir (John vd., 2007; Tanaka vd., 2009; Song ve Yoon, 2009).

HbA1c tayini için geliştirilen bazı immünoassay yöntemleri kaynak araştırması bölümünde verilmiştir. Bu çalışmalar genel olarak incelendiğinde, etiket olarak glukoz oksidaz, alkalin fosfat enzimleri ve CdTe kuantum dot yapıları kullanılmış ve genellikle elektrokimyasal ve florometrik analizler yapılmıştır. Yapılan literatür araştırmaları ışığında, lantanit komplekslerinin HbA1c molekülünü ölçmede tanı etiketi olarak kullanıldığı çalışmaların olmadığı görülmüştür. Diğer bazı türler için lantanit komplekslerinin özellikle de Eu(III) komplekslerinin etiket olarak kullanıldığı çalışmalar yapılmış ve bu yapıların etkinliği gösterilmiştir (Yuan ve Matsumoto, 1997; Wu ve Zhang, 2002; Harma vd., 2003; Jiang vd., 2010; Niu vd., 2011; Zong vd., 2012; Hou vd., 2012; Järvenpää vd., 2012).

2.7. 3,4bis[4-(4,4,5,5,6,6,6-heptafloro-1,3dioksoheksil)fenil]benzensülfonilklorür

Yuan ve Matsumoto tarafından sentezlenen, kimyasal adı 3,4-Bis[4-(4,4,5,5,6,6,6-heptafloro-1,3dioksoheksil)fenil]benzensülfonilklorür (BHHCT) olan ve günümüzde ticari olarak temini mümkün olan bir liganttir. Kimyasal yapısı şekil 2.10'de verilmiştir. BHHCT bir tetradentat β -diketonat şelatıdır ve trivalent katyonların uyarılması için mükemmel bir anten molekülüdür. Molekül, β -diketonat parçasının yanındaki iki elektron çeken heptafloro grubuna sahiptir ve lantanit iyonunu kuvvetlice bağlamak için enol oluşumunu desteklemeye yardımcı olurlar ayrıca bu gruplar florofore artmış hidrofobik karakter verirler (Yuan ve Matsumoto, 1998).



Şekil 2.10. BHHCT'nin kimyasal yapısı.

BHHCT'nin Eu(III) ile kararlı bir kompleksi oluşturması mümkündür. Bu kompleks yine heptafloro grubu sayesinde güçlü floresans ışıması yapabilecek ve proteinlere kovalent olarak bağlanabilecektir. Proteinlerle birleşmeyi sağlayan ise yapıdaki mevcut klorosülfonil gruplarıdır. Burada kovalent bağlar BHHCT'nin $-SO_2Cl$ grubu ile proteinlerin amino grupları arasında oluşur ve $-SO_2-NH$ bağları üretir. Sonuç olarak çözünür özellikteki Eu(III) kompleksi proteinlere kolayca bağlanabilir.

Tez çalışması kapsamında BHHCT ile oluşturulan kompleks etiket olarak kullanılacaktır. Genel olarak bakıldığında, β -Diketonat esaslı ligantlar etiket olarak kullanılacak Eu(III) kompleksinin fosforesans duyarlılıklarını artırdıkları için tercih edilmektedir. Bu komplekslerin sentezinde Eu(III) iyonunun kullanılmasının sebebi ise bu iyonun özel bir fosforesans emisyonu vermesinden kaynaklanmaktadır. Eu(III) komplekslerinin verdiği bu fosforesans emisyonunun organik fosforesans bileşiklere göre en önemli avantajları uzun Stokes kayması (böylece zemin sinyalinin kaynaklanan fosforesans önlenmektedir) uyarılmış haldeki milisaniyelere varan uzun ömür süreleri, UV bölgede uyarıldıklarında görünür bölgede hiper geçiş olarak tanımlanan dar ve keskin bir emisyon bantının gözlenmesi olarak sıralanabilir (Yuan ve Matsumoto, 1998; Kimura 1998; Kimura vd., 1999; Connally vd., 2004; Deng vd., 2010).

Literatürde HbA1c biyomolekülünü ölçmede kullanılan β -diketonat esaslı Eu(III) kompleksleri ile ilgili çalışmalara rastlanılmamıştır. Tez kapsamında HbA1c biyomolekülünün ölçümünde kullanılacak ve biyoetiket işlevi görecek β -diketonat esaslı Eu(III) kompleksinin

gerekli biyokimyasal işlemlerin tamamlanması ile HbA1c biyomolekülünün ölçümü Zaman Gecikmeli Floroimmünoassay (TR-FIA) tekniği ile gerçekleştirilecektir.

2.8. Kaynak Araştırması

2.8.1. TR-FIA ile yapılan çalışmalar

Liang ve arkadaşları viral kapsit antijeninin tayini için TR-FIA yöntemi geliştirmişlerdir. Bu çalışmada Eu(III) etiketli antikor kullanılmış ve oldukça tatmin edici sonuçlar elde edilmiştir. Uygulanan prosedür ile doğrusal aralık 0-30 AU/mL ve tayin limiti 0,018 AU/mL olarak belirlenmiştir. Intra-assay ve inter-assay sonuçları da sırasıyla % 1,62-4,30 ve % 3,56-7,57 olarak verilmiştir (Liang vd., 2015).

Liu ve arkadaşları tarafından, insan serumunda insülin ve C-peptidin eş zamanlı olarak ölçülmesi için TR-FIA yöntemi geliştirilmiştir. Diğer yöntemlerden farklı olarak Eu(III) ve Sm(III) şelatlarının ikisi de etiket olarak kullanılmıştır. Sandviç tipi TR-FIA formatındaki antikor kaplı manyetik parçacıkların nicel tayinde iyi bir performans gösterdiğini gözlemlemişlerdir. C peptid ve insülinin erken tanı için gözlenebilme sınırları sırasıyla 27 pmol/mL ve 0,04 mIU/L olarak belirlenmiştir (Liu vd., 2014).

Hou ve arkadaşlarının insan serumunda tümör belirteçlerinin (CEA; karsinoembriyonik antijen) belirlenmesine yönelik yaptığı immünoassay çalışmaları TR-FIA ve immünomanyetik ayırmanın kombinasyonu ile oluşturulmuştur. Numunedeki analitlerin monoklonal antikor ile kaplanmış manyetik boncuklar tarafından yakalanıp sonrasında ise Eu(III) şelatlarla etiketlenmiş ikincil antikorlar tarafından etkileşimi ile yöntemlerini sandviç tipi immünoassay üzerine temellendirmişlerdir. Formatta lüminesans artırıcı çözelti kullanılmıştır. Çalışma aralığı ve gözlenebilme sınırı sırasıyla 1-1000 ng/mL ve 0,5 ng/mL olarak belirlenmiştir (Hou vd., 2012).

Niu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, insan Ig G'nin kantitatif tayini için yeni bir bifonksiyonlu europiyum şelat (ETNP) kullanan TR-FIA tekniği geliştirilmiştir. Çalışmada birincil antikorun miktarı, birincil antikor ve antijenin etkileşim süresi, antijen ve ETNP etiketli ikincil antikorun etkileşim süresi optimize edilmiştir. Uygun parametreler belirlendikten sonra, insan Ig G'nin 16-500 µg/mL aralığında kalibrasyon eğrisi çizilmiştir ve gözlenebilme sınırı 5 µg/mL olarak belirlenmiştir (Niu vd., 2011).

Yan ve arkadaşları karsinoembriyonik antijenin (CEA) tayini için yöntem geliştirmişlerdir. Mevcut yöntem TR-FIA ve akış enjeksiyon analizinin kombinasyonu şeklinde

oluşturulmuş olup, basit, hassas ve spesifiktir. Bir sandviç immünoassay formatı temel alınarak, bir akış sistemine yerleştirilen bir monoklonal antikorun immobilize edildiği immunoaffinite kolonu immüno-reaksiyonlar için kullanılmıştır. Serumdaki CEA, 2,5-100 ng/mL doğrusal aralıkta ve 1,0 ng / mL gözlebilme sınırında tespit edilmiştir (Yan vd., 2005).

Daijo ve Sportsman tarafından kemirgen plazmasındaki insülinin tayini için yeni bir zaman gecikmeli immunoassay geliştirilmiştir.. Elde edilen veriler ışığında TR-FIA, ELISA ve RIA sonuçları karşılaştırılmıştır ve TR-FIA yönteminin ELISA ve RIA yöntemleri için bir alternatif olduğu gözlenmiştir (Daijo ve Sportsman, 1999).

Bertoft ve arkadaşlarının 1984'te yapmış olduğu bir çalışmada, testosteronun tayininde kullanılan TR-FIA yönteminin çok hassas ve tekrarlanabilir bir test olduğunu sonucuna varılmıştır. Mevcut yöntemde, katı faz üzerine testosteron-3-(O-karboksimetil)-oksim-ovalbümün konjugatının kaplanmasıyla başlamış olup, bu konjugata karşı Eu(III) etiketli poliklonal ve monoklonal antikorların verdiği cevaplar ile karşılaştırılmıştır. Poliklonal etiket analizde daha duyarlı sonuç göstermiştir. Bu etiketle ölçüm aralığı 0,3-10 nmol/L iken monoklonal etiket için 3,0-100 nmol/L olarak bulunmuştur. (Bertoft vd., 1984).

2.8.2. BHHCT ve diğer β -diketonat esash ligantlar ile yapılan çalışmalar

2010 yılında Deng ve arkadaşları, BHHCT-Eu⁺³ kompleksi için yeni bir yöntem bulmuşlardır. İlk aşamada SA(BSA) oluşturularak, belirli inkübasyon ve diyaliz işlemleri sonrasında ortama BHHCT ilave edilerek konjugat oluşturulmuştur. Kompleks yapının gerçekleşmesi için ölçüm zamanından 12 saat önce çözeltiye EuCl₃, BSA, NaN₃ ve NaCl belirli oranlarda ilave edilmiştir. Çalışmanın devamında kompleksin ve onun metal nanoyapısının lüminesans uygulanmış biyoassay çalışmaları yapılmıştır (Deng vd., 2010).

Kimura ve arkadaşları ise BHHCT'nin etiket olarak kullanılabilmesi için bir takım sıralı etiketleme prosedürü oluşturmuşlardır. Elde edilen etiket ile yarışmalı TR-FIA yöntemi kullanılarak metafetaiminin kantitatif tayini yapılmıştır. İki aşamalı olarak yapılan çalışmada en düşük tayin değerleri sırasıyla 1 ng/mL ve 1 pg/mL olarak verilmiştir. Numune çalışmaları TR-FIA ve GC-MS yöntemleriyle yapılarak elde edilen sonuçlar karşılaştırmalı olarak incelenmiştir (Kimura vd., 1999).

2010 yılında Jiang ve arkadaşları zaman gecikmeli florometrik uygulamalar için europiyum kompleksleri geliştirmişlerdir. Eu(III)'ün floresansı, bir lüminesans artırıcı çözelti ile birlikteyken okunduğu DELFIA yöntemi kullanılmıştır. Kompleksler BHHCT ve BHHT ligantları kullanılarak oluşturulmuş ve karşılaştırmalı olarak incelenmeler sonucunda daha

yüksek kuantum veriminden dolayı çevresel patojenlerin lüminesans tayininde BHHCT-Eu(III) kompleksini kullanılmışlardır (Jiang vd., 2010).

Hai ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, kopolimerizasyon tekniği ile nanopartikül geliştirilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen nanopartiküller, SA ile belirli bir prosedür kapsamında etiketlenmiş olup, insan hepatit B yüzey antijeninin tayini için sandviç tipi TR-FIA yönteminde kullanılmıştır. Nanopartikülün etkisini görebilmek için (SA)-APS-BHHCT-Eu⁺³ ve (SA)-BHHCT-Eu⁺³ etiketleriyle yapılan TR-FIA çalışmaları karşılaştırılmıştır (Hai vd., 2004).

Wu ve Zhang tarafından yapılan bir çalışmada, BHHCT molekülünün yapısı değiştirilerek yeni bir β -diketon şelatı olan BTBCT elde edilmiştir. BHHCT ile karşılaştırıldığında sulu çözeltide BTBCT-Eu(III) şelatının tayin hassasiyeti zaman gecikmeli floresans yöntemiyle sekiz kat geliştirilmiştir. Floresan etiketi olarak BTBCT-Eu şelatını oluşturmak için, streptavidin-BSA konjugatı, maleimid-tiol yöntemi ile hazırlanıp BTBCT ile etiketlenmiştir. Yapılan deney sonuçları ile BTBCT'nin TRFIA ölçümlerinde güçlü bir etiketleme malzemesi olarak kullanılabileceğini gösterilmiştir (Wu ve Zhang, 2002).

Yuan ve Matsumoto tarafından yapılan çalışmada albümin için BCOT kodlu tetradentat β -diketon şelatı sentezlenmiştir. TR-FIA çalışmaları için BCOT, BSA ile etiketlenmiş ve floresans özellikleri araştırılmıştır. Ayrıca floresans özelliğe pH'nin etkisi de çalışılmıştır (Yuan ve Matsumoto, 1997).

2012 yılında yayınlanan bir makale de ise Zhang ve arkadaşları (Zhang vd., 2012) β -diketonat esaslı ligantların DLCLLA yönteminde DELFIA'dan daha iyi sonuçlar verdiği, sulu çözeltilerinde Eu(III) komplekslerinin kararlı olduğu, klorosülfonatlandıkları için proteine rahatlıkla kovalent olarak bağlanabildiği ve yine sulu çözeltilerinde yüksek lüminesans özellikte oldukları görülmüştür.

Hagan ve Zuchner'in yaptıkları bir çalışmada da β -diketonat esaslı Eu(III) kompleksleriyle α -fetoprotein, troit, T4 gibi antijenlerin tayinlerinin yapılabilirliği gözlenmiştir (Hagan ve Zuchner, 2011).

Mevcut β -diketonat esaslı Eu(III) komplekslerinin HbA1c biyomolekülünü ölçmede kullanıldığına dair bir literatüre rastlanılmamıştır.

2.8.3. HbA1c için yapılan çalışmalar

Chopra ve arkadaşları tarafından HbA1c'nin tayinine yönelik optoelektrokimyasal bir çalışma yapılmıştır. Etiket olarak yüksek düzeyde lüminesans özellik gösteren CdTe kuantum dotlar (QD) sentezlenmiş ve QD-nanobiyoproboların geliştirilmesi için anti- HbA1c antikoruyla konjuge edilmiştir. QD-nanobiyoprobolar ile HbA1c'nin tayininde floresan ve elektrokimyasal olmak üzere iki assay formatı kullanılmıştır. Çalışma aralığı % 4-16 olarak belirlenmiştir (Chopra vd., 2013).

Tanaka ve arkadaşları, etiket olarak ferrosenli bileşikler kullandıkları (HbA1c / Fc etiketli anti-insan Hb antikor) mevcut çalışmada HbA1c'nin tayinini iyon değiştirme kromatografisi ve elektrokimyasal olarak gerçekleştirmişlerdir. Çalışma aralığının % 4-12,6 olduğu görülmüştür (Tanaka vd., 2009).

Tanaka ve Matsunaga'nın HbA1c tayini için yaptığı bir çalışmada etiket olarak alkalen fosfataz (AP) enzimi kullanılmıştır. Tayin için boronat afinite immunassay ve lüminesans esaslı çalışmalar yapılmıştır. İmmunoassay formatı, bakteriyel manyetik partikül/boronik asit/HbA1c /AP etiketli anti-Hb antikor şeklinde olup, çalışma aralığı 10-100 ng/mL'dir (Tanaka ve Matsunaga, 2001).

Stollner ve arkadaşları tarafından HbA1c tayini için amperometrik bir immünosensör, Pt-çalışma elektroduna afinite matrisi olarak haptoglobin immobilize edilmiştir. Yöntemde etiket olarak glukoz oksidaz (GOx) kullanılmış olup assay formatı Anti-Hb antikor/Hb-HbA1c /anti-HbA1c antikor/Biyotinlenmiş IgG/Avidin-GOx konjugatı şeklindedir. HbA1c için standart eğri % 0-25 aralığında elde edilmiştir (Stollner vd., 2002).

Tanaka ve arkadaşlarının yaptığı HbA1c tayini için diğer bir çalışmada da boronat afinite immünoassay yöntemi ve amperometrik analizler kullanılmıştır. Yöntem, çip üzerinde bir elektrokimyasal akış immünoassay sistemi, ferrosen monokarboksilik asit (Fc-COOH) ve boronat-afinite kromatografisi ile işaretlenmiş anti-insan hemoglobin (Hb) IgG kullanılarak geliştirilmiştir. HbA1c'nin elektrokimyasal tayini için Fc-COOH (Fc-IgG) ile konjuge edilmiş anti-insan Hb IgG kullanılmıştır. 500 µg/mL derişime kadar HbA1c için cevap elde edilmiştir (Tanaka vd., 2007).

Chen ve arkadaşları HbA1c'nin tayinini mikroakışkan immunoassay yöntemiyle gerçekleştirmişlerdir. Kan içindeki HbA1c'nin saptanması için afinite matrisi olarak altın nanopartiküller ile kaplanmış manyetik mikroküreler kullanmışlardır. Optimize edilmiş

elektroforez ve tayin koşulları altında doğrusal aralık 0,05-1,5 µg/mL olarak belirlenmiş ve gözlenebilme sınırı 0,025 µg/mL olarak saptanmıştır (Chen vd., 2011).

Chen ve arkadaşları tarafından HbA1c'nin saptanmasına yönelik yapılan bir diğer çalışma da ise yöntem olarak ELISA ve HPLC kullanılmıştır. Assay formatı sandviç tipte olup polidimetilsiloksan üzerine anti-HbA1c antikorunun kovalent olarak bağlanmasıyla oluşturulmuştur. Doğrusal çalışma aralığı ve gözlenebilme sınırı 10-100 ng/mL ve 3,58 ng/mL olarak belirlenmiştir (Chen vd., 2012).

Liu ve arkadaşları, HbA1c tayini için elektrokimyasal bir çalışma yapmışlardır. Sensör yüzeyi ZrO₂ nanopartikülleri ile kaplanmış olup, anti-HbA1c antikoru ferrososenboronik asit (FcBA) ile etiketlenmiştir. Assay formatı, ZrO₂ nanopartikül anti-HbA1c antikor/FcBA/ HbA1c şeklindedir. Doğrusal çalışma aralığı % 6,8-14 olarak belirlenmiştir (Liu vd., 2006).

Liu ve arkadaşlarının 2006 yılındaki çalışmalarına benzer bir yöntemi de Halamek ve arkadaşları çalışmışlardır. Bu çalışma diğerinden farklı olarak yüzeyde ZrO₂ nanopartikülleri kullanılmamış, anti-HbA1c antikoru sadece ferrosenboronik asit (FcBA) ile etiketlenmiştir. Kalibrasyon çalışması yine yüzde şeklinde çalışılmıştır; ve çalışma aralığının geniş % 0-20 olduğu görülmüş ve mevcut sensör için gözlenebilme sınırının <% 5 olduğu saptanmıştır (Halamek vd., 2007).

Ahn ve arkadaşları tarafından HbA1c tayini için etiketsiz lüminol kemilüminesans (CL) temelli biyosensör geliştirilmiştir. Kan numunelerinde HbA1c'yi seçici olarak yakalamak için 3-aminofenil borik asit (3-APBA) ile kendi kendine birleştirilen (self-assembled) bir altın substrat kullanmışlardır. Boronik asit ise HbA1c'yi plazmadan veya tam kandan ayırmak için kullanılmıştır. Doğrusal çalışma aralığının % 2,5-15 olduğu görülmüştür (Ahn vd., 2016).

Xue ve arkadaşları diğer çalışmalardan farklı olarak etiket kullanmadan, nanoküreler üzerine antikoron kovalent olarak bağlanmasıyla potansiyometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Çalışma aralığı total hemogloblin için 166,7-570 ng/mL iken HbA1c için 50-170,5 ng/mL'dir (Xue vd., 2011).

BHHCT ligandı ile hazırlanan Eu(III) etiketi kullanılarak HbA1c'nin tayinine yönelik TR-FIA çalışmalarına literatürde rastlanmamıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. İmmünoassay Sistemi ve Yöntemler

İmmünoassay çalışmaları, Şekil 3.1’ de gösterilen bilgisayar bağlantılı BMG-FluoStar Omega (filter based), multi modlu floresans okuyucu (BMG LABTECH) ile Costar® 96-kuyucuklu opak polistiren plateler kullanılarak Zaman Gecikmeli Floroimmünoassay (TR-FIA) yöntemi ile gerçekleştirildi. Elde edilen veriler Omega yazılımı ile değerlendirildi.



Şekil 3.1. FLUOstar Omega immünoassay cihazı ve 96 kuyucuklu polistiren opak plate.

3.2. Mikroplateler

TR-FIA ölçümleri için Costar® 96-kuyucuklu opak, polistiren (Corning Incorporated, USA) assay plate kullanıldı. Ayrıca, ELISA çalışmaları NUNC 96-kuyucuklu şeffaf plateler ile gerçekleştirildi.

3.3. Kullanılan Diğer Cihazlar

UV-vis absorpsiyon spektrumları Shimadzu UV-2550 spektrofotometre cihazında 1 cm’ lik kuartz küvetler içerisinde alındı.

Serum numunelerinin hazırlanmasında Nüve NF800 marka santrifüj cihazı kullanıldı.

Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin tartımları, 0,1 mg duyarlılıkla tartım yapabilen Shimadzu marka elektronik terazi ile yapıldı.

Deney çözeltilerinin pH'ları Mettler-Toledo marka kombine pH elektrodu kullanılarak Mettler-Toledo marka pH metre cihazı ile ayarlandı. Cihazı kalibre etmek için pH'sı 7,0 ve pH'sı 4,0 olan Isolab analitik standart çözeltileri kullanıldı.

Çözeltilerin hazırlanmasında ve mikrolatelere ilgili çözeltilerin ilavesinde Brand ve Eppendorf marka mikro pipetler kullanıldı.

Kimyasal madde çözme işlemlerinde Bandalin marka ultrasonik banyo kullanıldı.

Çözeltileri karıştırmak için Daihan marka manyetik karıştırıcı kullanıldı.

Tüp içerisindeki çözeltileri karıştırmak için Isolab marka Vortex cihazı kullanıldı. Ayrıca, platelerin uygun şekilde kaplanmasını sağlamak için Isolab marka Plate Shaker kullanıldı.

Bütün çözeltiler Millipore Synergy marka saf su cihazından elde edilen çift distile su (18,2 MΩ cm) ile hazırlandı.

3.4. Kullanılan Kimyasallar

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasalların isimleri ve temin edildikleri firmalar.

Kimyasal Madde	Firma Adı
Fare Hemoglobin A1c Monoklonal Antikoru	MyBioSource
İnsan HbA1c Proteini ve Tavşan anti-HbA1c Poliklonal Antikoru	MyBioSource
Hemoglobin (Hb) Antikoru	MyBioSource
Streptavidin (SA, 60 kDa)	Sigma-Aldrich
Sığır Serum Albümin (BSA $\geq$ %98),	Sigma-Aldrich
3,4-Bis[4-(4,4,5,5,6,6,6-heptafloro 1,3dioksoheksil)fenil]benzensülfonilklorür (C ₃₀ H ₁₅ ClF ₁₄ O ₆ S) (BHHCT)	Sigma-Aldrich
Streptavidin-Horseradish peroksidaz konjugatı (SA-HRP)	Sigma-Aldrich
Glutaraldehit (CHO (CH ₂) ₃ CHO)	Sigma-Aldrich
Europiyum(III) klorür (EuCl ₃),	Sigma-Aldrich
Sodyum klorür (NaCl)	Merck
Sodyum azit (NaN ₃),	Sigma-Aldrich
Di-sodyum monohidrojenfosfat dihidrat (Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O)	Riedel de Haën
Sodyum dihidrojenfosfat dihidrat (NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O)	Riedel de Haën

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasalların isimleri ve temin edildikleri firmalar (devamı).

Kimyasal Madde	Firma Adı
Tween 20	Sigma-Aldrich
3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin (TMB)	Sigma-Aldrich
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck
Potasyum klorür (KCl)	Merck
Sodyum borhidrür (NaBH ₄),	Sigma-Aldrich
Etil alkol (CH ₃ CH ₂ OH)	Sigma-Aldrich
Hidroklorik Asit (HCl)	Sigma-Aldrich

3.5. Kullanılan Çözeltiler

3.5.1 Kaplama tamponu

Antikorlar için yaygın şekilde kullanılan üç kaplama tamponu; 0,5 mol L⁻¹ karbonat (pH 9,6), 0,1 mol L⁻¹ Tris (pH 8,5) ve 0,1 mol L⁻¹ fosfat tamponudur (PBS) (pH 7,0).

Tez çalışması kapsamında kaplama tamponu olarak pH 7,0 PBS 0,1 mol L⁻¹ derişimde fosfat tamponu kullanıldı. Bunun için hesaplanan miktarlardaki sodyum dihidrojenfosfat dihidrat ve disodyum monohidrojenfosfat dihidrat tartılarak saf suda çözüldü. pH'sı 7,0 olacak şekilde 0,1 mol L⁻¹ HCl ve 0,1 mol L⁻¹ NaOH çözeltileri ile pH'sı ayarlandı. Hazırlanan çözelti buzdolabında 4°C'de muhafaza edildi. Bu tampon, antikor ve antijen çözeltilerinin hazırlanmasında da kullanıldığı için tezin ilerleyen bölümlerinde inkübasyon çözeltisi olarak da adlandırılmıştır.

3.5.2. Yıkama tamponu

ELISA ve TR-FIA çalışmalarında yapılan inkübasyonlar, kullanılan kimyasallar arasında yüksek afiniteli spesifik etkileşimlerin oluşmasına izin verir. Her inkübasyon basamağı arasında, birkaç kez yıkama yaparak madde ortamdan uzaklaştırılmaya çalışılır. Spesifik yüksek afiniteli etkileşimlere ilaveten, türler arasında daima düşük afiniteli etkileşimler de vardır. Yıkama tamponu, bu türlerin uzaklaşması için düşük afiniteli etkileşimleri bozmalıdır. Yıkama çözeltisi, biyolojik türlerin denatürasyonunu önlemek ve etkinliğini korumak için bir fizyolojik tampon içermelidir. Bu amaç için genellikle, PBS, TBS veya nötr pH'da imidazol-tamponlu salin çözeltiler idealdir. Ayrıca, düşük afiniteli spesifik olmayan etkileşimleri bozmak için yıkama tamponuna bir deterjan ilave edilmelidir. Tween 20 veya Triton X-100'in bu amaçla % 0,01-0,05 konsantrasyonlarda kullanımı uygundur. Genelde, her inkübasyondan sonra 3-5 kez

yıkama adımı uygulanır. Yıkama basamakları elle gerçekleştiriliyorsa, kuru kâğıt havluya plate ters çevrilerek her adımda aşırı yıkama tamponunun uzaklaşması için hafifçe vurulmalıdır. Platenin yıkama adımları arasında uzun süre olmamalıdır, bu durum aktivitenin azalmasına neden olabilir (<http://www.seracare.com/news-events/kpl>).

Tez çalışması için kullanılacak yıkama tamponu, yukarıdaki bilgiler göz önüne alınarak, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PBS (inkübasyon çözeltisi) içerisine % 0,05'lik Tween 20 ilave edilmesi ile hazırlandı. Her inkübasyon sonrasında platelere 3 kez yıkama işlemi uygulandı.

3.5.3. Bloke edici tampon

Bu aşama, kuyucukların antijen veya antikor ile kaplanması sonucunda, boş kalan hidrofobik bölgelerin bloke edilmesi olayıdır. Kuyucuklar, sonraki reaksiyon maddelerinin spesifik olmayan bağlanmasını önlemek için bloke edilmelidir. Eğer bu etkili bir şekilde başarılmazsa, analiz için spesifiklik ve hassasiyet düşecektir. Bloke edici maddelerin başlıca iki sınıfı proteinler ve deterjanlardır. Deterjanlar üç sınıftan oluşur: noniyonik, iyonik ve zwitteriyonik. İyonik ve zwitteriyonik deterjanlar zayıf blokerlerdir ve kullanılmamalıdır. Tween 20 ve Triton X-100 gibi noniyonik deterjanlar, katı yüzey ile kovalent bağlanmış reaktiflerle kullanılmıştır, fakat protein-protein etkileşimlerini bozabilecek yıkama maddeleri olarak kullanımları daha çoktur. Diğer bir bloke edici ajan olan proteinler ise; yağsız süt tozu, balık jelatini, kazain ve sığır serum albümindir (BSA). BSA genellikle $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0'da % 1-5 arasında bir derişimde kullanılır (<http://www.seracare.com/news-events/kpl>).

Tez çalışması için kullanılacak olan bloke edici tampon, % 0,05'lik Tween 20 içeren $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PBS çözeltisine (yıkama çözeltisi) % 3'lük BSA ilave edilerek hazırlandı.

3.5.4. Diyaliz tamponu

$0,01 \text{ mol L}^{-1}$ derişimde fosfat tamponu hazırlamak için hesaplanan miktarlardaki sodyum dihidrojenfosfat dihidrat ve disodyum monohidrojenfosfat dihidrat tartılarak saf suda çözüldü. pH 7,4 olacak şekilde pH'sı ayarlandı.

3.5.5. Etiket tamponları

TR-FIA çalışmaları için hazırlanan etiket çözeltisinin, inkübasyon tamponu ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PBS) ile seyreltilmesiyle hazırlandı.

ELISA çalışmaları için ise, stok SA-HRP (streptavidin-horseradish peroksidaz konjugatı) çözeltisi, inkübasyon tamponu ile ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PBS) ile 1/5000 oranında seyreltilmesiyle hazırlandı.

3.5.6. Sonlandırma çözeltisi

% 97'lik H_2SO_4 çözeltisinden gerekli hesaplamalar yapıldıktan sonra uygun hacimde alınarak $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ derişimde sonlandırma çözeltisi hazırlandı.

3.5.7. Kan numuneleri

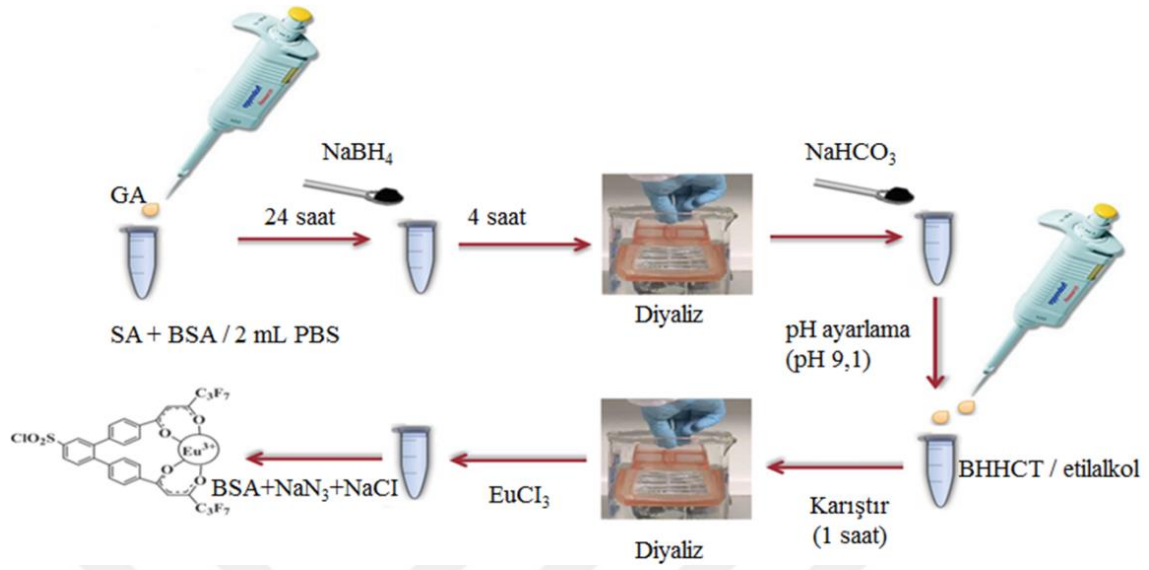
Sağlıklı bireylerden alınan 3'er mL kan numuneleri 30 dakika 5000 rpm de santrifüjlendi. Süpernatant kısımdan 1 mL lik örnekler alınarak buzdolabında -20°C 'de depolandı. Deney öncesinde 4°C 'de çözünme sağlandıktan sonra oda sıcaklığına getirilerek kullanıldı.

3.6. Eu (III) Kompleksi İle Etiketlenmiş SA(BSA)-BHHCT Konjugatının Hazırlanması

Çalışmada birinci adım olarak, ticari olarak temin edilen 3,4-Bis[4-(4,4,5,5,6,6,6-heptafloro-1,3dioksoheksil)fenil]benzensülfonilklorür bileşiğı (BHHCT) ile Eu(III) kompleksinin hazırlanması amaçlandı. Prosedür, Deng ve arkadaşları (2010) tarafından önerilen yönteme benzer şekilde yürütüldü. Buna göre:

- i. 1 mg streptavidin (SA) ve 1 mg BSA $2 \text{ mL } 0,01 \text{ mol L}^{-1}$ PBS pH 7,4 içerisinde çözüldü.
- ii. $0,1 \text{ mL } \%1$ 'lik glutaraldehit (GA) eklendi. (4°C 'de 24 saat ilk inkübasyon gerçekleştirildi.)
- iii. $0,4 \text{ mg}$ sodyum bor hidrür (NaBH_4) eklendi. (Oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakıldı.)
- iv. İnkübasyon sonrasında çözelti $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ PBS pH 7,4'e karşı diyaliz edildi.
- v. Diyaliz sonrasında, çözeltiye $1,5 \text{ mL}$ distile su ilave edildi ve homojenizasyon sağlandı.
- vi. $12,6 \text{ mg}$ sodyum bikarbonat (NaHCO_3) eklendi.
- vii. Bu aşamalardan sonra çözeltinin pH'sı $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH çözeltisi ile 9,1'e ayarlandı. (4°C 'de gece boyunca inkübasyona bırakıldı.)
- viii. 2 mg BHHCT/ $0,3 \text{ mL}$ etil alkol (EtOH) damla damla çözeltiye ilave edildi ve oda sıcaklığında 1 saat boyunca karıştırıldı.
- ix. Çözelti $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ PBS pH 7,4'e karşı bağlanmayan türleri ortamdan uzaklaştırmak için diyaliz edildi.

Toplanan çözelti stoklar halinde -20°C 'de depolandı ve her bir deney öncesinde stok çözeltiden alınıp gerekli seyreltme işleminden sonra içerisine $1,8 \mu\text{L } 0,04 \text{ mol L}^{-1}$ EuCl_3 , % 2'lik BSA, % 1'lik NaN_3 ve % 9 NaCl eklenerek 12 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası çözelti etiket çözeltisi olarak kullanıldı (Şekil 3.2).



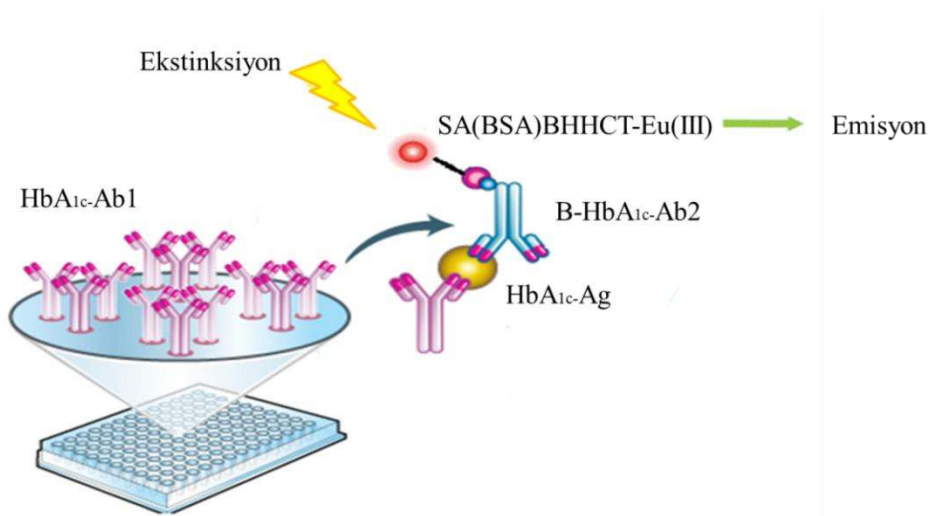
Şekil 3.2. SA(BSA)-BHHCT-Eu³⁺ etiketinin hazırlanma prosedürü.

3.7. Eu (III) Kompleksi İle Etiketlenmiş SA-BSA Konjugatının Karakterizasyonu

Etiketleme prosedüründen sonra türler arası olması beklenen bağlanmalar, UV-Vis spektroskopisi yöntemi kullanılarak araştırıldı. Bunun için SA(BSA), BHHCT ve SA(BSA)-BHHCT türlerinin 200-600 nm dalga boyu arasında UV spektrumları alındı ve sonuçlar değerlendirildi

3.8. İmmünoassay Formatının Hazırlanışı

Oluşturulan format Şekil 3.3'te verilmiştir.



Şekil 3.3. TR-FIA yöntemi ile oluşturulan immünoassay formatı.

Anti-HbA1c birincil antikorun (HbA1c-Ab1) yüzeye kaplanması;

100 µL HbA1c-Ab1 çözeltisi 96 kuyucuklu opak mikrotiter plateye eklendi ve gece boyu 37°C’de inkübasyona bırakıldı.

- ***Yıkama ve Bloking;***

Kuyucuklar yıkama tamponu (% 0,05 Tween 20) ile 3 kez yıkandı.

Bloke edici tampon kuyucuklara eklendi ve 37°C’de inkübe edildikten sonra kaplanan plateler -20°C’de depolandı.

- ***HbA1c’nin (HbA1c –Ag) eklenmesi;***

Antikorlar ile muamele edilmiş kuyucuklara derişimi bilinen HbA1c-Ag standartları eklendi. 37°C’de gerçekleştirilen inkübasyon süresinin ardından kuyucuklar 3 kez yıkandı.

- ***Biyotinlenmiş ikincil antikor (B-HbA1c-Ab2) ilavesi;***

Kuyucuklara belli hacimde 100 µL B-HbA1c-Ab2 çözeltisi eklendi ve inkübasyona bırakıldı.

- ***SA(BSA)-BHHCT-Eu(III) etiket çözeltisinin eklenmesi;***

Gerekli yıkama adımından sonra hazırlanan etiket çözeltisi kuyucuklara ilave edildi. İnkübasyondan sonra yıkama adımı yapılarak ölçüm alındı.

3.9. SA(BSA)-BHHCT-Eu(III) Etiket Çözeltisinin Seyreltme Oranının Optimizasyonu

Optimizasyon çalışmalarında ilk olarak hazırlanan etiket çözeltisinin seyreltme oranı çalışıldı. Bunun için aşağıdaki deneysel işlemler uygulandı.

1. Antikorun Kaplanması

1.1. Polistiren 96 kuyucuklu mikrotiter platelere, 5 µg/mL derişimde HbA1c-Ab1 çözeltisi her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde ilave edildi. Hazırlanan plateler 37°C’de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında bağlanmamış antikorları ortamdan uzaklaştırmak için yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı.

1.2. İkinci işlem olarak kuyucuklar bloke edildi. Bunun için 300 µL bloke edici tampon kuyucuklara eklendi ve 37°C’de bir saat inkübasyona bırakıldı.

2. Sabit derişimlerde hazırlanan HbA1c-Ag çözeltileri (100 ng/mL) yukarıda hazırlanan platelere her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde ilave edildi ve 37°C’de bir saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı.

3. Sabit derişimde HbA1c-Ag ile muamele edilmiş kuyucuklara 400 ng/mL 100 µL B-HbA1c-Ab2 eklendi. 37°C’de bir saat inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon sonunda yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı.

4. SA(BSA)-BHHCT-Eu(III) etiket çözeltisi 1:5, 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 ve 1:500 oranlarında seyreltilerek her bir kuyucuğa 15 µL olacak şekilde ilave edildi ve 37°C’de bir saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda yıkama çözeltisi ile yıkama yapıldı.
5. Deney aşamaları tamamlandıktan sonra ekstinksiyon ve emisyon dalga boyları sırasıyla 390 ve 615 nm, kuyucuk başına gönderilen flaş sayısı 100, entegrasyon başlatma ve entegrasyon süresi de 200 ve 400 µs olarak girilip TR-FIA ölçümleri alındı. Elde edilen floresans yoğunluk değerleri seyreltme oranına karşı grafiğe geçirildi ve optimum oran belirlendi.

3.10. Mikrotiter Plateler İçine İlgili Antikorların Bağlanması Ve HbA1c-Ab1 (Ab1) Ve B-HbA1c-Ab2 (Ab2) Derişimlerinin Optimizasyonu

Optimum HbA1c-Ab1 ve B- HbA1c-Ab2 derişimlerinin belirlenmesi amacıyla aşağıda belirtilen işlemler uygulandı. Her bir değişken için farklı kombinasyonlar Şekil 3.3’te verilen format çerçevesinde denenerek optimum derişimler belirlenmesi amaçlandı.

1. Antikorum Kaplanması
 - 1.1. Polistiren 96 kuyucuklu mikrotiter platelere, farklı derişimlerde (2, 5, 7, 10, 15 µg/mL) HbA1c-Ab1 çözeltisi her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde ilave edildi. Hazırlanan plateler 37°C’de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı.
 - 1.2. 300 µL bloke edici çözelti kuyucuklara eklendi ve 37°C’de bir saat inkübasyona bırakıldı.
2. Sabit derişimlerde hazırlanan HbA1c-Ag çözeltileri (100 ng/mL) yukarıda hazırlanan platelere her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde ilave edildi ve 37°C’de bir saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı.
3. Antijenler ile muamele edilmiş Ab1 kaplı kuyucuklara farklı derişimlerde (100, 200, 300, 400, 500 ng/mL) 100 µL B- HbA1c-Ab2 eklendi. 37°C’de bir saat inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon sonunda yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı.
4. SA(BSA)-BHHCT-Eu(III) etiket çözeltisi belli oranda seyreltilerek her bir kuyucuğa 15 µL olacak şekilde ilave edildi ve 37°C’de bir saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı.
5. Deney aşamaları tamamlandıktan sonra TR-FIA ölçümleri alındı. Elde edilen floresans yoğunluk değerleri sırasıyla, HbA1c-Ab1 ve B-HbA1c-Ab2 derişimlerine karşı grafiğe geçirildi ve optimum derişim belirlendi.

3.11. HbA1c-Ab1 ile HbA1c Antijeninin Etkileşim Süresinin Optimizasyonu

Biyolojik türlerin birbiri ile etkileşimi, zaman parametresinden etkilenir. Bu sebeple HbA1c-Ab1 ve HbA1c arasındaki etkileşim süresi bağlanma afinitesi açısından önemlidir. HbA1c-Ab1 ve B-HbA1c-Ab2 parametrelerinin derişimleri optimize edildikten sonraki adım etkileşim sürelerinin optimizasyonudur.

1. Antikorum Kaplanması

1.1. Polistiren 96 kuyucuklu mikrotiter platelere, belli derişimde HbA1c-Ab1 çözeltisi her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde ilave edildi. Hazırlanan plateler 37°C’de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı.

1.2. Daha sonra 300 µL bloke edici çözelti kuyucuklara eklendi ve 37°C’de bir saat inkübasyona bırakıldı.

2. 100 ng/mL sabit derişimde hazırlanan HbA1c-Ag çözeltileri HbA1c-Ab1 kaplı platelere her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde zaman araları göz önünde bulundurularak ilave edildi ve 37°C’de kuyucuklar 100, 80, 60, 40, 20 ve 10 dakika olmak üzere inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı.

3. Antijenler ile muamele edilmiş Ab1 kaplı kuyucuklara belli derişimde 100 µL B-HbA1c-Ab2 eklendi. 37°C’de bir saat inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon sonunda yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı.

4. SA(BSA)-BHHCT-Eu(III) etiket çözeltisi her bir kuyucuğa 15 µL olacak şekilde ilave edildi ve 37°C’de bir saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı.

5. Deney aşamaları tamamlandıktan TR-FIA ölçümleri alındı. Elde edilen floresans yoğunluk değerleri, zamana karşı grafiğe geçirildi ve optimum süre belirlendi.

3.12. B-HbA1c-Ab2 İle HbA1c Antijeninin Etkileşim Süresinin Optimizasyonu

1. Antikorum Kaplanması

1.1. Polistiren 96 kuyucuklu mikrotiter platelere, 5 µg/mL derişimde HbA1c-Ab1 çözeltisi her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde ilave edildi. Hazırlanan plateler 37°C’de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı.

1.2. Son işlem olarak kuyucuklar bloke edilir. 300 µL bloke edici çözelti kuyucuklara eklendi ve 37°C’de bir saat inkübasyona bırakıldı.

2. 100 ng/mL sabit derişimde hazırlanan HbA1c-Ag çözeltileri HbA1c-Ab1 kaplı platelere her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde ilave edildi ve 37°C’de kuyucuklar inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı.
3. Antiijenler ile muamele edilmiş Ab1 kaplı kuyucuklara 400 ng/mL 100 µL B-HbA1c-Ab2 eklendi. 37°C’de kuyucuklar 100, 80, 60, 40, 20 ve 10 dk olmak üzere inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı
4. SA(BSA)-BHHCT-Eu(III) etiket çözeltisi 1:50 oranında seyreltilerek her bir kuyucuğa 15 µL olacak şekilde ilave edildi ve 37°C’de bir saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı.
5. Deney aşamaları tamamlandıktan TR-FIA ölçümleri alındı. Elde edilen floresans yoğunluk değerleri zamana karşı grafiğe geçirildi ve optimum dakika belirlendi.

3.13. TR-FIA Yöntemi ile HbA1c (ng/mL) Tayini için Doğrusal Çalışma Aralığının Belirlenmesi

Optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra HbA1c için kalibrasyon çalışmaları yapıldı ve doğrusal çalışma aralığı belirlendi.

1. Antikorum Kaplanması
 - 1.1. Polistiren 96 kuyucuklu mikrotiter platelere, 5 µg/mL derişimde HbA1c-Ab1 çözeltisi her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde ilave edildi. Hazırlanan plateler 37°C’de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı.
 - 1.2. 300 µL bloke edici çözelti kuyucuklara eklendi ve 37°C’de bir saat inkübasyona bırakıldı.
2. Farklı derişimlerde hazırlanan (0,05-9200 ng/mL) HbA1c-Ag çözeltileri HbA1c-Ab1 kaplı platelere her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde ilave edildi ve 37°C’de kuyucuklar inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı.
3. Antiijenler ile muamele edilmiş Ab1 kaplı kuyucuklara belli derişimde 100 µL B-HbA1c-Ab2 eklendi. 37°C’de kuyucuklar inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı
4. SA(BSA)-BHHCT-Eu(III) etiket çözeltisi her bir kuyucuğa 15 µL olacak şekilde ilave edildi ve 37°C’de bir saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı.
5. Deney aşamaları tamamlandıktan sonra TR-FIA ölçümleri alındı. Elde edilen floresans yoğunluk değerleri derişimlere karşı grafiğe geçirildi.

3.14. TR-FIA Yöntemi ile %HbA1c Tayini İçin Doğrusal Çalışma Aralığının Belirlenmesi

1. Antikoru Kaplanması

1.1. Polistiren 96 kuyucuklu mikrotiter platelere, belli derişimde Hb-Ab1 çözeltisi her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde ilave edildi. Hazırlanan plateler 37°C’de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı.

1.2. 300 µL bloke edici çözelti kuyucuklara eklendi ve 37°C’de bir saat inkübasyona bırakıldı.

2. Farklı yüzdelerde (2-25%) hazırlanan HbA1c/HbA0 çözeltileri yukarıda hazırlanan platelere her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde ilave edildi ve 37°C’de bir saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı.

3. Farklı yüzdelerdeki (2-25%) HbA1c/HbA0 ile muamele edilmiş kuyucuklara belli derişimde 100 µL B-HbA1c-Ab2 eklendi. 37°C’de bir saat inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon sonunda yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı.

4. SA(BSA)-BHHCT-Eu(III) etiket çözeltisi 1:50 oranında seyreltilerek her bir kuyucuğa 15 µL olacak şekilde ilave edildi ve 37°C’de bir saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı.

5. Deney aşamaları tamamlandıktan sonra TR-FIA ölçümleri alındı. Okunan floresans yoğunluk değerleri % HbA1c/HbA0 değerlerine karşı grafiğe geçirildi ve kalibrasyon grafiği çizildi.

3.15. %HbA1c Tayini için Tekrarlanabilirlik Çalışması

Tez kapsamında oluşturulan immünoassayın tekrarlanabilirliği % 5, % 10 ve % 20 HbA1c standartları için okunan floresans yoğunluk değerlerinin kuyucuktan kuyucuğa ve plateden plateye karşılaştırılmasıyla çalışıldı.

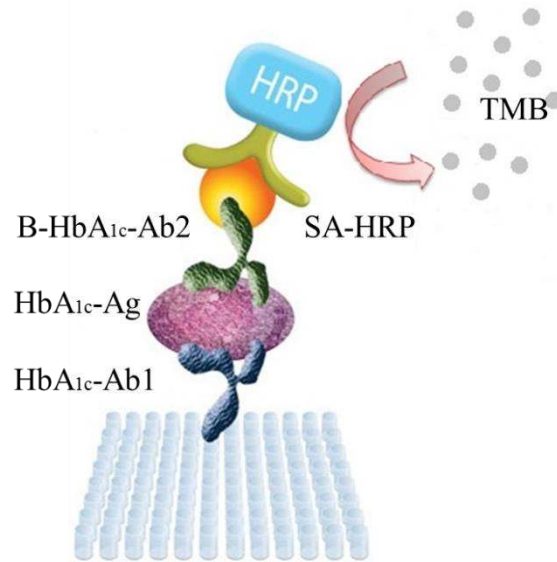
3.16. ELISA Yöntemi ile % HbA1c Tayini İçin Doğrusal Çalışma Aralığının Belirlenmesi

1. Antikoru Kaplanması

1.1. Polistiren 96 kuyucuklu mikrotiter platelere, belli derişimde Hb-Ab1 çözeltisi her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde ilave edildi. Hazırlanan plateler 37°C’de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı.

1.2. 300 µL bloke edici çözelti kuyucuklara eklendi ve 37°C’de bir saat inkübasyona bırakıldı.

2. Farklı yüzdelerde (% 2-25) hazırlanan HbA1c/HbA0 çözeltileri yukarıda hazırlanan platelere her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde ilave edildi ve 37°C’de bir saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı.
3. HbA1c/HbA0 ile muamele edilmiş kuyucuklara 400 ng/mL 100 µL B-HbA1c-Ab2 eklendi. 37°C’de bir saat inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon sonunda yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı.
4. Çalışılan yöntem ELISA olduğu için bir enzim etiketinin kullanılması söz konusudur. Etiket olarak kullanılan streptavidin-horseradish peroksidaz (SA-HRP) konjugat çözeltisi her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde eklendi. İnkübasyon işleminden sonra yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı.
5. 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin (TMB) substrat çözeltisi her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde ilave edildi ve platelerin üzeri kapatılarak renk değişimi gözlenene kadar inkübasyona bırakıldı (~15 dakika).
6. Herhangi bir yıkama işlemi yapılmadan 50 µL sonlandırma çözeltisinin (2,0 mol L⁻¹ H₂SO₄) kuyucuklara eklenmesi ile reaksiyon sonlandırıldı.
7. Deney aşamaları tamamlandıktan sonra mikrotiter plateler, microplate okuyucuya yerleştirildi ve 450 nm’de absorbans değerleri okundu. Okunan absorbans değerleri % HbA1c/HbA0 değerlerine karşılık grafiğe geçirildi ve standart bir eğri elde edildi.



Şekil 3.4. ELISA yöntemi ile oluşturulan immunoassay formatı.

3.17. Kan Numunelerinde %HbA1c Tayininin Yapılması

TR-FIA yöntemi ile kan numunelerinde %HbA1c tayininin yapılması

1. Antikoru Kaplanması

1.1. Polistiren 96 kuyucuklu mikrotiter platelere, belli derişimde Hb-Ab1 çözeltisi her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde ilave edildi. Hazırlanan plateler 37°C’de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı.

1.1. 300 µL bloke edici çözelti kuyucuklara eklendi ve 37°C’de bir saat inkübasyona bırakıldı.

2. Hb-Ab1 kaplı platenin ilk skalasına (% 0-25) standart % HbA1c/HbA0 çözeltileri, ikinci skalaya ise gönüllülerden alınan kan numuneleri gerekli işlemlerden geçirildikten sonra her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde ilave edildi ve 37°C’de bir saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı.

3. Belli derişimde 100 µL B-HbA1c-Ab2 eklendi. 37°C’de bir saat inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon sonunda yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı.

4. SA(BSA)-BHHCT-Eu(III) etiket çözeltisi belli oranda seyreltilerek her bir kuyucuğa 15 µL olacak şekilde ilave edildi ve 37°C’de bir saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı.

Deney aşamaları tamamlandıktan TR-FIA ölçümleri alındı. Okunan floresans yoğunluk değerleri standart % HbA1c örnekleri ile oluşturulan kalibrasyon baz alınarak numunelerdeki % HbA1c oranı belirlendi. Sonuçlar karşılaştırılarak % geri kazanım ve % yüzde bağıl standart hata değerleri hesaplandı.

ELISA yöntemi ile kan numunelerinde % HbA1c tayininin yapılması

1. Antikoru Kaplanması

1.1. Polistiren 96 kuyucuklu mikrotiter platelere, belli derişimde Hb-Ab1 çözeltisi her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde ilave edildi. Hazırlanan plateler 37°C’de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı.

1.2. 300 µL bloke edici çözelti kuyucuklara eklendi ve 37°C’de bir saat inkübasyona bırakıldı.

2. Hb-Ab1 kaplı platenin ilk skalasına (% 0-25) standart % HbA1c/HbA0 çözeltileri, diğer skalaya ise gönüllülerden alınan kan numuneleri gerekli işlemlerden geçirildikten sonra her

kuyucuğa 100 µL olacak şekilde ilave edildi ve 37°C’de bir saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı.

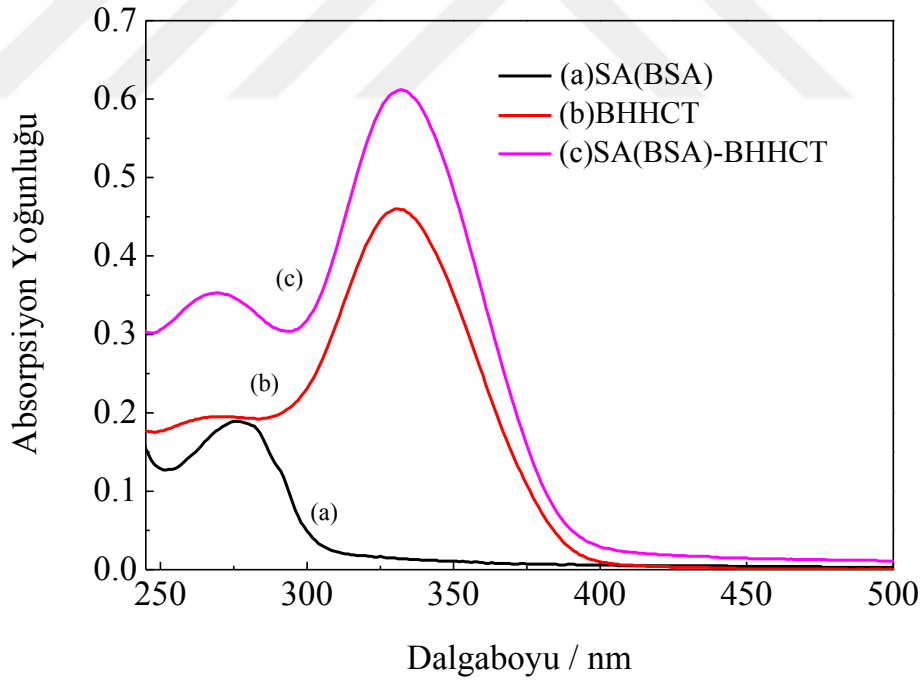
3. Belli derişimde 100 µL B-HbA1c-Ab2 eklendi. 37°C’de bir saat inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon sonunda yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı.
4. Bu aşamada çalışan yöntem ELISA olduğu için bir enzim etiketinin kullanılması söz konusudur. Etiket olarak kullanılan SA-HRP konjugat çözeltisi her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde eklendi. İnkübasyon işleminden sonra yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı.
5. 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin (TMB) substrat çözeltisi her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde ilave edildi ve platelerin üzeri kapatılarak renk değışimi gözlenene kadar inkübasyona bırakıldı (~15 dakika). (Süre sonunda kuyucuklar içindeki çözeltiler dökülmez ve yıkama çözeltisi ortama eklenmez).
6. 50 µL sonlandırma çözeltisinin (2,0 mol L⁻¹ H₂SO₄) kuyucuklara eklenmesi ile reaksiyon sonlandırıldı.
7. Deney aşamaları tamamlandıktan sonra mikrotiter plateler, microplate okuyucuya yerleştirildi ve 450 nm’de absorbans değeri okundu. Okunan absorbans değeri standart % HbA1c örnekleri ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi baz alınarak numunelerdeki % HbA1c oranı belirlendi ve sonuçlar kendi içinde karşılaştırılarak % geri kazanım ve % yüzde bağıl standart hata değeri hesaplandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Tez kapsamında HbA1c tayinine yönelik yeni bir immünoassay yönteminin geliştirilmesi amaçlandı. İlk olarak streptavidin ile sığır serum albümin konjugatı (SA(BSA)) oluşturuldu. 3,4-Bis[4-(4,4,5,5,6,6,6-heptafloro-1,3dioksoheksil)fenil]benzensülfonilklorür (BHHCT), ilavesiyle oluşturulan kompleks, Eu(III) ile etiketlendi. Elde edilen etiket kullanılarak ilgili immünoassay formatı oluşturuldu ve Mikro Plate Floresans Okuyucuda, zaman gecikmeli floroimmünoassay (TR-FIA) tekniği ile HbA1c biyomolekülünün ölçümü gerçekleştirildi. Deneysel parametreler optimize edildi ve edilen sonuçlar aşağıda sunuldu.

4.1. Hazırlanan SA(BSA)-BHHCT Konjugatının UV-Vis Spektrofotometre ile Karakterizasyonu

Tezin ilk aşamasında Bölüm 3.6'da belirtildiği SA(BSA)-BHHCT konjugatları oluşturuldu ve bu konjugatların Eu(III) ile etiketlenmeden önce etkinliği araştırıldı. Bunun için saf BHHCT, SA(BSA) ve SA(BSA)-BHHCT konjugatlarının absorpsiyon spektrumları alındı.



Şekil 4.1. (a) SA-BSA konjugatı, (b) Saf BHHCT, (c) SA(BSA)-BHHCT'nin absorpsiyon spektrumları.

Şekil 4.1 incelendiğinde, saf BHHCT 342 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon gösterirken, SA(BSA) konjugatına ait pikin 284 nm dalgaboyunda olduğu gözlemlendi. Bunun

yanında SA(BSA)-BHHCT konjugatı oluşturulduktan sonra, hem 284 nm hem de 342 nm civarında pikler elde edildi. Bu durum gerekli bağlanmaların sağlandığı ve istenen konjugatların elde edildiği şeklinde yorumlanabilir (Deng vd., 2010).

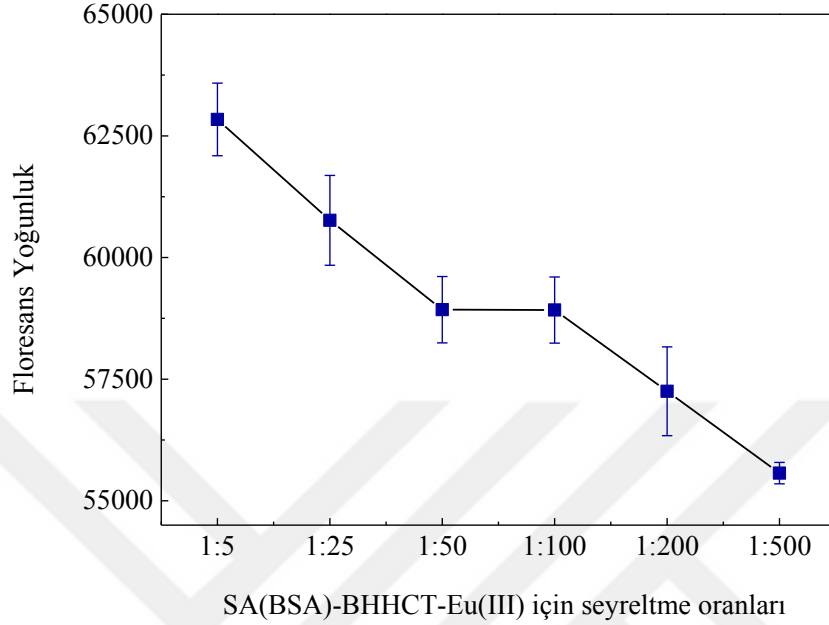
4.2. Optimizasyon Çalışmaları

İmmunoassay prosedürlerini etkileyen faktörlerin optimizasyonları, çalışmaların güvenilirliği açısından gereklidir. Bu sebepten parametreler optimize edilirken, farklı kombinasyonlar denenerek çalışıldı.

4.2.1. SA(BSA)-BHHCT-Eu(III) etiket çözeltisinin seyreltme oranının optimizasyonu

Bölüm 3.6’da anlatıldığı gibi, hazırlanan SA(BSA)-BHHCT-Eu(III) etiket çözeltisinin ilk olarak seyreltme oranı optimize edildi. Bu amaç doğrultusunda, Bölüm 3.9’de belirtildiği üzere mikrotiter plate üzerine ilgili anti-HbA1c antikoru (HbA1c-Ab1), sabit derişimde (5 µg/mL) eklenerek, gece boyu inkübasyona bırakıldı ve antikorun fiziksel olarak katı yüzeye bağlanması sağlandı. Gerekli yıkama ve bloking adımlarından sonra immunoassayin diğer aşamaları uygulandı. HbA1c-Ab1 kaplı her bir kuyucuğa yine sabit derişimde (100 ng/mL) HbA1c-Ag eklendi. Antijenler ile muamele edilmiş HbA1c-Ab1 kaplı kuyucuklara B-HbA1c-Ab2 ilave edildi. Son olarak, SA(BSA)-BHHCT-Eu(III) etiket çözeltisi 1:5, 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 ve 1:500 oranlarında seyreltilerek her bir kuyucuğa 100 µL olacak şekilde ilave edildi ve 37°C’de bir saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda yıkama çözeltisi ile yıkama yapıldı. Deney aşamaları tamamlandıktan sonra aşağıda verilen parametreler doğrultusunda TR-FIA ölçümü alındı. Elde edilen floresans yoğunluk değerleri seyreltme oranına karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.2).

- Ekstinksiyon ve emisyon dalga boyları; 390 nm, 615 nm,
- Kuyucuk başına gönderilen flaş sayısı; 100,
- Entegrasyon başlatma ve entegrasyon süresi; 200 µs ve 400 µs.



Şekil 4.2. SA(BSA)-BHHCT-Eu(III) etiket çözeltisinin seyreltme oranı (1:5, 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 ve 1:500) optimizasyonu (Hata çubukları 3 ölçüm sonrası elde edilmiştir).

Yukarıdaki grafik göz önünde bulundurulduğunda, seyreltme oranının artmasına bağlı olarak floresan yoğunluğunun azaldığı görülmektedir. 1:50 seyreltme oranının gösterdiği floresans yoğunluk 1:5 ve 1:25'ten daha düşük olmasına rağmen, bu oranlarda uygun kalibrasyon eğrilerinin oluşturulamadığı görüldü. Bunun yanında minimum madde kullanımı da göz önüne alındı. Dolayısıyla, tatmin edici sinyal yoğunluğuna ulaşıldığı düşünülerek 1:50 oranı optimum olarak seçildi.

Hou ve arkadaşları tarafından karsinoembriyonik antijenin, TR-FIA yöntemiyle tayin edildiği bir çalışmada ikincil antikor Eu(III) ile etiketlenmiş ve ölçüm alınmıştır. Oluşturulan assay prosedüründe etiketin seyreltme oranı optimize edilmiştir. 1:10, 1:25, 1:50, 1:75, 1:100 ve 1:200 oranlarında çalışılmış ve elde edilen seyreltme oranına karşılık çizilen floresans yoğunluk grafiğinde 1:50 seyreltme oranından sonra yoğunluğun azalması sebebiyle optimum olarak 1:50 belirlenmiştir (Hou vd., 2012).

Yan ve arkadaşları tarafından karsinoembriyonik antijenin TR-FIA ve akış enjeksiyon immunoassay yöntemiyle tayin edildiği bir çalışmada da yine ikincil antikor, Eu(III) ile etiketlenmiş ve ölçüm alınmıştır. Optimizasyon çalışması etiketin çeşitli seyreltme oranlarında çalışılmıştır. Seyreltme oranına karşılık çizilen floresans yoğunluk grafiğinde 1:100 seyreltme

oranından sonra floresans yoğunluğun azalması sebebiyle optimum olarak 1:100 oranı seçilmiştir (Yan vd., 2005).

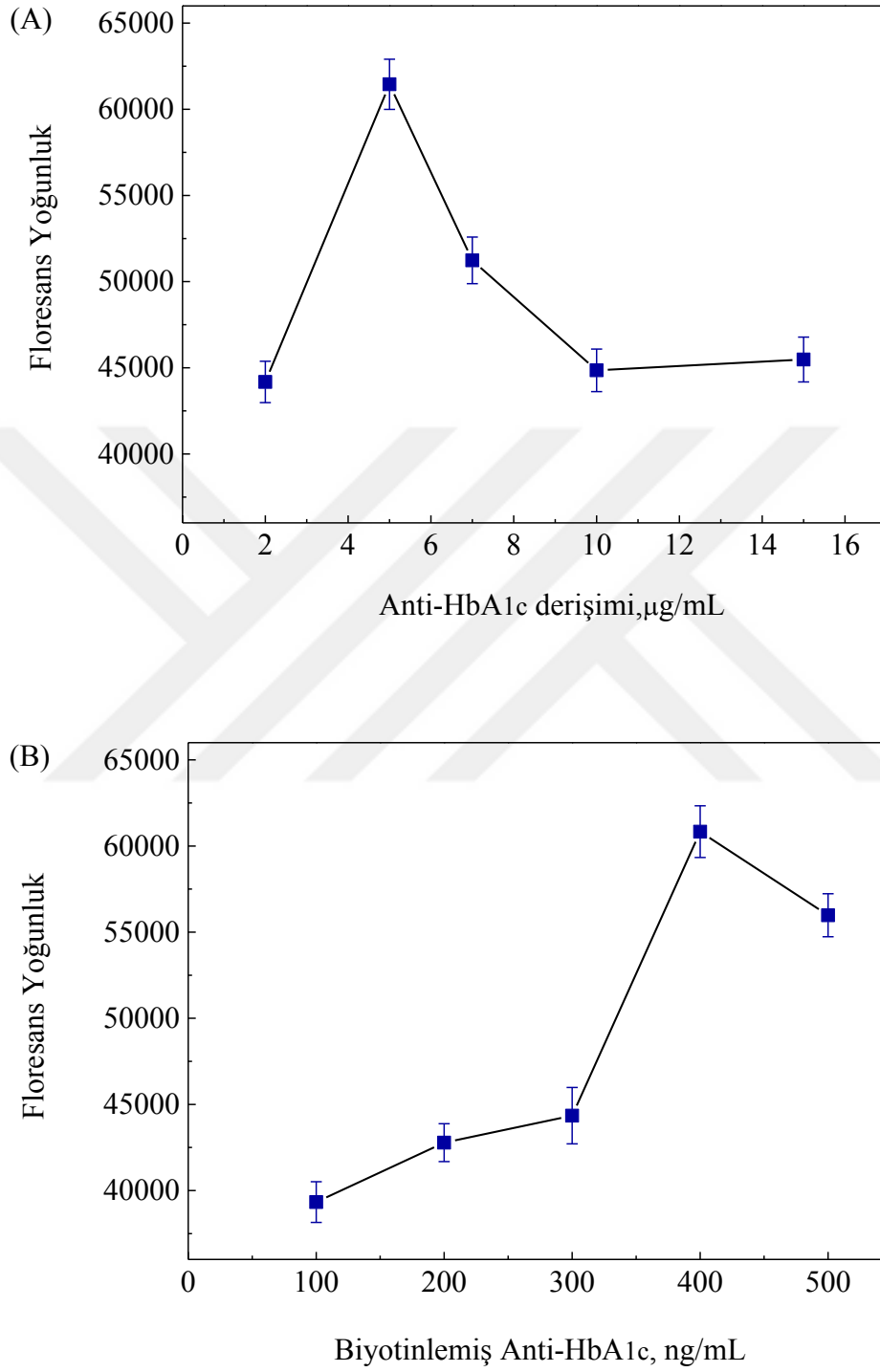
4.2.2. HbA1c-Ab1 (Ab1) ve B- HbA1c-Ab2 (Ab2) derişimlerinin optimizasyonu

Bölüm 3.10'da anlatıldığı gibi, optimum HbA1c-Ab1 ve B-HbA1c-Ab2 derişimlerinin belirlenmesi amacıyla basamaklı immunoassay işlemleri uygulandı. Her iki parametrenin optimizasyonu farklı kombinasyonlar oluşturularak yapıldı ve grafiğe geçirilen sonuçlar neticesinde optimum değerler belirlendi.

İlk olarak polistiren 96-kuyucuklu mikrotiter platelere, farklı derişimlerde (2, 5, 7, 10, 15 µg/mL) HbA1c-Ab1 çözeltisi kaplandı. Belli derişimde hazırlanan HbA1c-Ag çözeltileri yukarıda hazırlanan platelere ilave edilip inkübasyon sonrasında yıkama çözeltisi ile yıkama yapıldı. Bu platelere yine farklı derişimlerde (100, 200, 300, 400, 500 ng/mL) B-HbA1c-Ab2 çözeltisi eklenip inkübasyon sonunda yıkama çözeltisi ile yıkama yapıldı.

Bir önceki bölümde, optimize edilen oranda seyreltilen SA(BSA)-BHHCT-Eu(III) etiket çözeltisi, her bir kuyucuğa 15 µL olacak şekilde ilave edildi ve inkübasyon sonunda yıkama çözeltisi ile yıkama yapıldı.

İmmunoassay aşamaları tamamlandıktan sonra TR-FIA ölçümleri alındı. Elde edilen floresans yoğunluk değerleri birincil antikor ve biyotinlenmiş ikincil antikor derişim miktarlarına göre ayrı ayrı grafiklere geçirildi ve en iyi floresans değerlerinin elde edildiği miktarlar HbA1c-Ab1 için 5 µg/mL, B-HbA1c-Ab2 için de 400 ng/mL olarak belirlendi. Şekil 4.3'te bu verilere ait grafikler görülmektedir.



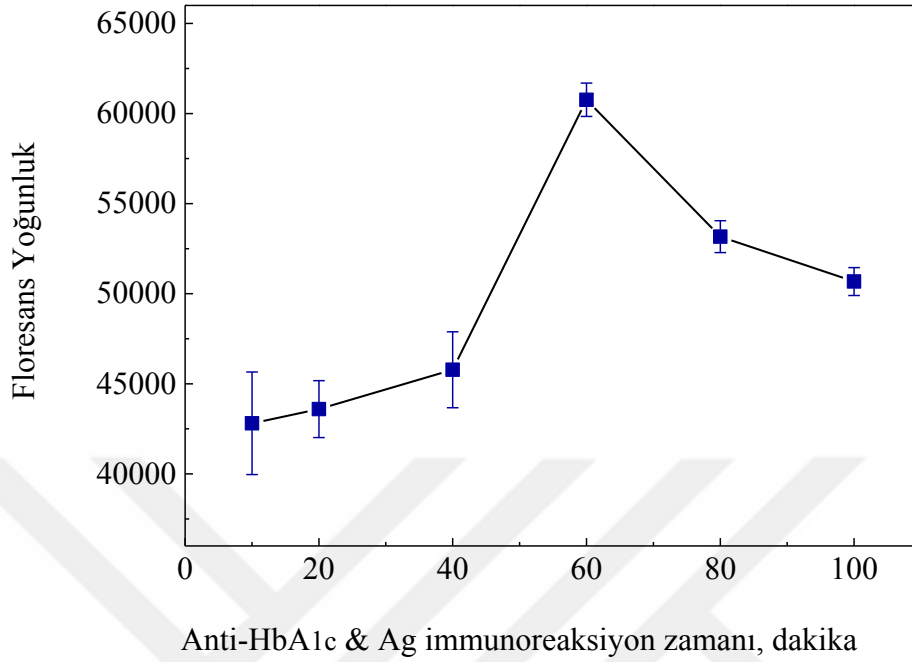
Şekil 4.3. (A) HbA1c'nin derişiminin optimizasyonu. (B) B-HbA1c-Ab2'nin derişiminin optimizasyonu (Hata çubukları 3 ölçüm sonrası elde edilmiştir).

Niu ve arkadaşları tarafından TR-FIA yöntemiyle, insan Ig G tayini için yapılan bir çalışmada kaplama antikorunun derişimi benzer şekilde optimize edilmiştir. Çalışma aralığı 0-25 $\mu\text{g/L}$ olup, yayında sunulan grafik incelendiğinde, antikor miktarı arttıkça floresans yoğunluğun azalmasına bağlı olarak optimum derişim 5 $\mu\text{g/L}$ olarak belirlenmiştir (Niu vd., 2011).

4.2.3. HbA1c-Ab1 ile HbA1c antijeninin etkileşim süresinin optimizasyonu

Oluşturulan sandviç tipi immunoassayde, birincil antikor olan HbA1c-Ab1'in, HbA1c-Ag'nin ve ikincil antikor olan B-HbA1c-Ab2'nin assay kapsamında birbirlerine bağlanma afinitelerinin, her reaktanın molar oranı tarafından önemli ölçüde etkilendiğini floresan yoğunluklarına bakarak görmekteyiz. Mevcut etkileşim üzerine inkübasyon sürelerinin de etkisinin olacağı düşünülerek, çalışmalar sürelerin optimizasyonu doğrultusunda ilerlemiştir.

İnkübasyon süreleri iki aşamalı olarak araştırıldı. İlk aşamada, birincil antikor olan HbA1c-Ab1 ve HbA1c-Ag'nin bağlanma afinitesi üzerine inkübasyon süresinin etkisi çalışıldı. Bölüm 3.11'de anlatıldığı gibi, HbA1c-Ab1 kaplı platelere her kuyucuğa 100 μL HbA1c-Ag olacak şekilde zaman araları göz önünde bulundurularak ilave edildi. 37°C'de kuyucuklar 100, 80, 60, 40, 20 ve 10 dakika olmak üzere inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda yıkama çözeltisi ile yıkama yapıp diğer adımlara geçildi. Floresans yoğunluklar, inkübasyon sürelerine karşı grafiğe geçirildi ve optimum etkileşim süresi 60 dakika olarak belirlendi ve tüm deneylerde ilk inkübasyon süresi 60 dakika olarak alındı.



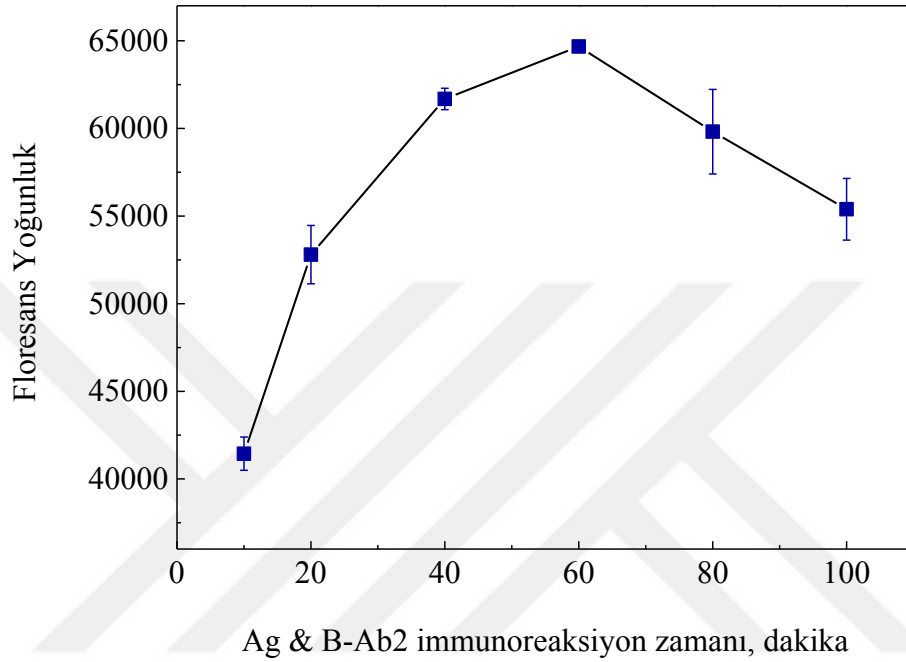
Şekil 4.4. Farklı inkübasyon süreleri altında Anti-HbA1c & Ag etkileşimine bağımlı floresans yoğunlukları (Hata çubukları 3 ölçüm sonrası elde edilmiştir).

4.2.4. B-HbA1c-Ab2 İle HbA1c antijeninin etkileşim süresinin optimizasyonu

Bölüm 4.2.3'te belirtildiği gibi inkübasyon sürelerinin optimizasyonu iki aşamalı gerçekleştirildi. İkinci aşamada, B-HbA1c-Ab2 ve HbA1c-Ag için optimum etkileşim süresi belirlendi. Prosedür diğerleri ile aynı aşamalardan ibaret olup antijen ile muamele edilmiş kuyucuklara 100 μ L B-HbA1c-Ab2 eklenip 37°C'de kuyucuklar 100, 80, 60, 40, 20 ve 10 dakika olmak üzere inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda yıkama çözeltisi ile yıkama yapıldı ve çalışmanın diğer adımları gerçekleştirildi. Elde edilen verilerin grafiğe geçirilmesi ile maksimum floresans yoğunluğun gözlemlendiği süre optimum olarak belirlendi (Şekil 4.5). Buna göre diğer deneylerde kullanılmak üzere inkübasyon süresi 60 dakika olarak seçildi.

Türlerin derişim optimizasyonunda da belirtildiği gibi, yine Niu ve arkadaşlarının yaptığı aynı çalışmada yakalama antikoru ile antijen ve antijen ile ikincil antikorun bağlanma afinitesine inkübasyon süresinin etkisi çalışılmıştır. Her iki çalışma için de süre aralıkları 15-120 dakika arasındadır. Yayında verilmiş olan zamana karşı floresans yoğunluk grafikleri incelendiğinde ilk grafik için (kaplama antikoru ile ilgili antijen etkileşimi) 60 dakikadan sonra çok az bir artışın olduğu sonrasında ise floresans yoğunluk değerinin artmadığı gözlenmiş ve bu sebepten optimum süre 75 dakika olarak çalışılmıştır. İkinci grafik için (antijen ile ikincil

antikor etkileşimi) yine 60 dakikadan 90 dakikaya kadar çok az bir artışın olduğu sonrasında ise floresans yoğunluk değerinin artmadığı gözlenmiş ve bu sebepten optimum süre 90 dakika olarak çalışılmıştır (Niu vd., 2011).



Şekil 4.5. Farklı inkübasyon süreleri altında Anti-HbA1c & Ag etkileşimine bağımlı floresans yoğunlukları (Hata çubukları 3 ölçüm sonrası elde edilmiştir).

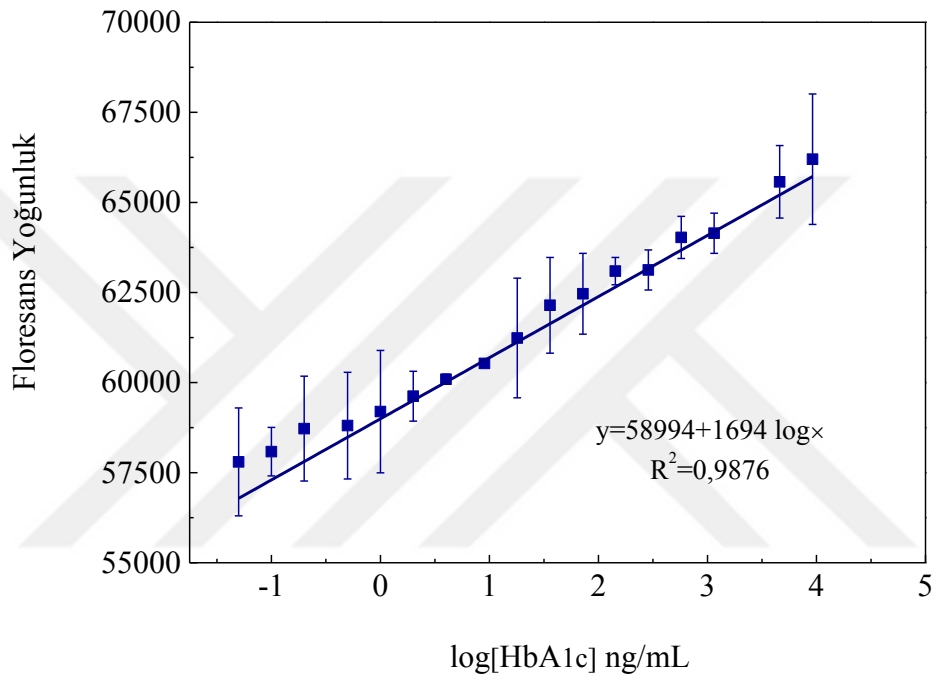
4.3. TR-FIA Yöntemi ile HbA1c (ng/mL) Tayini İçin Doğrusal Çalışma Aralığının Belirlenmesi

Bölüm 3.13’de anlatıldığı gibi elde edilen optimum veriler ile immünoassay prosedürü oluşturuldu. Buna göre; 5 µg/mL derişimde HbA1c-Ab1 ile mikrotiter plateler kaplandı. Kuyucuklar bloke edildikten sonra antijenler ile muamele edildi. Farklı derişimlerde hazırlanan (0,05-9200 ng/mL) HbA1c-Ag çözeltileri HbA1c-Ab1 kaplı platelere her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde ilave edildi ve 37°C’de kuyucuklar inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı.

Antikor ile antijenin etkileşimi gerçekleşikten sonra 400 ng/mL derişimde B-HbA1c-Ab2 kuyucuklara eklendi ve inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı.

SA(BSA)-BHHCT-Eu(III) etiket çözeltisi 1:50 oranında seyreltilerek her bir kuyucuğa 15 µL olacak şekilde ilave edildi ve 37°C’de bir saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı.

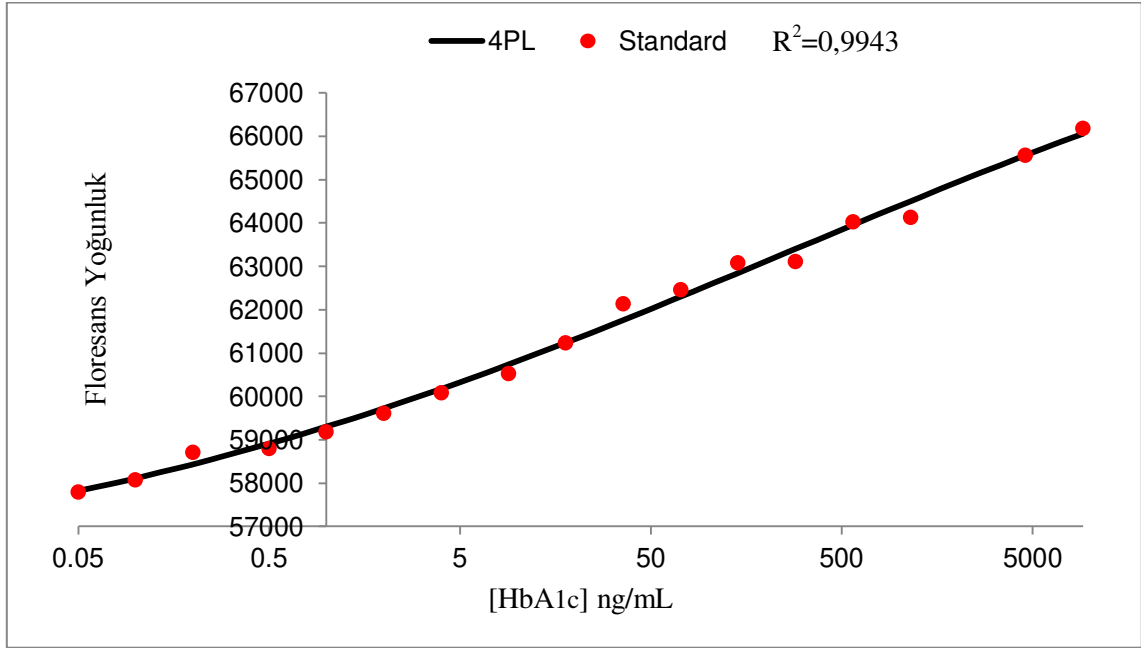
Deney aşamaları tamamlandıktan sonra TR-FIA ölçümleri alındı. Elde edilen floresans yoğunluk değerleri farklı HbA1c derişimlerine karşı grafiğe geçirildi.



Şekil 4.6. HbA1c biyomolekülü için kalibrasyon grafiği (Hata çubukları 5 ölçüm sonrası elde edilmiştir).

İmmunoassayler gibi ligant bağlama assaylerinde kalibrasyon eğrileri, genellikle, analit derişimi ve cevap arasındaki lineer olmayan ilişki ile açıklanır. Tipik olarak, cevap derişim ile sigmoidal bir ilişki sergiler. Bu tip kalibrasyon eğrileri için kabul edilen model 4-parametre lojistik (4-PL) (Findlay ve Dillard, 2007).

İmmunoassay prosedürleri de ligand bağlama çalışmaları içerdiğinden verilerin 4-PL ile değerlendirilmeleri daha doğru sonuçlar sunar. Bunun için kalibrasyon çalışması sonucunda elde edilen veriler bu şekilde grafiğe geçirildi ve daha doğrusal bir grafik elde edildiği görüldü. (Şekil 4.7). Buna göre HbA1c için çalışma aralığının 0,05-9200 ng/mL olduğu görüldü.



Şekil 4.7. HbA1c biyomolekülü için 4-parameter fit kalibrasyon grafiği.

4.4. TR-FIA Yöntemi ile %HbA1c Tayini İçin Doğrusal Çalışma Aralığının Belirlenmesi

HbA1c tayinine yönelik çalışmalar incelendiğinde, genellikle yüzde olarak çalışıldığı görüldü. Bölüm 3.14'te anlatıldığı gibi % HbA1c tayini yapıldı. Elde edilen kalibrasyon eğrisi ayrıca gerçek numunelerde % HbA1c tayini için kullanıldı.

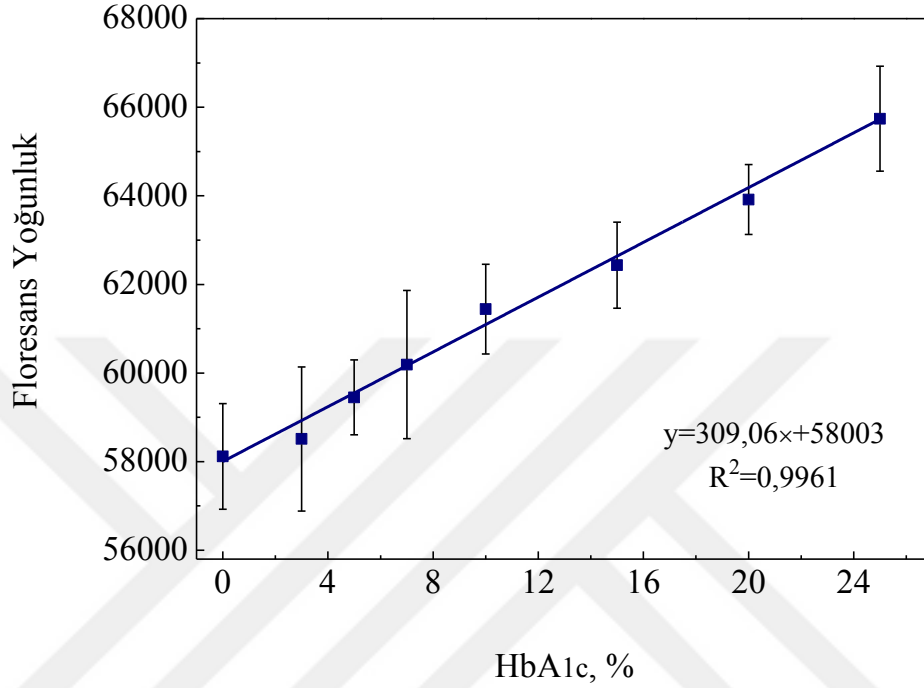
Polistiren 96-kuyucuklu mikrotiter platelere, 5 µg/mL derişimde Hb-Ab1 çözeltisi her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde ilave edildi. Hazırlanan plateler 37°C'de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrasında bağlanmamış antikorları ortamdan uzaklaştırmak için yıkama çözeltisi ile yıkama yapıldı. Son işlem olarak 300 µL bloke edici çözelti kuyucuklara eklendi ve 37°C'de bir saat inkübasyona bırakıldı.

Farklı yüzdelerde hazırlanan (% 0-25) HbA1c/HbA0 çözeltileri yukarıda hazırlanan platelere her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde ilave edildi ve 37°C'de bir saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda yıkama çözeltisi ile yıkama yapıldı.

Farklı yüzdelerdeki HbA1c/HbA0 ile muamele edilmiş kuyucuklara 400 ng/mL 100 µL B-HbA1c-Ab2 eklendi. 37°C'de bir saat inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon sonunda yıkama çözeltisi ile yıkama yapıldı.

SA(BSA)-BHHCT-Eu(III) etiket çözeltisi 1:50 oranında seyreltilerek her bir kuyucuğa 100 µL olacak şekilde ilave edildi ve 37°C'de bir saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda

yıkama çözeltisi ile yıkama yapıldı ve TR-FIA ölçümü alındı. Okunan floresans yoğunluk değerleri % HbA1c/HbA0 değerlerine karşı grafiğe geçirildi ve standart bir eğri elde edildi.



Şekil 4.8. HbA1c biyomolekülü için TR-FIA yöntemi ile % kalibrasyon grafiği (Hata çubukları 4 ölçüm sonrası elde edilmiştir).

Şekil incelendiğinde, % HbA1c için çalışma aralığının % 0-25 olduğu görüldü. Literatürde HbA1c seviyesi için klinik olarak referans değerleri % 5-20 aralığında kabul edilmiş ve normal değerlerin %4-6 arasında değişebileceği belirtilmiştir (Pundir ve Chawla, 2014). Bu sebepten, tez kapsamında, elde edilen çalışma aralığının uygun olduğu söylenebilir.

HbA1c biyomolekülünün tayini için yapılan kalibrasyon çalışmalar aşağıdaki tabloda özetlenmiştir; ancak mevcut türün tayini için bu yöntemin kullanıldığı çalışmalara rastlanmamıştır.

Çizelge 4.1. Elde edilen sonucun diğer çalışmalar ile karşılaştırılması.

Yöntem	Etiket	İmmunoassay formatı	Çalışma Aralığı	Literatür
Floroimmüno assay/ Elektrokimyasal	CdTe kuantum dotlar (ODs)	Protein A/ Anti HbA1c antikor/ HbA1c/ QD etiketli anti HbA1c antikor	% 4-16	Chopra vd. (2013).
İyon değiştirme kromatografisi/ Elektrokimyasal	Ferrosen (Fc)	HbA1c/ Fc etiketli anti-insan Hb antikor	% 4,0-12,6	Tanaka vd. (2009).
Borarat afinite immuoassay /Lüminesans	AP	Bakteriyel Manyetik partikül/boronik asit/HbA1c/ AP etiketli anti-Hb antikor	10-104 ng/mL	Tanaka ve Matsunaga (2001).
ELISA/ Amperometrik	Glukoz oksidaz (GOx)	Anti-Hb antikor/Hb-HbA1c/anti- HbA1c antikor/Biyotinlenmiş Ig G/Avidin-GOx kongugatı	% 0-25	Stollner vd. (2002).
Borarat afinite immuoassay/ Amperometrik	Ferrosen- monokarboksilik asit(Fc-COOH)	HbA1c/Fc-COOH etiketli anti- insan Hb Ig G	500 µg/mL'ye kadar	Tanaka vd. (2007).
ELISA/ Lüminesans	Alkalen fosfataz (AP)	Au.kitosan.Fe3O4 mikroküre/HbA1c antikor/HbA1c/Hb antikor/AP etiketli Ig G antikor	0,05-1,5 µg/mL	Chen vd. (2011).
Potansiyometrik	Etiketsiz	Nanopartikül (SAM)/ anti-HbA1c antikor	50-170,5 ng/mL	Xue vd. (2011).
ELISA/ HPLC	Boronik asit	Polidimetilsiloksan (Sandviç immunoassay)/anti-HbA1c antikor	10-100 ng/mL	Chen vd. (2012).
Elektrokimyasal (piezosensör)/ İmmunoassay	Ferrosenboronik asit (FcBA)	FcBa etiketli anti-HbA1c antikor	% 0-20	Halamek vd. (2007).
Elektrokimyasal	Ferrosenboronik asit (FcBA)	ZrO2 nanopartikül anti-HbA1c antikor/FcBA/ HbA1c	% 6,8-14	Liu vd. (2006).
Elektrokimyasal/ Kemilüminesans Biyosensör	Etiketsiz	3-Aminofenilboronik asit (3- APBA)/SAM/ HbA1c	% 2,5-17	Ahn vd. (2016).
Zaman gecikmeli Floroimmunoassay (TR-FIA)	SA(BSA)-BHHCT- Eu(III)	Anti-Hb antikoru ya da anti-HbA1c antikoru/HbA1c/biyotinlenmiş anti- HbA1c antikoru/SA(BSA)(BHHCT)-Eu+3	% 0-25 0,05-9200 ng/mL	Bu çalışma.

4.5 %HbA1c Tayini için Tekrarlanabilirlik Çalışması

Tez kapsamında oluşturulan immünoassayın tekrarlanabilirliği % 5, % 10 ve % 20 HbA1c standartları için floresans yoğunluk değerlerinin kuyucuktan kuyucuğa ve plateden plateye karşılaştırılmasıyla çalışıldı. Elde edilen ölçümlerin bağıl standart sapmaları (BSS) % olarak hesaplandı ve çizelge 4.2’de sunuldu.

Çizelge 4.2. Tekrarlanabilirlik Çalışmaları.

HbA1c (%)	BSS %	
	kuyucuktan kuyucuğa (n=8)	plateden plateye (n=3)
5	2,82	6,31
10	2,20	3,74
20	4,58	6,31

Çizelge incelendiğinde, kuyucuktan kuyucuğa ve plateden plateye elde edilen % BSS değerlerinin oldukça düşük olması, assay formatının tekrarlanabilir olduğunu gösterir.

4.6 ELISA Yöntemi ile % HbA1c Tayini İçin Doğrusal Çalışma Aralığının Belirlenmesi

Tez kapsamında, diyabet tanısında kullanılan bir parametre olan HbA1c’nin tayininin gerçek numunelerde yapılması amaçlandı. Bunun için elde edilen sonuçların standart bir yöntemle karşılaştırılması gereklidir. Yöntem olarak ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) seçildi ve ilk olarak kalibrasyon eğrisi oluşturuldu.

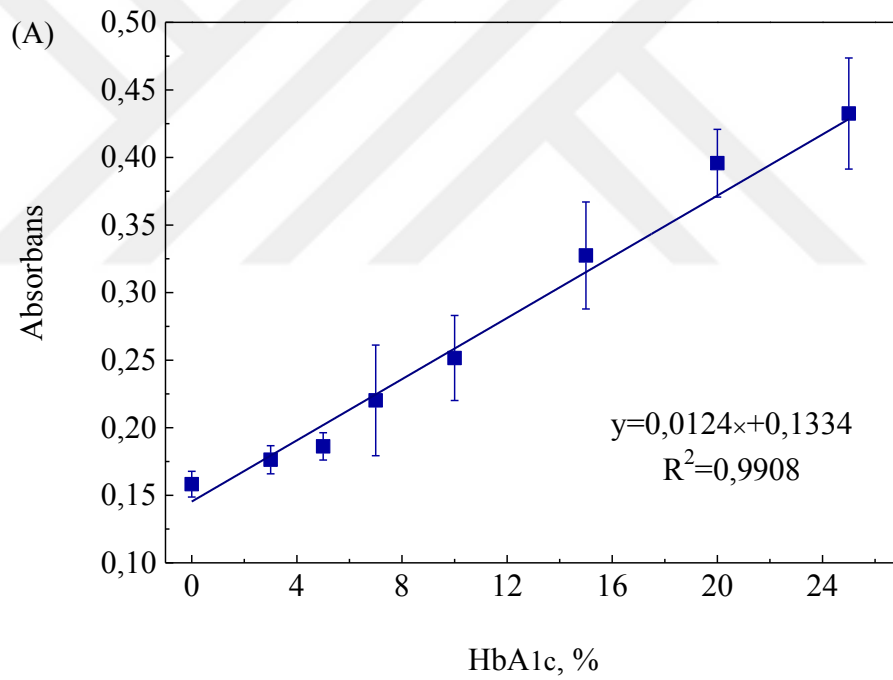
Bölüm 3.16’da anlatıldığı gibi polistiren 96-kuyucuklu mikrotiter platelere, 5 µg/mL derişimde Hb-Ab1 çözeltisi her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde ilave edildi. Hazırlanan platerler 37°C’de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrasında bağlanmamış antikorları ortamdan uzaklaştırmak için yıkama çözeltisi ile yıkama yapıldı. Son işlem olarak 300 µL bloke edici çözelti kuyucuklara eklendi ve 37°C’de bir saat inkübasyona bırakıldı.

Farklı yüzdelerde hazırlanan HbA1c/HbA0 çözeltileri yukarıda hazırlanan platelere her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde ilave edildi ve 37°C’de bir saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda yıkama çözeltisi ile yıkama yapıldı.

Farklı yüzdelerdeki HbA1c/HbA0 ile muamele edilmiş kuyucuklara 400 ng/mL 100 µL B-HbA1c-Ab2 eklendi. 37°C’de bir saat inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon sonunda yıkama çözeltisi ile yıkama yapıldı.

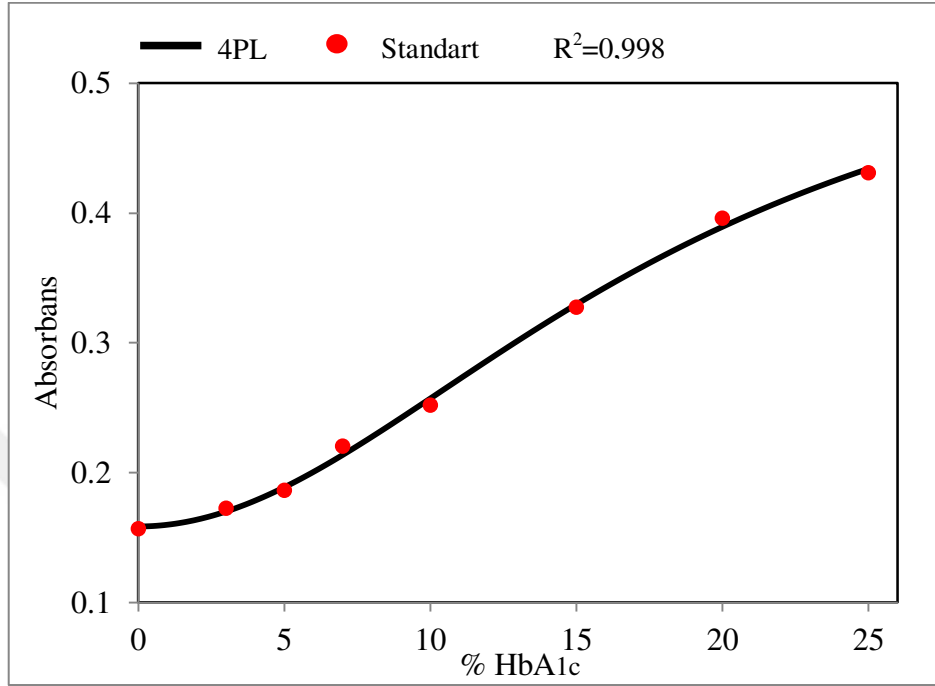
Etiket olarak kullanılan SA-HRP konjugat çözeltisi her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde eklendi. İnkübasyon işleminden sonra yıkama çözeltisi ile yıkama yapıldı.

3,3',5,5'-Tetrametilbenzidin (TMB) substrat çözeltisi her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde ilave edildi ve renk değişiminden sonra 50 µL sonlandırma çözeltisinin kuyucuklara eklenmesi ile reaksiyon sonlandırıldı. Mikrotiter plateler, microplate okuyucuya yerleştirildi ve 450 nm’de absorbans değerleri okundu. Okunan absorbans değerleri % HbA1c/HbA0 değerlerine karşılık grafiğe geçirildi ve standart bir eğri elde edildi (Şekil4.8).



Şekil 4.9. (A) HbA1c biyomolekülü için ELISA yöntemi ile % kalibrasyon grafiği (Hata çubukları 4 ölçüm sonrası elde edilmiştir). (B) HbA1c biyomolekülü için ELISA yöntemi ile 4-PL kalibrasyon grafiği.

(B)



Şekil 4.9. (A) HbA1c biyomolekülü için ELISA yöntemi ile % kalibrasyon grafiği (Hata çubukları 4 ölçüm sonrası elde edilmiştir). (B) HbA1c biyomolekülü için ELISA yöntemi ile 4-PL kalibrasyon grafiği (devamı).

4.7. Kan Numunelerinde % HbA1c Tayininin Yapılması

TR-FIA yöntemiyle kan numunelerinde % HbA1c tayininin yapılması

Tez çalışması kapsamında oluşturulan mevcut immünoassay yönteminin gerçek numunelerde HbA1c tayini için kullanılıp kullanılamayacağı araştırıldı. Bölüm 3.17’de anlatıldığı gibi antijen çözeltisi olarak kan ve serum örnekleri kuyucuklara ilave edildi.

Ölçüm sonucunda, elde edilen veriler, standart % HbA1c eğrisinde yerine konarak numunelerdeki % HbA1c miktarı belirlendi.

ELISA yöntemiyle kan numunelerinde % HbA1c tayininin yapılması

Aynı işlem ELISA prosedürü ile tekrarlandı ve numunelerdeki % HbA1c miktarı hesaplandı. Elde edilen tüm sonuçlar çizelge 4.3’te sunuldu.

Çizelge 4.3 Kan numunelerinde standart bir yöntem ile karşılaştırmalı % HbA1c analizi.

Kan Numuneleri	% HbA1c			
	TR-FIA*	ELISA	BSS (%)	Geri Kazanım (%)
Numune a	4,23±0,06	4,44	1,30	95,27
Numune b	5,06±0,31	4,73	6,60	106,98
Numune c	6,17±0,33	6,18	5,40	99,84
Numune d	8,38±0,40	8,25	4,50	101,58

*Sonuçlar üç numune için ortalama±ts√N olarak verilmiştir (%97 güven seviyesi),

Tablo incelendiğinde, tez kapsamında geliştirilen yöntem ve ELISA yöntemi arasında uyum olduğu söylenebilir ve % BSS değerleri 1,30-6,60 arasındadır. Böylelikle, söz konusu yöntemin (TR-FIA) kan örneklerinde HbA1c tayini için başarılı bir şekilde kullanılabileceği yorumu yapılabilir.

5. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında, biyoetiket olarak kullanımı mevcut olan SA(BSA)-BHHCT-Eu(III) kompleksi hazırlandı ve diyabetin tanı ve tedavi sürecinde kullanılmak üzere önemli bir parametre olan HbA1c tayini için yeni bir TR-FIA tekniği geliştirildi. Bu amaçla ilk olarak ticari olarak temin edilen BHHCT ligandı, SA(BSA) ile konjugat oluşturuldu ve konjugat Eu(III) ile etiketlendi.

- ✓ Hazırlanan etiketin (SA(BSA)-BHHCT-Eu(III)) seyrelme miktarı belirlenen prosedür çerçevesinde çalışıldı. Elde edilen verilerin floresans yoğunluk ve seyrelme oranına karşı grafiğe geçirilmesi ile SA(BSA)-BHHCT-Eu(III) etiketi için optimum seyrelmenin 1:50 oranında olduğuna karar verildi.
- ✓ 96 kuyucuklu mikrotiter plateye kaplanan ilgili antikorun (HbA1c-Ab1) miktarı belirli bir format çerçevesinde optimize edildi. Veriler ışığında 5 µg/mL HbA1c-Ab1 en uygun derişim olarak seçildi.
- ✓ HbA1c-Ab1 ile eş zamanlı olarak, antijene bağlanması istenilen biyotinlenmiş ikincil antikorun da (B-HbA1c-Ab2) miktarı optimize edildi. B-HbA1c-Ab2 için optimum derişim 400 ng/mL olarak belirlendi.
- ✓ Biyolojik türlerin kendi aralarında etkileşim süresi miktarı çalışıldı. HbA1c-Ab1 ile HbA1c-Ag ve HbA1c-Ag ile B-HbA1c-Ab2 arasında en iyi etkileşimin 60 dakikada olduğu gözlemlendi.
- ✓ HbA1c biyomolekölü için doğrusal çalışma aralıklarının % 0-25 ve 0,05-9200 ng/ml olduğu görüldü.
- ✓ Oluşturulan immunoassay yöntemi kullanılarak, gerçek numunelerde başarılı bir şekilde HbA1c'nin tayininin yapılabileceği gösterildi. Sonuçların ise ELISA yöntemi ile uyumluluğu gözlemlendi.

Sonuç olarak tez kapsamında oluşturulan immunoassay prosedürünün HbA1c tayini için geniş bir çalışma aralığına sahip, tekrarlanabilir ve güvenilir bir yöntem olduğu görüldü.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., (2003), Cellular and Molecular Immunology, Elsevier, United States, s.535.
- Ahn, K.S., Lee, J. H., Park, J. M., Choi, H. N., Lee, W. Y., (2016), Luminol chemiluminescence biosensor for glycated hemoglobin (HbA1c) in human blood samples, *Biosensors and Bioelectronics* 75, s. 82-87.
- Ankelo, M., Karlsson, A.W., Ilonen, J., Knip, M., Savola, K., Kankaanpa, P., Merio, L., Siitari, H., Hinkkanen, A., (2003), Time-resolved Fluorometric Assay for Detection of Autoantibodies to Glutamic Acid Decarboxylase (GAD65), *Clinical Chemistry* 49, s. 908-915.
- Armelaio, L., Quici, S., Barigelletti, F., Accorsi, G., Bottoro, G., Cavazzini M., ve Tondello, E., (2010), Design of luminescent lanthanide complexes; From molecules to highly efficient photo-emitting materials, *Coordination Chemistry Reviews* 254, s. 487-505.
- Ayodele, O. E., Alebiosu, C. O., Salako, B. L., (2004), Diabetic nephropathy-A review of the natural history, burden, risk factors and treatment, *Journal of the National Medical Association* 11, s. 1445-1454.
- Bertoft, E., Eskola, J.U., Niintii, V., Liivgren, T., (1984), Competitive solid-phase immunoassay of testosterone time-resolved fluorescence, *FEBS* 173, s. 213-216.
- Benjamini, E., Sunshine, G., Leskowitz, S., (1996), Immunology: A short Course, Wiley-Liss, New York, s. 57-75.
- Braga, F., Dolci, A., Montagnana, M., Pagani, F., Paleari, R., Guidi G.C., Mosca, A., Panteghini, M., (2011), Revaluation of Biological Variation of Glycated Hemoglobin (HbA1c) Using an Accurately Designed Protocol and an Assay Traceable to the IFCC Reference Aystem, *Clinica Chimica Acta* 412, s. 1412-1416.
- Chawla, S., Pundir, C. S., (2012) An amperometric Hemoglobin A1c Biosensor Based on Immobilization of Fructosyl Amino Acid Oxidase onto Zinc Oxide Nanoparticles-Polypyrrole Film, *Analytical Biochemistry* 430, s. 156-162.
- Chen, S.P., Yu, X.D., Xu, J.J., Chen, H.Y., (2011), Gold nanoparticles-coated magnetic microspheres as affinity matrix for detection of hemoglobin A1c in blood by microfluidic immunoassay, *Biosensors and Bioelectronics* 26, s. 4779-4784.
- Chen, H. H., Wu, C., Tsai, M. L., Huang, Y. J., Chen, S.P., (2012), Detection of Total and A1c-Glycosylated Hemoglobin in Human Whole Blood Using Sandwich Immunoassaya on Polymethylsiloxane-Based Antibody Microarrays, *Analytical Chemistry* 84, s. 8635-8641.
- Chopra, A., Tuteja, S., Sachdeva, N., Bhasin, K. K., Bhalla, V., Suri, C. R., (2013), CdTe nanobioprobe based optoelectrochemical immunodetection of diabetic marker HbA1c, *Biosensors and Bioelectronics* 44, s. 132-135.
- Connally, R., Veal, D., Piper, J., (2004), Time-Resolved Fluorescence Microscopy Using an Improved Europium Chelate BHHST for the In Situ Detection of Cryptosporidium and Giardia, *Microscopy Research and Technique* 64, s. 312-322.
- Daijo, J.E., Sportsman, J.R., (1999), A time-resolved fluorescence immunoassay for insulin in rodent plasma, *journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 19, s. 335-342.

KAYNAKLAR DİZİN (devam)

- Dandliker, W.B., Kelly, R.J., Danliker, J., Farquar, J., Levin, J., (1973), *Immunochemistry* 10, s. 219-227.
- Darwish, I.A., (2006), *Immunoassay Methods and their Application in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances*, *International Journal of Biomedical Science*, 2, s. 217-235.
- Deng, W., Jin, D., Drozdowicz-Tomsia, K., Yuan, J., and Goldys, E., M., (2010), Europium chelate (BHHCT-Eu³⁺) and its metal nanostructure enhanced luminescence applied to bioassays and time-gated bioimaging. *Langmuir*, 26(12), s. 10036-10043.
- Dickson, E. F. G., Pollak, A., Diamandis, E. P., (1995 a), *Ultrasensitive Bioanalytical assays using Time-Resolved Fluorescence Detection*, *Pharmac.Ther.* 66, s. 207-235.
- Dickson E.G., Pollak A., ve Diamandis E.P. (1995 b), *Time-resolved detection of lanthanide luminescence ultrasensitive bioanalytical assays* *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.*, 27, s. 3-19.
- Fernandeza, M.A., Romero, M.J., Bravo, M.J.J, Samper, C.M.J., Simarro, L.F., Unanua, P.A., Iriso, I.J., (2015), *Glycemic control and use of A1c in primary care patients with type 2, diabetes mellitus*, *Primary Care Diabetes* 9, s.385-391.
- Findlay, J. W. A., Dillard, R. F., (2007), *Appropriate Calibration Curve Fitting In Ligand Binding Assays*, *The AAPS Journal* 9, s. 260-267.
- Fowler, M. J., Wong, K. Y. D., Halsall, H. B., Heineman, W. R., (2008), *Recent development in electrochemical immunoassays and immunosensors, electrochemical sensors, biosensors and their biomedical application*, s. 115-143.
- Geisberger, R., Lamers, M., Achatz, G., (2006), *The riddle of the dual expression of IgM and IgD*, *Immunology* 118, s. 429-437.
- Gerald, B. P., Jeffrey, B. L., Wetzler, L. M., (2004), *Immunology, Infection, and Immunity*, *Immunology and Cell Biology* 82, s.651.
- Guyton, A.,C, Hall, J.E., (2006) Textbook of Medical Physiology, Eleventh edition. Philadelphia; Saunder (Elsevier), s. 45.
- Gonzalez, M., Bagatolli, L. A., Echabe, I., Arrondo, J. L. R., Argaran, C. E., Cantor, C. R., Fidelio, G. D., (1997), *Interaction of Biotin with Streptavidin*, *The Journal of Biological Chemistry* 272, (17), s. 11288-11294.
- Gülmezoğlu, E.; Ergüven, S., (1994) İmmünoloji, Hacettepe Taş Kitapçılık Ltd. Şti. Ankara, s. 308.
- Hai, X., Tan, M., Wang, G., Ye, Z., Yuan, J., Matsumoto, K., (2004), *Preparation and a Time-Resolved Fluoroimmunoassay Application of New Europium Fluorescent Nanoparticles*, *Analytical Sciences* 20, s.245-246.
- Hagan, A. K., Zuchner, T., (2011), *Lanthanide-based time-resolved luminescence immunoassays*, *Anal.Bioanal. Chem.* 400, s.2847-2864.
- Halamek, J., Wollenberger, U., Stöcklein, W., Scheller, F.W., (2007), *Development of a biosensor for glycated hemoglobin*, *Electrochimica Acta* 53, s. 1127-1133.

KAYNAKLAR DİZİN (devam)

- Halifeoğlu, İ., Karataş, F., Çolak, R., Canatan, H., Telo., S., (2005), Tip 2 Diyabetik Hastalarda Tedavi Öncesi ve Tedavi Sonrası Oksidan ve Antioksidan Durum, Fırat Tıp Dergisi, 10, s.117-122.
- Handl, H.L., Gillies, R. J. T., (2005), Lanthanide-based luminescent assays for ligand-receptor interactions, Life Sciences 77, s. 361-371.
- Harma, H., Pelkkikangas, A-M., Soukka, T., Huhtinen, P., Hupalahti, S., Lövgren, T., (2003), Sensitive miniature single-particle immunoassay of prostate-specific antigen using time-resolved fluorescence, Analytica Chimica Acta 482, s. 157-164.
- Harvey R., Ferrier D., (2007), Lippincott's Illustrated Rewievs, Wolters Kluwer, China.
- Hawcroft, D., Hector, T., Rowell, F.,(1984), Quantitative Bioassay, Wiley, New York.
- Hemilia, I., (1985), Fluoroimmunoassays and Immunofluorometric Assays, Clinical Chemistry, s.359-370.
- Hemilia, I., Laitala, V., (2005), Progress in Lanthanide as Luminescent Probes, Journal of Fluorescence 15, s.529-541.
- Hou, J.Y., Liu, T.C., Lin, G.F., Li, Z.X., Zou, L.P., Li, M., Wu, Y.S., (2012), Development of an immunomagnetic bead-based time-resolved fluorescence immunoassay for rapid determination of levels of carcinoembryonic antigen in human serum, Analytica Chimica Acta 734, s. 93-98.
- <http://www.seracare.com/news-events/kpl>
- Hu, N., Rusling, J.F., (1997), Electrochemistry and Catalysis with Myoglobin in Hydrated (Polyester sulfonic acid) ionomer Films, Langmuir 13, s. 4119-4125.
- Hughes, C.R., (1976), A rewiev of structure and Function, Membrane Glycoproteins 1st Edition, Butterworth-Heinemann, s.376.
- Järvenpää, M-L., Kuningas, K., Niemi, I., Hedberg, P., Ristiniemi, N., Pettersson K., Lövgren, T., (2012), Rapid and sensitive cardiac troponin I immunoassay based on fluorencent europium(III)-chelate-dyed nanoparticles, Clinica Chimica Acta 414, s. 70-75.
- Jiang, L., Wu, J., Wang, G., Ye, Z., Zhang, W., Jin, D., Yuan, J., Piper, J., (2010), Development of a visible-light-Sensitized Europium Complex for Time-Resolved Fluorometric Application, Analytical Chemistry 82, s. 2529-2535.
- John, G.W., Mosca, A., Weykamp, C.W., Goodall, I., (2007),HbA1c standardisation: history, science and politics, Clinical Biochemistry 58, s.163-171.
- Keltanen, T., Sajantila, A., Valonen, T., Vanhala, T., Lindroos, K., (2013), Measuring postmortem glycated hemoglobin-A comparison of three methods, Legal Medicine 15, s. 72-78.
- Kılıçturgay, K., (1994), İmmünolojiye Giriş, Güneş ve Nobel Tıp Kitapevleri, 3. Baskı, Bursa, s., 155.
- Kimura, H., Yuan, J., Wang, G., Matsumoto, K., Mukaida, M., (1999), Highly Sensitive Quantitation of Methamphetamine by Time-Resolved Fluoroimmunoassay Using a New Europium Chelate as a Label, Journal of Analytical Toxicology 23, s. 11-16.

KAYNAKLAR DİZİN (devam)

- Kimura, H., (1998), New Tetradentate β -diketonate-Europium Chelate That Can Be Covalently Bound To Proteins For Time-Resolved Fluoroimmunoassays, *Analytical Chemistry* 70, s. 596-601.
- Lenters- Westra, E., Schindhelm, R. K., Bilo, H. J., Slingerland, R. L., (2013), Hemoglobin A1c; Historical overview and current concepts, *Diabetes Research and Clinical Practise* 99, s. 75-84.
- Liang, Q. N., hen, P. Q., Liu, T. C., Zhou, J. W., Chen, J. J., Wu, Y. S., (2015), Development of a time-resolved fluoroimmunoassay for Epstein-Barr virüs viral capsid antigen IgA antibody in human serum, *Journal of Virological Methods* 222, s. 16-21.
- Lin. Z., (2004) Time-Resolved Fluorescence-Based Europium-Derived Probes for Peroxidase Bioassays, Citrate Cycle Imaging and Chirality Sensing, *Universität Regensburg, der Fakultät Chemie und Pharmazie*.
- Liu, T.C., Chen, M.J., Ren, Z., Hou, J. Y., Lin, G. F., Wu, Y. S., (2014), Development of an improved time-resolved fluoroimmunoassay for simultaneous quantification of C-peptide and insülin in human serum, *Clinical Biochemistry* 47, s. 439-444.
- Liu, S., Wollenberg, U., Katterle, M., Scheller, F. W., (2006), Ferroceneboronic acid-based amperometric biosensor for glycated haemoglobin, *Sensors and Actuators* 113, s. 623-629.
- Liu, L., Hood, S., Wang, Y., Bezverkov, R., Dou, C., Datta, A., Yuan, C., (2008), Direct Enzymatic Assay for % HbA1c in human whole blood samples, *Clinical Biochemistry* 41, s. 576-583.
- Lyons, T., Basu, A., (2012) Biomarkers in diabetes: Hemoglobin A1c vascularand tissue markers, *Translational Research* 159, s. 303-311.
- Mikkelsen, S.R., Corton, E., (1960), Bioanalytical Chemistry, John Wiley, United States of America.
- Mongia, S.K., Little, R.R., Rohlfing, C.L., Hanson, S., Roberts, R.F., Owen, W.E., D'Costa, M.A., Reyes, C.A., Luzzi, VI., Roberts, W.L., (2008) Effects of hemoglobin C and S traits on the results of 14 commercial glycated hemoglobin assays, *American Journal of Clinical Pathology* 130, s.136-140.
- Niu, C-G., Liu, J., Quin, P-Z., Zeng, G-M., Ruan, M., He, H., (2011), A novel bifunctional europium chelate applied in quantitative determination of human immunoglobulin G using time-resolved fluoroimmunoasay, *Analytical biochemistry* 409, s. 244-248.
- Park, J., Lertdumrongluk, P., Molnar, M. Z., Kovesdy, C. P., Zadeh, K. K., (2012) Glycemic Control in Diabetic Dialysis Patients and the Burnt-Out Diabetes Phenomenon, *Current Diabetes Reports* 12, s. 432-439.
- Pravatmuang, P., Sae-Ngow, B., Whanpuch, T., Leowattana, W., (2001), Effect of HbE and HbH on HbA1c level by ionic Exchange HPLC comparing to immunoturbidimetry, *Clinica Chimica Acta* 313, s. 171-178.
- Pribly, J., Skladal, P., (2006) Development of a combined setup for simultaneous detection of total and glycated hemoglobin content in blood samples, *Biosensors and Bioelectronics* 21, s. 1952-1959.

KAYNAKLAR DİZİN (devam)

- Price, C., Newman, D., (1991), In Principles and Practice of Immunoassay, Price, C., Newman, D., Eds., Macmillan, New York.
- Pundir, C., Chawla, S., (2014) Determination of glycated hemoglobin with special emphasis on biosensing methods, *Analytical Biochemistry* 444, s. 47-56.
- Raile, K., Galler, A., Hofer, S., Herbst, A., Dunstheimer, D., Busch, P., Holl, R. W., (2007), Diabetic Nephropathy in 27,805 Children, Adolescents, and Adults with Type 1 Diabetes, *Diabetes Care* 10, s. 2523-2528.
- Randie, R.L., William L.R., (2009) A Review Of Variant Hemoglobins Interfering With Hemoglobin A1c Measurement.
- Richardson, F.S., (1982), Terbium(III) and Europium(III) Ions as Luminescent Probes and Stains for Biomolecular System, *Chemical Reviews* 82, s. 541-552.
- Roit, I., Brostoff, J., Male, D., (1998), Immunology, Mostby International Ltd., London, s. 563.
- Rother, K.I., (2007), Diabetes Treatment-Bridging the Divide, *The New England Journal of Medicine* 356, s. 1499-1501.
- Skoog, D.A., Holler, F. J., Nieman T.A., (1998), Principles of Instrumental Analysis, United States of Amerika.
- Stollner, D., Stöcklein, W., Scheller, F., Warsinke, A., (2002), Membrane-immobilized haptoglobin as affinity matrix for a hemoglobin-A1c immunosensor, *Analytica Chimica Acta* 470, s. 111-119.
- Song, S.Y., Yoon, H. C., (2009), Boronic acid-modified thin film interface for specific binding of glycated hemoglobin (HbA1c) and electrochemical biosensing, *Sensors and Actuators B: Chemical* 140, s. 233-239.
- Tanaka, T., Matsunaga, T., (2001), detection of HbA 1c by boronate affinity immunoassay using bacterial magnetic particles, *Biosensors & Bioelectronics* 15, s. 1089-1094.
- Tanaka, T., Tsukube, S., Izawa, K., Okochi, M., Lim, T-K., Watanabe, S., Harada, M., Matsunaga T, (2007), Electrochemical detection of HbA 1c, a marker for diabetes, using a flow immunoassay system, *Biosensors & Bioelectronics* 22, s. 2051-2056.
- Tanaka, T., Kojiro, I., Okochi, M., Lim, T-K., Watanabe, S., Harada, M., Matsunaga T, (2009), On-chip type cation-exchange chromatography with ferrocene-labeled anti-hemoglobin antibody and electrochemical detector for determination of haemoglobin A 1c level, *analytica Chimica Acta* 638, s. 186-190.
- Tierney, L. M., McPhee, S. J., Papadakis, M. A., (2002), Current medical Diagnosis & Treatment, International edition, New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill, s. 1203-1215.
- Uysal, Y., Akpınar, E., (2013) Tip 2 Diyabetli Hastalarda Hastalık Algısı ve Depresyon, *Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 38, s. 31-40.
- Westra, E.L., Schindhelm, R.K., Bilo, H.J., Slingerland R.J., (2013), Hemoglobin A1c: Historical overview and current concepts, *Diabetes Research and Clinical Practice* 99, s.75-84.

KAYNAKLAR DİZİN (devam)

- Weykamp, C.W., Penders, T.J., Muskiet, F.A., (1993), Influence of hemoglobin variants and derivatives on glycohemoglobin determination, as investigated by 102 laboratories using 16 methods, *Clinical Chemistry* 39, s. 1717-1740.
- Wu,F., Zhang, C., (2002), A new europium β -diketonate chelate for ultrasensitive time-resolved fluorescence immunoassays, *Analytical Biochemistry* 311, s. 57-67.
- Xue, Q., Bian, C., Tong, J., Sun, J., Zhang, H., Xia, S., (2011), A micro potentiometric immunosensor for hemoglobin-A1c level detection based on mixed SAMs wrapped nanospheres array, *Biosensors & Bioelectronics* 26, s. 2689-2693.
- Yakovleva J., ve Emneus J. 2008. *Electrochemical Immunoassays Bioelectrochemistry: Fundamentals, Experimental Techniques and Applications* Edited by Bartlett P.377-410.
- Yan, F., Zhou, J., Ju, H., Hou, X., (2005), Flow Injection Immunoassay For Carcinoembryonic Antigen Combined With Time-Resolved Fluorometric Detection, *Journal of Immunological Methods* 305, s. 120-127.
- Yeğen, O., (1990), Temel Immunoloji ve İmmün Eksikli Hastalıkları, Palme Tıp Kitapevi, Ankara.
- Yuan, J., Matsumoto, K., (1997), Synthesis of a new tetradentate β -diketonate-europium chelate and its application for time-resolved fluorimetry of albumin, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 15, s.1397-1403.
- Yuan, J., Matsumoto, K., Kimura, H., (1998), New Tetradentate β -diketonate-Europium Chelate That Can Be Covalently Bound To Proteins For Time-Resolved Fluoroimmunoassays, *Analytical Biochemistry* 70, S. 596-601.
- Yuan, J., Matsumoto, K., (1996), Synthesis of a new tetradentate Chelate That Can Be Covalently Time-Resolved Fluorometry β -Diketonate-Europium Bound To Proteins in Time-Resolved Fluorometry, *Analytical Sciences* 12, s. 695-699.
- Wang G., Yuan J., Matsumoto K., Hu Z., (2001), Homogeneous Time-Resolved Fluorescence DNA Hybridization Assay by DNA-Mediated Formation of an EDTA-Eu(III)- β -Diketonate Ternary Complex, *Analytical Biochemistry* 299, s.169–172.
- Wang, Y.H., Zhang, Y.G., (2017), Kidney and innate immunity, *Immunology Letters* 183, s. 73-78.
- Wu F-B., Zhang C., (2002), A new europium β -diketone chelate for ultrasensitive time-resolved fluorescence immunoassays, *Analytical Biochemistry* 311, s.57-67.
- Wu F. B., Han S-Q., Zhang C., He Y-F., (2002),Synthesis of a Highly Fluorescent α -Diketone-Europium Chelate and Its Utility in Time-Resolved Fluoroimmunoassay of Serum Total Thyroxine” *Analytical Chemistry* 74, s. 5882-5889.
- Zhang I., Wang Y., Ye Z., Jin D., Yuan J., (2012), New Class of Tetradentate β -Diketonate-Europium Complexes That Can Be Covalently Bound to Proteins for Time-Gated FluorometricApplication”, *Bioconjugate Chem.*, 23, s. 1244–51.
- Zong C., Wu J.,Wang C.,Ju H., ve Yan F., (2012), Chemiluminescence Imaging Immunoassay of Multiple Tumor Markers for Cancer Screening, *Anal. Chem.*, 84 (5), s. 2410–2415.

ÖZGEÇMİŞ

1. Adı Soyadı : M. Özge KARAŞALLI

İletişim Bilgileri

Adres : Yıldırım Beyazıt Mah. Mısırlı Sok. Nilda Apt. Daire:9
Kütahya/ Merkez

Telefon : 0543 212 9847

Mail : ozgekarasalli43 @ gmail.com

2. Doğum Tarihi : 01.11.1990

3. Unvanı : Kimyager

4. Öğrenim Durumu

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Kimya Bölümü	Amasya Üniversitesi	2009-2014
Yüksek Lisans	Biyokimya Bölümü	Dumlupınar Üniversitesi	2014-Halen

5. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceeding) basılan bildiriler.

D. Koyuncu Zeybek, M. Ö. Karaşallı, A -“A Label-Free Electrochemical Immunosensor based on ERGO for Determination of Hemoglobin A1c” OP0310, 05-07 October 2016, Ankara (SÖZLÜ)

S. Kart, O. Karasalli, D. Koyuncu Zeybek, “Determination of Tartrazin Using Novel Electrochemical Sensor Based on Nanoceria in Drink Samples”, 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, 91-92, 09-12 June 2015, Ankara (POSTER)

6. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan bildiri kitabında basılan bildiriler

Derya Koyuncu Zeybek, M. Özge Karaşallı, Alper Tolga Çolak, Semanur Şen, “Sensitive Time Resolved Fluoroimmunoassay for Hemoglobin A1c with Eu Label” 28th National Chemistry Congress, 15-21 August 2016, Mersin (SÖZLÜ)

Alper Tolga Çolak, Derya Koyuncu Zeybek, Semanur Şen, Özge Karaşallı, “Synthesis and characterization of new biolabel with propiophenone”, 28th National Chemistry Congress, 15-21 August 2016, Mersin (POSTER)

Alper Tolga Çolak, Derya Koyuncu Zeybek, Semanur Şen, Özge Karaşallı “Synthesis and characterization of new biolabel with 1-acetylpyrene”, 28th National Chemistry Congress, 15-21 August 2016, Mersin (POSTER)

Alper Tolga Çolak, Derya Koyuncu Zeybek, Semanur Şen, Özge Karaşallı, “Synthesis and characterization of new biolabel Eu (III) complexes”, 28th National Chemistry Congress, 15-21 August 2016, Mersin (POSTER)

Alper Tolga Çolak, Derya Koyuncu Zeybek, Semanur Şen, Özge Karaşallı “Synthesis and characterization of new biolabel with 9-acetylanthracene”, 28th National Chemistry Congress, 15-21 August 2016, Mersin (POSTER)

M. Özge Karaşallı, Melek Gül, Serpil Eryılmaz, “Yeni Limonen Türevli Bisiklik İzoksazolin Bileşiklerinin Sentezi ve DFT Çalışmaları”, 1.Ulusal Organik Kimya Kongresi, 25-29 Ekim 2013, Sakarya (POSTER)

7.Projeler

1. Derya Koyuncu Zeybek, M. Özge Karaşallı, Hemoglobin A1c Tayini için Etiketsiz Elektrokimyasal İmmünoşansör Geliştirilmesi (Project no: 2017-03), DÜMLUPINAR ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR PROJESİ FONU (BAP)

2. Alper Tolga Çolak, Derya Koyuncu Zeybek, M. Özge Karaşallı, Semanur Şen, Yeni Biyoetiket Eu(III) Komplekslerinin Sentezi ve Diyabet Tanısında Kullanılmak Üzere

Hemoglobin A_{1c} Test Kitinin Geliştirilmesi (214Z093), TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU (TÜBİTAK), 1001 – BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA PROJELERİNİ DESTEKLEME PROGRAMI

3.Derya Koyuncu Zeybek, M. Özge Karaşallı, Burcu Demir, Çeşitli Anti-kanser İlaçlarının Elektrokimyasal Tayini ve DNA ile Etkileşiminin Belirlenmesi (Project no: 2015-41), DÜMLUPINAR ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR PROJESİ FONU (BAP)

