

18178

T.C.
İstanbul Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Biyofizik Anabilim Dalı

LEPRALI HASTALARIN SERUM PROTEİNLERİNİN
ELEKTROFORETİK YÖNTEM İLE İNCELENMESİ

Yüksek Lisans Tezi
Leman Yalçın-tepe

T. C.
Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi

Danışman
Prof.Dr.Demir Tiryaki

İstanbul-1991

İ Ç İ N D E K İ L E R

	<u>Sayfa</u>
I.GİRİŞ	1
1. Proteinler.....	
2. Serum Proteinleri.....	5
3. Lepra	7
1. Lepra Tipleri.....	9
2. Reaksiyonlar	11
4. ELEKTROFOREZ.....	12
1. Elektrofrezin Teorisi.....	13
2. Zon Elektrofrez Metodları	16
3. Proteinlerin İzoelektrik Ayırması.....	23
4. İki Boyutlu Poliakrilamid Gel Yönteminin Prensibi.....	24
5. Tezin Amacı	
II.GEREÇ ve YÖNTEMLERİ	
1. Çalışmada Kullanılan Maddeler	25
1. Kullanılan Başlıca Kimyasal Maddeler	
2. Kullanılan Cihazlar	

2. YÖNTEMLER	
1. Serumda Toplam Protein Konsantrasyon Ölçülmesi (LOWRY YÖNTEMİ).....	26
2. Laemlli Poliakrilamid Gel Elektroforezi.....	28
3. DAVIS yöntemiyle Poliakrilamid Gel Elektroforezi (DAVIS-PAGE).....	31
III. BULGULAR	
1. Serumdaki Toplam Protein Konsantrasyon Değerleri.....	35
2. DAVIS Poliakrilamid Gel Elektroforez Bulguları	38
3. SDS Poliakrilamid Gel Elektroforez Bulguları.....	45
IV. TARTIŞMA	48
V. ÖZET	50
VI. SUMMARY	51
VII. KAYNAKLAR	52

I. G İ R İ Ő

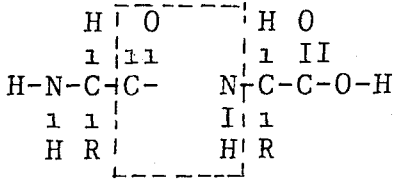
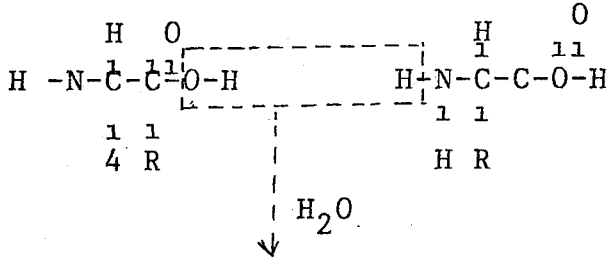
Patolojik olgularda serum proteinlerinin miktar ve özelliklerinde değişiklikler beklenir. Çeşitli proteinlerin düzeyi birbirinden bağımsız olarak değişebilir. Albumin ve globulin oranının değişmesi bazı hastalıkların tanısında önemli bir kriter olarak alınır (1). Serum proteinlerinin incelenmesinde günümüze kadar yapılan araştırmalarda kağıt elektroforezi ve kimyasal yöntemlerden yararlanılmıştır.

Birçok patolojik olayda, serum protein fraksiyonlarındaki değişmeler çoğunlukla kağıt elektroforezi yöntemiyle gözlenmiştir. Günümüzde destek ortam olarak kağıt yerine poliakrilamid gel tercih edilmektedir.

1. P R O T E İ N L E R

Proteinler hücrede en fazla bulunan organik moleküller olup hücre kuru kütlelerinin en az % 50'sini oluştururlar. Bütün biyolojik işlemlerde büyük önem taşırlar. Hücrenin çeşitli bölgelerinde çok farklı tipte proteinler bulunabilir ve bunlar belirli biyolojik fonksiyonlar için özelleşmişlerdir (2).

Proteinler 20 çeşit aminoasidin peptit bağları denilen kovalent bağlarla birleşmesi sonunda oluşur. Peptid bağı bir aminoasidin karboksil grubu ile ikinci bir aminoasidin amino grubu arasından bir H₂O molekülünün ayrılması sonunda meydana gelir:



Böyle peptit bağları ile arka arkaya sıralanmış bir aminoasit dizisinin oluşturduğu bir polipeptid zincirinin bir ucunda serbest bir amino grubu ($-\text{NH}_2$) ve diğer ucunda serbest bir karboksil grubu ($-\text{COOH}$) bulunur. Serbest amino grubunun bulunduğu uca proteinin amino ve serbest karboksil grubunun bulunduğu uca da karboksil ucu adı verilir. Bir proteini meydana getiren aminoasit dizisine yani polipeptit zincirine o proteinin birincil (primer) yapısı adı verilir. Her bir proteinin birinci yapısını teşkil eden aminoasitlerin çeşidi, sayısı ve sırası o proteine özgüdür. Bir polipeptit zincirindeki çeşitli gruplar aralarında, peptit bağından başka değişik türde diğer bazı bağlarda kurarlar. Bu bağlar sayesinde öyle bir polipeptit zinciri kendi içine katlanarak özel bir üç boyutlu yapı ya da başka bir deyimle konformasyon kazanır. İkincil (sekonder) yapı ise bir polipeptit zincirinin, komşu aminoasitlerin yan zincirlerindeki grupların aralarında kurdukları hidrojen köprüleri sonucu kazandığı yapı düzenidir. Bu üç boyutlu yapı düzeninde peptit zincirlerinin kendiliklerinden α -heliks konformasyonunu oluşturmaları beklenir. Zira bu konformasyon peptit zincirlerinin oluşturabileceği en kararlı en sağlam şekle ve erişebilecekleri en düşük enerji düzeyine tekabül etmektedir.

α - heliksin yanı sıra diğer bir sekonder yapı tipine β - konformasyon adı verilir. Fibroinde ve ısı denatürasyonu sonucu yün ve saç proteinlerinde görülen bu durum antiparalel şekilde sıralanmış iki polipeptit zincirinin imino ve karbonil grupları

arasındaki hidrojen köprüleri sayesinde oluşur. Üçüncül (tersiyer) yapı polipeptit zincirlerinin uzak bölümlerindeki grupların birbirleriyle kurdukları (s-s, hidrojen, vander waals ya da tuz gibi) bağlar sonucu oluşan özgün, küresel yapı düzenidir. Bir proteinin birincil yapısı o proteinin doğal üç boyutlu yapısının ya da konformasyonun oluşması içinde gerekli bilgiyi de taşır. Polipeptidin içerdiği aminoasit dizisinin erişebileceği en düşük enerji düzeni proteinin en kalımlı ve özgün üç boyutlu yapısını da belirler. Buna göre birincil yapıda yer alan değişiklikler proteinlerin tersiyer yapılarını ve dolayısıyla biyolojik etkinliklerini etkileyebilir.

Dördüncül (kvarterner) yapı düzeni birden çok polipeptit zincirinden meydana gelen proteinlerde örneğin hemoglobin veya immunoglobullinler) görülür. Böyle proteinler, alt birim adı verilen polipeptit zincirinin zayıf bağlarla ya da S-S köprüleriyle birleşmesi sonucu oluşurlar.

Protein Sınıfları

Proteinler hücre içinde üstlendikleri işler açısından iki sınıfa ayrılabilir:

1. Yapısal Proteinler: Bu proteinler hücre ve organizmanın oluşumunda daha çok bir yapı taşı rolü oynarlar. Bunların arasında suda çözünme yetenekleri olmayan kollagen, elastin ve keratin gibi proteinleri sayabiliriz.

2. Biyolojik Yönden Etkin Proteinler:

Bu sınıfa giren proteinlerin ortak özelliği ligant adı verilen kendilerine özgü maddeleri bağlama yetenekleridir. Bağladıkları ligantın özelliklerine, onu tabii tuttıkları işleme ve liganda bağlamaları sonunda meydana gelen reaksiyonlara göre bu proteinler de çeşitli gruplara ayrılabilir.

Enzimler (katalitik proteinler): Bu proteinler substrat adı verilen ligandlarını bağladıktan sonra onu kimyasal bir değişme tabi tutarlar. Reaksiyon hızını 10^8-10^{12} kat arttırırlar. Canlı organizmada reaksiyonların vücut ısısında gerçekleşebilmesi enzimler sayesinde.

İmmun Proteinler: Bu proteinler antijen adı verilen ligand proteinleri geri dönüşümsüz bir etkileşim ile bağlayarak sabitleştirir (3).

Protein Hormonlar: Etkilerini gösterdikleri hücrelerin membranlarındaki kendilerine özgü proteinlere geri dönüşümlü olarak bağlanırlar.

Regülatif Proteinler: Ligandlarına bağlanmaları geri dönüşümlü olup, ligandın biyolojik aktivitesinin değişmesiyle sonuçlanır.

Taşıyıcı Proteinler: Kendilerine özgü ligandı reversible olarak bağlayıp organizmanın bir bölümünden diğer bir bölüme taşımakta görevlidirler.

Kontraktıl Proteinler: Liganda bağlanmaları mekanik işin gerçekleşmesiyle sonuçlanır. Aktif proteinlerin ligandlarının bağlandığı yer proteinlerin bağlama bölgesi ya da aktif bölgesi olarak gösterilir. Her bir aktif proteinin bir veya birden fazla bağlama bölgesi olabilir. Bu bölgeler işlev ve yapıları yönünden birbirlerinin benzeri olabilecekleri gibi, değişik özelliklere de sahip olabilirler.

2. SERUM PROTEİNLERİ

Normal şartlar altında insan serumunda 65-80 gr/lt protein bulunur. Vücut fonksiyonlarında serum proteinleri önemli bir tanı aracı olarak kullanılabilirler. Serum proteinleri kağıt ve selüloz asetat elektroforezinde 5 ana fraksiyona ayrılırlar. Bu fraksiyonlar ve fraksiyonlardaki başlıca proteinler şunlardır:

1. Albumin Fraksiyonu:

a) Prealbumin: Molekül ağırlığı 61000 Daltondur.

b) Albumin: Serumda 37-52 gr/lt bulunur. İzoelektrik noktası 4.9 pH, molekül ağırlığı 69000 daltondur.

2. α_1 -Globulin Fraksiyonu: Serumda 1,4 gr/lt bulunur. Akut faz'a cevap proteinleridirler.

a) Asid α_1 -glikoprotein (α_1 -serumkoid, orosomukoid):
İzoelektrik noktası 2,7 pH, molekül ağırlığı 44100 daltondur.

b) α_1 -Antitripsin: Molekül ağırlığı 45000 daltondur.

3. α_2 -Globulin Fraksiyonları: Serumda 5-10 gr/lt bulunur.

a) α_2 -Makroglobulin: İzoelektrik noktası 5.4 pH, molekül ağırlığı 900000 daltondur.

b) Haptoglobulin: İzoelektrik noktası 4.1 pH, molekül ağırlığı 85000 daltondur (4).

c) Seruloplazmin: İzoelektrik noktası 4.4 pH, molekül ağırlığı 15000 daltondur.

4. β -Globulin Fraksiyonu: Serumda 6-12 gr/lt bulunur.

- a) Transferrin: İzoelektrik noktası 5.8 pH, molekül ağırlığı 88000 daltondur.
- b) B-Lipoprotein: İzoelektrik noktası 5.4pH, molekül ağırlığı 250000 daltondur.

Bu grupta ayrıca molekül ağırlığı 81000 dalton olan plazminojen ile hemopeksin ve kompleman C_3 proteinleride yer alır.

5. γ -Globulinler: Serumda 6-16 gr/lt bulunur.

- a) IgA: Molekül ağırlığı 180000-500000 daltondur.
- b) IgM: Molekül ağırlığı 950000 daltondur.
- c) IgG: İzoelektrik noktaları 7.3 pH, molekül ağırlığı 150000 daltondur.
- d) IgD: Molekül ağırlığı 150000 daltondur.
- e) IgE: Molekül ağırlığı 200000 daltondur. Deri duyarlılığında etkileşim antikoru olarak görev yapar (5).

3. L E P R A

Lepra, binlerce yıldan beri insanları ençok korkutan hastalıklardan biri olmuştur.

Hastalığın etkeni olan mikrobakterium lepra aside dirençli bir çomak olup 1873 yılında Dr. Hansen tarafından bulunmuştur (6). Lepra basillerinin insanların çoğunda hastalık meydana getirmeyişi ancak çocukluk çağında lepranın alınması hastalığın immunitayle çok yakından ilişkili olduğunu düşündürmüştür (7,8).

Lepra, primer olarak periferik sinirleri sekonder olarak da deriyi, retiküloendotelial sistemi, gözü, testisleri ve diğerk organları etkileyen ancak bazı olgularda infeksiyöz olan kronik mikobakterial bir hastalıktır (9).

Toplumlarda lepranın yayılması, infeksiif lepralı hastayla yakın temasa ve insanların hücrenel immunitelerine bağılıdır. Evli çiftler arasında hastalığı geçirme oranı % 20 olarak bulunmuştur. Buna karşın çocukların lepraya yakalanma olasılığı çok daha yüksektir. Hastaların % 60'ında çocukluk veya ilk gençlik dönemlerinde ortaya çıkar. Hastalığın inkübasyon süresi 2-7 yıldır. Bu sürenin uzun olması ilk belirtilerin gözden kaçmasına neden olur. Bu nedenle lepra tanısı 5-10 yıl gecikmeyle konmaktadır (7,8,9,10,11,12).

Hastalığın bulaşma şeklinin solunum yoluyla ya da temasla olduğu kabul edilmektedir (10).

Çok çeşitli lepra belirtileri gözlenebilmektedir. Deride bir veya birkaç lezyon olabilir. Lezyon kendiliğinden kaybolabilir. Klinik olarak ilk lezyon indetermine lepradır. Vücuttaki lekelerde duyu kaybı görülebilir. Hastalar el ve

ayaklarını yakarlar. Kas zayıflığı ani ya da yavaş başlayabilir. Akut reaksiyonda, ulnar paralizisi, düşük ayak, yüz felci gelişebilir. Gözlerde ağrı, fotofobi, görme bulanıklaşması, görmede azalma, burun tıkanıklığı ve kanama Lepramotöz Lepranın ilk belirtileri olabilir (9,13,14).

Lepralı hastalar için genellikle evlerinde ve ayaktan tedavi öngörülmektedir. Ancak çok önemli bir reaksiyon, araya giren, enefeksiyon veya operasyon gerekirse herhangi bir hastaneye yatırılmaları ve bütün diğer hastalıklarda uygulanan normal hijyen kuralları altında tedavileri uygundur (15).



1. LEpra TİPLERİ

Lepra basili vucuda girdiğinde hedef doku, periferik sinirlerin schwann hücreleridir. Hastalığın meydana gelmesi vucuda giren basille konağın immunitesi arasındaki ilişkiye bağlıdır. Hücresel immunitenin normale göre düşük olması hastanın lepra tiplerinden birine yakalanmasına neden olabilir. Hastalık klinik, bakteriyolojik, immunolojik ve histopatolojik durumlara göre sınıflandırılabilir.

Ridley Jopling Sınıflaması (16)

- LL Lepramatoz Lepra
- BL Borderlayn Lepra
- BB Borderlayn Borderlayn
- BT Borderlayn Tuberculoid
- TT Tuberculoid Lepra
- I Indetermine Lepra

İNDETERMİNE LEPRADA

İndetermine Leprada, genellikle çocuklarda, vücudun yüz, kol, bacak ve kalça gibi serin olan bölgelerinde, deriden açık renkli bazen duyu kaybı gösterebilen lekeler bulunur. Bu lekelerin dörtte üçü kendiliğinden iyileşir. İyileşmenin olmadığı durumlarda İndetermine Lepra spektrumdaki diğer lepra tiplerinden birine kayar (9,10,17,19).

TÜBERKÜLOİD LEPRADA

Lepra basilinin periferik sinirin Schwann hücrelerine gelmesiyle, hücresel immunitesi yüksek olan kişide Tüberküloid Lepra gelişir (18). Deri lezyonları asimmetrik, hipopigmente veya bakır renginde olup duyu ve terleme kaybı gösterebilir. Sinirlerde kalınlaşma, ağrı, etkilenen sinir bölgesinde duyu kaybı ve kas atrofileri görülür. En çok iki ya da üç sinir tutulur. Tedavi edilmediğinde periferik sinir harabiyetine bağlı deformiteler görülür. Diğer lepra tiplerinden birine kayabilir (9,10,16,20).

LEPRAMATÖZ LEPRADA

Lepra basili hücresel immunitesi düşük olan insanlarda çoğalır. Kan, lenf ve komşuluk yoluyla çeşitli organlara giderek hastalık belirtileri görülür. Çok sayıda maküler simetrik lezyon vardır. Erken dönemde duyu kaybı görülmez. Çok sayıda sinir etkilenir, sinir hasarı yavaş gelişir. Hastalık ilerledikçe kollarda ve bacaklarda duyu kaybı, kas atrofileri daha sonraki dönemlerde de paralizlere bağlı deformiteler görülür. Hastalık ilerledikçe deri kalınlaşır ve katlanır, aslan yüzü oluşur. Kaşlar ve kirpikler dökülür. Serum IgG düzeyi yükselmiştir (9,10,16,21).

BORDERLAYN LEPRA

Tüberküloid ve Lepramatöz formların arasındadır. Hücrel immunitesi güçlü olanlarda Borderlayn Tüberküloid, hücrel immunitesi düşük olanlarda Borderlayn Lepromatöz Lepra gelişir. Etkilenen sinir sayısı Borderlayn Leprada azdır. Basil negatiftir. Borderlayn Lepramatöz Lepra da lezyon sayısı ve tutulan sinir sayısı fazladır. Lepramatöz forma benzer, fakat simetri göstermez. Basil bulunur fakat lepramatöz tipteki kadar bol değildir. Borderlayn spektrumun tam ortasında, Borderlayn Borderlayn Lepra formu bulunur. Bu form Borderlayn Tüberküloid'e ya da Borderlayn Lepramatöze kayar (9,10,16).

2. REAKSİYONLAR

Reaksiyon terimi akut infilamasyonun semptom ve işaretlerini açıklamak için kullanılır.

Klinik olarak sinirlerde ödem, ağrı, hassasiyet ve sıklıkla fonksiyon kaybı vardır. Lezyonlarda kabarma, hiperemi ve hassasiyet görülür. Bu dönemde yeni lezyonlar ortaya çıkabilir. Reaksiyonda genellikle basiller antijene akut aşırı duyarlık odakları mevcuttur. İki tip aşırı duyarlık görülebilir. Reaksiyon belirtileri birbirine benzeyebilir (22).

TİP I REAKSİYON (Reversal Reaksiyon)

Hastada hücrel immunité düzeyinin değişmesiyle ortaya çıkar. Genellikle borderlayn formda görülür. Sinirlerde ödem, ağrı, sinirin etkilendiği bölgelerde duyu kaybı ve felçler gelişebilir. Lezyonlarda kabarma, kızarma ve hassasiyet vardır (22,24).

TİP II REAKSİYON (Eritema Nodosum Leprozum)

Tip II reaksiyon hümoral aşırı duyarlılık olarak görülür. Parçalanmış mikobakterium lepra antijeninin antikorlarla birleşmesi sonucunda oluşan immün komplekslerin çeşitli dokularda depolanması sonucu akut infiltrasyon gelişir (23,24). Borderlayn Lepramatöz ve Lepramatöz Leprada görülür. Deride kırmızı ağrılı nodüller vardır. Lezyonlar yüzde, ekstremitelerin ekstanjör yüzeyinde ve bütün vücutta görülebilir. Deride birkaç gün kalır, daha sonra kaybolabilir. Deri lezyonlarına ilave olarak iridosiklit, orsit, periferik sinirlerde ağrı, hassasiyet, lenf adonopati, eklem ağrıları, burun kanaması, proteinüri görülebilir. Tip II reaksiyon, Tip I reaksiyon kadar ciddi değildir. Sinir hasarı uzun yıllar sonra gelişir (9,10,13,18,24,26,27).

4. ELEKTROFOREZ

Elektroforez, yüklü bir parçacığın bir elektrolitik çözeltide ve bir elektrik olan etkisiyle hareketidir (28).

Elektroforezin değişik globin fraksiyonları ve kan serumu içindeki albumin gibi kompleks karışımların analizini yapmada faydası kanıtlanmıştır (29). Bu tekniği uygulamak için iki faktör gereklidir.

a) Üzerinde çalışılması istenilen partikülün (iyonlar, moleküller ve mikroskobik boyda maddeler) yüklü veya yüklenebilir özellikte olması gereklidir. Birçok aminoasit veya protein gibi partiküller bu özellikleri taşımaktadır.

b) Elektroforezin uygulanacağı ortam, elektrik akımı taşıma kapasitesine sahip olmalıdır (30).

Elektroforetik teknikler ya zone elektroforezi ya da hareketli sınır elektroforezi olarak sınıflandırılabilirler. Titreşim, diffüze olması gibi sebeplerden dolayı hareketli sınır elektroforezi rutin kullanımda tercih edilmez.

Zonal elektroforetik tekniği, bir spot veya ince bir solüsyon tabakası, jelatinimsi ortam veya bir yarıkatı ile temas edecek şekilde yerleştirilir. Elektrik alan uygulanır. Partiküller destek materyalin içinden veya üstünden göç ederler. Partiküller bir bölgeye uygulandığı için küçük miktarda örnekler kullanılır ve ayırım tamamlanır. Destek ortamın fonksiyonu, makromoleküllerin, solüsyondan ve sıcaklık değişimlerinden kaynaklanan konveksiyon ve mekanik karışıklıkları önlemektir. Bununla birlikte destek ortamı, değişik moleküler türleri adsorbe eder veya bir moleküler elek gibi davranır. Bu yüzden bir kromatografik etki sonucu ayrılma ya azaltılabilir veya daha iyi olur (31).

1. ELEKTROFOREZİN TEORİSİ

Bir elektrik alana maruz kalan yüklü molekülün hareketi (1) eşitliği ile tanımlanır.

$$Eq = fV \quad (1)$$

burada

E= volt/cm başına elektrik alan

q= molekül üzerindeki net yük

f= molekülün biçimine ve yoğunluğuna bağlı sürtünme katsayısı

v= molekülün hızı

yüklü partikül elektriksel güçle doğrudan oranlı olarak (Eq) sabit bir hızla göç eder. Fakat yüklü partikül ayrıca elektriksel alan yönünün tersine sıvının viskozite engeline maruz kalır. Yüklü molekülün hızı (2) eşitliği ile ifade edilir.

$$v = \frac{E \cdot q}{f} \quad (2)$$

(2) eşitliğinde E ile tanımlanan uygulanmış elektrik alan elektroforez boyunca sabit tutulur. Bu durumların etkisinde yüklü molekülün hareketi, gerçekte, yük/kütle oranına bağlıdır.

Bir elektrik alanda yüklü bir partikülün hareketi, elektrik alanın birimi başına hızı yani mobilitesine (μ) göre tanımlanır (3, eşitlik).

$$\mu = \frac{q}{f} \quad (3)$$

Teoride bir molekül üzerindeki net yük q ise f ölçümü mümkün olur. Bu yüzden bir elektrik alanda mobilitenin incelenmesi ile molekülün yaklaşık hidrodinamik şekli ve büyüklüğü hakkında bilgi elde edilir. Elektroforetik metodu 3 denklemini yeteri derecede tanımlayamadığı için, herşeyden önce elektroforez yöntemi ile f ölçülmeye çalışıldığında başarılı olunmaz. Eşitlikte hesaba katılmamış ama mobilitesine etki eden bazı önemli faktörlerde mevcuttur. Bunlar: a) göçen moleküllerinin destek ortamla olan etkileşimleri ve b) moleküllerin tampon iyonları tarafından gölgelenmesidir.

Elektroforezi bir molekülün biçiminin ve büyüklüğünün özgül ayrıntılarını tanımlamak için kullanmak faydalı değildir. Bunun yerine elektroforez, moleküllerin tanınması ve saflaştırmanın analizi için uygulanır. Bir karışımdaki her molekülün tek bir yüke ve büyüklüğe sahip olması beklenildiği için elektrik

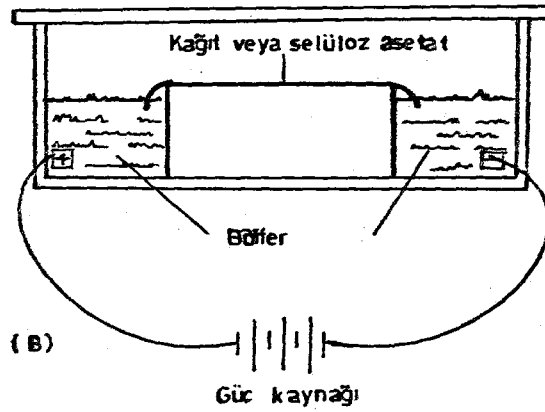
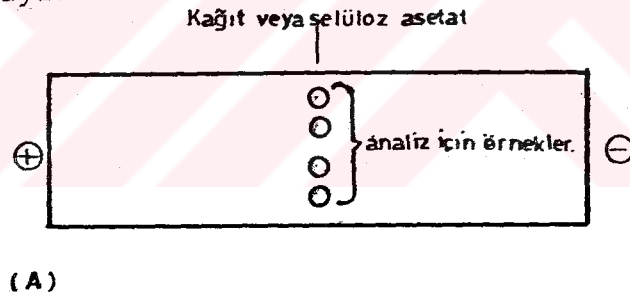
alandaki mobilite de tek olacaktır. Bu beklenti tüm elektroforetik metodlarda ayırma ve analiz için temel esastır (32). Bu teknik özellikle aminoasitlerin, karbonhidratların, peptidlerin, proteinlerin, nükleotitlerin ve nükleik asitlerin analizi için kullanılır (33).



2. ZON ELEKTROFOREZ METODLARI

KAĞIT VE SELÜLOZ ASETAT ELEKTROFOREZİ

Kağıt ve selüloz asetat elektroforez tekniklerinde kullanılan deney seti şekil 4.1'de gösterilmiştir (32). Kağıt elektroforezi için iki yöntem vardır. Düşük voltajda yapılan kağıt elektroforezi yöntemi ve yüksek voltajda yapılan kağıt elektroforez yöntemidir. Düşük voltajda yapılan kağıt elektroforez deneyleri, proteinlerin ve enzimlerin ayırt edilmelerinde kullanılır. Bugün destek ortam olarak diğer materyaller kullanılmaktadır. Bununla beraber kağıt, oldukça düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin ayırt edilmeleri için en iyi ortamdır. Yüksek voltajlı kağıt elektroforezinde genellikle her cm için 20 volt'dan fazla voltaj kullanılır. Bu metod birçok peptitler ve aminoasitlerin ayrılmalarında kullanılmaktadır.



Şekil 2. Selüloz asetat veya kağıt elektroforezi için deney düzeneği.

Selüloz asetat elektroforezi ise öncelikle serum proteinlerinin elektroforezinde önemlidir. Selüloz asetatın az miktarda yabancı madde içermesi ve tamamıyla homojen bir yapıdan oluşması gibi üstün tarafları da vardır. Ayrıca kağıt elektroforezi ile çok iyi ayrılamayan bazı serumlar selüloz asetat ile başarılı bir şekilde ayrılabilirler (34).

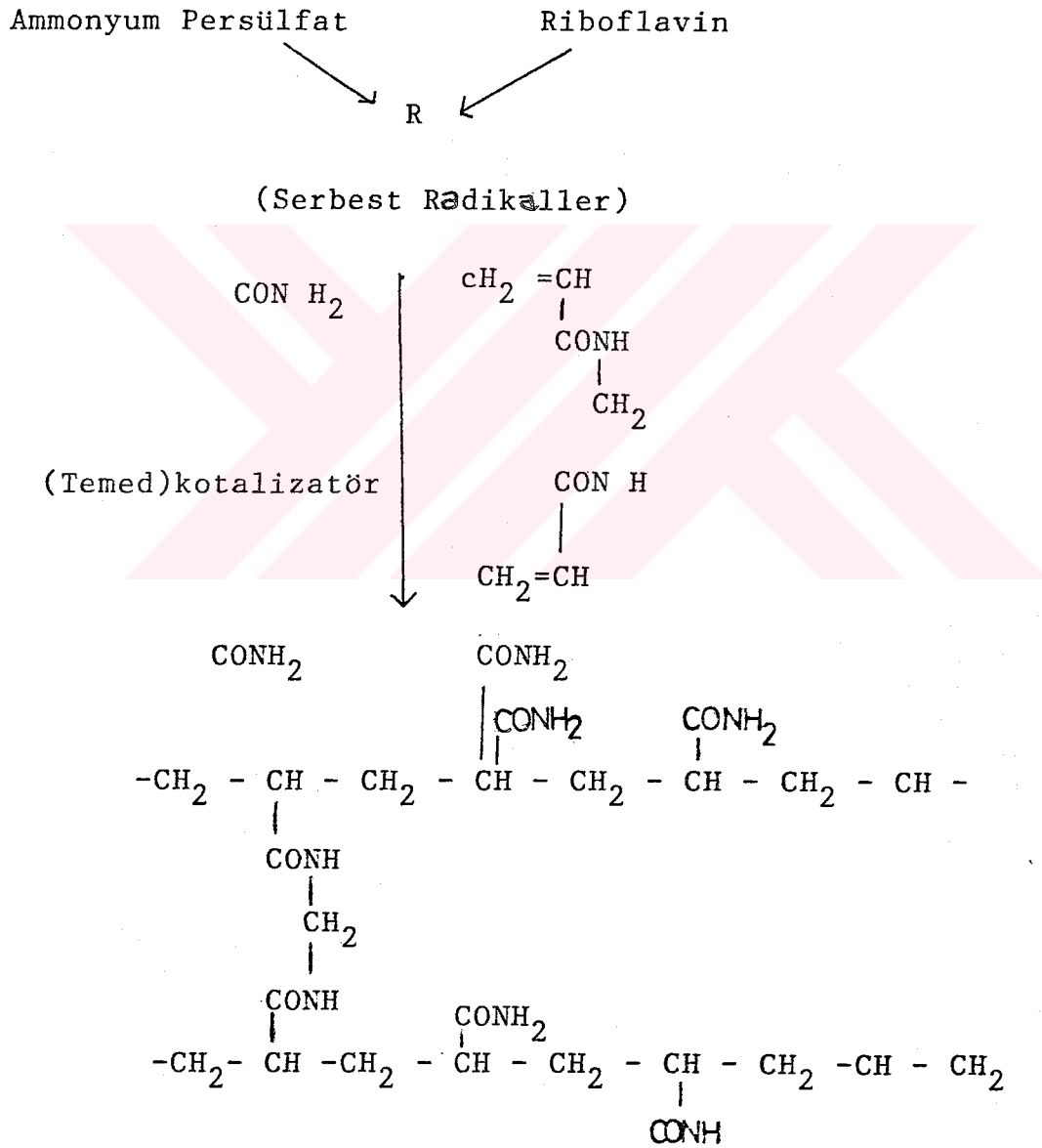
GEL ELEKTROFOREZİ

Selüloz asetat elektroforetik ayırmalar, ayırma gücü ve işlem kolaylığı ile karakterizedir. Fakat büyük ayırmalarda biyokimyasal analizler gerekir. Bu nedenle birkaç tip destek ortam kullanılmaktadır.

Nişasta Geller: Örnek tabaka geldeki kuyulara yerleştirilir ve voltaj uygulanır. Elektroforezden sonra örnek bileşenlerinin görülebilmesi için boyanır. Nişasta geller hala izoenzimlerin ve bazı proteinlerin analizlerinde kullanılmaktadır (32).

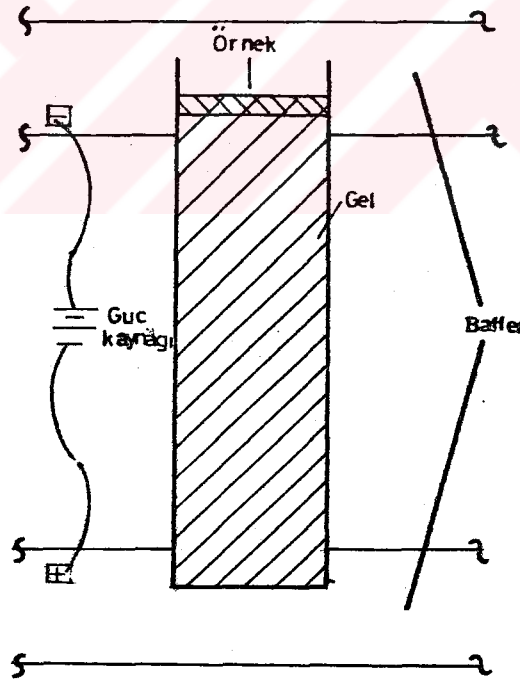
Poliakrilamid Geller: Nişasta geller gözenek boylarının kontrol edilememesi nedeniyle oldukça sınırlı kullanılır. Poliakrilamid gelle yapılan elektroforez, örneklerin daha iyi ayrılmasını sağlar. Çünkü ayırma hem moleküler ekleme hem de elektroforetik mobilite üzerine temellendirilmiştir. Poliakrilamid geller minimal protein adsorpsiyonu, hızlı analizleri, kolay hazırlanmaları, boyama, kopyasını alabilme ve ayarlanabilir gözenek boyları ile birçok avantaja sahiptir. Gel filtrasyonu ve Poli Akrilamid Gel Elektroforezi arasındaki önemli fark da şudur: Gel filtrasyonunda büyük moleküllerin hareketi küçük moleküllerden hızlıdır. Gel elektroforezinde ise durum tersinedir.

Poliakrilamid geller N,N^1 -meti ilen-bis-akrilamid çapraz bağlama maddesi ve akrilamidin serbest radikal polimerizasyonu ile hazırlanır. Kimyasal polimerizasyon bir başlatıcı/katalizatör (Ammonyum persülfat/ N,N,N^1,N^1 - tetrametil etilen diamin (Temed) ile kontrol edilir. (Şekil 2).



Şekil 3- Poliakrilamid

Şekil IV.3. Akrilamid ve N,N^1 - metilen bisakrilamidin kopolimerizasyonunu gösteren kimyasal relaksasyonlar. Bu gel 10.000 den 1.000.000 Dalton molekül ağırlığına kadar olan moleküller için kullanılır. Bununla beraber en iyi ayırma 30.000 den 300.000'e kadar olan molekül ağırlıklar içindir. % 3.5 poli Akrilamid Gel konsantrasyon ise 1.000.000'dan 5.000.000'a kadar molekül ağırlıklar için kullanılır. 5.000.000'nun üstünde molekül ağırlıkları için agaroz/Poli Akrilamid karışımları ve agaroz geller kullanılır. Poliakrilamid gel elektroforezinde kalan gel veya tabaka gel olmak üzere iki farklı deney düzenineğinden biri kullanılır. Şekil 4 3'de kalan gel için tipik bir deney düzeniğ gösteriliyor (36,43).



Şekil 4. Poliakrilamid gel elektroforezi için bir kolon gel.

KESİKLİ GEL ELEKTROFOREZİ

Disk gel elektroforezi için deneysel düzende şekil 4'de gösteriliyor. Bu metodda üç önemli fark bulunmaktadır. 1. Üstte konsantrasyon geli ve altta ayırma geli olmak üzere tabaka vardır.

2. Bu iki geli hazırlamada kullanılan tamponlar, farklı iyonik güçlerde ve PH'dadırlar.

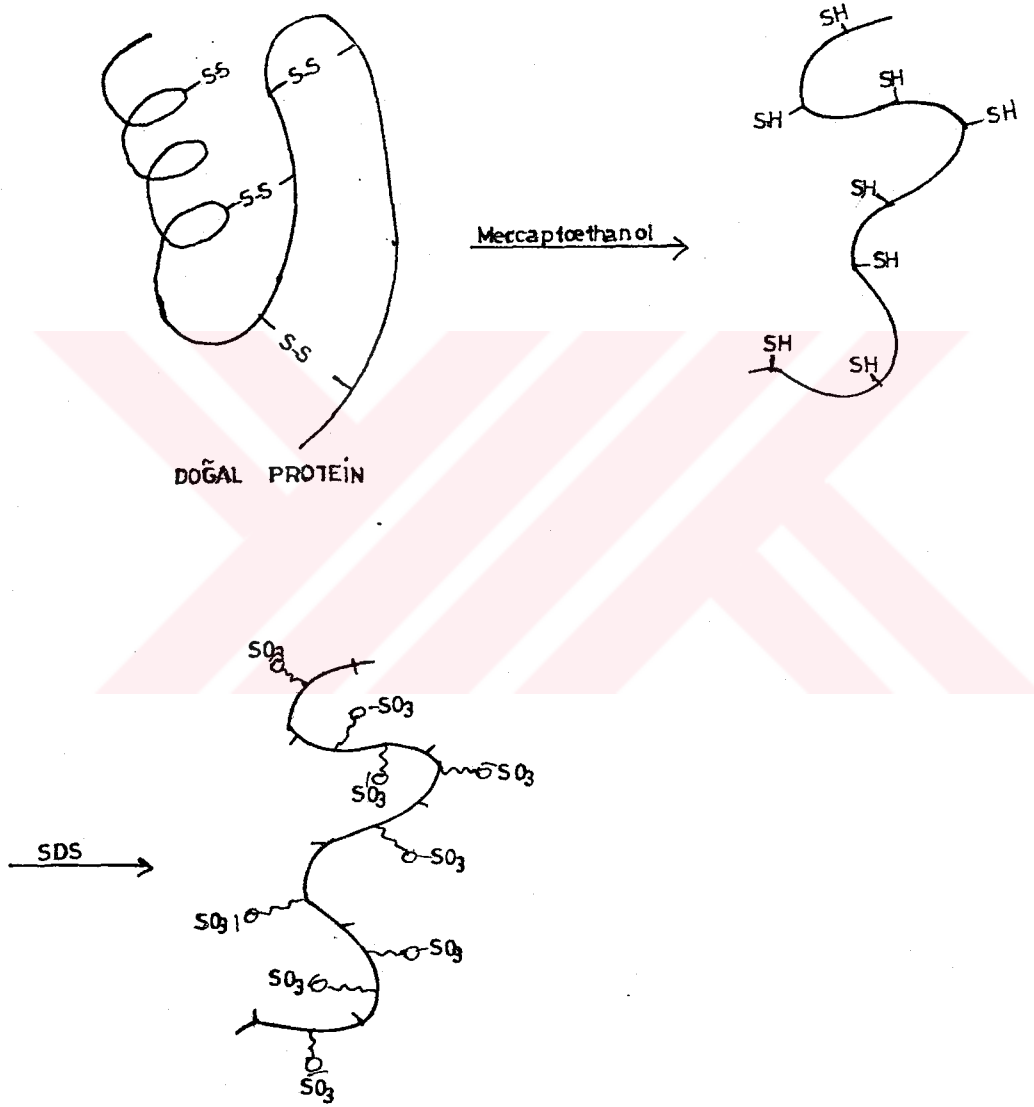
3. Ayırma geli en az akrilamid konsantrasyonuna sahiptir ve bu yüzden gözeneklerin boyları geniştir. Bu üç fark; konsantrasyon gelinde yüksek konsantre olmuş örneğin bantlarının oluşumuna, ayırma gelinde ise örnek komponentlerin en iyi ayrılmasına neden olur (32).

SODYUM DODESÜL SÜLFAT-POLİAKRİLAMİD GEL ELEKTROFOREZİ

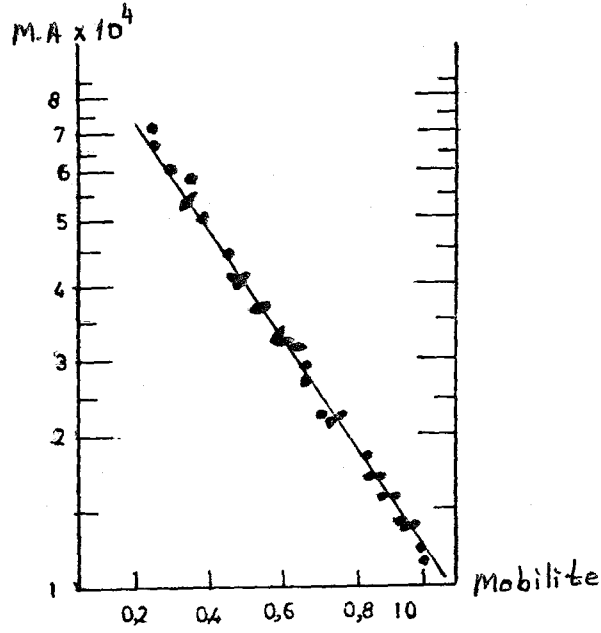
Mobilite, biyolojik moleküllerin hem yük hem de boylarından etkilenir. Şayet protein örneklerinin yükleri eşit ise mobilite, sadece büyüklüğe bağlıdır. Eğer proteinlerin disülfid bağları MET (Mercapto ethanol) vasıtasıyla kırılır ve bir deterjan olan SDS (sodium dodecyl-sulphate) karşısında elektroforez edilirse proteinlerin molekül ağırlıkları tahmin edilebilir.

Protein moleküllerinin SDS ile muamelesi sonucunda herhangi bir heliks yapıdaki polipeptit zincirlerinin ikinci, üçüncü ve dördüncü yapılarını parçalar (32,40). MET ise disülfid bağlarının tamamını kırarak denatürasyona yardımcı olur (Şekil 5). Denaturasyon için gram-protein başına 1,4 gr SDS gereklidir. Deterjan protein zincirinin hidrofobik bölgelerine bağlanır. Negatif yüklü deterjan molekülleri proteinlerin doğal yüklerini maskeler. Polipeptit zincirlerinde sabit bir yük/kütle oranı ve tek bir biçim (yapı) meydana gelir. SDS-protein komplekslerinin elektroforetik mobilitesi, öncelikle, molekül boyundan etkilenir.

Küçük moleküller büyük mobiliteye sahip olup, büyük moleküller geç inecedirler. Deneysel ölçümler, elektroforetik mobilite ve moleküler ağırlık arasında lineer bir ilişki olduğunu göstermiştir.



Şekil 5. Alt birimsiz bir proteinin SDS ve MET yardımıyla denatüre hale getirilmesi



Şekil IV.6. Bu grafik bir proteinin elektroforetik mobilitesi ve moleküler ağırlık arasındaki lineer ilişkiyi gösteriyor. 4.000'den 70.000'e kadar değişik molekül ağırlıklı 37 polipeptid zincirini gösterir.

SDS poliakrilamid gel elektroforezinde molekül ağırlıkları 10.000 den 200.000 Dalton ile sınırlıdır. Yaklaşık 200.000 Dalton molekül ağırlığını saptamak için % 2.5'dan daha az akrilamid içeren geller kullanılmalıdır ki bunun pratik uygulaması zordur (32).

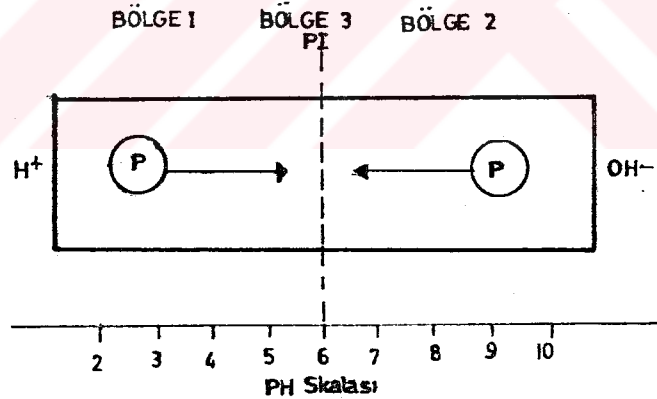
AGARUZ GEL ELEKTROFOREZİ

Agaroz gel uygulaması, DNA ve RNA analizi için kullanılan standart metoddur.

Agaroz geldeki nükleik asitlerin mobilitesi, agaroz konsantrasyonu, nükleik asitlerin moleküler boyu ve nükleik asitlerin moleküler şekilleri ile etkilenir. % 3-0,5 agaroz konsantrasyonu nükleik asitleri ayırmak için en etkili konsantrasyondur.

3. PROTEİNLERİN İZOELEKTRİK ODAKLAMA İLE AYIRILMASI

Elektroforezin diğer etki metodu, elektroforetik mobilitenin pH'nın bir fonksiyonu olarak inceleyen isoelektrik ayırmadır (IEF). Bir protein molekülü üzerindeki net yük, pH'ya bağlıdır ve bunet yükün nötr olduğu (yani (+) ve (-) yüklerin eşit olduğu) pH izoelektrik nokta olarak tanımlanır. Proteinler, izoelektrik noktalarının altındaki pH'da pozitif yüklenmişlerdir ve katoda doğru göç ederler. İzoelektrik noktanın üstündeki pH'da ise bir protein anoda doğru göç edecektir. Elektroforetik ortamın pH'sı, proteinin pH_1 ile aynıysa, o zaman proteinin net yükü o olacak ve hareketsiz kalacaktır. Şekil 6'da proteinlerin çeşitli pH değerlerinde gel içinden göçme yönleri gösterilmiştir.



Şekil IV.7.

Genellikle IEF da, katoda fosforik asit çözeltisi anoda ise tri ethonolamine çözeltisi yerleştirilir. Elektrotlar arası pH, 2 den 10'a kadar azar azar artar. Her bölge için pH değerleri ampolinler sayesinde düzenlenir ve böylece bir pH gradyanı oluşur.

Proteinin pI 'nin 1. bölgenin pH'sından çok, 2.bölgenin pH'sından az olduğu farzedilir. 1. bölgeye yakın protein molekülleri pozitif yüklenecek ve bir elektrik alan etkisinde katoda göç edecekler. Net yük 0'a ulaştığı zaman (bölge 3) duracaktır. Elektroforetik ortamın bu bölgesi protein pI ile çatışan bir pH'ye sahip olacaktır. Bölge 2'deki protein molekülleri negatif yüklenmiş olacak ve anoda doğru göç edecektir (32,36).

4. İKİ BOYUTLU POLİAKRİLAMİD GEL YÖNTEMİNİN PRENSİBİ

İki boyutlu poliakrilamid gel elektroforez sisteminde birinci boyutta SDS-PAGE, ikinci boyutta poliakrilamid gel izoelektrik ayırma kullanılır (39,41). Elektrik yükleri aynı fakat molekül ağırlıkları farklı olan proteinler ayrıştırılır. Eğer bir protein ikinci boyutta tek bir nokta şeklinde belirmişse, bu proteinin tek bir peptit zincirinden oluştuğu ve alt birimlerinin olmadığı kabul edilebilir (39).

5. A M A Ç

Poliakrilamid gel elektroforezi (PAGE) ile yapılan elektroforetik ayırmalar diğer tekniklere oranla iyi sonuçlar verir. DAVIS poliakrilamid gel elektroforezinde 25 adet band ayırt etmek mümkündür. Bu üstünlük hastalıkların tanısında çok daha ayrıntılı bir görüntü sunacaktır. DAVIS ve sodyum dodesil sülfat (SDS) poliakrilamid gel elektroforez teknikleri çabuk, kolay uygulanabilirliği ve mikro gram mertebesinde protein kullanıldığı için günümüzde destek ortam olarak en çok tercih edilendir. Sunulan çalışmada bu teknikler kullanılarak lepra hastalarının serum profilleri incelendi. Bu inceleme sonucuna göre reaksiyon sırasında ve reaksiyon sonrasında protein profillerindeki olası farklılıkların hastalığın gidişatı hakkında erken bilgi elde edilmesi ve böylece daha erken tedaviye başlatma imkanı ortaya çıkartmak konularında hekime yardımcı olmak amaçlandı.

II. GEREÇ ve YÖNTEMLER

1. ÇALIŞMADA KULLANILAN MADDELER

1. ÇALIŞMADA KULLANILAN BAŞLICA KİMYASAL MADDELER

- 1) Akrilamid-Merck
- 2) Bis-(NN^1 -Methylen-bis-acrylamide)-Merck
- 3) Temed ($\text{N,N,N}^1,\text{N}^1$ - Tetramethyletylene diamine)-Merck
- 4) MET (-Mercaptoethanol)-Merck
- 5) APS (Ammonium persulfate)-Merck
- 6) BFB (Bromophenol Blue)-Merck
- 7) Comassie Brilliant Blau R-250-Biomol
- 8) SDS (Sodium Dodecyl Sulphate)-Biomol
- 9) Glysin - Merck
- 10) Tris - Merck
- 11) Sucrose - Merck
- 12) Riboflavin - Merck
- 13) Glycerol - Sigma

2. ÇALIŞMADA KULLANILAN CİHAZLAR

- 1) Spektrofotometre
- 2) Gel elektroforez tankı
- 3) Elektroforez güç kaynağı (CAMAG, 0-200 mA, 150 V.DC)
- 4) Derin dondurucu (-10, Beko)
- 5) Magnetik karıştırıcı
- 6) İnkübatör
- 7) Santrifüj cihazı

2. Y Ö N T E M L E R

Eritema Nodosum Leprozum tanısı, lepra hastalarına, Lepra hastanesinde çalışan uzman doktorlar tarafından kondu. Hastanede eritema nodozum leprozum belirtileri sırasında ve reaksiyon atağı geçirdikten sonra 5'er ml kan örnekleri alındı. 5000 rpm'de santifüj edildi. Üstte kalan serum 3 ayrı ependorfa alındı ve -20°C'de -kontrol sayıları tamamlanincaya kadar saklandı.

1. SERUMDAKİ TOPLAM PROTEİN KONSANTRASYON ÖLÇÜLMESİ (LOWRY YÖNTEMİ) (37)

1) Kullanılan Çözeltiler

so₂ : 2 N NaoH
 So₂ II: % 2 Na₂Co₃
 % 1 CuSo₄
 % 2 K.Na Tartarat
 50:1:1 karıştırılır.

So₂ III : Folin-Ciocalteaus-Phenol Reagent

1: 1

So₂ IV : % 100 T.C.A.

2) Bovine serum Albumini çözeltisinin hazırlanması protein konsantrasyonu 5 mg/ml olan stok B.SA. (Bovine Serum Albumini) çözeltisinden, 200 µl alınarak 800 µl bidestile su eklenir ve böylece 1 mg/ml'lik çözelti hazırlanmış olur.

3) Deneyin yapılışı

a) Hazırlanmış 1 mg/ml'lik (bovine serum albumini) çözeltisinden herbir tübe 0,2,5,8,10,20,30,40,45 μ l konur. Protein miktarı belirlenecek serum örneklerinde de deney tüplerine değişik konsantrasyonlarda 2'şer μ l konur. Toplam hacim bidestile su eklenerek 90 μ l'ye tamamlanır. Vorteks ile karıştırılır.

b) SOL IV'den BSA (bovine serum albumini) ve serum örneklerinin üzerine 10 μ l eklenir.

c) SOL 2'den 50 μ l eklenerek 37°C'de 30' inkübasyonda tutulur.

d) SOL II'den 1 ml tüm tüplere ilave edilerek 20°C'de 10' inkübasyonda kalır

e) SOL III'den 100 μ l ilave edilir. Vorteks ile 2' karıştırılarak 4°C'de 5' inkübasyondan kalır.

Böylece standart çözeltiler ve serum örnekleri hazırlanmış olur.

f) Spektrofotometre 750 nm'ye ayarlanır. BSA (bovine serum albumini) örneklerinden protein konsantrasyonu sıfır (o) olan standart çözelti ile sıfır ayarı yapılır. Küçük protein konsantrasyonlu çözeltilerden başlayarak bütün standart çözeltiler için spektrofotometreden adsorbsiyon değerleri okunur.

g) Standart çözeltilerin adsorbsiyon (A) ve protein konsantrasyon (c) değerleri arasında $c = f(A)$ standart eğrisi çizilir.

h) Serum örneklerinin adsorbsiyon (A) değerlerine karşılık gelen protein konsantrasyon (c) değerleri, standart eğriden bulunur.

LAEMLLİ POLİAKRİLAMİD GEL ELEKTROFOREZİ

Elektroforez Ayrıma Geli (% 7)

7,5	mlt	1.5 m	Tris-HCL	(PH 8.8)
0,3	ml	% 10	Sodyum dodesil sülfat	
7	ml		Akrilamid/bisakrilamid	(30:08)
0.1	ml	% 10	Amonyum persülfat	
7.5	ul		Temed	
15.1	ml		Bidestile su	

Konsantrasyon Geli Çözeltisi (% 4.5)

1.25	ml	1 m	Tris-HCL	(PH.6,8)
0,1	ml	% 10	Sodyum dodesil sülfat	
0,15	ml		Akrilamid/bisakrilamid	(30:08)
0,1	ml	% 10	Amonyum per sülfate	
5	ul		Temed	
7,5	ml		Bidestile su	

Elektrot Tamponu :

54	gr	Tris bazı
270	gr	Glisin
18	gr	Sodyum dodesil sülfat

Bidestile su ile 8 lt'ye tamamlanır.

Gel Boyama Çözeltisi

% 0,2	"Comassie "	mavisi
% 50	Metanol (ya da isopropil alkol)	
% 10	Asetik asit	

Gel Boya Çıkarma Çözeltisi

% 25	isopropil alkol
% 10	Asetik asit

Denatürleştirici Erijik (PDB)

2 ml	2 m	Tris HCL	(PH 6.8)
3.2 ml		Gliserol	
2 ml	% 20	SDS	
% 4 ml		β.MET	
0,4 ml	% 0.1	BPB (W/V)	

1. Gel plaklarının dökülmesi için ilk önce iki cam levha arasına plastik bantlar konularak, plastik bant ile cam arasında kalan bölme % 2 agar ile kapatıldı.

2. SDS ve TEMED'i kullanma anında konulmuş ayırma geli bir pipet yardımı ile cam kalıplara 11 cm yüksekliğinde olacak şekilde koyuldu.

3. Düzgün bir gel yüzeyi elde edebilmek için % 0.1 SDS içeren su ile 1 cm'lik bir tabaka oluşturuldu. Gelin polimerleşmesi için üzeri örtülerek bir gün bekletildi.

4. Üzerindeki su döküldükten sonra konsantrasyon gel çözeltisi döküldü ve üzerine düzgün bir yüzey elde etmek için yine su ile tabakalandı. Daha sonra hemen örnek kuyuları tescil edecek olan kalıp tarak yerleştirildi.

5. 30 dak. polimerleşme süresi sonunda tarak ve plağın alt kısmındaki plastik bant çıkarılır. Plaklar elektroforez kabına monte edildi.

6. Aletin anot ve katot kapları elektrot tampon ile doldurularak daha önce 80 µl denatürleştirici eriyik (PDB) içine alınarak kaynar suda 1'dak. bekletilen 20 µl'lik örnekler, derişim gelindeki kuyulara tek tek kondu.

7. Elektroforez sırasında gel üzerinde gözlenen işaretli boya konsantrasyon gelini geçerken 20 mA, ayırım gelini geçerken 40 mA şiddetinde akım uygulandı.

8. Boya gelin alt bölgesine gelince işlem durduruldu.

9. Gel plak kalıpları elektroforez kabından ve plastik bantlardan çıkartılarak 30 dak. 40°C de boyama solüsyonuna kondu.

10. 40°C de boya çıkarma solüsyonuna konarak boyanın çıkması beklendi.

11. Gelde proteinlerin olduğu bölgeler koyu mavi bantlar olarak gözlemlendi.

3. DAVIS YÖNTEMİYLE POLİAKRİLAMİD GEL ELEKTROFOREZİ (DAVIS-PAGE) (38)

Proteinleri denatüre etmeden inceleyen bir yöntemdir. Proteinlerin izoelektrik noktalarının üzerinde pH'da tampon kullanıldığından, proteinler negatif yük kazanırlar ve anoda doğru göçerler.

- 1) Kullanılan çözeltiler: Akrilamid % 7.5
 Bis % 0,225
 Akr/Bis 33

	20 ml'deki madde miktarı	Çözeltilerin karışım oranı
Sol A:	6 gr Akrilamid 0,18 gr Bis 4,18 ml 1 N HCL	1
Sol B:	3,63 gr Tris 0,06 ml Temed	1
Sol C:	0,072 gr Amonyum Per sulfat	2
Konsantrasyon geli:		
Sol D:	1 gr Akrilamid 0,18 gr Bis	2
Sol E :	2,56 ml 1N H ₃ PO ₄ 0,57 gr Tris	2
(PH:7,5)	0,02 ml Temed	
Sol F:	0,4 mg Riboflavin 8 gr sukroz (Taze hazırlanır)	1

Anod çözeltisi : 12,1 gr Tris
(pH: 8,1) 50 ml 1N HCL
Marker çözeltisi: 2,85 gr Tris
12,5 ml 1N H_3PO_4
20 gr sukroz
2 gr Brom Fenol Blue
Bidestile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

Katod çözeltisi : 6,32 gr Tris (baz)
(pH:8,7) 3,94 gr Glisin
Bidestile su ile 1000'ml ye tamamlanır.

2) Deneyin Yapılışı

a) 12 gel tüpünün alt ucu parafilm ile kapatılır. Tüpler alttan itibaren 6 ve 7 cm yükseklikle işaretlenir.

b) Ayırma geli hazırlanır ve gel tüplerine 6 cm yüksekliğe kadar dökülür. Gel döküldüğünde hava kabarcıkları oluşturulmamalıdır. Tüplerin üzerine mikro pipetle 1-2 mm kadar su eklenir. Ayırma geli ortamın sıcaklığına göre 10'-20' da polimerize olması beklenir. Gelin polimerize olması gel ile bidestile su arasında oluşan çizgiden belli olur.

c) Konsantrasyon geli hazırlanır. Ayırma geli üzerindeki bidestile su alındıktan sonra hazırlanan gel 1 cm yüksekliğinde dökülür. Mikropipet yardımıyla 1-2 mm yüksekliğe kadar bidestile su konur. Konsantrasyon gelin polimerleşmesi için UV lambanın altına yerleştirilir.

d) Serum örnekleriyle protokol sıvısı hazırlanır. Çalışmada 5 µl serum örneği, 45 µl marker ve 50 µl bidestile su konarak toplam hacim 100 µl olacak şekilde hazırlanır.

e) Polimerize olmuş konsantrasyon gelinin üzerindeki bidestile su alınır ve alt ucundaki parafilm çıkarılır. Elektroforez tankına düşey olarak yerleştirilir.

f) Hazırlanmış protokol sıvısı her gel üzerine dikkatle konur.

g) Protokol sıvısının üzerine katod solüsyonu, üst ucuna kadar doldurulur.

h) Elektroforez tankının alt kabına anot, üst kabına katod solüsyonu konur.

i) Gel tüplerinin alt kaptaki bulunan uçlarında hava kabarcıkları olmamasına dikkat edilir.

j) Gel başına 2 mA akım verilir. Marker çözeltisi konsantrasyon gelini geçtikten sonra akım iki katına çıkarılır.

k) Marker çözeltisi gelin bitimine 1 cm yaklaştığında akım kesilir.

l) Gelleri tüplerden çıkarmak için kullanılan enjektör iğnesi ile cam ile gel arasına yavaşça sokulur ve enjektördeki % 50 gliserinli su enjekte edilir. Bu işlem gel tüpünün alt ucunda tekrarlanır. Daha sonra gel bir lastik pompa ile yavaşça itilerek çıkarılır. Marker boyanın bulunduğu yer bir iğne ile işaretlenir. Delinerek işaretlenen geller deney tüplerine konur.

m) Geller 30' boyama solusyonu içinde tutulur.

n) Geller boyama solusyonundan çıkarılır ve boya çıkarma solusyonu içine konur.

o) Boya çıkarma işlemi bittikten sonra geller + 4°C'de % 7.5 asetik asit çözeltisinde saklanır.



III. B U L G U L A R

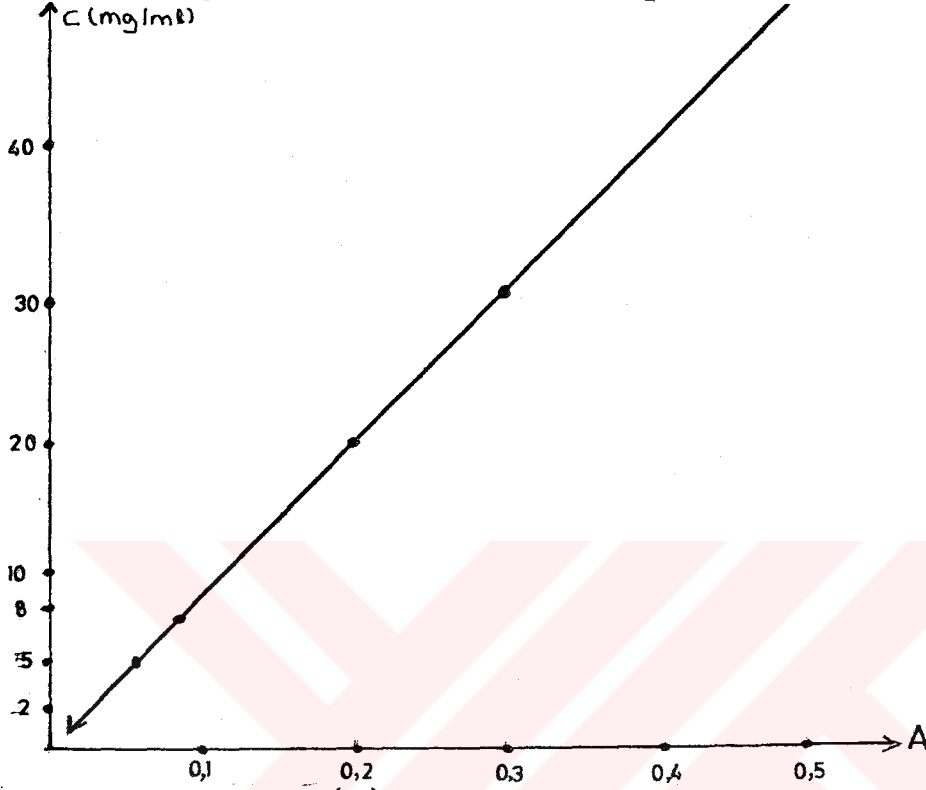
1. SERUMDAKİ TOPLAM PROTEİN KONSANTRASYON DEĞERLERİ

Protein konsantrasyonu 5mg/ml olan BSA. (Bovine Serum Albumini) çözeltilisi yöntem kısmında açıklandığı gibi değişik konsantrasyonlarda hazırlandı. Bu çözeltilerin spektrofotometre de 750 nm dalga boyunda absorbands değerleri okundu (Tablo III. 1)

Standart çözeltilerin (B.S.A)

<u>Protein konsantrasyonu C(mg/ml)</u>	<u>Absorbans (A)</u>
0	
2	27
5	55
8	73
10	141
20	272
30	314
40	403
45	432

Tablo III.1. Standart solüsyonların protein konsantrasyonu ve bunlara karşılık olan absorbans değerleri



Şekil III. 1- C= f (A) eğrisi.

Tablo III. 2 Lepra-reaksiyonlu ve lepra reaksiyon sonrası hasta serumlarından hazırlanan örnek çözelti spektrofotometre (750 nm)'de bulunan absorbans değerlerine karşılık olan protein konsantrasyon değerleri.

Lepra reaksiyonlu

hastaların serum prot.konst.(mg/ml)

92

97

98

93

108

105

Lepra reaksiyon sonrası
hastaların serum prot. konst.(mg/ml)

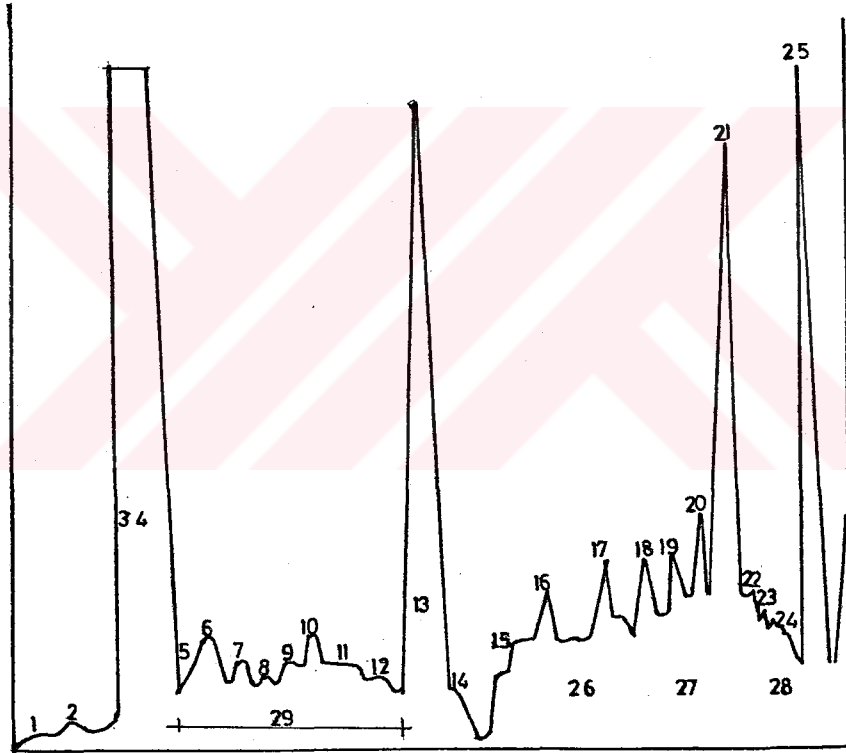
86
89,9
86
85
88
89

Tablo 4,2 deki absorbans değerlerine karşılık olan, örnek çözeltilerdeki toplam protein konsantrasyon değerleri (c), şekil III.1 deki $c=f(A)$ standart eğrisinden bulundu. Bu bulunan değerlerden hareketle gel başına uygulanacak protein miktarları belirlendi. Lepra reaksiyonlu hastalarda protein konsantrasyonunun arttığı, Lepra-reaksiyonu bitmiş hastalarda ise protein konsantrasyonunun azaldığı, buna rağmen kontrol grubunun protein konsantrasyonundan yüksek olduğu benzer çalışmalarda da (42,43,44,45) gösterilmiştir.

2. DAVIS-POLİAKRİLAMİD GEL ELEKTROFOREZ BULGULARI

Yöntem kısmında açıklanan protein tayini, elektroforez, boyama ve boya çıkarma işlemlerinden sonra normal ve lepra reaksiyonlu, reaksiyon sonrası, lereamatöz lepralı ve tedavisi bitmiş hastaların gel görüntüleri elde edildi.

Şekil III.2 deki dansitogram ile yer belirlenmesi yapıldıktan sonra bu gel görüntülerindeki sıralanışın normalden olan farkları saptandı.



Şekil III.2 Standardize edilmiş DAVIS-PAGE Dansitogramı (36)

Dansitogramda bandlara eş yerli tepeler numaralanmış ve çeşitli immunolojik ve karşılıklı elektroforez yöntemleri ile proteinler belirlenmiştir. Buna göre aşağıdaki tablo oluşturulmuştur.

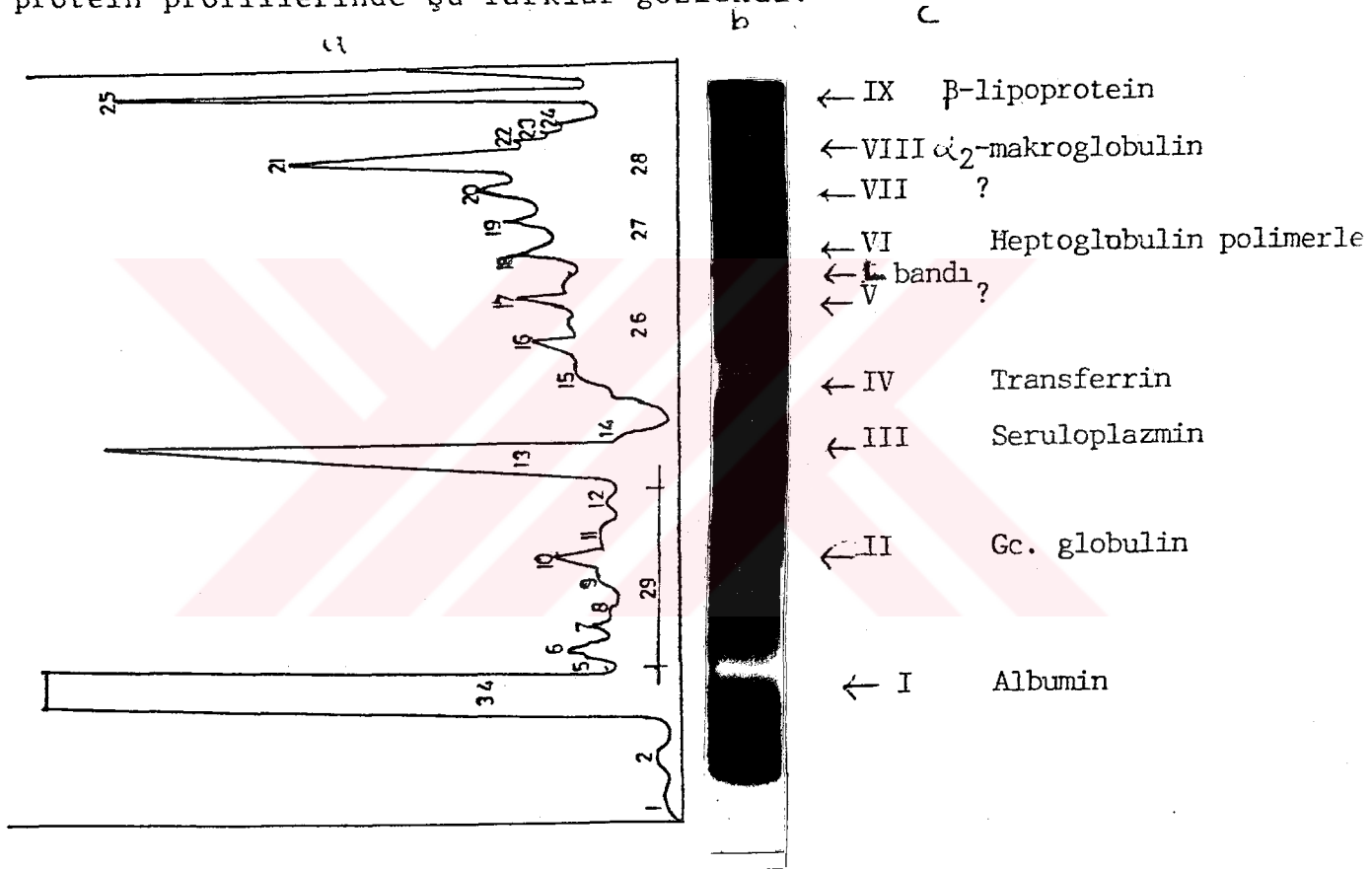
Tablo 4.3

- | | |
|----------------------------------|---------------------------|
| 1. Prealbumin | 24. ? |
| 2. Asid α_1 -glikoprotein | 25. β -lipoprotein |
| 3. Albumin | 26. γ A- globulin |
| 4. α_1 -Antitripsin | 27. γ G- globulin |
| 5. γ -Gc. globulin | 28. γ M- globulin |
| 6. α_1 -HS- glikoprotein | 29. β - Lipoprotein |
| α_1 -Anti-Kimotripsin | |
| 8. ? | |
| 9. ? | |
| 10. Seruloplazmin | |
| 11. ? | |
| 12. Hemopeksin | |
| 13. Transferrin | |
| 14. İnter-a tripsin inhibitör | |
| 15. B ₁ A- globulin | |
| 16. ? | |
| 17. 18-Heptoglobulin polimerleri | |
| 19. ? | |
| 20. β -glikoprotein | |
| 21. α_2 -makroglobulin | |
| 22. ? | |
| 23. Haptoglobulin polimerleri | |

LEPRA HASTALARINDAN ALINAN SERUMDAN, PAGE BULGULARI

Lepra hastaları tam kriterlerine göre literatüre uygun olarak 4 gruba ayrıldı.

Her grup ayrı ayrı normaller ile kıyaslamadan sonra serum protein profillerinde şu farklar gözlemlendi.



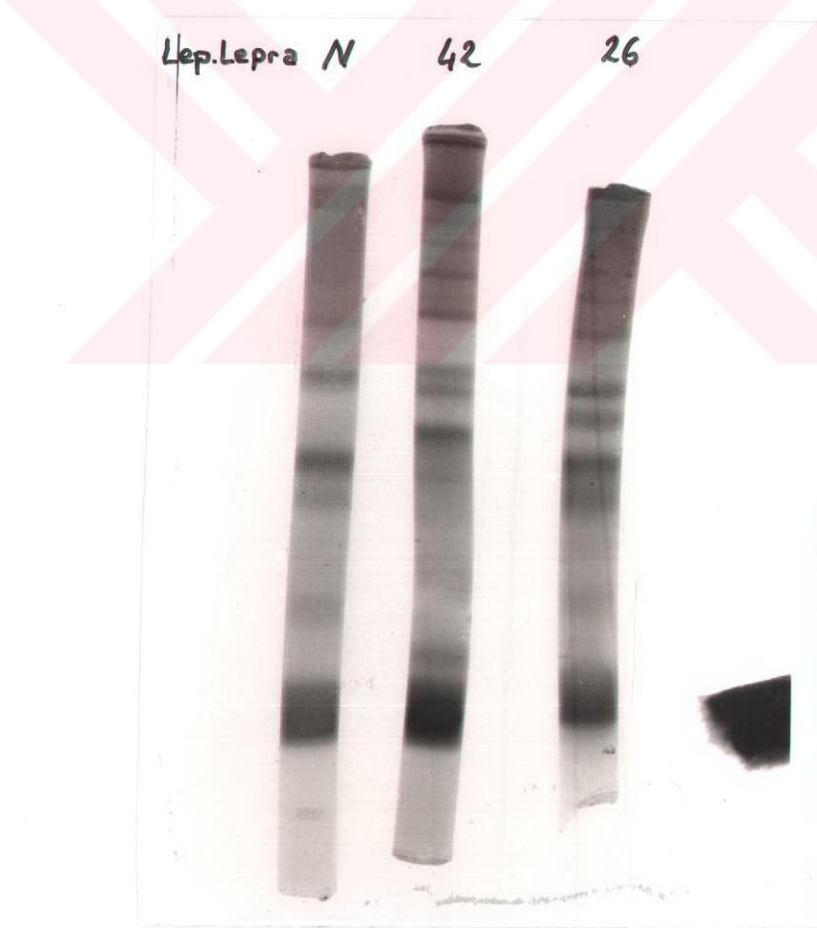
Referans (36)'da miktarlar Avrupalı bir kişinin bandlara karşılıkları şekil III.4 a da görülmektedir. Bizim çalışmamızda kürsümüz elemanlarının serum gel patterni görülmektedir. Aradaki büyük benzerliğe rağmen isimlendirmek yerine numara vermeyi uygun gördük.

4 ve 5 bandları arasında okla gösterilen bölge lepra hastalarının hemen hepsinde gözlenen ilave band bölgesidir. Biz bunu kolay anlaşılсын diye L bandı olarak isimlendirdik.

Lepramatöz Leprada DAVIS PAGE Görüntüleri

Lepramatöz lepra hastaları arasından tipik 2 hastanın bulgusu Davis PAGE paternleri aşağıda görülmektedir. Her iki hastada da, III nolu bant bölgesinde (Bant I ve Bant III arası) birkaç diffüz bant seçilmektedir.

42 nolu hastada, albüminin hemen üzerindeki bant koyu ve belirgin bir haldedir. Her ikisinde de L bandı kesin ve belirgin bir şekilde arttığı gözlenmektedir. Benzer şekilde her iki hastada da gelin üst bölgesinde belirgin bantlar izlenmektedir.

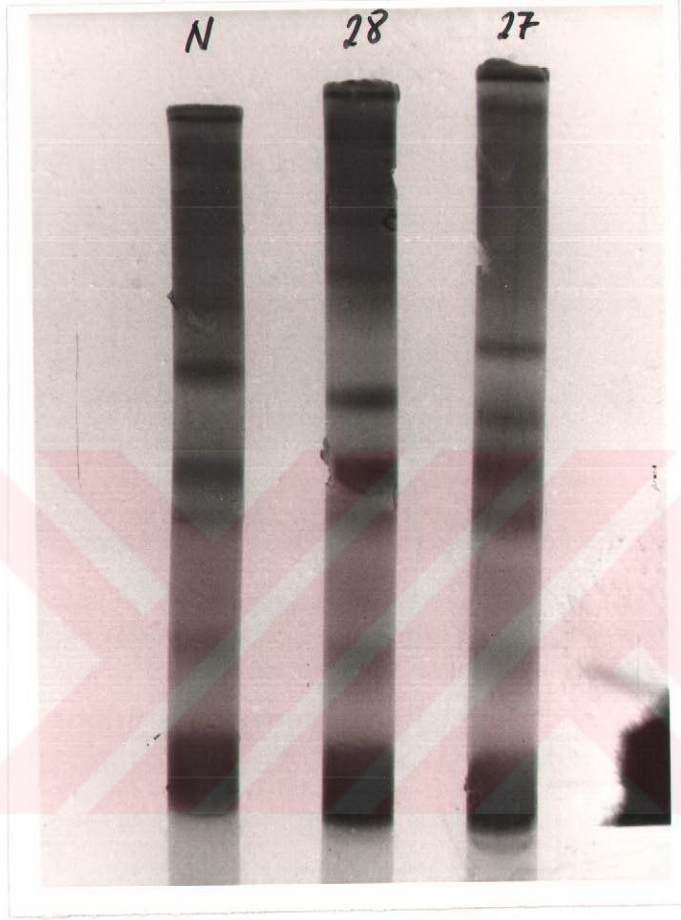


Lepra Reaksiyonlu Hasta Serumunda DAVIS PAGE Görüntüleri

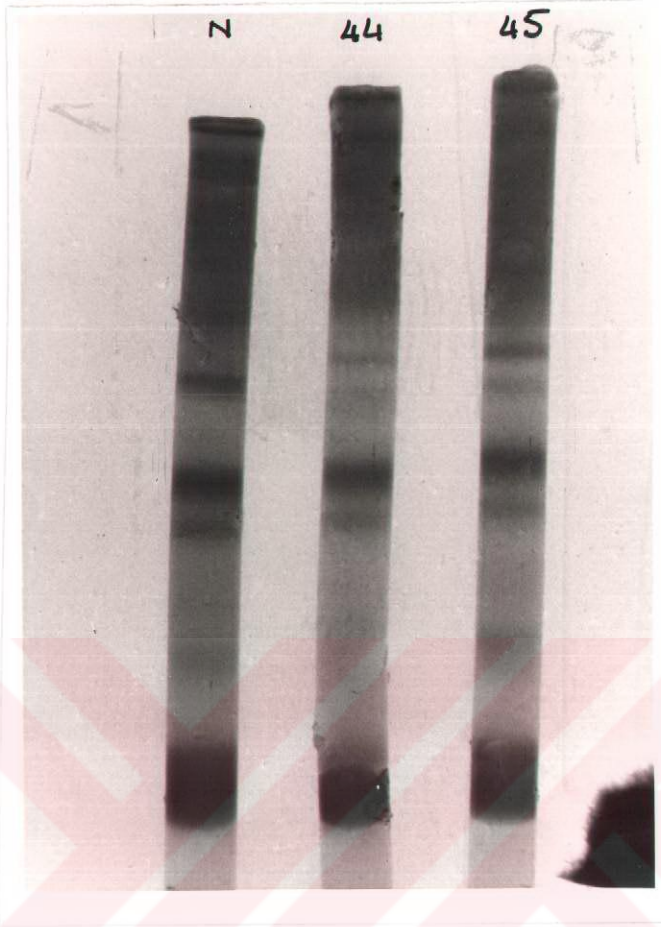
Reaksiyonlu hastalar arasından iki tipik hastanın Davis PAGE elektroforez paternleri aşağıda görülmektedir. 6 nolu hastada L bandında ileri derecede artma, ve globin hapto globin (gelin üst) bölgelerinde) belirgin bantları görülmektedir.



13 nolu hastanın bant profilinde diffüz bir L bandından başka, 3 no ile tanımladığımız band'da ileri bir artma gözlenmektedir.

Tedavisi Bitmiş Hasta Serumunda DAVIS PAGE Görüntüleri

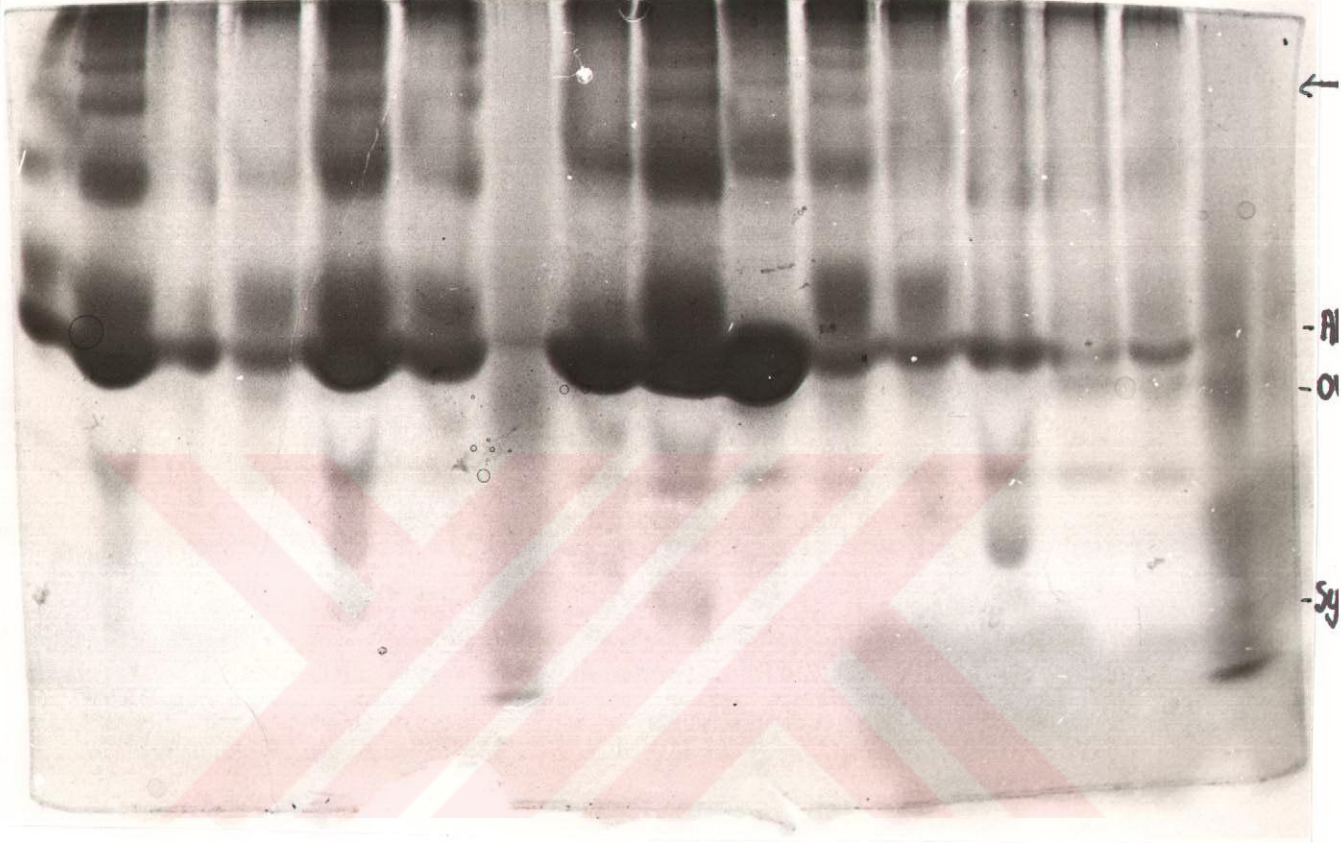
Remisyonlu oldukları bilinen ve reaksiyonda olmamalarına rağmen muntazam aralıklarla kontrole gelen iki hastadan elde edilen serum örneklerini Davis gel elektroforezine verdiğimizde, sağlıklı insan serumunun Davis gel elektroforez profilinden ve hatta Lepra hastalarından farklı oldukları gözlemlendi. 28 nolu hasta DAVIS PAGE profili 4,5 daki L bandı çok koyu ve V nolu band görülmemektedir. 27 nolu hasta profilinde ise L bandı daha hızlı yürümüş izlemi vermektedir. Hastane ile kurulan ilişkide hastaların herhangi bir reaksiyon bulgusu vermediklerini öğrendik. Sonraki daha geniş bir araştırma için yeniden başvurmalarını bekleyeceğiz.



Remisyonadaki yani tedavisi bitmiş olup arada kontrole gelen hastalardan ikisi farklı görüntüler verdiklerinden bunlar 2 ayrı grupta incelendiler. 44 ve 45 nolu hastaların PAGE profilleri reaksiyonları hafiflemiş izlenimi vermektedir. Zira L bandı reaksiyondaki hastalara göre daha hafiflemiş görünümündedir. Ayrıca globin ve haptoglobulin bölgelerindeki bantlı görünümde kaybolmuştur. Bu bölge lepra hastanesinden alınan remisyon kriterlerine uygun bulunmuştur.

Leamli PAGE Bulguları

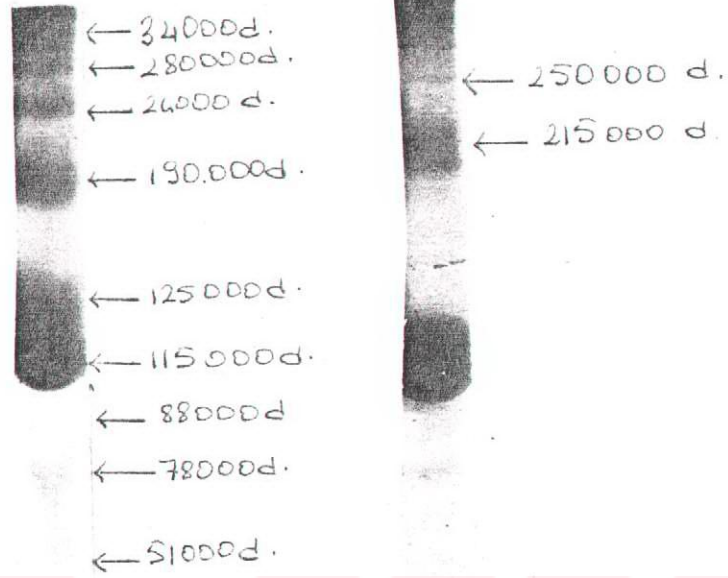
N 28 27 45 44 std 13s 9 19 6 5 13 30 42 std



9,6 nolu reaksiyonlu hastalar ile 45 ve 44 nolu remisyondaki hastalarda ortak olarak her sahada normale benzer band patterni görülüyor.

Bunun yanında, 13,9 ve 6 nolu reaksiyonlu lepra hastaları ile 45 nolu remisyondaki hastanın SDS PAGE patternlerinde 20 kd bölgesi değişik şiddetde diffüz bir band gözlenmektedir.

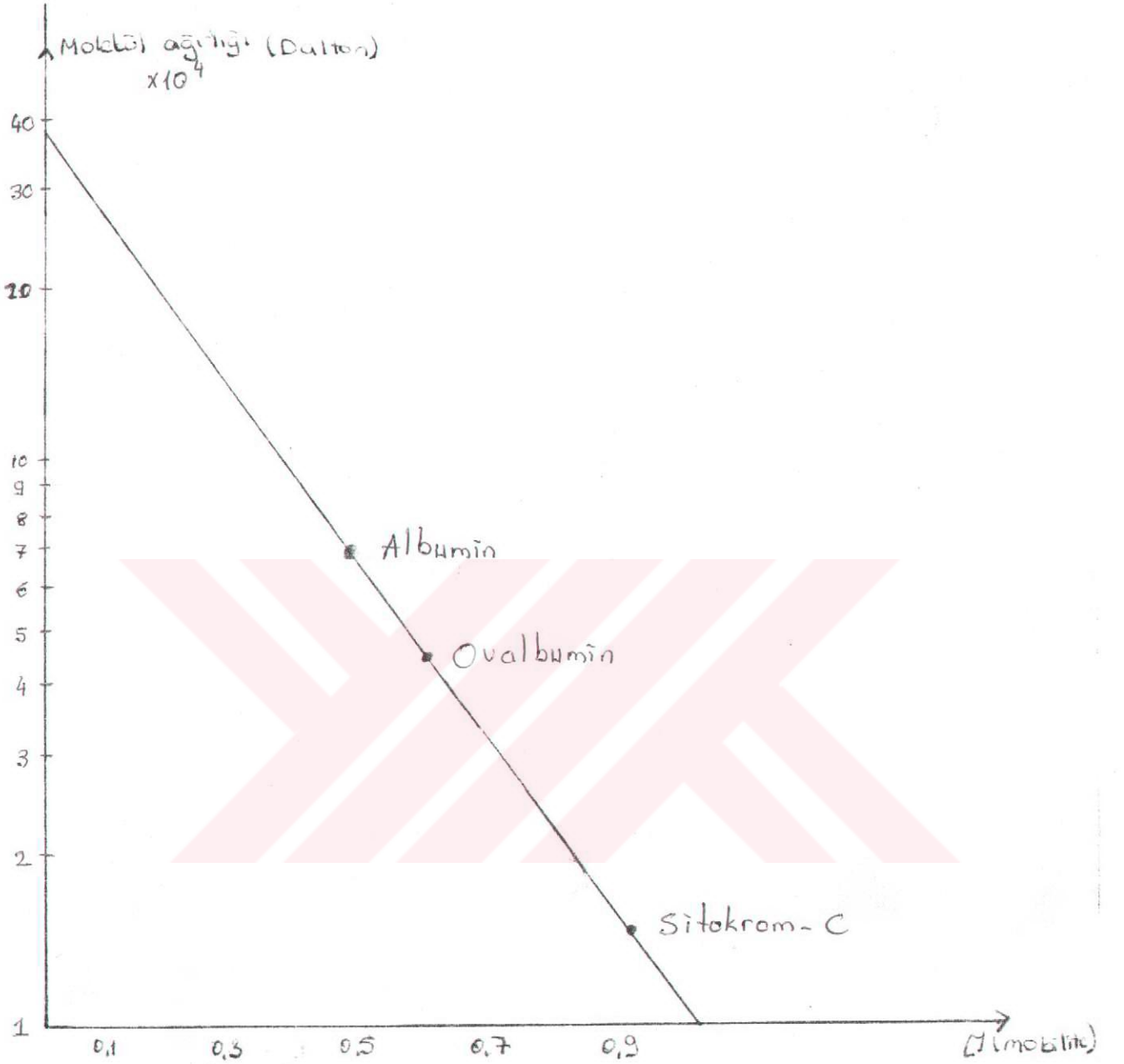
19 nolu reaksiyonlu hastada, Leamli SDS PAGE'de normale göre oldukça değişik bir band patterni gözlemlendi. 280 kd ve 240 kd molekül ağırlıklı bandların kaybolduğu ve 250 kd ve 215 kd molekül ağırlığında yeni bandların varlığı gözlemlendi. Ayrıca 125 kd ağırlığında band görünümündeki diffüz bölgenin kaybolduğu belirlendi.



Normal

Lepra reaksiyonlu hasta (19 no)

Leamli PAGE'de normal insan serumu ile lepra reaksiyonlu hasta serumunun bant patternleri arasındaki farklar.



Şekil III.5 Leamli elektrofrezini düşük moleküler ağırlıkta protein standartları için çizilmiş moleküler ağırlık tayin grafiği.

T A R T I Ő M A

Bu alışmada, Türkiye'de Reversal Reaksiyonlu hastalara sık rastlanmadığı için Eritema Nodosum Leprozum'lu hastaların kan serum örnekleriyle çalışıldı. Hastalara uzman doktorlar tarafından Eritema Nodosum Leprozum tanısı konduktan sonra kan serum örnekleri alındı ve bize getirildi.

Bu hastaları literatüre uygun olarak 4 gruba ayırdık.

Bu serum örneklerinin ilk olarak Lowry metodu ile protein tayini yapıldı. 750 nm'de absorbanları okundu. Bunun sonucunda biz kontrol grubunun serumdaki protein miktarını ortalama 8.0 mg/ml bulurken, reaksiyondaki hastanın serumdaki protein miktarını 99.8 bulduk. Reaksiyon sonrasında ise serumdaki protein miktarının bir miktar düştüğü 88.8 fakat yinede sağlıklı insandan daha fazla olduğunu gördük. Bu sonuçların literatürde verilmiş olanlarla benzer olduğu görülmüştür (42,43,44,45).

Dört grup hastaların gel pattern incelemeleri bulgular bölümünde anlatıldığı gibi tüm Lepra hastalarında bir L bandının varlığı tespit edildi. Literatür incelemelerinde bu bulguyu destekleyecek bir çalışmaya rastlanmadı. Bunun olası bir nedeni literatürde karşılaştığımız tüm elektroforez alışmaları SDS PAGE ile yapılmış olmasıydı. Bu bandla çalışmamızın daha ileri evrelerinde Lepra hastanesi ile daha sıkı işbirliği kurarak yoğun bir şekilde incelemeyi planlıyoruz.

Bu çalışmada reaksiyon sonrası ve remisyonadaki hasta grupları için iyileşme aşamasında olduklarından, benzer gel patterni bekleniyordu ancak 2 hastada (27 ve 28 nolu hastalar) aşırı reaksiyonlu izlenimi veren patternler elde edildi. Ancak Lepra hastanesi ile yaptığımız temas sonucunda, bu hastalarda reaksiyon bulgusu tespit edilmediğini öğrendik. Bu hastalarında gelecek kontrollerinde nasıl bir gel pattern ve hastane bulgusu sergileyecekleri ve bunun bizim mevcut bulgularımızla nasıl bağdaştırılacağı ileri bir tarihe bırakıldı.

Literatürde verilen λ bant patterni ile bizim bant patternimiz arasında büyük benzerlik mevcuttur. Ancak aradaki moleküler ağırlık hesabından doğan çelişki yüksek moleküler ağırlıktaki protein standartı olmamasından kaynaklanmaktadır.

Sonuç olarak lepra hastalarının gel patterninin incelenmesi hastalığın erken tanısı ve erken ilaç tedavisine başlanması konusunda yararlı olacağı izlenimini vermektedir.

V . Ö Z E T

Bu alışmada Lepra reaksiyonlu, Lepra reaksiyondan sonra, Lepramatöz lepra ve tedaviye yardımcı olmak üzere serum proteinlerinin iki değişik yöntemle poliakrilamid gel elektroforez görüntüleri elde edildi. Bu amaçla hastalardan alınan kan örneklerinin serum protein miktarları tayin edildi. Elektroforetik ayırma yöntemiyle görüntülemiş serum proteinleri mukayeseli bir şekilde incelendi.

VI. SUMMARY

In this work polyacrylamide gel electrophoresis patterns of patients serum with Lepromatous Leprosy, Leprosy reaction (Type II) subside reaction of Leprosy and remission types, were investigated for possible contribution to diagnose and also treatment of the disease. For this purpose total protein concentration of the blood samples were determined and band pattern were investigated.

K A Y N A K L A R

1. YENSON M:, İnsan Biyokimyası, Sermet matbaası, Kırklareli-Vize.(1984)
2. Ed.Azmi Telefoncu: Protein Yapısı ve Fonksiyonu.Tübitak, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu, Çeşme-İzmir/Turkey:(1988)
3. Karlson, Peter : Tıp ve Fen Bilimciler için Biyokimya Çeviri: Doç.Dr.Azmi Telefoncu, Sermet Matbaası-Kırklareli-Vize: (1988)
4. Dien, K. and Lentner.: Scientific Tables. Ciba-Geigy Imt. : 580-582 (1971)
5. Sonnenwirth, A.C., Jarett, L.: Grodwahls Clinical Laboratory Methods and Diagnosis : 1280 (1980)
6. Rees,W.F.: The microblog of Leprosy-Leprosy'de Ed. Hastings, R.C. 1'nci baskı. London-Edinburg, Churchill Livingstone Book: 31-52 (1985)
7. Nordeen, S.K.: The epidemiology of Leprosy-leprosyde Ed. Hastings, RC. 1'nci baskı. London, Edinburg, Churchill Livingstone Book : 15-30 (1985)
8. Lechat M.F., Vanderveken M.: Basic epidemiological İndicators for monitoring Leprosy control. Sasakawa Memorial Health Foundation, Tokyo: (1983)

9. Pfaltzgraff, R.E., Bryceson, A.: Clinical Leprosy. Leprosy'de Ed. Hastings, R.C. 1'nci baskı London, Edinburg, Churchill Livingstone Book: 134-176 (1985)
10. Bryceson,A., pfaltzgoft, R.E.: Leprosy. 3'ncü baskı. Edinburg, London, Melbourne ve New-York, Churchill Livingstone Book: (1990)
11. Prasod KUN., Ali, PM.: Incubation period of Leprosy, Indian Journal of Medical Research 55: 29-42 (1987)
12. Report of a wHo study Group: Epidemiology of Leprosy in relation to control. WHO Technical Report Series n^o 716, Geneva: (1985)
13. Pearson JMH.: The evalvation of nerue damage in Leprosy-Leprosy Review 53: 119-130 (1982)
14. Brand, P.W., Fritschi E.P.: Rehabilitation in Leprosy. Leprosy'de Ed. Hastings, RC. 1'nci baskı. London, Edinburg, Churchill Livingstone Book: 287-318 (1985)
15. Aytekin, H., Soyulan,T.: Türkiye'de Lepra. II. Ulusal Lepra seminerinde. Ed. Saylan, T., Sütlaş, M., Yaylacık Matbaası: 51-63 (1986)
16. Dharmerdra: Classifications of Leprosy,Leprosy'de Ed. Hastings, R.C. 1'nci baskı, London, Edinburg, Churchill Livingstone Book: 94-95 (1985)
17. Godal T, Negassi K.: Subclinical infection in Leprosy. British Medical Journall III: 557-559 (1985)
18. Ridley DS.: Histological classification and the immunologic spectrum of Leprosy. Bulletin of the World Health Organization, 51: 451-465 (1985)

19. Sehgal VN, Srivastava C.: Indeterminate Leprosy a passing phase in the evolution of Leprosy Review 58: 291-299 (1987)
20. Pearson JMJ, Ross WF: Nerve involvement in Leprosy Pathology, differential diagnosis and principles of management Leprosy Review 46 : 199-212 (1985)
21. Sabin T.D., Ebner JD.: Dattern of Sensory loss in Lepramatous Leprosy Int. Journ. of Lepr. 3:239-248 (1969)
22. Bjune, G.:Reaction in Leprosy. Leprosy Review Ispecial issue): 615-675 (1983)
23. Ridley D.S.: Reaction in Leprosy.Leprosy Review 40: 77-81 (1969)
24. Petit JHS., Waters MFR.: The etiology of erythema nodosum Leprosom. Int.Jour Lepr. 35 : 1-10 (1967)
25. Wemambu SNC, Türk JL, Waters MFR, Rees RJW : Erythema nodosum Leprosom, a clinical manifestation of the Arthos phenomom. Lancet II : 933-935 (1969)
26. Brand, M.E., Ffytche, T.J.: Eye complicatiuous of Lefrosy.Leprosy'de Ed. Hastings. l'nci baskı London, Edinburg, Churchill Livingstone Book: 223-242 (1985)
27. Barton R.P.E.: Ear, nose, and throat involement in Leprosy-Leprosy'de Ed.Hastings- l'nci baskı. London, Edinburg, Churchil Liulngstone Book: 243-252 (1985)
28. Newman J.: Electrochemical Systems, Ptentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, N.J.: 201 (1973)

29. Martin R.B.: Introduction To Biophysical Chemistry. Mc Grow-Hill Book Company : 183 (1964)
30. Williams, D.L., Nunn, R.F., Marks, V.: Scientific Foundations of clinical Biochemistry (Volume I). W. Heinemann Medical Books Hd. London: 259-275 (1978)
31. Freifelder, D.: Physical Biochemistry, W.H.Freeman and Company: 211-235 (1976)
32. Boyer, R.F.: Modern Experimental Biochemistry, The Benjamin/Commings Publishing Company, Inc.: 119-138 (1986)
33. Osborn M., Pringle J.R., Weberk.: Measurement of Molecular Weights by Electrophoresis on SDS-Acrylamide Gel, Meth. Enzymologie XXVI : 1972
34. Başar, Mustafa, Bodur, Hatice : Klinikte kağıt Elektroforezi, İstanbul Matbaası, İstanbul-1964
35. Weber K. and Osborn M.: The Reliability of Molecular weight Determination by Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, J.Biol.Chem., 244:4406-4412 (1969)
36. Ed.Allen,R.C.,Maurer, H.R.: Electrophoresis and isoelectric Focusing in Polyacrylamide Gel, Proceedings of small Congerence held at Tübingen, Germany: 1974
37. Lowry, o.H.: Methods of Enzmology III jwr.Bio. Chem. Vol. 193: 265 (1981)
38. Davis, B.J.: Disc Electrophoresis, II.Method and Application To Human Serum Proteins. Ann. N.4. Acad. Sci. 121: 404-427 (1964)

39. O' Farrell P.H. : High Resalution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. J.Biol.Chem, 250: 4007 (1975)
40. Öner, N., Akev, N.: Sodyum Dodesil sülfatın proteine Etki Tarzı ve Proteinin Dördüncül Yapısının Aydınlatılmasında kullanılması, Tıp Fak. Mecm 42: 723-730 (1979)
41. Garrels, J.I.: Computer-analysed two-dimensional gel electrophosesis of proteins. TIBS :281-283 (1980)
42. Gupta, R.K., Mukheja, R.D., Gupta. S., Samuel, K.C.: Electrophoretic Pattern of serum proteins in Leprosy. Int. Journ. of. Leprosy, vol.44, Number 4: 453-455 (1976)
43. Kapoor, K.K., Gupta, S.C., Mehtotra, T.N., Issac, J.J.: Electrophoretic Pattern of serum proteins In Leprosy Indion J. Med. Res 59 : 1424-1429 (1971)
44. Sen, K.N., Mital, U.S., Gupta, S.C., Mishra, D.N.,Singh, R.: Electrophoretic Pattern of serum proteins in Leprosy. J. Assoc Phsicians India, Vol.22: 381-384 (1974)
45. Mukherjee, A., Ghosh, S.: Study of Lepra-reaction-protein pattern. Bull Cacutta Sch Trop Med, vol 20 : 7-9 (1972)