

AMİLOİD PROTEİNİNİN TAYİNİ İÇİN DUYARLI İMMÜNOASSAY YÖNTEMLERİNİN  
GELİŞTİRİLMESİ

Büşra YILMAZ

Kütahya Dumlupınar Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği Uyarınca  
Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalında

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Doç. Dr. Derya KOYUNCU ZEYBEK

Ocak - 2020

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Büşra YILMAZ tarafından hazırlanan “AMİLOİD PROTEİNİNİN TAYİNİ İÇİN DUYARLI İMMÜNOASSAY YÖNTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ” adlı tez çalışması, aşağıda belirtilen jüri tarafından Kütahya Dumlupınar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek OY BİRLİĞİ ile Kütahya Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Matematik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

15/01/2020

Prof. Dr. Önder UYSAL  
Enstitü Müdürü, Fen Bilimleri Enstitüsü

Prof. Dr. Metin BÜLBÜL ✓  
Anabilim Dalı Başkanı, Biyokimya Anabilim Dalı

Doç. Dr. Derya KOYUNCU ZEYBEK  
Danışman, Biyokimya Anabilim Dalı

### Sınav Komitesi Üyeleri

Doç. Dr. Derya KOYUNCU ZEYBEK  
Kütahya Dumlupınar Üniversitesi, Biyokimya Bölümü

Doç. Dr. Ceylan AYADA  
Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Fizyoloji Bölümü

Dr. Öğr. Üyesi Ferda ÖZMAL  
Kütahya Dumlupınar Üniversitesi, Biyokimya Bölümü

\_\_\_\_\_

F.077

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Derya

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Ceylan

\_\_\_\_\_

F.077

## 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 Kütahya Dumlupınar Üniversitesi tarafından kullanılan İntihal Programı ile tarandığını ve benzerlik oranının % 19 çıktığını beyan ederiz. Aykırı bir durum ortaya çıktığı takdirde tüm hukuki sonuçlara razı olduğumuzu taahhüt ederiz.

Doç. Dr. Derya KOYUNCU ZEYBEK

Büşra YILMAZ



## AMİLOİD PROTEİNİNİN TAYİNİ İÇİN DUYARLI İMMÜNOASSAY YÖNTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Büşra YILMAZ

Biyokimya, Yüksek Lisans Tezi, 2020

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Derya KOYUNCU ZEYBEK

### ÖZET

Bu tez çalışmasının amacı, nörodejeneratif bir hastalık olan Alzheimer tayininde biyomarker olarak kullanılan amiloid  $\beta$  (1-42) proteini için yeni bir zaman gecikmeli immünoassay (TR-FIA) yöntemi geliştirilmesidir. Bunun için, ilk olarak, ticari olarak temin edilen 3,4bis [4(4,4,5,5,6,6,6 heptafloro1o,3dioksoheksil) fenil]bensülfoniklorür (BHHCT) ve sentezi yapılan 10,10'-(4,4,5,5,6,6,7,7-oktafloro-3,8-dioksodekane diol) bis (antrasin-9-sülfonil klorür) (SD1) ligantları kullanılarak floresans etiketler oluşturuldu. Uygun immünoassay prosedürü oluşturuldu ve çeşitli deney parametreleri optimize edildi. Çalışmanın ikinci kısmında optimum veriler ışığında, hazırlanan etiketler kullanılarak, amiloid  $\beta$  (1-42) proteinine ait kalibrasyon çalışmaları mikro plate floresans okuyucuda Zaman Gecikmeli Floroİmmünoassay (TR-FIA) tekniği yapıldı. Amiloid  $\beta$  (1-42) biyomolekülü için doğrusal çalışma aralığı, BHHCT etiketi kullanılarak 0,5-10000 pg/mL olarak, SD1 etiketi kullanılarak 0,5-4000 pg/mL olarak belirlendi. Son olarak oluşturulan assayın analitik uygulanabilirliği, sentetik serum numunelerine amiloid  $\beta$  (1-42) proteini ilave edilerek araştırıldı ve % geri kazanım değerleri hesaplandı.

**Anahtar Kelimeler:** Amiloid  $\beta$  (1-42), Eu(III) Kompleks, Floresans etiketler, İmmünoassay, Zaman Gecikmeli Floro İmmünoassay (TR-FIA)

# THE SENSITIVE IMMUNOASSAY METHODS DEVELOPMENT FOR DETECTION OF AMYLOID PROTEIN

Büşra YILMAZ

Biochemistry, M.S. Thesis, 2020

Thesis Supervisor: Assoc. Prof. Derya KOYUNCU ZEYBEK

## SUMMARY

The aim of this thesis is to develop a new time delay immunoassay (TR-FIA) method for amyloid  $\beta$  (1-42) protein used as biomarker in the determination of Alzheimer's disease which is a neurodegenerative disease. For this, firstly, commercially available 3,4bis [4 (4,4,5,5,6,6,6heptafluoro, 3dioxohexyl) phenyl] benzenesulfonylchloride (BHHCT) and synthesized 10,10'-(4,4 Fluorescence labels were generated using 5,5,6,6,7,7-octafluoro-3,8-dioxodecanediol) bis (anthracene-9-sulfonyl chloride) (SD1) ligands. The appropriate immunoassay procedure was established and various experimental parameters were optimized. In the second part of the study, in the light of optimum data, calibration studies of amyloid  $\beta$  (1-42) protein were prepared by using labels prepared TR-FIA technique in Micro Plate Fluorescence Reader. The linear working range for the amyloid  $\beta$  (1-42) biomolecule was 0.5-10000 pg / mL for BHHCT and 0.5-4000 pg / mL for SD1 labels. Finally, when using assay analysis, synthetic serum samples were calculated for examining amyloid  $\beta$  (1-42) protein and % recovery.

**Keywords:** Amyloid  $\beta$  (1-42), Eu (III) Complex, Fluorescence labels, Immunoassay, Time Resolved Fluoro Immunoassay (TR-FIA)

## TEŞEKKÜR

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

TÜBİTAK tarafından desteklenen 214Z093 nolu proje kapsamında SD1 maddesinin sentezini yapan ve bu teze büyük bir katkı sağlayan Kimya Bölümü öğretim üyesi sayın Prof.Dr. Alper Tolga ÇOLAK' a teşekkürlerimi sunarım.

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

Eğitimim süresince olduğu gibi hayatım boyunca beni destekleyen annem Ayşe YILMAZ, babam Mevlüt YILMAZ' a ve kardeşimlerim Şeyma YILMAZ, Kübra COŞKUN' a, çalışmalarımda beni yalnız bırakmayan araştırma grubu arkadaşım, değerli dostum Betül ŞENOL' a teşekkür ederim.

Tez dönemim boyunca, 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs kapsamında beni maddi olarak destekleyen TÜBİTAK-BİDEB'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa</u></b>
ÖZET .....	v
SUMMARY .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ .....	1
2. KURAMSAL TEMELLER .....	3
2.1. Alzheimer Hastalığı ve Tarihçesi.....	3
2.1.1. Alzheimer hastalığını etkileyen faktörler .....	4
2.1.2. Alzheimer'ın nöropatolojisi .....	5
2.2. Amiloid $\beta$ .....	8
2.2.1. Alzheimer tanısı ve amiloid $\beta$ tayin yöntemleri .....	10
2.3. İmmünite.....	11
2.3.1. Antikor (Ab) ve yapısı.....	12
2.3.2. Antijen (Ag) .....	15
2.3.3. İmmünoanalitik teknikler .....	16
2.4. İmmünosensör.....	17
2.5. İmmünoassay .....	18
2.5.1. İmmünoassay yöntemlerinin sınıflandırılması .....	20
2.6. İmmünoassaylerde Kullanılan Etiketler.....	22
2.7. İmmünoassay Çeşitleri.....	23
2.8. Zaman Gecikmeli Floresans İmmünoassay (TR-FIA).....	25
2.8.1. 3,4bis [4(4,4,5,5,6,6heptafloro1o,3dioksoheksil) fenil] benzen sülfonil klorür (BHHCT) ve 10,10'-(4,4,5,5,6,6,7,7-oktafloro-3,8-dioksodekanediol)bis (antrasin-9-sülfonil klorür) (SD1).....	27
2.9. Kaynak Araştırması .....	28
2.9.1. Amiloid $\beta$ tayini için yapılan çalışmalar .....	28
2.9.2. TR-FIA tekniği ile yapılan çalışmalar.....	29
3. MATERYAL YÖNTEM .....	32

## İÇİNDEKİLER (devam)

	<b><u>Sayfa</u></b>
3.1. Kullanılan İmmunoassay Cihazı ve Mikroplaterler .....	32
3.2. Kullanılan Diğer Cihazlar .....	34
3.3. Kullanılan Kimyasallar .....	35
3.4. Kullanılan Çözeltiler.....	35
3.4.1. İnkübasyon tamponu .....	35
3.4.2. Bloke edici-Engelleme tamponu .....	35
3.4.3. Yıkama tamponu .....	36
3.4.4. Diyaliz tamponu .....	37
3.4.5. Etiket tamponları .....	37
3.5. Eu (III) Etiket Çözeltilisinin Hazırlanması .....	37
3.6. Uygulanan İmmunoassay Formatı .....	39
3.7. SA(BSA)-Ligant-Eu(III) Etiket Çözeltilisinin Seyreltme Oranının Optimizasyonu .....	40
3.8. A $\beta$ (1-42)- Ab1 ve B-A $\beta$ (1-42)-Ab2 Derişim Optimizasyonu Çalışması.....	40
3.9. A $\beta$ (1-42)-Ab1 ile A $\beta$ (1-42)-Ag Etkileşim Süresi Optimizasyonu.....	42
3.10. A $\beta$ (1-42)-Ag ile B-A $\beta$ (1-42)-Ab2 Etkileşim Süresi Optimizasyonu.....	43
3.11. A $\beta$ (1-42) (pg/mL) Protein Tayini İçin Doğrusal Çalışma Aralığının Belirlenmesi .....	43
3.12. Tekrarlanabilirlik .....	44
3.13. Sentetik Serumda A $\beta$ (1-42) Tayininin Yapılması .....	44
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....	46
4.1. Optimizasyon Çalışmaları.....	46
4.1.1. SA(BSA)-LİGAND-Eu(III) etiket çözeltilisinin dilüsyon oranının optimizasyonu.....	46
4.1.2. A $\beta$ (1-42)-Ab1 ve B- A $\beta$ (1-42)-Ab2 derişimlerinin optimizasyonu .....	49
4.1.3. A $\beta$ (1-42)-Ab1 ile A $\beta$ (1-42)-Ag antijeninin etkileşim süresinin optimizasyonu .....	53
4.1.4. A $\beta$ (1-42)-Ag ve B-A $\beta$ (1-42)-Ab2 etkileşim süresinin optimizasyonu .....	55
4.2. TR-FIA Yöntemi ile A $\beta$ (1-42) (pg/mL) Tayini İçin Doğrusal Çalışma Aralığının Belirlenmesi .....	58
4.3. Tekrarlanabilirlik .....	62
4.4. Sentetik Serum Numunelerinde Amiloid $\beta$ Proteininin Tayini.....	63
5. SONUÇLAR .....	65
KAYNAKLAR DİZİNİ .....	67
ÖZGEÇMİŞ	



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b><u>Sekil</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
2.1. Nörofibriler yumak oluşumu.....	7
2.2. Amiloid prekürsör protein işlenmesi.....	8
2.3. Amiloid kaskad hipotezi. ....	9
2.4. Antikor yapısı.....	12
2.5. İmmünoansör genel gösterimi. ....	18
2.6. İmmünoassay genel gösterimi.....	20
2.7. İmmünoassay tipleri (1: homojen yarışmalı immünoassay. 2: homojen yarışmasız immünoassay. 3: heterojen yarışmalı immünoassay. 4: heterojen yarışmasız immünoassay).....	20
2.8. Yarışmasız immünoassay deney aşamaları. ....	21
2.9. Yarışmalı immünoassay deney aşamaları. ....	22
2.10. $\beta$ -diketonatlar. ....	27
2.11. BHHCT'nin kimyasal yapısı.....	28
2.12. SD1 kimyasal yapısı.....	28
3.1. Deneyde kullanılan plaka okuyucu. ....	32
3.2. Corning Costar® 96-kuyucuklu siyah polistiren plate.....	34
3.3. SA-BSA(BHHCT/SD1) kompleks hazırlama prosedürü. ....	38
3.4. İmmünoassay basamakları (A) Mikroplakalara antikor kaplanması B) Yıkama ve bloke etme C) Antijenin ilave edilmesi D) İkincil antikorun ilave edilmesi E) Etiketinin ilave edilmesi) .....	39
3.5. Optimizasyon için kuyucuklara eklenen derişimler (farklı derişimlerde eklenen Ab1-Ab2 derişim miktarları).....	42
3.6. A $\beta$ (1-42)-Ag protein tayini için kuyulara eklenen antijen derişimleri.....	44
4.1. SA(BSA)-BHHCT-Eu(III) etiket çözeltisinin dilüsyon oranı (1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200) optimizasyonu. ....	47
4.2. SA(BSA)-SD1-Eu(III) etiket çözeltisinin dilüsyon oranı (1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200) optimizasyonu. ....	48
4.3. (A) A $\beta$ (1-42)-Ab1 Antikor derişim optimizasyonu (B) B-A $\beta$ (1-42)-Ab2 derişim optimizasyonu. ....	50
4.4. (A) A $\beta$ (1-42)-Ab1 Antikoru derişim optimizasyonu ve (B) B-A $\beta$ (1-42)-Ab2 antikoru derişim optimizasyonu. ....	52

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<b><u>Sekil</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
4.5. SA(BSA)-BHHCT-Eu(III) etiketi kullanılarak A $\beta$ (1-42)-Ab1 ile A $\beta$ (1-42)-Ag antijeninin etkileşim süresinin optimizasyonu. ....	54
4.6. SA(BSA)-SD1-Eu(III) etiketi kullanılarak A $\beta$ (1-42)-Ab1 ile A $\beta$ (1-42)-Ag antijeninin etkileşim süresinin optimizasyonu. ....	55
4.7. SA(BSA)-BHHCT-Eu(III) etiketi kullanılarak A $\beta$ (1-42) protein & B-Ab2(1-42) etkileşim süresinin optimizasyonu. ....	56
4.8. SA(BSA)-SD1-Eu(III) etiketi kullanılarak Ab(1-42)-Ag protein & B-Ab2(1-42) etkileşim süresinin optimizasyonu. ....	57
4.9. (A) SA(BSA)-BHHCT-Eu(III) ile elde edilen kalibrasyon grafiği (B) 4-PL model ile elde edilen kalibrasyon grafiği. ....	59
4.10. (A) SA(BSA)-SD1-Eu(III) ile elde edilen kalibrasyon grafiği (B) 4-PL model ile elde edilen kalibrasyon grafiği. ....	61

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. İmmünoassayde kullanılan etiketler ve örnekleri.....	23
2.2. BHHCT ve diğer $\beta$ -diketonat esaslı ligandlar kullanılarak yapılan TR-FIA çalışmaları.....	31
3.1. Destek tiplerinin sınıflandırılması.....	33
3.2. Çalışmada kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları.....	34
3.3. Çalışmada kullanılan kimyasalların isimleri ve temin edildikleri firmalar.....	35
3.4. İmmünoassay gelişiminde yaygın olarak kullanılan tamponlar.....	37
4.1. Literatürlerde etiket dilüsyon oranı çalışmaları.....	49
4.2. Literatürde Optimum birincil ve ikincil antikor derişimleri çalışmaları.....	53
4.3. Kullanılan etiketler için optimize koşullar.....	58
4.4. Amiloid $\beta$ proteininin tayini için yapılan çalışmalar.....	62
4.5. Tekrarlanabilirlik sonuçları.....	63
4.6. Sentetik serum numunesinde % geri kazanım değerleri.....	64

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

%	Yüzde
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
ng	Nanogram
pg/mL	Pikogram/mililitre
L	Litre
M	Molar
mL	mililitre
nm	nanometre
°C	Santigrat derece
t	Zaman

### Kısaltmalar

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
AH	Alzheimer hastalığı
NFY	Nörofibril yumak
SP	Senil plak
APP	Amiloid öncü protein
Aβ (1-42)	Amiloid β (1-42)
Aβ (1-42)-Ab1	Amiloid β (1-42) birincil antikor
B-Aβ (1-42)-Ab2	B-Amiloid β (1-42) ikincil antikor
Aβ (1-42)-Ag	Amiloid β(1-42) proteini
BSA	Sığır serum albumin
SA	Streptaavidin
GA	Gluteraldehit
BHHCT	4,4''-Bis(4,4,5,5,6,6,6-heptafloro-1,3-dioksiheksil)-o-terpenil-4'-sülfonil klorür
SD1	10,10'-(4,4,5,5,6,6,7,7-oktafloro-3,8-dioksodekanediol)bis (antrasin-9-sülfonil klorür)
TR-FIA	Zaman gecikmeli floroimmünoassay
PBS	Fosfat tampon çözeltisi

## 1. GİRİŞ

Bir demans türü olarak bilinen Alzheimer hastalığı (AH), merkezi sinir sisteminin çeşitli kısımlarında nöron ve sinaps kayıpları nedeni ile ortaya çıkan; bilişsel işlevlerde azalma, öz bakım yetersizlikleri, çeşitli nöropsikiyatrik ve davranışsal bozukluklar ile karakterize edilen bir hastalıktır (Lleo vd., 2006). AH ile ilişkili başlıca lezyonlar senil plaklar ve nörofibriler yumaklardır. Senil plakların ana bileşeni Amiloid  $\beta$  ( $A\beta$ ) proteinidir.  $A\beta$ , öncül bir protein olan amiloid prokürsör protein (APP)'in çeşitli enzimlerle parçalanmasıyla oluşan bir metabolizma ürünüdür. Bir diğer lezyon, nörofibriler yumak ise aktif kinazların tau proteinin hiperfosforilasyonlanmasıyla oluşur ve hücrel fonksiyonlara zarar vermektedir (Yiannopoulou ve Papageorgiou, 2013).

AH dünya çapında önemli bir halk sağlığı problemidir. AH yavaş yavaş hafıza kaybı, anormal beyin sinirleri oluşumu ve bilişsel gerileme gibi belirtilerle karakterize olmuştur. Amiloid  $\beta$ , AH'nin saptanması, erken taranması ve teşhisi için güvenilir moleküler biyobelirteçlerden biri olarak kullanılabilirdiği düşünülmüştür (Ke vd., 2018). Alzheimer hastalığında serumda veya plazmada algılanan amiloid  $\beta$ , ölüm sonrası histokimyasal analizden ziyade Alzheimer hastalığının olası bir potansiyelinde teşhis edilebilirliği gösterilmiştir (Diba vd., 2017).

Alzheimer'da tanı amaçlı kullanılabilen amiloid  $\beta$  proteininin tayininin yapılması söz konusu hastalığın erken tanısında ve sonrasında tedavi sürecinin yönetilmesinde önemli olmaktadır. İnsan ve deney hayvanlarının beyinlerindeki, amiloid  $\beta$  peptitlerinin tayini için Enzim Bağlı İmmüno-sorbent Assay (ELISA) ve kütle spektroskopisi en çok kullanılan yöntemlerdir. Diğer pek çok tür için de yeni kütle spektrometrisi teknikleri de geliştirilmiştir. Ancak bu yöntemler pahalı ve zaman alıcıdır (Xing ve Xia, 2015). Bunun yanında, yöntemlerin uygulanabilmesi için uzmanlaşmış kullanıcılar gerekmede ve bu yöntemler hasta başı analizler için uygun görülmemektedir. Antikor-antijen arasındaki spesifik etkileşime dayalı olarak gerçekleşen ELISA ve diğer immünoassay yöntemleri ise nispeten daha duyarlı ve kolay analiz imkanları sunmaktadır. Bu sebepten **immünoassay yöntemleri** pek çok proteinin tayini için diğer yöntemlere iyi bir alternatif oluşturmaktadır (Darwish, 2006).

İmmünoanalitik teknikler, antijen-antikor etkileşmesine dayanan tayin yöntemleridir. İmmünoanalitik teknikler immünoassay ve immünosensör olarak ikiye ayrılmaktadır. İmmünoassay çalışmaları, hastalıkların tanısı için klinik laboratuvarlarda, terapötik ilaç analizleri, ilaç tasarımı ve ilaç endüstrisindeki farmokinetik ve biyo-eşdeğerlik çalışmaları, çevre

analizleri, araştırma laboratuvarları veya sanayi laboratuvarlarında tayini istenilen türün ölçümünde kullanılırlar (Law, 1996).

İmmünoassaylerdeki ölçüm sistemi, herhangi bir immünoanalitik reaktife (analit ya da antikor) bağlanabilen, immünolojik özelliklerini kaybetmeden ve hızlı bir şekilde tayin edilebilir bir etiket kullanılması gerekir. Kullanıldığı etiket tipine göre isimlendirilirler. Eu(III) komplekslerinin etiket olarak kullanıldığı Zaman Gecikmeli Floroimmünoassay (TR-FIA) yöntemi, floresans yönteminin yüksek seçiciliğini ve zemin floresansı önleyebilmesi gibi avantajlarından dolayı, bu güne kadar pek çok proteinin tayini için, tercih edilmiştir. Yapılan literatür araştırmaları ışığında, amiloid  $\beta$  proteinin tayininde Eu(III) komplekslerinin etiket olarak kullanıldığı çalışmalara rastlanmamıştır

Bu çalışmada; dünya çapında önemli bir nörodejenaratif hastalık olan **Alzheimer hastalığının** tanı ve tedavisinde fizyolojik bir belirteç olan amiloid  $\beta$  proteininin tayini için **Zaman Gecikmeli Floroimmünoassay (TR-FIA)** yöntemi geliştirilmesi amaçlanmaktadır.

## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. Alzheimer Hastalığı ve Tarihçesi

AH, 1907 yılında tanımlanan, yaşlanmayla birlikte giderek yaygınlaşan kronik nörodejeneratif bir hastalıktır. Hastalık, beyinde plak ya da yumak oluşturmak üzere proteinlerin birikimiyle karakterize edilir (De Paula vd., 2012). Bilişsel işlevlerde azalma, öz bakım yetersizlikleri, çeşitli nöropsikiyatrik ve davranışsal bozukluklar ile seyrederek (Leo vd. , 2006)

AH adını hastalığı ilk kez tanımlayan Alman Doktor Alois Alzheimer'dan almıştır. Dr. Alzheimer, ilerleyen bilişsel bozukluklar, odaklanma problemleri, halüsinasyonlar, psikososyal yetersizlik ve unutkanlık gibi durumlarla karşı karşıya olan, Augusta Deter isimli hastanın davranışlarını beyinsel yapıyla ilişkilendirmek için çalışmalar yapmıştır. Hastanın nekropsisinden sonra beyinde plakların nörofibriler yumakların, arteriosiklotik değişikliklerin ve serebral kortekste belirgin bir hücre kaybının (atrofi) varlığını göstermiştir (Maurer vd., 1997). Doktor Alzheimer'ın meslektaşı olan Dr. Emil Kraepelin 1910 yılında yayımlanan bir tıp kitabında Alzheimer adını vermiştir.

AH, demansın (bunama) en bilinen formudur. Demans genel olarak hafızanın ve günlük yaşamı ciddi bir şekilde etkileyen bilişsel yeteneklerin kaybı için kullanılan bir terimdir. Demans ile sonuçlanan pek çok hastalık tanımlanmasına rağmen Alzheimer tüm demans vakaları içerisinde en fazla orana (%60-80) sahip hastalıktır ([https://www.alz.org/national/documents/brochure\\_basicsofalz\\_low.pdf](https://www.alz.org/national/documents/brochure_basicsofalz_low.pdf)).

Alzheimer hastalığında üç ayrı evre görülür:



Alzheimer hastası bireylerin ölümünden sonra nöropatolojik incelemeler sonunda beyinde büyük hücre kaybı (atrofi) görülmüştür. Makroskopik incelemeler ışığında, beyindeki girintilerinde (sulkus) genişleme, çıkıntılarında (girus) küçülme ve atrofiye bağlı olarak ventrikül genişlemesi görülmektedir (Muselum, 2000).

### 2.1.1. Alzheimer hastalığını etkileyen faktörler

Alzheimer hastalığına, çeşitli proteinlerin, hücre dışı senil plak ve hücre içi nörofibriler yumak oluşturmak üzere birikmesiyle, nörolojik dejenerasyona yol açan patolojiler yol açar (Kim vd., 2015). Bunun yanı sıra, hastalığın gelişiminde, etkili olan birçok faktör olduğu bilinmektedir.

Amiloid  $\beta$  proteini ( $A\beta$ ), beyinde, AH'ye yol açan bir olaylar dizisi için tetikleyici olarak önerilmiştir. Her ne kadar kesin nörotoksik mekanizma tartışmalı kalsa da, genetik, biyokimyasal, moleküler biyolojik ve patolojik kanıtlar güçlü bir şekilde amiloid hipotezini



desteklemekte ve A $\beta$ ' nin aşırı birikiminin, AH'de nörofibriler yumaklar, nörodejenerasyon ve nöroenflamasyona yol açan birincil patolojik olay olduğunu ortaya koymaktadır (Wang, 2018).

Alzheimer hastalığı görülme sıklığı yaşa bağlı olarak artar. Hastalık, başlangıç yaşı temel alınarak, erken başlangıçlı ve geç başlangıçlı AH olmak üzere iki alt gruba ayrılır (Bekris vd., 2010). Hastalığın görülme sıklığı 60 yaşından önce nadirken, 85 yaş ve üzerindeki yaşlarda yaklaşık %50 artmaktadır (Yavuz, 2008). AH' nin 2050 yılı itibariyle, dünya genelinde, 85 kişiden 1' ini etkileyeceği tahmin edilmektedir (Liu vd., 2014).

Otozomal dominant ailevi AH ile üç gen (Amiloid  $\beta$  protein prekürsörü, APP; presenilin-1, PS1 ve presenilin-2, PS2) ve bir genetik risk faktörü (APOE $\epsilon$ 4 alel) ile ilişkilendirilmiştir (Bekris vd., 2010). Bunun yanında tau proteinin kodlayan gen mutasyonları da hastalığa yol açmaktadır. Geç başlangıçlı AH için APOE- $\epsilon$ 4'ün çok ciddi bir risk faktörü olduğu bilinmektedir. Geç başlangıçlı AH sıklığının, genetik ve çevresel risk faktörleri arasındaki etkileşim nedeniyle arttığı düşünülmektedir.

AH için risk faktörleri sıralanırsa,

- Kadın hastaların sayısının erkek hastalardan %10 daha fazla olduğu rapor edilmiştir (Kawas vd., 2000).
- Uzun süreli alkol kullanımı Alzheimer hastalığını tetikler (Tyas, 2001).
- Down sendromlu erişkin bireylerde risk artmaktadır (Lott ve Head, 2005).
- Ailesel Alzheimer hikayesi diğer kişilere göre artmış risk demektir (Brien ve Ballard, 2001).
- Eğitim seviyesinin düşük olması hastalık riskini artırmaktadır (Teri vd., 1990).

### 2.1.2. Alzheimer'ın nöropatolojisi

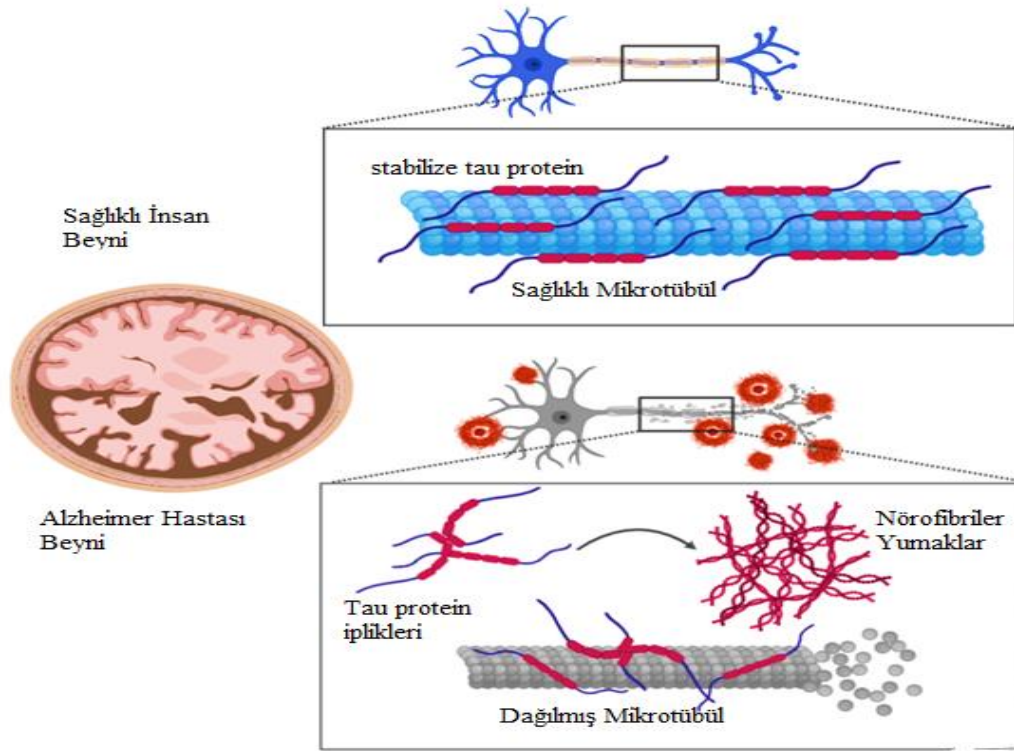
Alzheimer hastalığı ile ilişkili başlıca lezyonlar, nörofibriler yumaklar ve senil plaklardır. Nörofibriler yumaklar, belirli nöronların sitoplazması içinde anormal fosforillenmiş tau proteinlerinin birikimlerinden oluşur. Senil plaklar ise, anormal bir şekilde nöronal süreçlerle çevrelenen, amiloid  $\beta$  peptitinden oluşan merkezi bir çekirdekten ibarettir. Alzheimer vakalarında başka nöropatolojik lezyonlara da rastlanır, ancak hastalık bu iki lezyon ile tanımlanır ve tanınır (Swerdlow, 2007).

Diğer söz konusu lezyonlar, granülovakuolar dejenerasyon ve eozinofilik çubuk benzeri cisimler (Hirano cisimleri) gibi çok iyi anlaşılmayan değişiklikleri içerir. Bunların yanında

sinaptik bileşenlerin kaybının, bilişsel işlev üzerinde belirgin bir etkisi vardır ve başka bir önemli morfolojik değişikliği temsil eder (Perl, 2010).

### Nörofibriler yumaklar

Alzheimer hastalığında, piramidal nöronların perikaryal sitoplazmasında anormal fibröz inklüzyonların varlığı belirlendikten sonra bu inklüzyonlara nörofibriler yumaklar adı verildi (Cummings, 2004). Nörofibriler yumaklar, yapısal olarak, 10 nm çapında çiftler halinde bulunan anormal fibrillerden oluşur ve sarmal bir şekilde düzenli aralıklarla sarılır. Bu yapılar genellikle çift sarmal fibriller olarak adlandırılır. Nörofibriler yumakların birincil bileşeni mikrotübül ile ilişkili tau proteindir. Tau molekülü, üzerindeki çok spesifik bölgelere fosfat gruplarının bağlanması ile anormal şekilde fosforile edilir. Hiperfosforilize tau proteini mikrotübüllere bağlanamaz ve çözünemeyen fibrillere dönüşür. Nörofibriler yumaklarla ilişkili ubiquitin, kolinesteraz ve amiloid  $\beta$  gibi pek çok protein daha mevcuttur. Ancak, tau bu yapıların kritik bileşeni olarak kabul edilir. Bu yumakların yaygınlığı ve dağılımı, hem hastalığın derecesi ve hem de hastalık süresi ile ilişkilidir. Bu anormallikler beynin işlevi kapasitesi üzerinde doğrudan bir etkiye sahiptir. Fibriler yumaklar, hücre iskeletinin bütünlüğünü bozar, aksonal taşınmayı engeller, nörolojik işlevlerde bozukluklara neden olur ve nöron kaybına yol açar (Arciniegas, 2001). Her ne kadar nörofibriler yumaklar, Alzheimer hastalığının başlıca bir histopatolojik özelliği olarak kabul edilmekle birlikte, bu nöropatolojik lezyonun diğer birçok hastalık durumuyla ilişkili olarak da görülebileceği akılda tutulmalıdır (Perl, 2010). Niemann-Pick hastalığı, Progresif Supranükleer Palsi (PSP), Parkinson-demans gibi nörodejeneratif hastalıklar örnek olarak verilebilir. Ancak Alzheimer hastalığı dışında diğer nörodejeneratif hastalıklarda amiloid  $\beta$  birikimi görülmez (Ozansoy ve Baþak, 2007). Şekil 2.1' de nörofibril yumak oluşumu ve bunun sonucunda beyinde oluşan değişiklik şematize edilmiştir.



Şekil 2.1. Nörofibriler yumak oluşumu (Barron vd., 2017).

### Senil plak

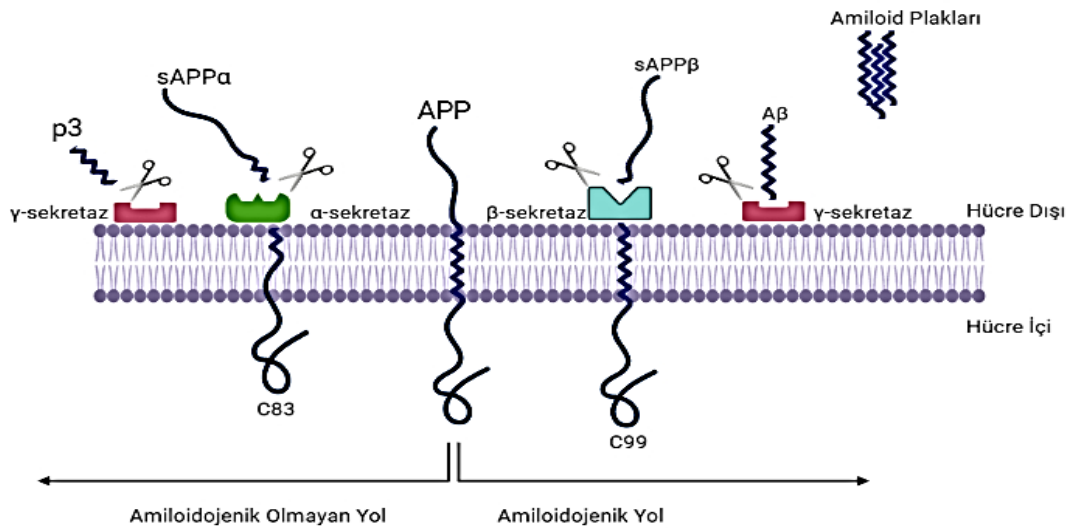
Alzheimer hastalığından karşılaşılan diğer temel patolojik lezyon, senil veya nöritik plaktır. Senil plaklar, amiloid  $\beta$  adı verilen 4-kD'lik bir proteinin,  $\beta$ -tabakalı konfigürasyonunda merkezi bir çekirdek oluşturacak şekilde birikimiyle meydana gelen kompleks yapılardır. Alzheimer hastalığı vakaları ayrıca çeşitli amiloid  $\beta$  plak formları da içerebilir. Senil veya nöritik plak, radyal tarzda düzenlenmiş amiloid  $\beta$  proteinden oluşmuş merkezi bir çekirdeğe sahiptir ve nöritlerin anormal şekilde bu merkezi çekirdeği çevrelemesi ile oluşmuştur. Amiloid  $\beta$  proteini daha büyük bir transmembran glikoprotein olan Amiloid öncü proteinden (APP) üretilir. Öncü proteinin, amiloid kısmı, 4-kD segmentinin amino ve karboksil terminallerini kesen iki sekretaz enzimin etkisiyle oluşturulur. Protein daha sonra salınır ve beyin dokularında birikir. Senil plakların merkezi çekirdeklerinde ayrıca, heparan sülfat, apolipoprotein E, alfa-1-antikimotripsin proteinleride bulunur (De Paula vd., 2012; Harris, 2012).

Senil amiloid plaklar (nöritik plaklar) hücre dışında bulunur ve 21. kromozomda kodlanan APP' nin çeşitli enzimlerle parçalanmasıyla 40–42 aminoasitlik amiloid  $\beta$  peptidi oluşturur. Senil plakların ana bileşeni  $A\beta$ 'dir. Amiloid  $\beta$  birikimi sonucu hücreler arası iletişim

bozulmakta, hücre ölümü artmakta ve sonuçta doku işlev göremez hale gelmektedir. Senil plaklar şekil ve boyut olarak farklılık gösterebilir ortalama olarak boyutları 50 mikrondur. Amiloid  $\beta$  seviyelerini artıran sebep ise 21.kromozomda yer alan APP ve 1. kromozomda yer alan Presenilin 2 (PS2) genlerinin mutasyonudur. Mutasyon sonucunda amiloid  $\beta$  peptit seviyeleri artmaktadır. Amiloid peptidinin farklı izoformları mevcuttur fakat Amiloid  $\beta$  (1-42) toplanarak yumak oluşumuna eğilimlidir bu nedenle senil plaklarda amyloid  $\beta$  baskın olarak görülür (Iwatsubo vd., 1994; Naslund vd., 2000; Gong vd., 2003; Cummings, 2004; Georganopoulou vd., 2005)

## 2.2. Amiloid $\beta$

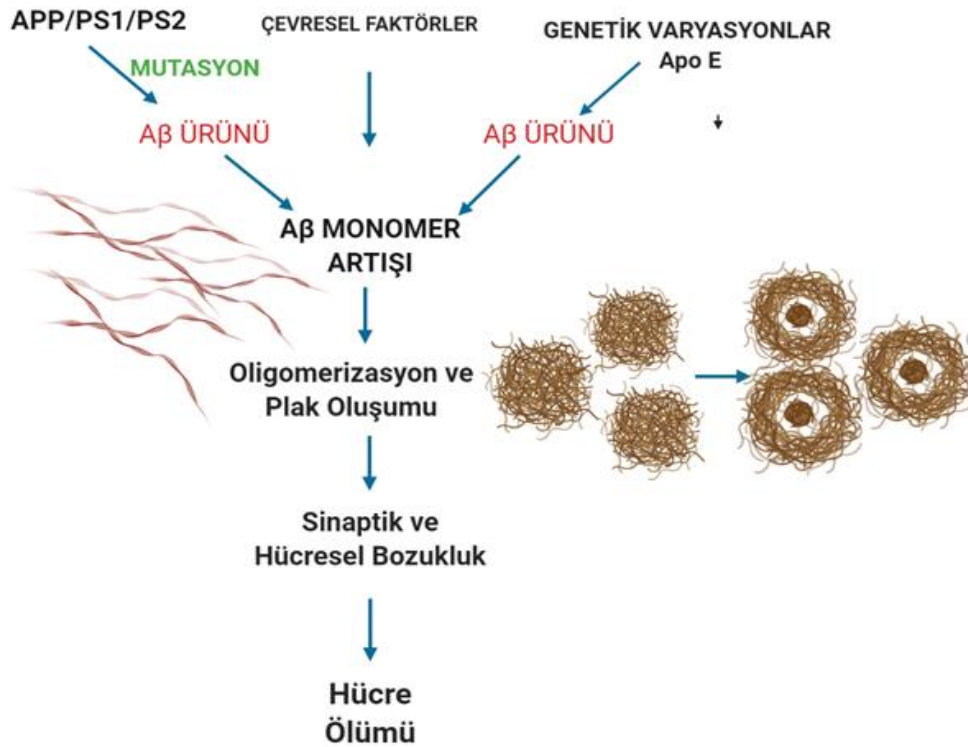
Senil plaklar temel bileşeni olan Amiloid  $\beta$  peptiti 21. kromozomdan kodlanan amiloid öncü proteininin enzimatik olarak kesilmesiyle oluşturulur. APP kısa ömürlüdür ve translyasyon sonrası amiloidojenik olan ve olmayan olmak üzere iki şekilde işlenir. (Şekil 2.2.) Amiloidojenik olmayan yolda  $\alpha$ -sekretaz  $\beta$  amiloid bölgesi içinden peptiti keser. Bu durumda amiloid  $\beta$  fragmentleri oluşmaz ve sonrasında  $\gamma$ -sekretaz enzimi bir P3 fragmenti oluşturmak üzere kalan peptiti keser. Amiloidojenik yolda ise,  $\beta$ -sekretaz Amiloid  $\beta$  bölgesinin N-terminalinden keserek amiloid prokürsör protein fragmentleri sAPP $\beta$  peptiti oluşturur.  $\gamma$  sekretaz ise kalan peptiti amiloid  $\beta$  oluşturmak üzere keser. Oluşan amiloid  $\beta$  peptitleri fibriller yapıda kıvrılarak plak yapılarını oluşturur (Hardy ve Higgins, 1992; Davinelli vd., 2011).



Şekil 2.2. Amiloid prekürsör protein işlenmesi.

Amiloid  $\beta$  proteini, 40–42 amino asitten oluşan bir proteindir. Amiloid  $\beta$ 'nın yaklaşık olarak %90'ı amiloid  $\beta$  (1–40) olmakla birlikte amiloid birikiminin ana bileşeni amiloid  $\beta$  (1–42)'dir. Hücrelerde biriken nörotoksik amiloid  $\beta$  peptidi mitokondriyal ve sinaptik hasara yol açarak hücre fonksiyonlarına zarar vermektedir (Yiannopoulou ve Papageorgiou, 2013). Bu sebepten amiloid  $\beta$  proteinin tayinin yapılması, söz konusu hastalığın erken tanısında ve sonrasında tedavi sürecinin yönetilmesinde önemli olmaktadır.

İnsan Amiloid  $\beta$ 'sı, monomerler, dimerler, trimerler, tetramerler, gibi farklı formlarda bulunabilmektedir. AH'larında yapılan bazı patolojik çalışmalarında amiloid plaklar hastalığın tanısında başlıca bulgulardır ve amiloid  $\beta$  birikiminin hastalığı başlattığı düşünülmektedir. Bu hipotez “amiloid kaskad hipotezi” olarak tanımlanır (Hardy ve Higgins, 1992; Haass ve Selkoe, 2007). Amiloid plakların kendisinden çok, monomerlerinin ya da oligomerlerinin hastalık patogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir. Şekil.2.3 de amiloid kaskat hipotezi verilmiştir.



Şekil 2.3. Amiloid kaskad hipotezi.

Amiloid  $\beta$  proteininin nöronların dışında birikmesi ve tau proteininin nöronlar içinde birikmesi, Alzheimer'la ilişkili en önemli beyin değişikliklerinden ikisidir. Amiloid  $\beta$  plaklar sinaps arası nöron ilişkilerini etkileyerek hücre ölümüne yol açabilir. Nörofibriler yumaklar ise nöronların içindeki diğer gerekli moleküllerin taşınmasını engeller. Bu etkiler sonucu beyinde görülen değişiklik, küçülmedir (Spires-Jones ve Hyman, 2014).

### 2.2.1. Alzheimer tanısı ve amiloid $\beta$ tayin yöntemleri

Alzheimer hastalığının klinik tanısından hastada öğrenme ve hafıza bozukluğunun olup olmadığı bilişsel işlevlerde bozukluğun görülüp görülmediği ve beyinde patolojik bir durumun bulunup bulunmadığı değerlendirilir. Daha önceleri Alzheimer'ın kesin tanısı için beyin otopsi senil plakların ve nörofibriler yumakların varlığını göstermek için kullanılan bir yoldu. Ancak daha sonra bunların görüntülenmesi amacıyla pozitron emisyon tomografisi (PET), bilgisayarlı tomografi (BT), manyetik rezonans (MR) görüntüleme ya da tek foton emisyon tomografi (SPECT) gibi çeşitli görüntüleme yöntemlerinden yararlanılmaktadır (Van Gool vd., 1995; Mielke ve Heiss, 1998; Kantarci vd., 2000).

Alzheimer'da tanı amaçlı kullanılabilen amiloid  $\beta$  proteininin tayininin yapılması söz konusu hastalığın erken tanısında ve sonrasında tedavi sürecinin yönetilmesinde önemli olmaktadır. İnsan ve deney hayvanlarının beyinlerindeki, amiloid  $\beta$  peptitlerinin tayini için ELISA ve kütle spektroskopisi en çok kullanılan yöntemlerdir. Diğer pek çok tür için de yeni kütle spektrometrisi teknikleri de geliştirilmiştir. Ancak bu yöntemler pahalı ve zaman alıcıdır (Xing ve Xia, 2015). Bunun yanında, yöntemlerin uygulanabilmesi için uzmanlaşmış kullanıcılar gerekmede ve bu yöntemler hasta başı analizler için uygun görülmemektedir. Antikor-antijen arasındaki spesifik etkileşime dayalı olarak gerçekleştiren ELISA ve diğer immünoassay yöntemleri ise nispeten daha duyarlı ve kolay analiz imkanları sunmaktadır. Bu sebepten **immünoassay yöntemleri** pek çok proteinin tayini için diğer yöntemlere iyi bir alternatif oluşturmaktadır (Darwish, 2006).

Alzheimer hastalığında tanı koymak zordur çünkü hastaların şikayetleri çok uzun zaman içinde gelişir. Bu sebepten beyinde biriken amiloid  $\beta$  proteininin doğru bir şekilde belirlenmesi Alzheimer hastalığının erken tanısı için çok önemlidir. Amiloid  $\beta$  proteininin tayini için önerilen yöntemler arasında en spesifik ölçüm imkanı sunanlar immünoassay temelli olan yöntemlerdir. Eu(III) komplekslerinin etiket olarak kullanıldığı Zaman Gecikmeli Floroimmünoassay (TR-FIA) yöntemi, floresans yönteminin yüksek seçiciliğini ve zemin floresansı önleyebilmesi gibi avantajlarından dolayı, bu güne kadar pek çok proteinin tayini için, tercih edilmiştir. Yapılan literatür araştırmaları ışığında, amiloid  $\beta$  proteinin tayininde Eu(III) komplekslerinin etiket

olarak kullanıldığı çalışmalara rastlanmamıştır. Etiket hazırlamak için ilk olarak Eu(III) ile kompleks oluşturacak bir liganta ihtiyaç duyulmaktadır.  $\beta$ -Diketonat esaslı ligantların etiketleme anlamında floresansı artıran moleküller olduğu bilinmektedir (Deng vd., 2010).

### 2.3. İmmünite

İmmün sistem, canlı bir organizmanın “kendinden olan” ve “olmayan” arasında ayrımı yapmasını sağlayan, hücrelerden, dokulardan ve organlardan oluşan bir mekanizmadır (McComb vd., 2013). İşlevsel olarak, bir immün sistem tepkisi iki kısma ayrılabilir: tanıma ve yanıtlama. İmmün sistem, yabancı patojenleri büyük bir özgüllük ile tanır, birbirinden ayırır ve bunları elimine eder. Ayrıca, immün sistem yabancı moleküller ile vücudun kendi hücreleri ve proteinleri arasında ayrım yapabilmektedir. İmmünite, “muafiyet” anlamına gelen Latince “*immunis*” kelimesinden türetilmiş bir kelimedir ve kısaca immün sistem kapasitesi olarak ifade edilebilir. İmmünite, doğal ve kazanılmış immünite olarak ikiye ayrılabilir.

Daha az spesifik olan, doğal ya da doğuştan gelen immünite, enfeksiyona karşı ilk savunma hattını sağlar. Doğuştan gelen bağışıklığın çoğu bileşeni, enfeksiyonun başlangıcından önce mevcuttur ve belirli bir patojene özgü olmayan ancak sıkça karşılaşılan patojenlere özgü molekül sınıflarını tanıyan hücresel ve moleküler bileşenleri içeren bir sistemdir. Makrofajlar ve nötrofiller gibi fagositik hücreler, deri gibi mekanik bariyerler ve konakçı tarafından sentezlenen çeşitli antimikrobiyal bileşikler, doğuştan gelen bağışıklıkta önemli roller oynarlar.

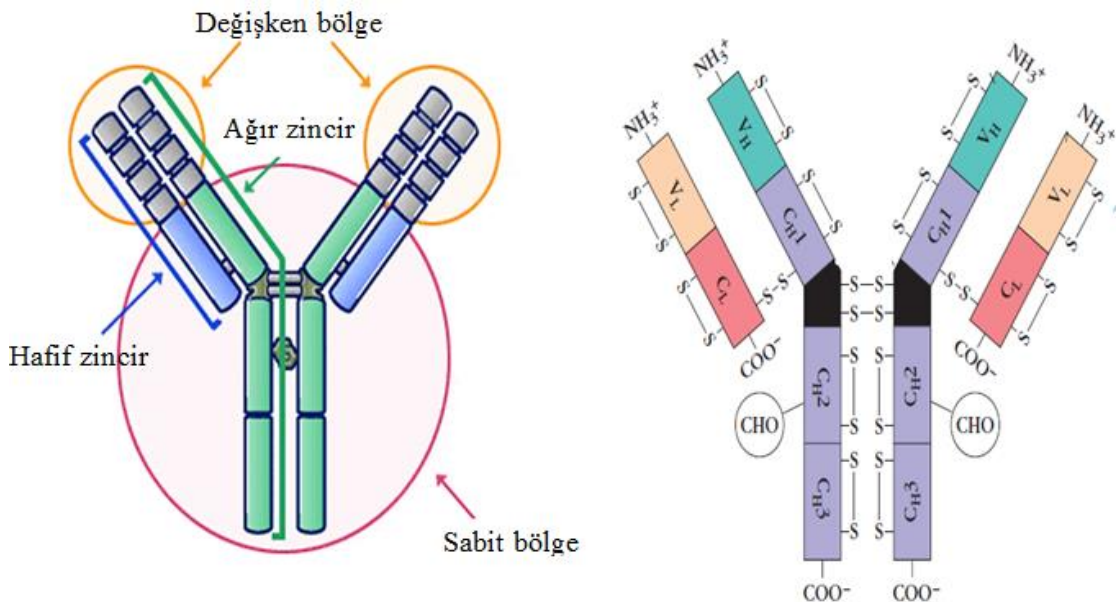
Daha spesifik olan kazanılmış ya da uyarlanabilir bağışıklık, organizma için antijenik bir karşılaşma olmadan ortaya çıkmaz. Kazanılmış bağışıklık, belirli yabancı mikroorganizmaları molekülleri tanıma ve seçici olarak ortadan kaldırma kabiliyetine sahiptir. Kazanılmış immünite “hafıza” özelliğinin yanı sıra yüksek derecede özgüllük ile yabancı moleküllere yanıt verir. Tipik olarak, bir antijene karşı o antijene maruz kaldıktan sonraki beş veya altı gün içinde kazanılmış bir bağışıklık tepkisi oluşturulur. Daha sonra aynı antijene maruz kalma, bir hafıza tepkisi ile sonuçlanır. Kazanılmış immünitenin ana bileşenleri lenfositler ve onların ürettiği antikor molekülleridir (Kindt, 2008).

Antijen, spesifik bir immün sistem tepkisi oluşturan ve spesifik bir antikorun veya özel olarak duyarlılaştırılmış T hücrelerinin veya her ikisinin oluşumunu tetikleyen, genellikle protein yapıda olan bir maddedir. Tüm antijenler spesifik lenfositler veya antikorlar tarafından tanınmasına rağmen, sadece bazı antijenler lenfositleri aktive edebilir. İmmün yanıtları uyaran moleküllere immünojenler denir. Epitop, lenfositler üzerindeki, antijene spesifik membran reseptörlerine veya salgılanan antikora bağlanan, immünojenin (veya antijenin) immünolojik

açıdan aktif bölgeleridir. Aynı zamanda antijenik determinantlar olarak da adlandırılır (<https://microbiologyinfo.com/antigen-properties-types-and-determinants-of-antigenicity/>).

### 2.3.1. Antikor (Ab) ve yapısı

Bağışıklık tepkisinin ilk spesifik ürünü olan antikorlar, kanın ya da plazmanın sıvı bileşeninde ve hücre dışı sıvılarda bulunur. Antikorların aracılık ettiği bağışıklık, hümorale (sıvısal) bağışıklık olarak bilinmektedir. Kolları iki aynı antijen bağlanma bölgesi oluşturan Y-şekilli moleküllerdir (Şekil 2.4. (Kindt, 2008)). Antikorlar, B hücresi zarı üzerinde bulunan ve plazma hücreleri tarafından salgılanan antijen bağlayıcı bir proteindir. Antikorlar, kendi substratlarını yapmak için özellikle ilgili antijene enzimlerden daha güçlü şekilde bağlanırlar. Antikorlar, immün sistemde immüoglobulin G (IgG) olarak tanımlanır ve antijenik maddelere karşı üretilen ve onlarla spesifik etkileşim gösteren çok işlevli glikoproteinlerdir (Burton, 1985). Antikorların, antijenlerine özgüllüğü ve afinitesi, çeşitli hastalıklar için antikor temelli tedavi yöntemlerinin önünü açmıştır (Amit vd., 1986; Kindt, 2008; Chan ve Carter, 2010; Sliwowski ve Mellman, 2013). Bunun yanında bu özelliklerinden, antikor temelli pek çok tanı/tayin yöntemleri de geliştirilmiştir. Bu yöntemler hem klinik hem de endüstriyel uygulama olanağı bulmuş ve pek çok türün (hastalık biyomarkerları, çeşitli kirleticiler, hormonlar vb.) tayini için güvenilir analizler sunmuştur.



Şekil 2.4. Antikor yapısı (Kindt, 2008).



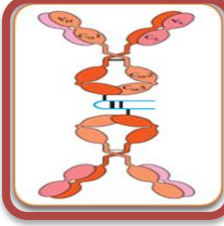
Antikorların genel özellikleri aşağıda sıralanmaktadır:

- Diğer izotiplere benzer şekilde, IgG immüoglobulin molekülü, zincirler arası disülfür bağlarıyla birbirine bağlanmış iki özdeş (50 kDa, H) ağır zincir ve iki özdeş (25 kDa, L) hafif zincirden oluşan dört polipeptit zincirinden meydana gelir.
- Her ağır ve hafif zincir, sabit (constant-C) ve değişken (variable-V) bölgelerden oluşur. Değişken bölgeler, antijenle bağlanmadan sorumlu bölgelerdir ve molekülün Fab bölgesi olarak bilinirler. Her monomerde toplam iki adet antijen bağlanma bölgesi bulunur.
- Hafif ve ağır zincirlerin bir ucunda  $\text{NH}_2$ , diğer ucunda  $\text{COOH}$  molekülleri bulunur.  $\text{NH}_2$  bulunan ucu amino,  $\text{COOH}$  bulunan ucu ise karboksi uç olarak adlandırılır. Değişken bölgeler (VL, VH) ise, molekülün amino ucundaki bölgelerdir.
- Hafif (L) zincirler sadece tek bir V ve tek bir C bölgesine sahiptirler, sırasıyla VL ve CL olarak kodlanabilir. Ağır zincirler, immüoglobülin sınıfına bağlı olarak değişkenlik gösterir. Tek bir değişken (VH) ve sabit (CH) bölgeye sahiptirler.
- Bir ağır zincir ortalama 420 aminoasitten, bir hafif zincir ise ortalama olarak 210 aminoasitten oluşur.
- İmmüoglobülinin Fc (Fc = crystallizable fragment) bölgesi, karboksi ucundaki CH bölgesidir (Kindt, 2008).

Serumda beş antikor immüoglobülin izotipi bulunmaktadır. A (alfa), D (delta), E (epsilon), G (gama), M (mü) immüoglobülin içerdikleri ağır zincir ile ayırt edilirler. Antikor izotopları, özgüllük ve avidite bakımından farklılık gösterir (Schroeder ve Cavacini, 2010). Bunlar arasından immüoglobülin G (IgG), kanda ve hücre dışı sıvıda bulunan temel antikor tipidir. Kan serumunun %25'ini antikorlar ve bulunan antikorların %75 ini IgG oluşturur (Janeway, 2001; Vidarsson vd., 2014).

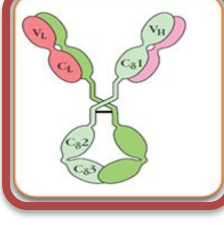
## Antikor İzofomları

**IgA**



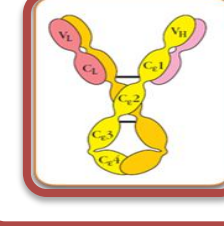
- IgA serumdaki toplam immüoglobülinin sadece %10-15'ini oluşturur. Anne sütü, tükürük, gözyaşı ve bronşiyal, genitoüriner ve sindirim yollarının mukusları gibi dış salgılarda baskın immüoglobülin sınıfıdır.
- Patojenler tarafından kolonileşmeyi önler.
- Serumda, IgA genellikle monomer olarak bulunur, ancak dimer, trimerler ve tetramer yapılarında görülebilir.

**IgD**



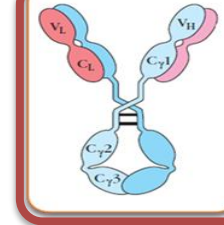
- IgD serumdaki toplam immüoglobülinin yaklaşık % 0.2'sini oluşturur. IgD, IgM ile birlikte, olgun B hücreleri tarafından oluşturulan başlıca immüoglobülinidir.
- Ömürleri kısa olan antikorlardır.
- Tek başlarına aktif değildir, T hücrelerinin yüzeyine yerleşerek onların antijenleri yakalamalarını sağlarlar.

**IgE**



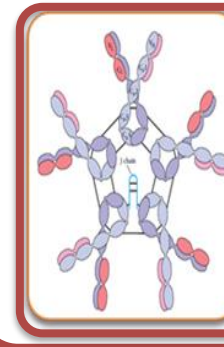
- IgE antikorları, saman nezlesi, astım, kurdeşen ve anafilaktik şok semptomlarından sorumlu olan aşırı duyarlılık reaksiyonlarına aracılık eder.
- Mononükleer hücrelerin ve özellikle eozinofillerin hücre membranlarına bağlanır ve antijenik uyarım sonucunda bu hücrelerin aktive olmasını sağlar.

**IgG**



- Serumda en bol bulunan sınıf olan IgG, toplam serum immüoglobülininin yaklaşık %80'ini oluşturur.
- IgG molekülü iki ağır zincir ve iki veya iki hafif zincirden oluşur.
- İstilacı patojenlere karşı antikor esaslı immünitenin çoğunu sağlar.
- Plasentadan geçebilen tek immüoglobülinidir.

**IgM**



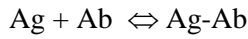
- Serum immüoglobülininin %5-10'unu IgM oluşturur.
- IgM, karboksil terminal ağır zincir alanlarını bağlayan disülfür bağlarıyla beş monomer ünitesinin bir arada tutulduğu bir pentamer olarak plazma hücreleri tarafından salgılanır.
- İmmüoglobülinler arasında en büyüktür.
- IgM'ler, aglütinasyon ve virüs nötralizasyonu gibi olaylarda etkilidir.
- Enfeksiyon esnasında ilk oluşan antikordur.
- Embriyosal yaşamda, antijenlere (enfeksiyonlara) karşı fetüste oluşabilen antikordur.
- Plasentadan geçemezler.

### 2.3.2. Antijen (Ag)

Organizmaya girdiğinde kendisine karşı bir bağışık yanıt oluşmasına yol açan maddelere antijen denir. Her ne kadar spesifik bir immün yanıt indükleyen bir madde genellikle antijen olarak adlandırılrsa da, daha uygun şekilde immünojen olarak tanımlanır. İmmünojeniklik ve antijeniklik ilişkilidir, ancak bazı farklı yanları vardır (Kindt, 2008).

İmmünojeniklik, hümmoral ve/veya hücre kaynaklı bir immün yanıt indükleme yeteneğidir. Antijenite, antikorlar ve/veya hücre yüzeyi reseptörleri ile birleşme yeteneğidir. İmmünojenite özelliğine sahip olan tüm moleküller aynı zamanda antijenite özelliğine sahip olsa da, bunun tersi doğru değildir. Haptenler olarak adlandırılan bazı küçük moleküller antijeniktir ancak kendi başlarına spesifik bir immün yanıt indükleyememektedirler (Kindt, 2008).

Antijen yüzeyinde, antikorla etkileşime giren spesifik bölgeler bulunur. Antijen üzerinde bulunan bu bölgelere epitop veya determinant grup olarak adlandırılır. Antijen yüzeyinde, farklı antikora spesifik, epitop bölgeleri bulunabilir. Farklı yapıda her epitop kendine özel antikor ile birleşebilir. Bir antijen birden fazla antijenik özellik gösterir (Kindt, 2008). Antijenin antikorla birleşme reaksiyonu kimyasal bir temele dayanır:



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

#### İmmünojen olabilme özellikleri

İmmünojenin yapısı immünojenikliğe katkıda bulunur. Yabancılık, moleküler boyut, kimyasal yapı-heterojeniklik gibi özellikler immünojen olabilmede önemlidir (Kindt, 2008).

#### *Yabancılık*

Bir antijen bir organizmaya verildiğinde, immünojenikliğinin derecesi, yabancılığının derecesine bağlıdır. Genel olarak, iki tür arasındaki filogenetik mesafe ne kadar büyükse, aralarındaki yapısal eşitsizlik o kadar yüksektir. Bir madde, girdiği organizmanın yapısına ne kadar fazla yabancı ise antijenik özelliğide o kadar yüksek olur. Kimyasal bir bileşiğin yabancılığından söz edilirken, molekülün üç boyutlu yapısı kastedilmektedir (Kindt, 2008).

### *Moleküler boyut*

Bir makromolekülün boyutu ile immünojenikliği arasında bir ilişki vardır. En aktif immünojenler 100000 Da moleküler kütleyle sahip olma eğilimindedir. Genel olarak, 5000-10000 Da' dan daha az moleküler kütleyle sahip maddeler, immünojenik olduğu kanıtlanmış olmasına rağmen, moleküler kütleleri 5000-10000 Da' dan az olan maddeler zayıf immünojenlerdir (Kindt, 2008).

### *Kimyasal yapısı ve heterojenlik*

Boyut ve yabancılık, kendi başlarına bir molekülü immünojenik hale getirmek için yeterli değildir; başka özelliklere de ihtiyaç vardır. Örneğin tek bir çeşit amino asitten sentezlenen sentetik polipeptid zincirleri, molekül ağırlıkları büyük de olsa iyi antijen değildirler. Eğer bir polipeptid zinciri iki veya üç çeşit amino asitten oluşmuşsa, yapı daha aktif olabilir. Farklı amino asitlerden veya şekerlerden oluşan kopolimerler, homopolimerlerden genellikle daha immünojeniktir (Kindt, 2008).

### *Diğer özellikler*

Molekülün immünojen olabilmesi için yapısal sertliğe sahip olması gerekir. Lipit, jelatin vb. maddeler iyi antijenik özellik taşımaz. İmmünojenik madde organizmada metabolize edilebilmeli yani çözülebilir olmalıdır. Metabolize edilmeyen maddeler antijen özellik göstermezler ve organizma buna karşılık immün yanıt oluşturamaz. Bir maddenin yüklü olması maddeye hidrofilik özellik kazandırır ve maddeyi antijenik yapar. Genetik yapı, tür, yaş gibi faktörler canlıda, antijeniteyi etkileyen diğer özelliklerdir (Kindt, 2008).

### *Hapten ve antijenite*

Moleküler kütlesi 2000 Da' dan küçük, peptitler, steroidler, hormonlar, tiroid hormonlar ve pek çok ilaç hapten olarak adlandırılır. Tek başına immün cevabı tetikleyemezler. Bunlar uygun immün yanıt oluşturmaları için bir taşıyıcı protein ile kovalent olarak bağlanmak zorundadırlar. Kendi başına, bir hapten, immünojenik bir epitop olarak işlev göremez. Ancak hapten bir taşıyıcı proteine bağlandığında, hapten immün sisteme erişilebilir hale gelir ve immünojen olarak işlev görebilir (Kindt, 2008).

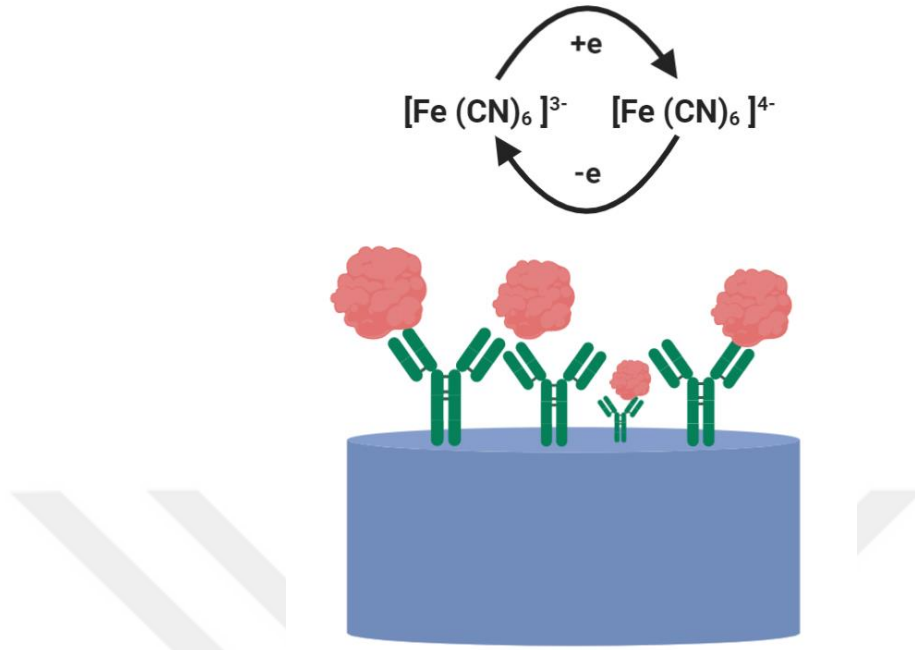
### **2.3.3. İmmünoanalitik teknikler**

İmmün sistem elemanlarında antijen ve antikorun kullanıldığı immünoanalitik teknikler; immünoassay ve immünoassay olmak üzere iki başlık altında incelenebilir. *İmmünoassaylar*,

immün sistem elemanlarından antijen ve antikorun tanıyıcı tabakada kullanıldığı, bu tabakadan gelen sinyallerin çevirici kısımda uygun verilere çevirilerek dijital ortama aktarıldığı sistemlerdir. Antijen-antikor etkileşiminden yararlanan bu sistemde, bu etkileşimi çeşitli yollarla algılanılabilir sinyallere dönüştürebilen cihazlar kullanılmaktadır. Antikor antijen etkileşimi ile kütle, ısı, elektrik potansiyeli gibi özgül fizikokimyasal değişimler oluşturulmaktadır ve bu değişimler, immünoassayın çevirici kısmı yardımı ile kullanıcı tarafından yorumlanabilecek sinyallere çevirmektedir. *İmmünoassay* ise, kanda düşük konsantrasyonlarda bulunan protein veya özel bir kimyasal maddelerin varlığını tespit etmek için, antikorun özgüllüğünden faydalanılarak yapılan biyokimyasal tayin yöntemlerinin genel adıdır (Dickson, 1995a). İmmün reaksiyonun sinyal kaydı için çeşitli etiketler kullanılmaktadır. Bu etiketler bir enzim, radioaktif atom, floresans bir madde, lüminesans ve kemilüminesans özellikte maddeler olabilir. Genel olarak heterojen ve homojen olarak iki tipi vardır. Heterojen immünoassayda, immünoaktiflerden biri katı bir destek üzerine örneğin lateks boncuklara, mikroplakalara, manyetik partiküllere, test tüplerine, mikrokürelere veya filtre kağıda sabitlenir ve serbest reaktifleri ayırmak için bir yıkama aşaması gerektirir (Voller vd., 1978). Homojen bir immünoassay formatında, immünoreaksiyon çözeltide gerçekleşir ve bir ayırma aşaması gerektirmez, ancak matris girişimlerine daha yatkındır (Darwish, 2006).

#### **2.4. İmmünoassay**

Biyobileşen olarak antikorların kullanıldığı biyosensörler, antikor temelli biyosensörler ya da immünoassaylar olarak adlandırılırlar. İmmünoassaylar antijen-antikor komplekslerinin oluşumunun algılandığı ve bir transducer (dönüştürücü) vasıtasıyla işlenebilen, kaydedilebilen ve görüntülenen bir elektrik sinyaline dönüştürüldüğü kompakt analitik cihazlardır. Elektrokimyasal, manyetik, optik ve kütle değişimlerini algılayan çevirici türlerini içeren çeşitli immünoassaylar bulunmaktadır. İmmünoassayların hassasiyeti, transducer türünün özelliklerine ve antikorun kalitesine göre değişmektedir (Brecht vd., 1995). Şekil 2.5' de immünoassay genel gösterimi verilmektedir.



Şekil 2.5. İmmünoansör genel gösterimi.

Özel bir antikor ya da bir antijen arasındaki spesifik ve seçici ilişki immünoansörün temel prensibini oluşturur. İmmünoassaylerden transduser kısmının analitik sistemin bir parçası olması özelliği ile ayrılırlar. İmmünoansörler, antikor-antijen bağlanmasının spesifikliğini ve biyosensör proseslerinin küçültülebilme, hızlı analiz, az miktarda kimyasal kullanma, doğru ve kesin analizler sağlama gibi özelliklerini birleştirirler. İdeal durumda bir immünoaktif direkt olarak elektrot yüzeyine immobilize edilebilir ve potansiyel değişim gibi bir değişkenin izlenmesiyle bir immünoelektrot hazırlanabilir (Lim ve Ahmed, 2015).

Antikorlar, hormon, ilaç, virüs, bakteri ve çevresel kirlenici olan diğer moleküllerin, pestisitlerin, biyomedikal maddelerin tayini için uygun transduserlar ile eşleştirilerek immünoansörler geliştirilebilir (Dong ve Chen, 2002).

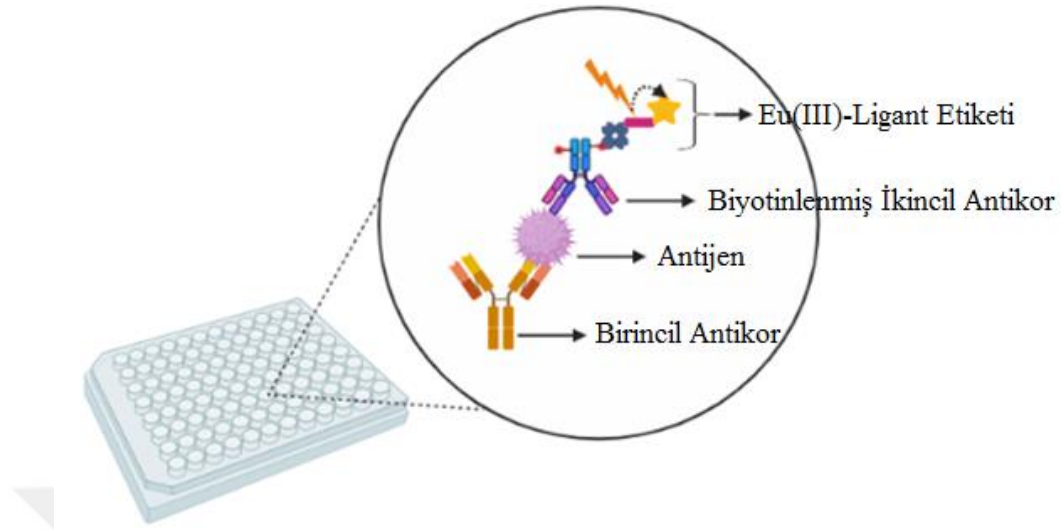
## 2.5. İmmünoassay

İmmünoassay, kanda düşük konsantrasyonlarda bulunan molekülleri (protein veya özel bir kimyasal madde) varlığını tespit etmek için, antikorun özgüllüğünü kullanarak yapılan biyokimyasal tayin yöntemlerinin genel adıdır (Dickson, 1995a). Antikorlar humoral bağışıklık sisteminin ayrılmaz bir parçasıdır. B hücrelerinin (B lenfositleri) yüzeyinde bulunurlar ve yabancı antijenlerin varlığını tanırlar. B hücresi, prionlardan virüslere, ilaçlara, toksinlere ve vücudumuzu istila eden anormal biyomoleküllere kadar geniş bir aralıkta antijen algılayabilirler.

İmmünoassaylerin temel prensibi antijene spesifik antikor kullanılarak yüksek afinite sabiti ile bağlanıp kompleks oluşturmalarıdır. Antikolar yaklaşık  $10^8 - 10^{10} \text{ L M}^{-1}$  afinite sabiti ile kendine spesifik antijenine ilgi gösterir. Bu yüksek afinite sabiti sayesinde antikolar kullanılarak düşük konsantrasyonlardaki antijenler tayin edilebilir (Dickson, 1995b).

İmmünoassay çalışmaları, hastalıkların tanısı için klinik laboratuvarlarda, terapötik ilaç analizleri, ilaç tasarımı ve ilaç endüstrisindeki farmokinetik ve biyoeşdeğerlik çalışmaları, çevre analizleri, araştırma laboratuvarları veya sanayi laboratuvarlarında tayini istenilen türün ölçümünde kullanılırlar. Son zamanlarda teropötik maddelere karşı antikora dayalı tayin biyofarmasötik endüstrisi tarafından ilgi görmeye başladı.

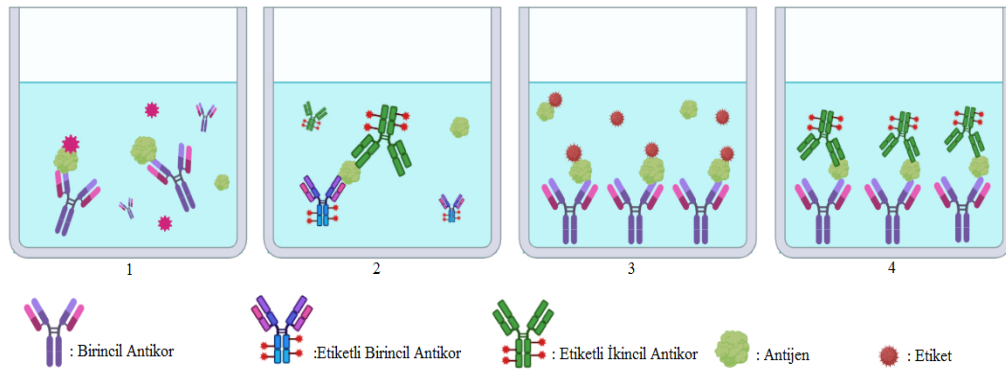
1959 yılında ilk kez R.S. Yalow ve S.A Berson antikor-antijen etkileşiminin kullanarak insülini radioimmünoassay yöntemi ile tayin etmiştir. Daha sonra tiroksin için benzer bir radioimmünoassay yöntemi geliştirilerek antijen-antikor etkileşimine dayanan immünoassay yeni bir analitik yöntem haline gelmiştir (Yalow ve Berson, 1960). Berson ve Yalow'un 1977'de Nobel Tıp ve Fizyoloji dalında Nobel Ödülü'nü almasıyla immünoassay tekniği önem kazanmıştır. Yapılması istenilen türün tayini için uygun immünoassay formatı seçilmesi gerekir. Tüm immünoassayler (Şekil 2.6) tayin için istenilen türe spesifik antikor kullanırlar. İmmünoassay tekniğinde ilk basamak katı bir faz üzerine antikor kaplanmasıyla gerçekleşir. Katı faz genellikle polimer kaplı kuyucuk, manyetik partikül-nanopartikül olabilir. Bu antikolar İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü (HIV), hepatit virüsü, çeşitli hormonlar ya da tayin etmek istenilen tür ne ise o maddeye özgün antikor olabilir. Bu tez kapsamında amiloid  $\beta$  proteinine özgü antikor kullanılacaktır. Tayin edilen türe özgü seçilen antikorun katı faza immobilize olabilmesi için yaklaşık 24 saat boyunca uygun ortam koşullarında bağlanması beklenir. Serum veya aranan maddenin içinde bulunduğu sıvı antikor kaplı katı fazın bulunduğu ortama eklenir. Serumdaki aranan madde-antijen konsantrasyonuna bağlı olarak bu katı fazın üzerindeki özgül antikora bağlanır. Yine antijene spesifik olan ikincil antikor ortama eklenir ve komplekse bağlanır. Eklenen bu ikincil antikor, ölçüm sistemi tarafından takip edilebilecek bir sinyal oluşturan etiket ile işaretlenmiştir. Bu etiket radyoaktif bir madde, özel bir enzim, floresans ışımaya yapan Eu(III) elementi olabilir. Bu etiket ortama konan özel bir maddede değişim yaratarak renk, floresans veya ışık gibi izlenebilen bir sinyal oluşturulmasını sağlar. Bu sinyal uygun analitik sistemler aracılığı ile ölçülerek analiz gerçekleştirilmiş olur (Darwish, 2006).



Şekil 2.6. İmmünoassay genel gösterimi.

### 2.5.1. İmmünoassay yöntemlerinin sınıflandırılması

İmmünoassay yöntemleri, ayırma basamakları gerektiren, gerektirmeyen assayler olarak sınıflandırılabilirler. Ayırma basamakları içeren assay heterojen, ayırma basamağı içermeyen ise homojen assay olarak adlandırılır. Şekil 2.7' de heterojen ve homojen assay şematize edilmiştir.



Şekil 2.7. İmmünoassay tipleri (1: homojen yarışmalı immünoassay. 2: homojen yarışmasız immünoassay. 3: heterojen yarışmalı immünoassay. 4: heterojen yarışmasız immünoassay).

**Homojen Assay:** analite bağlanan antikorun, serbest analitten fiziksel olarak ayrılmasını gerektirmez. Prosedür olarak kullanılan en basit assay formatıdır. Tayin reaktifleri hacmi bilinen örnek çözeltisine eklenir ve analit derişimiyle ilişkili bir sinyal oluşur. Antijen-antikor kompleksinin oluşumu ile işaretleyicinin elektroaktivitesi veya fonksiyonundaki değişimler ölçülür. Homojen assay tayin sistemi  $10^{-9}$  mol L<sup>-1</sup> den daha düşük konsantrasyonlarda çalışmaya

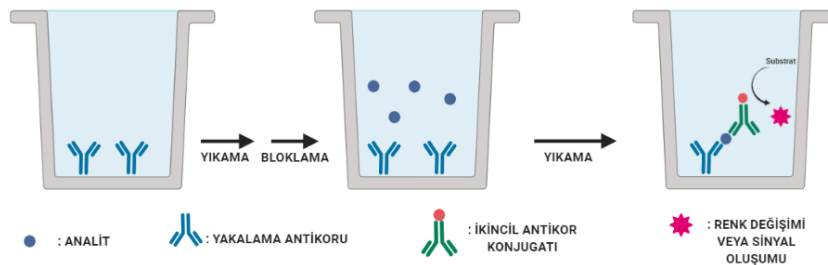


izin vermez. Ayırma basamakları içermediğinden biyolojik örneklerde bulunan farklı moleküller, assay sonucunu interfere edebilir (Jenkins, 1992).

Heterojen Assay: antikora bağlanan antijenin serbest analitten ayırma basamağı içermesi sebebiyle daha güvenilir sonuçlar verir. Homojen assay yöntemine göre daha fazla tercih edilir. Ayırma basamağından kasıt spesifik olarak antijene bağlanan etiketlenmiş tayin reaktifleri ilave edildikten sonra bağlanmamış fazla tayin reaktifleri yıkama ile uzaklaştırılmasıdır. Homojen assay yöntemine göre gerçek örneklerde bulunabilecek ve cevabı interfere edebilecek türlerin, ayırma basamağı ile uzaklaştırılması sayesinde daha duyarlı bir yöntem olduğu söylenebilir (Wild ve Kusnezow, 2013; Dixit ve Twyman, 2019).

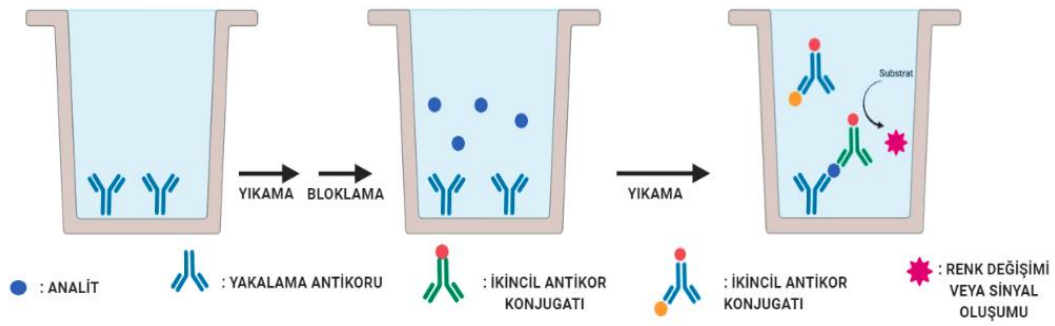
Yukarıda anlatılan her iki format, immünoassay sistemleri, yarışmasız ve yarışmalı (rekabetçi) immünoassayler şeklinde yapılabilir.

Yarışmasız assayde, analite özgü iki spesifik antikor kullanılmasını gerektirir ve sandviç assay olarak da adlandırılır. Bir sandviç immünoassay temel aşamaları, önce analite özgü antikorun yüzeye kaplanması, ardından bloklama ve yıkama aşamalarını içerir. Numune analiti, uygun bir süre boyunca uygulanır ve genellikle enzime bağlı tespit antikoru eklenir. Numunede analit varsa tespit antikoru bağlanır, enzimatik substrat eklenir ve renk değişimi gözlenir. Uygun ölçüm yöntemi ile ölçüm yapılarak tayin gerçekleştirilir. Yarışmasız immünoassayler, proteinler ve virüsler gibi moleküllerin saptanmasında yaygın olarak kullanılır, çünkü bu varlıklar, iki veya daha fazla antikorun bağlanmasını kolaylaştırabilecek kapasiteye sahiptir. Hareketsizleştirilmiş antikor, analiti, epitoplarından birine bağlayarak yakalar. Daha sonra etiketli ikinci bir antikor bağlanır ve etiket nedeniyle oluşturulan sinyal miktarı, numunedeki analit konsantrasyonuyla doğrudan orantılıdır. Şekil.2.8’ de yarışmasız bir immünoassaydaki temel adımları gösterir (Gan ve Patel, 2013; Wild ve Kusnezow, 2013).



**Şekil 2.8.** Yarışmasız immünoassay deney aşamaları.

Yarışmalı assay, etiketli antijen ve serbest antijen (analiz edilecek numunedan), yüzeye kaplanmış antikora bağlanmak için rekabet eder. Örnekteki analit seviyesi ne kadar yüksek olursa, bağlama için mevcut etiketli antijen miktarı o kadar küçüktür. Bu nedenle, üretilen sinyal serbest antijenin konsantrasyonuyla ters orantılıdır. Yarışmalı immünoassay, ilaçlar, hormonlar ve toksinler gibi küçük moleküllerin varlığını ve konsantrasyonunu ölçmek için yaygın olarak kullanılır (Byrne vd., 2009; Uraipong vd., 2013). Sadece bir spesifik antikorun kullanılmasını gerektirir. Küçük moleküller, birden fazla tespit antikorunun bağlanmasını kolaylaştırmak için yeterli epitopa sahip olmadığından, bu yöntem faydalıdır. Yarışmalı immünoassaylar, ilaçlar ve toksinler gibi küçük molekülleri tespit etmek için yaygın olarak kullanılır. İkincil antikor genellikle tespit edilebilir bir sinyal üretebilen bir enzim veya florofor ile etiketlenir. Şekil 2.9’ da yarışmalı bir immünoassaydaki temel adımları gösterir (Clark ve McDonald, 2013; Gan ve Patel, 2013).



Şekil 2.9. Yarışmalı immünoassay deney aşamaları.

## 2.6. İmmünoassaylerde Kullanılan Etiketler

İmmünoassaylerdeki ölçüm sistemi, herhangi bir immünoanalitik reaktife (analit ya da antikor) bağlanabilen, immünolojik özelliklerini kaybetmeden ve hızlı bir şekilde tayin edilebilir bir etiket kullanılmasını gerektir. İmmünoassaylerde bu gibi etiketlerin kullanılması yüksek duyarlılık ve düşük tayin sınırı gibi avantajlar sağlamaktadır. Bu etiket bir enzim, floresan etiket, radyoaktif atom veya nanopartikül olabilir (Kindt, 2008). İmmünoassay de kullanılan etiket çeşitleri, örnek ve literatür çizelge 2.1. de verilmiştir.

Çizelge 2.1. İmmünoassayde kullanılan etiketler ve örnekleri.

Etiket	Örnek	Literatür
<b>Radyoaktif etiket</b>	$\beta$ ve $\gamma$ partiküllerini emit eden $^{125}\text{I}$ , $^{32}\text{P}$ , $^3\text{H}$ gibi radyoaktif izotoplar	(Yalow ve Berson, 1959; Yalow ve Berson, 1960)
<b>Enzim Etiket</b>	Alkalın fosfataz (AP); glukoz oksidaz; Yaban turpu peroksidazı (HRP); soya fasulyesi peroksidaz (SBP); glukoz-6-fosfat dehidrojenaz ve ksantin oksidaz.	(Kuznetsov vd., 2001; Liu ve Li, 2001; Du vd., 2003)
<b>Kemilüminesans</b>	Akridinyum sülfonamidler; akridinyum esterler; luminol;	(Dodeigne vd., 2000)
<b>Gelişmiş lüminesans</b>	HRP, $\text{H}_2\text{O}_2$ substratı varlığında; arttırıcı moleküllerin, fenollerin veya naftalinlerin varlığında.	(Alegria-Schaffer vd., 2009; Kamidate vd., 2009)
<b>Floresans</b>	Floresan izotiyosiyanat (FITC); lantanit kriptatlar; rodamin; Texas kırmızısı; yarı iletken nanokristal kuantum noktaları; etidyum bromür.	(Hicks, 1984)
<b>Biyölüminesans</b>	Aequorin (Denizanası, Aquoria victoria'dan); lusiferaz (ateşböceği)	(Shim ve Rhee, 2003; Roda vd., 2004)
<b>Fosforesans</b>	Fosforlar-Europium ile aktive olan itriyum oksisülfür	(Goldman vd., 2002; Jia-Ming vd., 2005)
<b>Zaman gecikmeli floresans</b>	Ayrışma - Perkin Elmer'den Gelişmiş Lantan Flüoresan İmmünoassay (DELFI A R). Sandviçte veya yarışmalı testlerde Europium (lantanit) konjuge antikörleri veya antijeni.	(Maple vd., 2001; Maple vd., 2006)
<b>Nano ve mikropartikül etiketleri</b>	Floresan etki gösteren kuantum noktaları(dot), polistiren lateks boncuklar (aglutinasyon testlerinde yaygın kullanılır), koloidal altın nanopartükülleri.	(Tully vd., 2006; Xing vd., 2007; Kozłowska vd., 2009)
<b>Elektrokemilüminefor</b>	Rutenyum tris (bipiridil)	(Doeven vd., 2012)

## 2.7. İmmünoassay Çeşitleri

Kullanılan etiket tipine göre immünoassay çeşitlilik gösterir,

Radioimmünoassay (RIA): Temel olarak radyoaktif maddelerin kullanıldığı immünoassay tipleridir. Biyolojik sıvıda bulunan pek çok bileşiğin başarılı bir şekilde tayini için kullanılan en eski yöntemdir. Bu yöntemlerin çoğu katı faza bağlanan antikörlerin kullanılması yardımıyla otomatik hale getirilmiştir. RIA'nın avantajı pek çok analitik yöntemden üstün

olarak oldukça kesin ve hassas bir şekilde sonuç vermesidir. Ancak sağlık açısından getirdiği tehlikeler nedeniyle yerini diğer assay yöntemlerine bırakmıştır (Murphy ve O'Kennedy, 2017).

Enzim immunoassay (EIA): Bu immunoassay tipinde radioizotop atom yerine enzim etiket kullanılır. Enzimin etiket olarak kullanılmasındaki yaklaşım, uygun bir kimyasal teknikte reaktiflerden (analit yada antikor) birine enzim molekülünün bağlanmasını içerir. Enzim substratının ortama eklenmesi sonucunda, sinyal oluşumu uygun yöntemlerle izlenir (Murphy ve O'Kennedy, 2017).

Fluoroimmunoassay (FIA): Floresans, elektromanyetik enerji (ışığın bir foton) bir madde tarafından absorbe edildiğinde oluşan, böylece elektronlarını aktive eden ve daha yüksek enerji hallerine yükselten bir fenomendir. Temel hal enerjisine dönüş, floresans denilen ışık şeklinde enerjinin salınımına neden olur. Floresans sadece madde ışığı emdiği sürece meydana gelir, ancak floresan molekülü tekrar uyarılabilir, böylece çevrimi devam ettirir. Yayılan floresans, uyarma için dalga boyundan daha uzun bir dalga boyunda meydana gelir ve dalga boyundaki değişiklik, "Stokes kayması" olarak adlandırılır. Dalga boyundaki bu değişiklik, elektronun uyarılması ve enerjinin floresan olarak salınması arasındaki enerji kaybından kaynaklanmaktadır. "Stokes kayması" derecesi, floroforun doğal elektronik yapısına bağlıdır. Bir florofor, bir dizi dalga boyu boyunca uyarılır. Molekülün en uygun şekilde uyarıldığı dalga boyu, uyarma maksimum olarak adlandırılır. Aynı şekilde, florofor, bir dalga boyu aralığında floresans yayar. Emisyon maksimum değeri, flüoroforun en yoğun olarak ışık (floresans) yaydığı dalga boyudur. Floroforlar, bir dizi dalga boyu boyunca emdiği ve yaydığı için, farklı uyarma ve emisyon tepe noktalarına sahip iki florofor seçmek önemlidir. Florofor özellikte bir etiketin kullanılmasıyla diğer yöntemlerden ayrılır. Her immünoassay yöntemlerinde olduğu gibi heterojen ve homojen assayler olarak ayrılır. Hem yarışmalı hem de yarışmasız formatta tayin gerçekleştirilir (Murphy ve O'Kennedy, 2017)

Floresans polarizasyon fluoroimmünoassay (FPFIA): Bu teknikte floresan analit konjugatı polarize ışıkla uyarıldığında elde edilen emisyonun polarizasyonu ters orantılı olarak probun sönüm sabitine ve konjugatın rotasyonel hareketine bağlı kalır. Küçük moleküllerde, rastgele rotasyon polarizasyon sinyalini azaltır. Spesifik antikorlara bağlandığı zaman, rotasyonları yavaşlar ve polarizasyon sinyali artar. Polarizasyon sinyalindeki bu artış analit konsantrasyonu ile ilişkilidir (Murphy ve O'Kennedy, 2017).

Kemilüminesans immünoassay (CLIA): Kemilüminesans, enerjinin ışık şeklindeki kimyasal reaksiyonlardan serbest bırakılmasını ifade eder ve uyarma için bir ışık kaynağı gerektirmez (Roda vd. , 2004). Lüminesan bileşiklerden üretilen fotonlar çok kısa bir sürede

tetiklenebilir ve ulaşılan hassasiyet, geleneksel etiketleme ile elde edilenden daha yüksek olabilir. İki yöntem seçilebilir; ilk olarak bir kemilüminesan ürüne dönüşen kimyasal olarak etiketlenmiş bir substrat kullanarak, ikincisi ise doğrudan antikora bağlanmış bir kemilüminesan molekül kullanarak. Alternatif olarak, kemilüminesan bileşik, tamamlayıcı bağlama ortaklarından birine kovalent olarak etiketlenebilir. Bu basit bir yaklaşımdır, ancak pek çok kimyasal ışıldama etiketi mevcut değildir ve antikor üzerinde çoklu etiketlere uyacak şekilde sınırlı yüzey alanı vardır. Kemilüminesan saptama sistemlerinin avantajları arasında hızlı ışık emisyonu, geniş dinamik aralık, yüksek reaktif stabilitesi ve düşük reaktif tüketimi, kısa inkübasyon süreleri, yüksek hassasiyet, arka plan etkilerinin ortadan kaldırılması ve düşük toksisite vardır (Rongen vd., 1994; Bi vd., 2009).

*Biyolüminesans İmmünoassay (BIA):* Biyolüminesans, biyolojik reaksiyonların ışık ürettiği fenomenleri ifade eder (Shim ve Rhee, 2003). Biyolüminesans, benzersiz özelliklerinden dolayı immünolojik testlerde kullanıldığında sıklıkla avantajlıdır, çünkü floresanstan farklı olarak, hemen hemen ilişkili bir arka plan yoktur ve yüksek kuantum verimi ve hızlı reaksiyon kinetiğine sahiptir (Roda vd. , 2004). Rekombinant aequorin, kortizol hormonunu saptamak için immünolojik testlerde başarıyla kullanılmıştır (Mirasoli vd., 2002).

*Zaman Gecikmeli Floroimmünoassay (TR-FIA):* Farklı bir FIA tekniğidir. TR-FIA yönteminde lantanitler ve paladyum iyonları etiket olarak kullanılabilir. Bu assaylerin avantajı, assay floresansında zemin floresansının ayırma imkanıdır. Böylece spesifik olmayan endojen floresans elimine edilmiş olur (Murphy ve O'Kennedy, 2017). Bölüm 2.8 de daha kapsamlı anlatılacaktır.

## **2.8. Zaman Gecikmeli Floresans İmmünoassay (TR-FIA)**

Lantanit komplekslerinin etiket olarak kullanıldığı immünoassay yöntemi, zaman gecikmeli floroimmünoassay (TR-FIA) olarak adlandırılır. TR-FIA'da, özellikle, Europiyum (Eu(III)), Terbiyum (III), Samaryum (Sm(III)) ve Disprozyum (Dy(III)) iyonlarının kompleksleri etiket olarak kullanılmaktadırlar (Ankelo vd., 2003). Bu kompleksler floresans özelliklere sahiptir ve kullanılmalarının temel sebepleri, geleneksel floresans moleküllere kıyasla, uyarılmış ömürlerinin uzun, lüminesans kuantum verimlerinin yüksek ve Stokes kaymalarının büyük olmasıdır. Bu avantajlar, lantanitten gelen sinyal ile lantanit kaynaklı olmayan sinyallerin zamansal olarak ayrılmasına izin verir. Ölçüm sırasında plateden, ortamdaki hücre ve reaktiflerden gelen arka zemin gürültüsünün floresans ömrü pikosaniyeden mikrosaniyeye kadar değişir. Bununla birlikte lantanitlerin uyarılmış hallerinde ömürleri, 0,2-1,5 milisaniyedir. Bu durum ölçümün gecikmesini ve arka zemin floresans sinyallerinin

tamamen sönmesine ve sadece lantanitten gelen emisyon sinyallerinin toplanmasına olanak sağlar (Wu ve Zhang, 2002).

Lantalit iyonunun etiket olarak kullanılması için, organik bir ligand ile kompleksinin hazırlanması gerekir. Bu ligand bir anten görevi görmelidir, çünkü lantanit iyonları sulu çözeltilerde zayıf emisyona sahiplerdir. Bu amaçla ligand olarak beta diketonat esaslı bileşikler sıklıkla tercih edilmektedir. Europium (Eu(III)), TRFIA yönteminde en yaygın kullanılan lantanitlerden biridir. Bazı belirgin özellikleri:

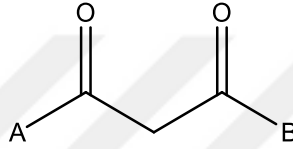
- Eu(III) kompleksleri, UV bölgesinde (330 nm) maksimum absorpsiyona sahiptir ve 615 nm civarında güçlü floresans yayar. Bu büyük Stokes kayması, UV absorpsiyonunun ligand absorpsiyonuna bağlı olmasına rağmen, yayılan enerjinin, bir intramoleküler sistemler arası geçiş mekanizması vasıtasıyla liganddan Eu(III)' a enerji transferinden sonra, Eu (III) geçişi  $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$  ye bağlı olmasından kaynaklanmaktadır,
- Emisyon bandı çok dardır (10 nm),
- Komplekslerin genellikle 100  $\mu$ s'den daha uzun ömürleri vardır.
- Eu (III) floresans komplekslerinin bu özellikleri, biyolojik matrisin arka plan fluoressan emisyonunun etkili bir şekilde çıkarılabildiği ve yüksek bir sinyal/gürültü oranının elde edilebildiği biyomoleküller için etiket olarak kullanıldığında benzersiz bir zaman gecikmeli floresansa izin verir (Karp vd., 1983; Hemmila vd., 1984; Seveus vd., 1992; Lovgren ve Blomberg, 1994; Yuan vd., 1998)

Zaman gecikmeli florometri esaslı biyoanalitik yöntemler, klinik tanı (Hemmila vd. , 1984), hücre analizi (Lovgren ve Blomberg, 1994) ve biyolojik görüntüleme (Seveus vd. , 1992) gibi uygulama alanları bulmuştur ve yaygın olarak kullanılmıştır. TR-FIA yönteminin ilk uygulamaları, 1983 yılında rapor edilmiş ve DELFIA sistemi, FIAgen sistemi ve Trace sistemi gibi ticari uygulamalarda özellikle klinik ve biyoteknoloji alanlarında yaygın olarak kullanılmıştır (Yan vd., 2005; Jiang vd., 2010). TR-FIA sistemi iki farklı yaklaşımda uygulanabilir: *i*) Dolaylı yöntem: Perkin Elmer firması tarafından geliştirilen DELFIA (Dissociation Enhanced Lanthanide Fluoroimmunoassay) sistemi örnek olarak verilebilir. Bu yöntemde, floresans etkisi olmayan ancak bir anten görevi taşıyan ligand Eu(III)' e bağlanır ve uyarılma sonrası liganndan Eu(III)' e enerji transferi gerçekleştirilir. Transfer sonucu Eu(III) ligand kompleksi parçalanır. Lüminesans artırıcı çözelti ile birlikte Eu (III) floresansı okunur (Hemmila, 1985). *ii*) Doğrudan yöntem: Bu yöntem de, yüksek floresan özellik gösteren ligandlar kullanılır. Burada ligand anten görevi görürken, yüksek floresan özelliği sayesinde,

lüminesans çözeltisine ihtiyaç duyulmadan direkt olarak ölçüm yapılabilir (Lin 2004). Bu tez kapsamında doğrudan yöntem kullanılmaktadır.

### 2.8.1. 3,4bis [4(4,4,5,5,6,6heptafloro1o,3dioksoheksil) fenil] benzen sülfonil klorür (BHHCT) ve 10,10'-(4,4,5,5,6,6,7,7-oktafloro-3,8-dioksodekanediol)bis (antrasin-9-sülfonil klorür) (SD1)

$\beta$ -diketonatlar veya 1,3-diketonlar bir karbon atomu tarafından ayrılan iki karbonil grubundan oluşur (Şekil 2.10). Bu karbon atomu  $\alpha$ -karbonudur.

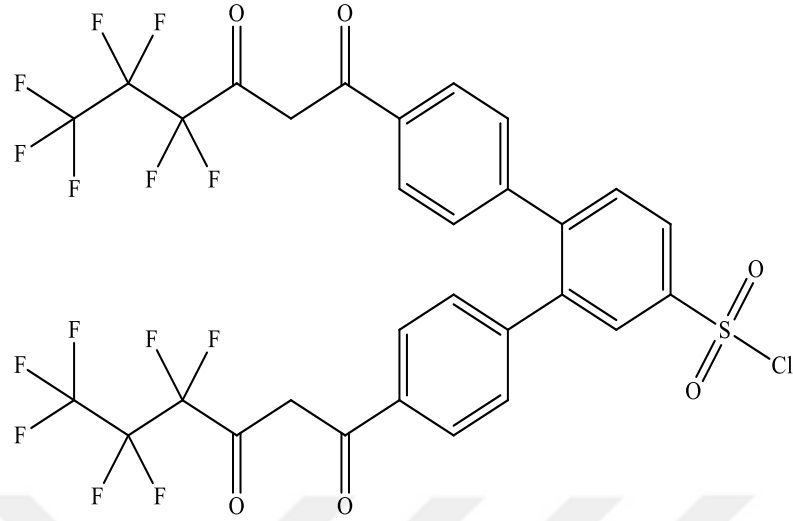


Şekil 2.10.  $\beta$ -diketonatlar.

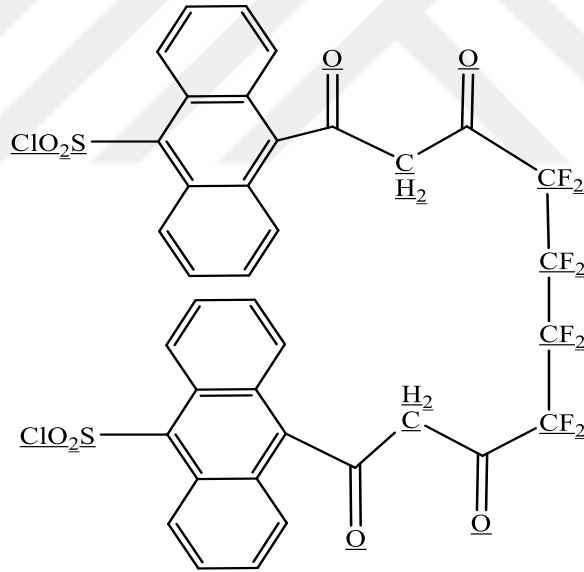
$\beta$ -diketonatların, sulu çözeltilerinde, Eu (III) komplekslerinin kararlı olması, yüksek lüminesans karaktere sahip olmaları, uyarılmış ömürlerinin uzun olması gibi özelliklerinden dolayı tez kapsamında bu tip ligantların kullanılmasına karar verilmiştir. 4,40-bis (1,1,1,2,2,3,3-heptafluoro-4,6-hexanedion-6-yl)chlorosulfo-o-terphenyl (BHHCT-Eu(III)) bileşiği kullanılarak hazırlanan Eu (III) komplekslerinin, etiketleme veriminin yüksek olduğu literatür araştırması sonucunda görülmüştür (Tan vd., 2006).

2012 yılında yayınlanan bir makalede Zhang vd. (2012),  $\beta$ -diketonat esaslı ligantlar kullanarak bir immunoassay yöntemi geliştirmişlerdir. Bu çalışmada, hazırlanan Eu (III) komplekslerinin kararlı olduğu ve ligantların içerdikleri klorosülfonat grupları sayesinde proteine rahatlıkla kovalent olarak bağlanabildiği ve yüksek lüminesans karaktere sahip oldukları belirtilmiştir.  $\beta$ -diketonat esaslı Eu(III) kompleksleri ile  $\alpha$ -fetoprotein (Matsumoto vd., 1999), tiroid (Wu ve Zhang, 2002), T4 (Wu ve Zhang, 2002), prostat (Harma vd., 2000) gibi antijenlerin tayini için kullanılmıştır (Hagan ve Zuchner, 2011).

Bu tez kapsamında ticari olarak temin edilen 3,4bis[4(4,4,5,5,6,6,6 heptafloro1o,3dioksoheksil)fenil] benzen sülfonil klorür (BHHCT) ve Prof. Dr. Alper Tolga ÇOLAK tarafından, bir başka proje kapsamında sentezlenen, yine  $\beta$ -diketonat esaslı 10,10'-(4,4,5,5,6,6,7,7-oktafloro-3,8-dioksodekanediol)bis (antrasin-9-sülfonil klorür) (SD1) bileşiklerini ligand olarak kullanılmıştır. Her iki ligand içinde farklı optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bileşiklerin kimyasal yapıları Şekil. 2.11. ve Şekil. 2.12' de verilmektedir.



Şekil 2.11. BHHCT'nin kimyasal yapısı.



Şekil 2.12. SD1 kimyasal yapısı.

## 2.9. Kaynak Araştırması

### 2.9.1. Amiloid $\beta$ tayini için yapılan çalışmalar

Bittner ve arkadaşları, 2016 yılında, Alzheimer tanısı için beyin omurilik sıvısındaki amiloid  $\beta$  (1-42) tayini için elektrokemilüminesans esaslı bir immunoassay yöntemi geliştirmiştir. Amiloid  $\beta$  (1-42) için doğrusal çalışma aralığı 200-1700 pg/ml ve tayin sınırı 11,28 pg / mL olarak belirlenmiştir (Bittner vd., 2016).



Tang ve arkadaşları, tarafından yapmış floresans etiket olarak kuantum noktaları (QD'ler) kullanarak, A $\beta$ (1-42)'yi tayin etmek sandviç immünoassay yöntemi geliştirilmiştir. Amiloid  $\beta$  (1-42) için doğrusal çalışma aralığı çalışma aralığı 0,23-0,45 ng / mL ve tayin sınırı 7,6 pg / mL olarak belirlenmiştir (Tang vd., 2018).

Diba ve arkadaşları, 2017 yılında, altın nanopartikül ile modifiye edilmiş ekran baskılı bir karbon elektrot (SPCE) üzerinde sandviç tipte elektrokimyasal immünosensör geliştirilmiştir. Au-NP-SPCE üzerine, anti-A $\beta$  antikoru-A $\beta$ (1-42)-antiA $\beta$ -alkalen fosfataz (ALP) olacak şekilde sandviç tipte bir bağlanma sağlandı. ALP etiketi ile substratı olan 4-aminofenil fosfat (APP) ile reaksiyonu sonucu, amiloid  $\beta$  derişimi ile orantılı, sinyal diferansiyel puls voltametri kullanılarak elde edilmiştir. Amiloid  $\beta$  (1-42) için doğrusal çalışma aralığı 100 fM ile 25 pM arasında belirlenmiştir. Geliştirilen immünosensörün insan serumunda bulunan A $\beta$  (1-42)'nin tayini için kullanıp kullanılmayacağı test edilerek sonuçlar ELISA ile karşılaştırılmıştır(Diba vd. , 2017) .

Zhang ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, Alzheimer hastalığının erken teşhisi için amiloid  $\beta$  proteininin tayini için SnO<sub>2</sub>/CdCO<sub>3</sub>/CdS temelli etiketsiz bir fotoelektrokimyasal immünosensör geliştirilmiştir. Optimum koşullar altında oluşturulan immünosensörünün tayin sınırı ve doğrusal çalışma aralığı, sırasıyla 0,05 pg mL ve 0,1 pg mL<sup>-1</sup> -100 ng mL<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir (Zhang vd., 2019).

Ke ve arkadaşları, 2018 yılında, amiloid  $\beta$ 'nin tayini için, elektrokemilüminesans temelli bir sandviç assay tekniği geliştirilmiştir. Bu çalışmada, amiloid  $\beta$  derişiminin belirlenmesi için elektrokimyasal rezonans enerji transferi (ECL-RET) kullanıldı. Amiloid  $\beta$  için doğrusal çalışma aralığı ve tayin sınırı, sırasıyla, 1,0 $\times$ 10<sup>-5</sup> - 100 ng / mL ve 4,2 $\times$ 10<sup>-6</sup> ng / mL olarak belirlenmiştir (Ke vd. , 2018).

### 2.9.2. TR-FIA tekniği ile yapılan çalışmalar

Zhang ve arkadaşları koroner arterioskleroz tespiti için lipoprotein ilişkili fosfolipaz A2 (Lp-PLA<sub>2</sub>) ve yüksek hassasiyetli C-reaktif protein (hsCRP) türlerinin eş zamanlı tayinini gerçekleştirmek amacıyla çift etiketli bir TRFIA yöntemi geliştirilmiştir. İmmünoassay uygulamaları, serum numuneleri kullanılarak değerlendirilmiş ve sonuçlar ticari kitlerle elde edilenler ile karşılaştırılmıştır. Her iki tür için de tayin sınırları, 1 ng/mL olarak belirlenmiştir (Zhang vd., 2017).

2016 yılında yayınlanan bir makalede ise, Liu ve arkadaşları su ve toprak örneklerinde bitki büyüme düzenleyicisi olan pakliobutrazolün analizi için hızlı ve hassas bir TRFIA yöntemi

geliştirmiştir. Bu yöntemin klasik ELISA'ya göre 30 kat hassas olduğu belirtilmiştir. Numunelerden elde edilen ortalama geri kazanımlar değerlerinin %80,2- %104,7 arasında olduğu bulunmuştur. Gerçek numuneler için TR-FIA sonuçları, yüksek performanslı sıvı kromatografi analizleri ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmış ve TR-FIA'nın, çevresel numunelerde pakliobutrazol tayinin için kullanılabilmesi belirtilmiştir (Liu vd., 2016).

Hua ve arkadaşları tarafından, pestisit kalıntısı olan imidacloprid'in tayini için kuantum dot etiketli floroimmünoassay (QD-FIA) ve europium etiketli zaman gecikmeli floroimmünoassay (TR-FIA) yöntemleri geliştirilmiştir. QD-FIA ve TR-FIA yöntemleri için tayin sınırları sırasıyla 6,91 ve 0,018  $\mu\text{g L}^{-1}$  olarak bulunmuştur (Hua vd., 2017).

Zhang ve arkadaşları mikoplazma pnömoni (MP) enfeksiyonunun tespitinde kullanılacak bir zaman gecikmeli floroimmünoassay (TRFIA) yöntemi geliştirilmiştir. Europium etiketli anti-insan IgM'si ve samaryum etiketli anti-insan IgG'si ikincil antikor olarak kullanılmış ve mikoplazma pnömoni IgM ve IgG yapıları serum örneklerinde taranmıştır (Zhang vd., 2018).

Zhu ve arkadaşları tarafından 2019 yılında yapılmış olduğu bir çalışmada, ftalat esterlerin çevresel derişimlerini belirlemek için bir yöntem geliştirilmiştir. Çalışmada, Eu (III) ve Sm (III) sulu ortamlarda dietil ftalat (DEP) ve dibutil ftalat (DBP) 'nin hassas tespiti için çift etiketli, zaman gecikmeli floroimmünoassay (TRFIA) geliştirmek için floresan etiketler olarak kullanılmıştır. Numune analizlerinin gaz kromatografisi tandem kütle spektrometresi analiz sonuçları ile iyi bir uyumlu olduğu görülmüştür (Zhu vd., 2019).

Huang ve arkadaşları 2018 yılında gastrik kanserin tanı ve prognozuna yardımcı olmak amacıyla, insan serumunda karbohidrat antijeni 125 (CA125) ile karsinoembriyonik antijeni (CEA) aynı anda belirlemek için çift etiketli, zaman gecikmeli bir floroimmünoassay (TRFIA) geliştirmişlerdir. Yöntemde, europium-etiketli anti-CA125 antikorları ve samaryum-etiketli anti-CEA antikorları mikropalakaya immobilize ederek sandviç tipte bir immünoassay hazırlanmıştır. Tümörlerin oluşumunu ve gelişimini izlemek için kullanılacak güvenilir ve kullanışlı yeni bir TRFIA yönteminin başarılı bir şekilde geliştirildiği belirtilmiştir (Huang vd., 2018).

Sheng ve arkadaşlarının 2016 yılında yapılmış olduğu bir çalışmada, (Eu(III))ve (Sm(III)), iyonlarını etiket olarak kullanarak, gıda numunelerinde Klotianidin ve dinikonazolün tayini için oldukça hassas, çift etiketli, zaman gecikmeli floroimmünoassay (TRFIA) yöntemi geliştirmişler. Örnekler için TRFIA'nın sonuçları, gaz kromatografisi (GC) analizleriyle

doğrulanmış ve tatmin edici bir korelasyon elde edilmiştir. Yöntemin söz konusu türlerin eşzamanlı tayini için alternatif bir yöntem olduğunu vurgulanmıştır (Sheng vd., 2016).

BHHCT ve diğer  $\beta$ -diketonat esaslı ligandlar kullanılarak yapılan TR-FIA çalışmaları aşağıdaki tabloda özetlenmektedir (Çizelge 2.2).

**Çizelge 2.2.** BHHCT ve diğer  $\beta$ -diketonat esaslı ligandlar kullanılarak yapılan TR-FIA çalışmaları.

<b>Etiket</b>	<b>Tayini Yapılan Tür</b>	<b>Kaynak</b>
<b>BHHCT–Eu (III) kompleksi</b>	-	Deng vd., 2010
<b>BHHCT– Eu (III) kompleksi</b>	metafetaiminin	Kimura vd., 1999
<b>BHHCT– Eu (III) kompleksi</b>	Su örneklerinde çevresel patojenler (Giardia lamblia, Cryptosporidium muris ve Cryptosporidium parvum)	Jiang vd., 2010
<b>BHHCT– Eu (III) kompleksi</b>	hepatit B yüzey antijenin	Hai vd., 2004
<b>BHHCT– Eu (III) kompleksi ve BTBCT– Eu(III)</b>	Tiroid uyarıcı hormon	(Wu ve Zhang, 2002)
<b>BHHBCB–Eu (III), BPPBCB–Eu (III) ve BTBBCB–Eu (III)</b>	-	Zhang vd., 2012
<b>BHHCT– Eu (III)</b>	$\alpha$ -fetoprotein	(Yuan vd. , 1998)
<b>BTOT–Eu<sup>3+</sup></b>	Total serum tiroksin	Wu and Zhang 2002)

### 3. MATERYAL YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan İmmünoassay Cihazı ve Mikroplateler

Bu tez kapsamında zaman gecikmeli floroimmünoassay (TR-FIA) deneyleri, Şekil 3.1 de gösterilen, filtreli BMG-Fluostar Omega otomatik bir mikro plaka okuyucu kullanılarak yapıldı.



Şekil 3.1. Deneyde kullanılan plaka okuyucu.

BMG-FLUOstar Omega florimetri cihazı, çeşitli ölçüm modlarına imkan sunan, otomatik bir mikro plaka okuyucudur. Cihazda çeşitli ölçüm tipleri mevcuttur.

- Ultra hızlı UV / vis absorbans spektrumları veya filtre bazlı absorbans ölçümü,
- FRET floresan yoğunluğu ölçümü,
- Zaman Gecikmeli Floresan (TRF) ölçümü,
- Zaman Gecikmeli FRET (TR-FRET) ölçümü,
- Lüminesans ölçüm
- AlphaScreen® / AlphaLISA® gibi çok yönlü algılama modları bulunmaktadır. (<http://www.rotalab.com/docs/microplate-systems/microplate-reader/bmg-labtech-fluostar-omega-brochure.pdf>).

İmmünoassayde önemli noktalardan birisi, antikorun katı bir yüzeyde tutunmasının etkinliğidir (Kusnezow ve Hoheisel, 2003). Katı bir desteğin (plaka) seçimi, immünoassayın duyarlılığına katkısı oldukça fazladır. İmmünoassayde kullanılan çeşitli destekler mevcuttur. Bu destekler kimyasal, fiziksel ve optik özellikleri bakımından birbirinden farklılık gösterir.

Kimyasal özelliklerine bakıldığında, metalik ve polimerik olarak sınıflandırılabilir. Çizelge 3.1.'de metalik ve polimerik tabanlı destek tipleri sınıflandırılmıştır. Polimerik katı destekler, mikrotitre plakalar, mikro dizi yongaları veya fluorkaplar için kullanılır (Kusnezow ve Hoheisel, 2003; Gerdtsen vd., 2016).

**Çizelge 3.1.** Destek tiplerinin sınıflandırılması.

<i>Destek tipi</i>	<i>Kimyasal özellik</i>	<i>İsmi</i>	<i>İmmünoassay platformu</i>
<b>Polimer Destekli</b>	Hidrofobik	Polistiren	Mikrotitre plate
		Polipropilen	Polimerik levha ve mikrotitre plate
		Polivinil klorür	Polimerik levha
	Hidrofilik	Polisikloolefin	Mikrotitre plate
		Zeonor ve zeonex	Polimerik levha ve disk
		Selüloz asetat	Polimerik levha
<b>Metalik</b>	Hidrofobik	Polikarbonat	Mikrotitre plate ve Polimerik levha
		Polimetilmetakrilat	Polimerik levha
		Poli sülfonat	Polimerik levha
		Altın	Çeşitli destekler üzerindeki altın kaplamalı yüzeyler
		Silikon	Levha

İmmünoassay deneylerinde kullanılan polimerik katı destekler, hidrofilik veya hidrofobik özellik gösterir. Hidrofilik polimerler genellikle elektronegatif fonksiyonel gruplara sahip monomerlerden oluşur. Tersine, hidrofobik monomerler elektronegatif fonksiyonelliğe sahip değildir (Sung vd., 2011). Kimyasal davranışı açısından, bir antikör hidrofobik bölge bakımından zengindir. Bu hidrofobik bölgeler, katı destekler üzerinde bir antikörün adsorbe edilmesi için çok önemlidir, çünkü antikör molekülleri ile yüzey arasındaki bu tür hidrofobik etkileşimler, bağlayıcı kuvvettir. Mikrotitre plakalar genellikle hidrofobik bir polimer olan polistirenden yapılıdır, ancak her biri farklı hidrofobiklik seviyeleri sağlayan ve farklı antikör bağlama ve tutma eğilimlerine sahip olan çeşitli formları mevcuttur (Spencer, vd., 2011).

Hidrofobik polimerlerin aksine, hidrofilik yüzeyler suya afinitelerini önemli ölçüde arttıran elektronegatif fonksiyonelliğe sahiptir. Antikörlerin yapısal ve fonksiyonel davranışı Vermeer ve arkadaşları tarafından kapsamlı bir şekilde çalışıldı ve çalışmalarından hidrofobik yüzeylerin, bir antikorda hidrofilik yüzeylere kıyasla daha yüksek derecede konformasyonel değişikliklere neden olma eğilimindeydi (Vermeer vd., 1998; Vermeer ve Norde, 2000).

Floresan ölçümünün yapılacağı uygulamalarda, genellikle, siyah opak polistiren mikrolakalar kullanılmaktadır. Bu sebepten, TR-FIA deneylerinde, katı zemin olarak polistirenden yapılmış opak Costar® 96-kuyucuklu mikroplate kullanıldı. Bu polistiren plate, sahip olduğu hidrofobik bölgeler sayesinde, antikorların kaplanması için uygun materyaller olduğu bilinmektedir. Analiz için çalışma hacmi 75 - 200 µL' arasındadır ve yüksek bağlanma gösteren bir yüzeye sahiptir.



**Şekil 3.2.** Corning Costar® 96-kuyucuklu siyah polistiren plate.

### 3.2. Kullanılan Diğer Cihazlar

**Çizelge 3.2.** Çalışmada kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları.

<b>Kullanılan cihazlar</b>	<b>Kullanım Amacı</b>
Elektronik terazi (Shimadzu)	Kimyasal maddelerin tartımları
pH metre (Mettler-Toledo)	Çözeltilerin pH'ları ölçme
Otomatik mikro pipetler (Brand ve Eppendorf)	Çözelti hazırlama ve mikroplate çözelti ilavesi
Isıticılı manyetik karıştırıcı (Isolab)	Çözeltilerin homojen bir şekilde karıştırılması
Vortex (Isolab)	Tüp içerisindeki çözeltilerin karıştırılması
Mikroplate çalkalayıcı (Isolab)	Platelerin devamlı ve orbital karıştırılması
Saf su cihazı (Millipore Synergy)	Çözeltilerin hazırlanması
Etüv	İnkübasyon basamaklarının uygulanması

### 3.3. Kullanılan Kimyasallar

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan kimyasalların isimleri ve temin edildikleri firmalar.

Kimyasal Madde	Firma
Anti-amiloid $\beta$ (1-42) antikoru	Abcam
Rekombinant insan amiloid $\beta$ (1-42) protein	Abcam
Amiloid $\beta$ (1-42) antikor-biyotin konjugatı	İnvitrogen
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]benzensülfonilklörür	Sigma-Aldrich
Glutaraldehit	Sigma-Aldrich
Europiyum(III) klorür ( $\text{EuCl}_3$ ),	Sigma-Aldrich
Sodyum klorür ( $\text{NaCl}$ )	Merck
Sodyum azit ( $\text{NaN}_3$ ),	Sigma-Aldrich
Di-sodyum monohidrojenfosfat dihidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	Riedel de Haën
Sodyum dihidrojenfosfat dihidrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	Riedel de Haën
Tween-20	Sigma-Aldrich
Sodyum hidroksit ( $\text{NaOH}$ )	Merck
Potasyum klorür ( $\text{KCl}$ )	Merck
Sodyum borhidrür ( $\text{NaBH}_4$ ),	Sigma-Aldrich
Etil alkol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ )	Sigma-Aldrich
Hidroklorik Asit ( $\text{HCl}$ )	Sigma-Aldrich
Fetal Sığır Serumu	Sigma-Aldrich

### 3.4. Kullanılan Çözeltiler

#### 3.4.1. İnkübasyon tamponu

Bu tez çalışmasında, derişimi  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  olan pH 7,4 fosfat tampon çözeltisi (PBS), inkübasyon tamponu olarak kullanıldı. Bu çözeltiyi hazırlamak için, sodyum dihidrojenfosfat dihidrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) ve disodyum monohidrojenfosfat dihidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) katıları uygun miktarda tartıldı, saf suda çözüldü. pH'sı 7,4 olacak şekilde, pH metre yardımıyla,  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  hidroklorik asit ( $\text{HCl}$ ) ve  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  sodyum hidroksit ( $\text{NaOH}$ ) çözeltileri ile ayarlandı. İnkübasyon tamponu buzdolabında  $4^\circ\text{C}$ 'de saklandı. Antikor ve antijen çözeltilerinin hazırlanması için kullanıldı.

#### 3.4.2. Bloke edici-Engelleme tamponu

İmmünoassaylerde bloke etme aşaması, spesifik olmayan bağlanmayı azaltmada için işlev görür. Birçok immünoassayde ilk adım, analizin gerçekleştirileceği kuyucuğun yüzeyinin bir protein (genellikle bir antikor veya bir protein konjugatı) ile kaplanmasını içerir. Kaplama

proteini, hiçbir zaman, toplam yüzey alanını tam kaplayamaz, bu nedenle test sırasında daha sonra eklenen reaktifler boş olanlara bağlanabilir. Doğal olarak reaktif endojen maddeler veya otoantikorlar, test yüzeyine veya yakalama antikoru da bağlanabilir. Bu bağlanmalar pozitif veya yanlış negatif hatalı sonuçların gözlemlenmesine neden olabilir (Tate ve Ward, 2004). Spesifik olmayan bağlantıların bloke edilmesi, ideal olarak sadece gerekli spesifik antikor-antijen reaksiyonunun meydana geldiği bir durumla sonuçlanır (Vogt vd., 1987). Biyolojik bloker olarak sığır serum albümin, jelatin, süt kazaini kullanılabilir. Biyolojik blokerlara ek olarak deterjanlar da kullanılır. Deterjanlar, protein blokerleri kadar verimli değildir. Deterjan blokerleri, iyonik ve hidrofobik biyomoleküler etkileşimleri bozar ve gevşek bir şekilde bağlanmış molekülleri yüzeyden sıyrır. En yaygın kullanılan non-iyonik deterjanlar; Tween, Triton-X100 ve Non-ident P-40'dır. Non-iyonik deterjanlar, proteinin katı faz üzerine hidrofobik adsorpsiyonunu ve ayrıca makromoleküllerin birikmesini önler (<https://www.corning.com/catalog/cls/documents/application-notes/CLS-DD-AN-456.pdf>.)

Bu tez çalışmasında, spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için, % 0,3'lük BSA ve % 0,05'lük Tween 20 içeren 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 6,0 PBS çözeltisi bloke edici tampon olarak kullanıldı.

### 3.4.3. Yıkama tamponu

Yıkama adımlarını immünoassay basamaklarına dahil etmenin temel amacı, istenmeyen ve spesifik olarak bağlanmayan proteinleri uzaklaştırmak, böylece zemin gürültüsünü azaltmaya yardımcı olmaktır. Antikorlar ilgili analitlerine en yüksek afinite ile bağlanır; ancak antikorlar ayrıca düşük afinite ile diğer proteinlere de bağlanabilir. Bu spesifik olmayan antikor etkileşimleri, birkaç farklı yaklaşımla önemli ölçüde azaltılabilir:

- NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub> ve CaCl<sub>2</sub> gibi kaotropik tuzların kullanılması
- Tween-20 veya Triton-X100 gibi yüzey aktif deterjanların dahil edilmesi hidrofobik etkileşimlerin azaltılması
- Metanol ve etilen glikol gibi organik çözücüler ile hidrofobik etkileşimlerin azaltılması

Yıkama için en sık kullanılan tamponlar genellikle fizyolojik pH'tadır. Tris tamponu (TBS) ve fosfat tamponu (PBS) sıklıkla kullanılır ve spesifik olmayan bağlanmanın azaltılmasına yardımcı olmak için deterjanlarla desteklenebilir (<https://www.seracare.com/page-not-found/>) (Murphy ve O'Kennedy, 2017).



Bu tez kapsamında yıkama tamponu olarak % 0,05 Tween 20 içeren derişimi  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  ( pH 6,0) 'da fosfat tampon çözeltisi kullanıldı. İmmünoassay basamakları arasında yıkama işlemi, yıkama çözeltisinin mikropalakalara ilavesi ve çözeltinin boşaltılması şeklinde uygulandı.

### 3.3.4. Diyaliz tamponu

Bölüm 3.6' da anlatılan BHHCT ve SD1 ligandlarının, sığır serum albümin(BSA) ile konjugat hazırlanması işleminde,  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  derişimde fosfat tampon çözeltisi (pH 7,4) kullanılarak diyaliz işlemi yapıldı.

### 3.4.5. Etiket tamponları

Bölüm 3.6' da kapsamlı şekilde anlatılan, BHHCT ve SD1 ligandları kullanılarak hazırlanan etiket çözeltilerinin seyreltme işlemleri, derişimi olan  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,0) PBS ile çözeltisi ile yapıldı.

İmmünoassay deneylerinde sıklıkla kullanılan tamponlar çizelge 3.4 de özetlenmiştir.

**Çizelge 3.4.** İmmünoassay gelişiminde yaygın olarak kullanılan tamponlar (Wild ve Kusnezow, 2013).

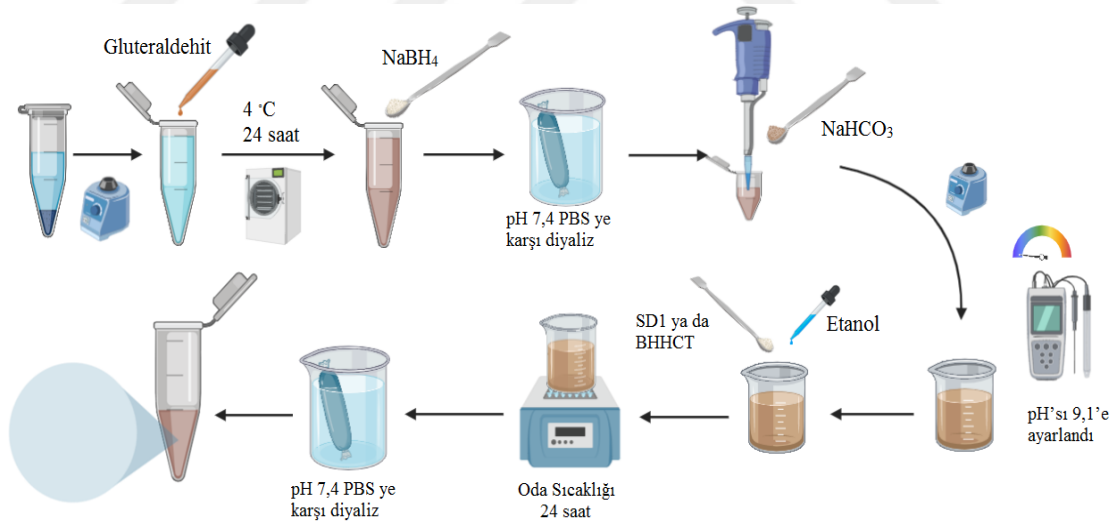
Uygulama için	Tampon	pH
Kaplama için	150 mM- 0.1 M Fosfat Tamponu(PBS)	7,4
	50-100 mM karbonat/ bikarbonat Tamponu	9,6
	10 mM Tris-HCl Tamponu	8,5
Yıkama Tamponu	$0,1 \text{ M PBS}$ ,% 0,05 (v/v) 0,5 mL Tween-20	7,4
Bloke edici tampon	% 1-5 (w / v) sığır serum albümini, kazein, jelatin veya diğer proteinleri içeren $0.1 \text{ M PBS}$	7,4
İnkübasyon tamponu	% 1 (w / v) bloklama reaktifi içeren $0.1 \text{ M PBS}$	7,4

### 3.5. Eu (III) Etiket Çözeltisinin Hazırlanması

TR-FIA yönteminde Eu(III) kompleksler etiket olarak kullanılır. Eu(III)'ü biyotinlenmiş ikincil antikora bağlamak için anten görevi gören bir liganda ihtiyaç duyulur. Özellikle, diketon esaslı bileşikler ligant olarak tercih edilmektedir. Bunun için, ticari olarak temini yapılan 3,4-Bis[4-(4,4,5,5,6,6,6-heptafloro-1,3dioksoheksil)fenil]benzen-sülfonil klorür bileşiğın (BHHCT) ve TÜBİTAK projesi kapsamında üniversitemiz Kimya Bölümü Öğretim üyesi Prof. Dr. Alper Tolga Çolak tarafından sentezlenen bir ligandın 10,10'-(4,4,5,5,6,6,7,7-oktafloro-3,8-dioksodekane-1,3-diol)bis (antrasin-9-sülfonil klorür) (SD1) Eu(III) ile kompleksleri oluşturuldu. Kullanılacak kompleksleri hazırlanmak için Deng ve arkadaşlarının (2010) kullandığı prosedürden yararlanıldı (Deng vd. , 2010). İlk olarak, derişimi  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  fosfat

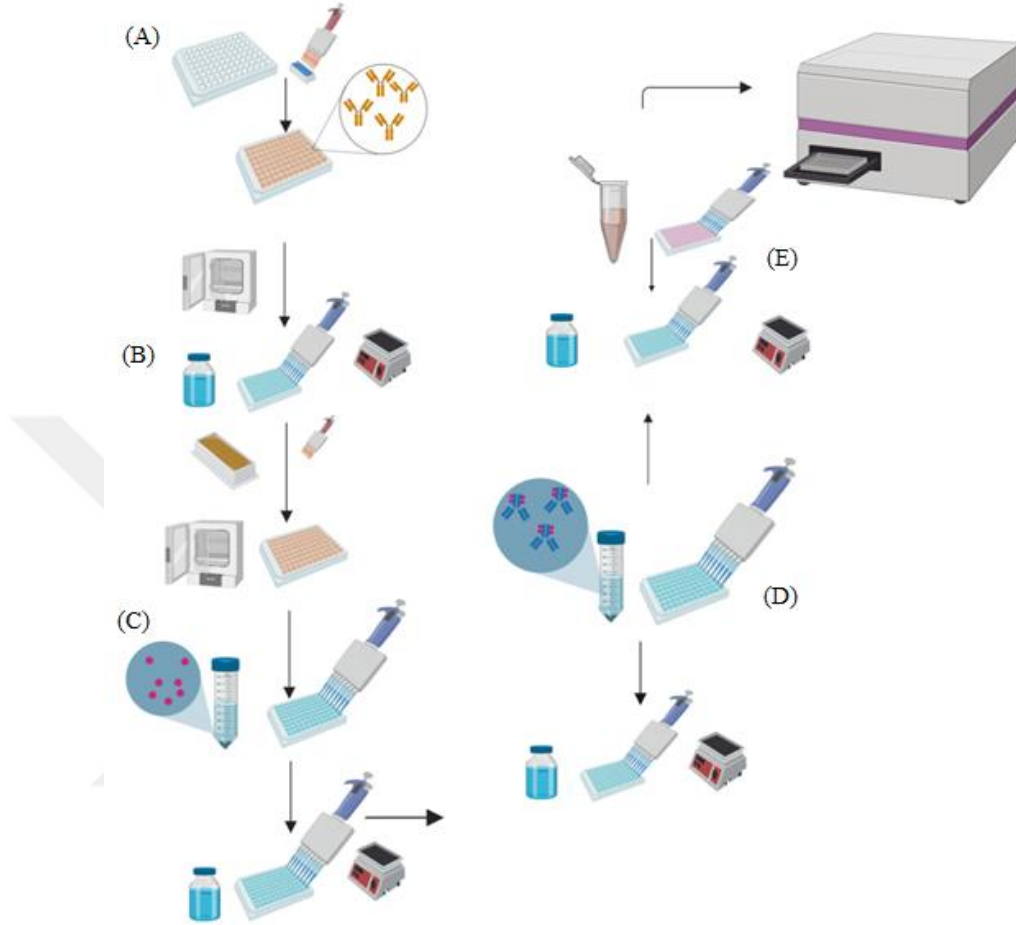
tampon çözeltisi (pH 7,4, 2 mL) içerisinde 1 mg streptavidin (SA) ve 1 mg sığır serum albümin çözüldü. Çözeltiye %1'lik glutaraldehit çözeltisinden 100  $\mu$ L ilave edildi ve 24 saat boyunca 4  $^{\circ}$ C' de inkübasyona bırakıldı. Elde edilen çözeltiye, 0,4 mg sodyum bor hidrür ( $\text{NaBH}_4$ ) ilavesi sonrası, çözelti oda sıcaklığında 2 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında, çözelti, derişimi 0,01 mol  $\text{L}^{-1}$  fosfat tampon çözeltisi (pH 7,4) kullanılarak diyaliz işlemi yapıldı. Diyaliz işlemi yapılan çözeltiye, 1,5 mL distile su ilave edildi ve karıştırıldı. Ardından çözeltiye, 12,6 mg sodyum bikarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) ilave edildi ve sonrasında çözeltinin pH'sı 9,1'e ayarlandı. Gece boyunca 4  $^{\circ}$ C' de inkübasyona bırakılan çözeltiye, etil alkolde çözülmüş olan BHHCT ya da SD1 çözeltileri ilave edildi ve 1 saat boyunca karışması sağlandı. Bağlanmayan türleri ortamdandan uzaklaştırmak için, 0,01 mol L fosfat tampon çözeltisi (pH 7,4) kullanılarak diyaliz işlemi uygulandı. Elde edilen çözelti -20  $^{\circ}$ C' de saklandı ve deney öncesinde gerekli seyreltme işlemi yapılarak etiket olarak kullanıldı. Seyreltme işlemi şu şekilde uygulandı:

Çözelti içerisine,  $\text{EuCl}_3$  (0,04 mol  $\text{L}^{-1}$ , 1,8  $\mu$ L) , BSA (%0,2'lik),  $\text{NaN}_3$  (% 0,1'lik) ve  $\text{NaCl}$  (% 0,9) ilave edildi ve inkübasyona (oda sıcaklığı, 12 saat) bırakıldı. Elde edilen konjugat  $\text{Eu(III)}$  etiket olarak kullanıldı. Uygulanan prosedür Şekil 3.3' de özetlenmektedir.



Şekil 3.3. SA-BSA(BHHCT/SD1) kompleks hazırlama prosedürü.

### 3.6. Uygulanan İmmünoassay Formatı



**Şekil 3.4.** İmmünoassay basamakları (A) Mikroplakalara anticor kaplanması B) Yıkama ve bloke etme C) Antijenin ilave edilmesi D) İkincil anticorun ilave edilmesi E) Etiketinin ilave edilmesi)

- A. **Mikroplakalara anticor kaplanması** Anti-amiloid  $\beta(1-42)$  birincil anticorun ( $A\beta(1-42)$ -Ab1) mikroplakalara kaplanma işlemi için, belli derişimdeki  $A\beta(1-42)$ -Ab1 anticorları, her kuyucuğa 100  $\mu$ L olacak şekilde, mikroplakalara eklendi. Sonrasında mikroplakalar 20-24 saat arası, 37°C’de tutuldu.
- B. **Yıkama ve Bloke etme** Gece boyunca inkübasyona bırakılan mikroplakalar, bağlanmayan anticorların uzaklaştırılması için yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı. Mikroplakalara bloke edici- engelleyici tampon çözeltisi ilave edildi ve BSA ile spesifik olmayan bağlanma bölgeleri engellenmiş oldu. 1 saat boyunca 37 °C’ de inkübasyon adımından sonra yıkama aşaması olmaksızın diğer basamağa geçildi.
- C. **Antijenin ilave edilmesi** Mikroplakaya belli derişimde  $A\beta(1-42)$  protein çözeltileri ilave edildi. Anticorlar üzerinde bulunan, antijene spesifik bölgelere, ilgili antijenin

bağlanması sağlandı. 1 saat inkübasyondan sonra, bağlanmayan antijenleri ortamdan uzaklaştırmak için 3 kez yıkama işlemi yapıldı

- D. **İkincil antikorun ilave edilmesi** Mikroplakaya belli derişimde hazırlanan B-A $\beta$ (1-42) ikincil antikor çözeltisinden 100  $\mu$ L hacimde ilave edildi. 1 saat inkübasyondan sonra, bağlanmayan ikincil antikorları uzaklaştırmak için yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama işlemi yapıldı.
- E. **Etiket ilave edilmesi** Hazırlanan Eu (III) etiket çözeltisi her bir kuyuya 15  $\mu$ L olacak şekilde eklendi. 1 saat inkübasyon sonunda yıkama çözeltisi ile mikroplakalar 6 kez yıkama yapıldı. Mikroplaka okuyucuda, TR-FIA ölçümleri gerçekleştirildi.

### 3.7. SA(BSA)-Ligant-Eu(III) Etiket Çözeltisinin Seyreltme Oranının Optimizasyonu

Ligant-Eu (III) etiket çözeltisi hazırlandıktan sonra, uygun etiket seyreltme oranını belirlemek için, aşağıda gösterildiği gibi, seyreltmeler yapıldı ve mevcut immünoassay formatı uygulanarak deneysel aşamalar gerçekleştirildi.

Bunun için, 96 kuyucuklu polistiren mikroplakalara belli derişimde anti-A $\beta$ (1-42)-Ab1 çözeltisi her kuyucuğa 100  $\mu$ L olacak şekilde ilave edildi ve inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında, bağlanmayan antikorları ortamdan uzaklaştırmak için yıkama adımı uygulandı. Spesifik olmayan bağlanma bölgeleri, % 0,3'lük BSA içeren bloke edici-engelleyen tampon kullanılarak kapatıldı. Bu işlem sonrasında, belli derişimde A $\beta$  (1-42) çözeltisinden tüm kuyucuklara 100  $\mu$ L ilave edildi ve 1 saat sonunda bağlanmayan antijenleri ortamdan uzaklaştırmak üzere yıkama işlemi yapıldı. Sonraki basamakta B-A $\beta$ (1-42)-Ab2 çözeltisinden kuyulara ilave edildi. İnkübasyon sonunda yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama işlemi yapıldı ve SA(BSA)-ligant-Eu(III) etiket çözeltisi 1:10, 1:25, 1:50, 1:100 veya 1:200 oranlarında seyreltilerek her bir kuyuya 15  $\mu$ L olacak şekilde ilave edildi ve 37°C'de bir saat inkübasyona bırakıldı.

Deney aşamaları tamamlandıktan sonra 337 nm ekstinksiyon ve 615 nm emisyon dalga boylarında, TR-FIA ölçümleri alındı. Elde edilen floresans şiddet değerleri, seyreltme oranına karşı grafiğe geçirildi ve optimum oran belirlendi.

### 3.8. A $\beta$ (1-42)- Ab1 ve B-A $\beta$ (1-42)-Ab2 Derişim Optimizasyonu Çalışması

Birincil ve ikincil antikorların derişimleri immünoassayın performansını etkileyen bir faktördür. Optimum derişimleri belirlemek için, farklı kombinasyonlarda A $\beta$ (1-42)- Ab1 ve B-

A $\beta$ (1-42)-Ab2 derişimleri alınarak mevcut immunoassay formatı ayrı ayrı uygulandı. A $\beta$ (1-42)-Ab1 için farklı derişimlerde (10, 20, 30, 40, 50 ng/mL) çözeltilerden kuyucuklara 100  $\mu$ L eklendi ve 37 °C de yaklaşık bir gün boyunca etüvde inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün 3 kez yıkama işleminin ardından 100  $\mu$ L bloke edici çözelti kuyucuklara eklendi ve 37°C'de bir saat inkübasyona bırakıldı. Bloke etme basamağından sonra sabit derişimlerde hazırlanan A $\beta$ (1-42)-Ag çözeltileri yukarıda hazırlanan plâtelere her kuyucuğa 100  $\mu$ L olacak şekilde ilave edildi ve 37°C'de bir saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı. Antijenler ile muamele edilmiş Ab1 kaplı kuyucuklara farklı derişimlerde (1,2,3,4,5 ng/mL) şekil 3.5' de gösterildiği gibi, 100  $\mu$ L B- A $\beta$ (1-42)-Ab2 eklendi ve 1 saat 37 °C de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası yıkama işlemi yapıldı. SA(BSA)-Ligant-Eu(III) etiket çözeltisi belli oranda seyreltilerek her bir kuyucuğa 15  $\mu$ L olacak şekilde ilave edildi ve 37°C'de bir saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda yıkama çözeltisi ile 6 kez yıkama yapıldı. Deney aşamaları tamamlandıktan sonra TR-FIA ölçümleri alındı. Elde edilen floresans şiddet değerleri sırasıyla, A $\beta$ (1-42)-Ab1 ve B-A $\beta$ (1-42)-Ab2 derişimlerine karşı grafiğe geçirildi ve optimum derişim belirlendi.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10 ng/mL 1 ng/mL	10 ng/mL 1 ng/mL	10 ng/mL 1 ng/mL	10 ng/mL 5 ng/mL	20 ng/mL 1 ng/mL	20 ng/mL 1 ng/mL	20 ng/mL 1 ng/mL	20 ng/mL 5 ng/mL	30 ng/mL 1 ng/mL	30 ng/mL 1 ng/mL	30 ng/mL 1 ng/mL	30 ng/mL 5 ng/mL
B	10 ng/mL 2 ng/mL	10 ng/mL 2 ng/mL	10 ng/mL 2 ng/mL	10 ng/mL 5 ng/mL	20 ng/mL 2 ng/mL	20 ng/mL 2 ng/mL	20 ng/mL 2 ng/mL	20 ng/mL 5 ng/mL	30 ng/mL 2 ng/mL	30 ng/mL 2 ng/mL	30 ng/mL 2 ng/mL	30 ng/mL 5 ng/mL
C	10 ng/mL 3 ng/mL	10 ng/mL 3 ng/mL	10 ng/mL 3 ng/mL	10 ng/mL 5 ng/mL	20 ng/mL 3 ng/mL	20 ng/mL 3 ng/mL	20 ng/mL 3 ng/mL	20 ng/mL 5 ng/mL	30 ng/mL 3 ng/mL	30 ng/mL 3 ng/mL	30 ng/mL 3 ng/mL	30 ng/mL 5 ng/mL
D	10 ng/mL 4 ng/mL	10 ng/mL 4 ng/mL	10 ng/mL 4 ng/mL	⊗	20 ng/mL 4 ng/mL	20 ng/mL 4 ng/mL	20 ng/mL 4 ng/mL	⊗	30 ng/mL 4 ng/mL	30 ng/mL 4 ng/mL	30 ng/mL 4 ng/mL	⊗
E	40 ng/mL 1 ng/mL	40 ng/mL 1 ng/mL	40 ng/mL 1 ng/mL	40 ng/mL 5 ng/mL	50 ng/mL 1 ng/mL	50 ng/mL 1 ng/mL	50 ng/mL 1 ng/mL	50 ng/mL 5 ng/mL	⊗	⊗	⊗	⊗
F	40 ng/mL 2 ng/mL	40 ng/mL 2 ng/mL	40 ng/mL 2 ng/mL	40 ng/mL 5 ng/mL	50 ng/mL 2 ng/mL	50 ng/mL 2 ng/mL	50 ng/mL 2 ng/mL	50 ng/mL 5 ng/mL	⊗	⊗	⊗	⊗
G	40 ng/mL 3 ng/mL	40 ng/mL 3 ng/mL	40 ng/mL 3 ng/mL	40 ng/mL 5 ng/mL	50 ng/mL 3 ng/mL	50 ng/mL 3 ng/mL	50 ng/mL 3 ng/mL	50 ng/mL 5 ng/mL	⊗	⊗	⊗	⊗
H	40 ng/mL 4 ng/mL	40 ng/mL 4 ng/mL	40 ng/mL 4 ng/mL	⊗	50 ng/mL 4 ng/mL	50 ng/mL 4 ng/mL	50 ng/mL 4 ng/mL	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗

Şekil 3.5. Optimizasyon için kuyucuklara eklenen derişimler (farklı derişimlerde eklenen Ab1-Ab2 derişim miktarları)

### 3.9. A $\beta$ (1-42)-Ab1 ile A $\beta$ (1-42)-Ag Etkileşim Süresi Optimizasyonu

Antijen-antikor bağlanması spesifik ve seçici bir olaydır. Antijenle antikor arasında birleşme kovalent bağlarla değil, elektrostatik, Van der Waals kuvvetleri ve hidrojen bağlarıyla olur. Bu iki molekül arasındaki bağın gücünü, antijenin birleşme yeri (epitop) ile antikorun bağlanma yeri (paratop) arasındaki temas belirler. Antijen ve antikorun etkileşim süresi geliştirmek istenen tanı kitinin zaman parametresini etkiler. Birincil antikor ve ikincil antikor derişim çalışmasının optimizasyonundan sonra, etkileşim zamanı Şekil 3.6'da anlatılan deney prosedürü üzerinden ilerler. İlk olarak belli derişimde A $\beta$  (1-42)-Ab1 çözeltisinden 100  $\mu$ L kuyucuklara eklendi ve immobilizasyon için yaklaşık 24 saat beklendi. Ertesi gün bağlanmayan antikorları kuyucuklardan uzaklaştırmak için 3 kez yıkama tamponuyla yıkama yapıldı. Spesifik olmayan bağlanma bölgelerini engellemek için bloke edici tamponla 1 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Bloke edici tampon kuyucuklardan uzaklaştırıldı. A $\beta$ (1-42)-Ag' nin birincil antikorla etkileşim süresinin optimizasyonu için belirli derişimde antijen kuyucuklara eklendi ve etkileşim süreleri 80, 60, 40, 20, 10 dakika olacak şekilde inkübasyona bırakıldı inkübasyon sonunda 3 kez yıkama tamponu ile yıkandı. Sabit derişimde hazırlanan B-A $\beta$ (1-42)-Ab2'den 100  $\mu$ L olacak şekilde kuyucuklara eklendi 1 saat boyunca 37 ° C de inkübasyona

bırakıldı. İnkübasyon basamağı sonrası yıkama tamponu ile bağlanmayan ikincil antikorları uzaklaştırmak için 3 kez yıkandı. Son basamak 15 µL SA(BSA)-ligand-Eu(III) etiketinden eklendi ve 1 saat 37 °C de inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda yıkama çözeltisi ile 6 kez yıkama yapıldı. Deney aşamaları tamamlandıktan sonra TR-FIA ölçümleri alındı. Elde edilen floresans şiddet değerleri, etkileşim zamanına karşı grafiğe geçirildi ve optimum süre belirlendi.

### **3.10. Aβ(1-42)-Ag ile B-Aβ(1-42)-Ab2 Etkileşim Süresi Optimizasyonu**

Aβ(1-42)-Ab1 ile Aβ(1-42)-Ag etkileşim süresi optimizasyonundan sonra B-Aβ(1-42)-Ab2 antijen ile etkileşim zamanı yine; Şekil 3.6 de anlatılan deney prosedürü üzerinden ilerledi. İlk olarak belirli derişimde Aβ (1-42)- Ab1 çözeltisinden 100 µL ilave edildi. Kaplama için mikrotiter plakalar 37 °C'de yaklaşık 24 saat inkübe edildi. Bağlanmayan antikorları mikrotiterden uzaklaştırmak için 3 kez yıkama tamponuyla yıkama yapıldı. Spesifik olmayan bağlanma bölgelerini engellemek için bloke edici tamponla 1 saat 37°C de inkübasyona bırakıldı. Bloke edici tampon kuyucuklardan uzaklaştırıldı. Sabit derişimde hazırlanan Aβ(1-42) proteini 100 µL kuyucuklara eklenerek 37 °C de inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda kuyucuklar 3 kez yıkama tamponu ile yıkandı. Belli derişimde hazırlanan B-Aβ(1-42)-Ab2 çözeltisinden 100 µL kuyucuklara eklendi ve 80, 60, 40, 20,10 dakika boyunca 37 ° C de inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda yıkama tamponu ile bağlanmayan ikincil antikorları uzaklaştırmak için 3 kez yıkandı. Son basamak olarak 15 µL SA(BSA)-Ligant -Eu(III) etiketinden eklendi ve 1 saat 37 °C de inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda yıkama çözeltisi ile 6 kez yıkama yapıldı. Deney aşamaları tamamlandıktan sonra TR-FIA ölçümleri alındı. Elde edilen floresans şiddet değerleri, etkileşim zamanına karşı grafiğe geçirildi ve optimum süre belirlendi.

### **3.11. Aβ (1-42) (pg/mL) Protein Tayini İçin Doğrusal Çalışma Aralığının Belirlenmesi**

Optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra amiloid β proteini için kalibrasyon çalışmaları yapıldı ve doğrusal çalışma aralığı belirlendi. İlk aşama polistiren 96 kuyucuklu mikrotiter plakalara, belli derişimde Aβ(1-42)-Ab1 çözeltisi her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde ilave edildi. Hazırlanan plakalar 37°C'de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı. 100 µL bloke edici çözelti kuyucuklara eklendi ve 37°C'de bir saat inkübasyona bırakıldı. Derişim aralığı 0,5-10000 pg/mL olan Aβ(1-42)-Ag çözeltileri Aβ (1-42)-Ab1 kaplı plakalara şekil 3.6'da gösterildiği gibi her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde ilave edildi ve 1 saat 37°C'de kuyucuklar inkübasyona bırakıldı.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,5 pg/mL	0,5 pg/mL	0,5 pg/mL	0,5 pg/mL	0,5 pg/mL	0,5 pg/mL	125 pg/mL	125 pg/mL	125 pg/mL	125 pg/mL	125 pg/mL	125 pg/mL
B	1 pg/mL	1 pg/mL	1 pg/mL	1 pg/mL	1 pg/mL	1 pg/mL	250 pg/mL	250 pg/mL	250 pg/mL	250 pg/mL	250 pg/mL	250 pg/mL
C	2 pg/mL	2 pg/mL	2 pg/mL	2 pg/mL	2 pg/mL	2 pg/mL	500 pg/mL	500 pg/mL	500 pg/mL	500 pg/mL	500 pg/mL	500 pg/mL
D	4 pg/mL	4 pg/mL	4 pg/mL	4 pg/mL	4 pg/mL	4 pg/mL	1000 pg/mL	1000 pg/mL	1000 pg/mL	1000 pg/mL	1000 pg/mL	1000 pg/mL
E	8 pg/mL	8 pg/mL	8 pg/mL	8 pg/mL	8 pg/mL	8 pg/mL	2000 pg/mL	2000 pg/mL	2000 pg/mL	2000 pg/mL	2000 pg/mL	2000 pg/mL
F	16 pg/mL	16 pg/mL	16 pg/mL	16 pg/mL	16 pg/mL	16 pg/mL	4000 pg/mL	4000 pg/mL	4000 pg/mL	4000 pg/mL	4000 pg/mL	4000 pg/mL
G	32 pg/mL	32 pg/mL	32 pg/mL	32 pg/mL	32 pg/mL	32 pg/mL	8000 pg/mL	8000 pg/mL	8000 pg/mL	8000 pg/mL	8000 pg/mL	8000 pg/mL
H	64 pg/mL	64 pg/mL	64 pg/mL	64 pg/mL	64 pg/mL	64 pg/mL	10000 pg/mL	10000 pg/mL	10000 pg/mL	10000 pg/mL	10000 pg/mL	10000 pg/mL

Şekil 3.6. A $\beta$ (1-42)-Ag protein tayini için kuyulara eklenen antijen derişimleri.

İnkübasyon sonrasında yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı. Antijenler ile muamele edilmiş A $\beta$ (1-42)-Ab1 kaplı kuyucuklara belli derişimde 100  $\mu$ L B-A $\beta$ (1-42)-Ab2 eklendi. 37°C’de kuyucuklar inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı. SA(BSA)-Ligant-Eu(III) etiket çözeltisi her bir kuyucuğa 15  $\mu$ L 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 şiddet değerleri amiloid  $\beta$  derişimine karşı grafiğe geçirildi.

### 3.12. Tekrarlanabilirlik

A $\beta$ (1-42) proteininin tayinine yönelik hazırlanan TR-FIA yönteminin tekrarlanabilirliği, belli derişimde antijen çözeltileri (250, 500, 1000 pg/mL) için çalışıldı. Her bir derişim değeri için okunan floresans değeri kullanılarak plateler arası (plate to plate ) ve kuyucuklar arası (well to well) % bağıl standart hata değeri hesaplandı.

### 3.13. Sentetik Serumda A $\beta$ (1-42) Tayininin Yapılması

Spike- geri kazanım testi, standart seyreltici ve numune matrisinin (plazma, serum vb.) immünoassayde kullanılan yakalama ve tespit antikörlerine analit bağlanmasına müdahale edip etmediğini belirlememize yardımcı olur. Ölçtüğünüz tüm proteini yakalayıp yakalamadığınızı



test etmek için, konsantrasyonu bilinen protein çözeltisini kalibrasyon grafiği sınırları altında geri kazanımını belirlemek oldukça önemlidir. Bu tez kapsamında spike deneyi için sentetik serum örneği kullanıldı. Bu A $\beta$  (1-42) (pg/mL) protein tayini için doğrusal çalışma aralığını belirledikten sonra sentetik serum içerisinde derişimleri 1, 10, 100 pg/mL olacak şekilde numuneler hazırlandı. Bölüm 3.6' da anlatılan immunoassay formatı üzerinden deney gerçekleştirildi.

İlk olarak belli derişimde A $\beta$  (1-42)-Ab1 çözeltisi kuyucuklara eklendi ve 24 saat 37 °C de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası yıkama ve bloklama aşaması yapıldı. A $\beta$  (1-42)-Ag belli derişimde (1, 10, 100 pg/mL ) ilavesinde sentetik serumda hazırlanan antiijenler 100  $\mu$ L kuyucuklara eklendi ve 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında kuyucuklar yıkama çözeltisi ile yıkandı ve bağlanmayan reaktifler ortamdand uzaklaştırıldı. Belli derişimde ikincil antikor B-A $\beta$  (1-42)-Ab2 kuyucuklara eklendi. İnkübasyon ve yıkama basamağı ardından belli oranda seyreltilmiş SA(BSA)-ligant-Eu(III) etiket çözeltisi 15  $\mu$ L kuyucuklara ilave edildi. Deney aşamaları tamamlandıktan sonra TR-FIA ölçümleri alındı. Elde edilen floresan şiddet değerleri kalibrasyon grafiğinde (4-PL) karşılaştırıldı.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Bu tez kapsamında, Alzheimer hastalığının tanı ve izlenmesinde biyobelirteç olarak kullanılan amiloid  $\beta$  ( $A\beta$  (1-42)) proteininin tayini için, Zaman Gecikmeli Floroimmünoassay (TR-FIA) tekniğine dayanan bir immünoassay yöntemi geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Bunun için, ilk olarak 3,4bis[4(4,4,5,5,6,6heptafloro1o,3dioksoheksil)fenil]benzensülfonilklorür (BHHCT) ve 10,10'-(4,4,5,5,6,6,7,7-oktafloro-3,8-dioksodekaneol)bis (antrasin-9-sülfonil klörür) (SD1) ligantları kullanılarak, bunların Eu(III) kompleksleri hazırlandı ve TR-FIA deneylerinde etiket olarak kullanıldı. Her iki ligand için,  $A\beta$ (1-42)-Ab1 ve B- $A\beta$ (1-42)-Ab2 miktarı,  $A\beta$ (1-42)-Ab1 &  $A\beta$ (1-42)Ag ve  $A\beta$ (1-42)Ag & B- $A\beta$ (1-42)-Ab2 etkileşim süresi, etiket dilüsyon oranları optimize edilip, tekrarlanabilirlik çalışmaları yapıldı. Optimum şartlarda hazırlanan immünoassay formatlarında, her iki etiket de kullanarak ayrı ayrı kalibrasyon grafikleri çizildi ve etiketlerin sentetik serum örneklerinde Amiloid  $\beta$ 'nin tayini için kullanıp kullanılmayacağı araştırıldı. Yapılan çalışmalarda elde edilen sonuçlar ve yorumlar aşağıda verildi.

### 4.1. Optimizasyon Çalışmaları

Biyolojik molekülleri, doğruluk, hassasiyet ve özgüllük ile ölçmek için kullanılacak immünoassay yöntemi optimize edilmelidir. Optimizasyon çalışmaları, immünoassay prosedürünün güvenilirliği açısından oldukça önemlidir. Her bir parametre için optimum değeri belirleyebilmek için ayrı deney aşamaları tasarlanmalıdır. Tez kapsamında optimize edilecek her parametrenin birbiriyle farklı kombinasyonları denenerek bu aşama gerçekleştirilmiştir ve sonuçlar aşağıda sunulmuştur.

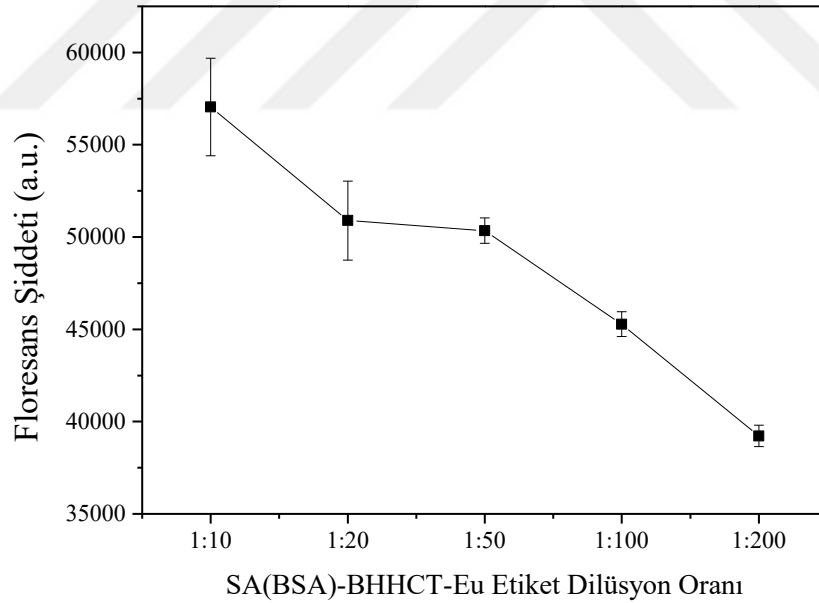
#### 4.1.1. SA(BSA)-LİGAND-Eu(III) etiket çözeltisinin dilüsyon oranının optimizasyonu

Bölüm 3.7'de belirtildiği üzere, ilk olarak kullanılacak etiket çözeltisinin optimum dilüsyon oranı belirlendi. Bunun için, 96 kuyucuklu polistiren mikropalakalara belli derişimde  $A\beta$  (1-42)-Ab1 çözeltisi her kuyucuğa 100  $\mu$ L olacak şekilde ilave edildi ve inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında, bağlanmayan antikorları ortamdan uzaklaştırmak için yıkama adımı uygulandı. Spesifik olmayan bağlanma bölgeleri, % 0,3'lük BSA içeren bloke edici-engelleyen tampon kullanılarak kapatıldı. Bu işlem sonrasında, belli derişimde  $A\beta$  (1-42)-Ag çözeltisinden tüm kuyucuklara 100  $\mu$ L ilave edildi ve inkübasyon sonunda bağlanmayan antijenleri ortamdan uzaklaştırmak üzere yıkama işlemi yapıldı. Sonraki basamakta B- $A\beta$  (1-42)-Ab2 çözeltisinden kuyucuklara ilave edildi. İnkübasyon sonunda yıkama çözeltisi ile 3 kez

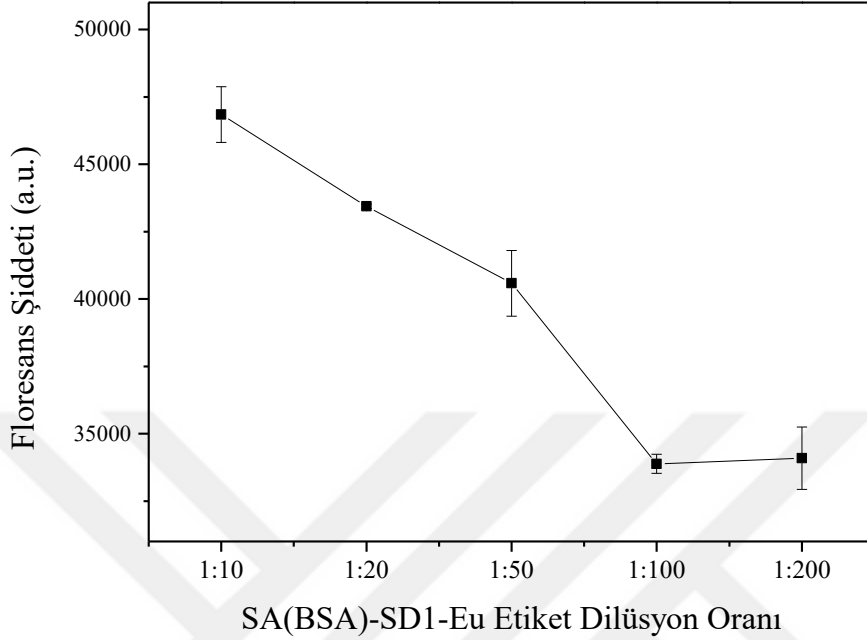
yıkama işlemi yapıldı. SA(BSA)-Ligant-Eu(III) etiket çözeltisi 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200 oranlarında seyreltilerek, her bir kuyuya 15 µL olacak şekilde, ilave edildi ve 37°C'de bir saat tutuldu. İnkübasyon adımından sonra, 6 kez yıkama yapıldı ve mikroplaterler cihaza yerleştirilip ölçüm gerçekleştirildi. Floresans yoğunluğu etiket dilüsyon oranına karşı grafiklendi. BHHCT ve SD1 ligantları kullanılarak hazırlanan Eu(III) etiketler için elde edilen grafikler sırasıyla Şekil 4.1 ve Şekil 4.2 görülmektedir.

TR-FIA ölçüm parametreleri;

- Ekstrinksiyon: 337nm
- Emisyon: 615 nm
- Flaş sayısı:100
- Entegrasyon başlama süresi:200µs
- Entegrasyon bitiş süresi:400µs



**Şekil 4.1.** SA(BSA)-BHHCT-Eu(III) etiket çözeltisinin dilüsyon oranı (1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200) optimizasyonu.



**Şekil 4.2.** SA(BSA)-SD1-Eu(III) etiket çözeltisinin dilüsyon oranı (1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:200) optimizasyonu.

Grafikler incelendiğinde, her iki etiket türü için, dilüsyon oranının artışı ile floresans şiddet değerlerinin azaldığı görülebilir. 1:50 dilüsyon oranına kadar, çok büyük bir azalma olmazken, bundan sonraki değerlerde floresans şiddetinin oldukça değiştiği görülebilir. Dolayısıyla 1:50 dilüsyon oranının, uygun sinyaller elde etmek için yeterli bir oran olduğu görüşüne varıldı ve deneylerde bu dilüsyon oranı kullanıldı.

Çizelge 4.1.'de çeşitli ligantlar ile hazırlanan Eu(III) etiketler ile yapılan çalışmalar aşağıda özetlenmiştir. Bu çalışmalar incelendiğinde, belli dilüsyon oranlarının çalışıldığı ve daha çok 1:50 ve 1:100 dilüsyon oranlarının optimum değer olarak kullanıldığı görülmüştür. Bazı çalışmalarda ise herhangi bir optimizasyon çalışması yapılmamış ve belli bir dilüsyon oranında çalışmalar yürütülmüştür.

**Çizelge 4.1.** Literatürlerde etiket dilüsyon oranı çalışmaları.

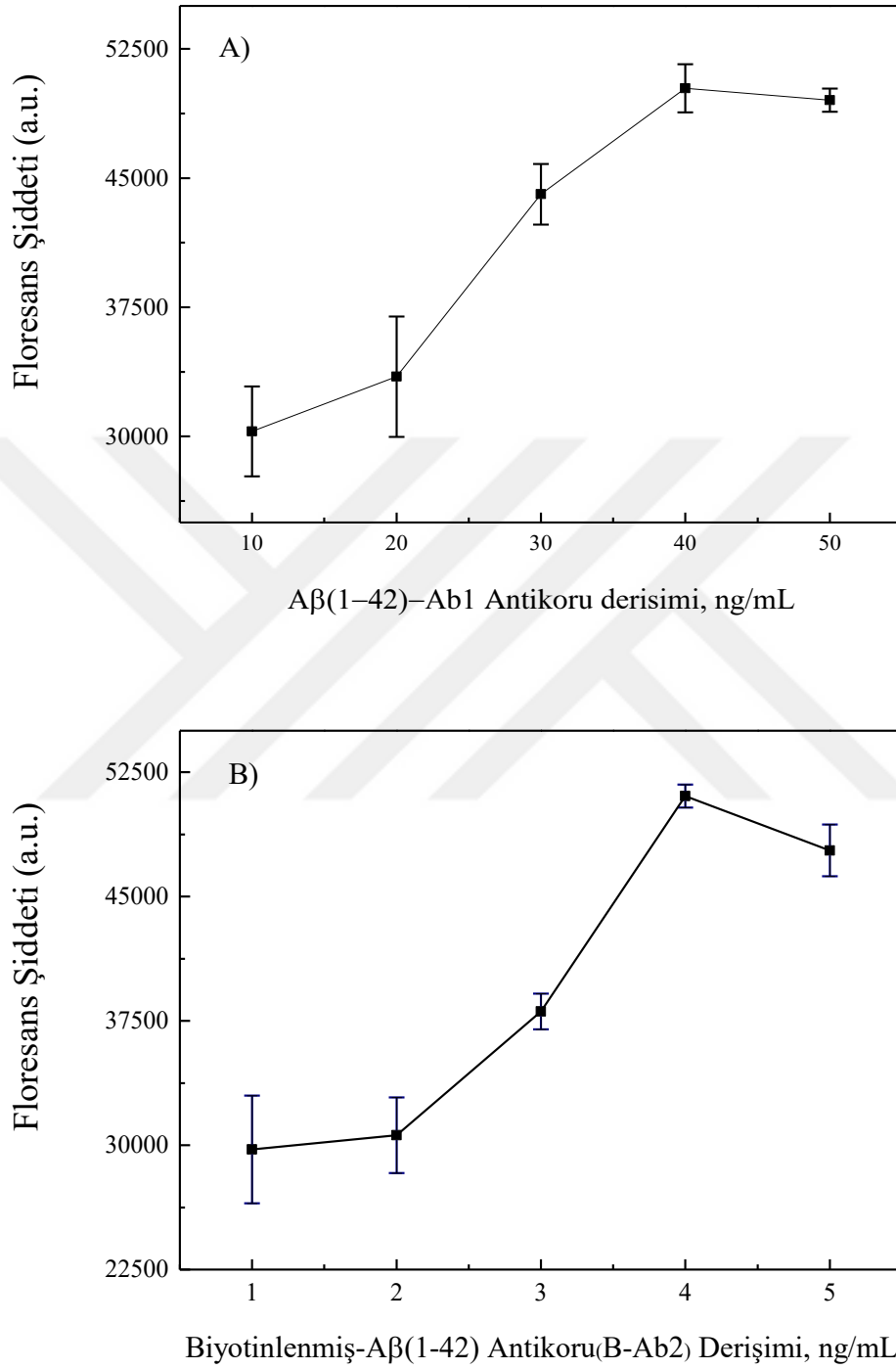
Etiket	Tayin edilen tür	Çalışılan dilüsyon oranları	Optimum dilüsyon oranı	Kaynak
<b>Manyetik boncuk-Eu(III) Etiket</b>	Karsinoembriyojenik antijen	1:10,1:25,1:50,1:75 1:100, 1:200	1:50	(Hou vd., 2012)
<b>Eu(III)-Etiket</b>	Karsioembriyojenik antijen	1:10,1:50,1:100,1:200 1:300, 1:500	1:100	(Yan vd., 2005)
<b>BHHCT-Eu(III)</b>	<i>Giardia lamblia</i>	-	1:10	(Deng vd., 2010)

#### 4.1.2. A $\beta$ (1-42)-Ab1 ve B- A $\beta$ (1-42)-Ab2 derişimlerinin optimizasyonu

BHHCT için; BHHCT ligantı kullanılarak hazırlanan SA(BSA)-BHCCT-Eu(III) etiket için; bölüm 3.7’de belirtildiği üzere, en uygun A $\beta$  (1-42)-Ab1 ve B-A $\beta$  (1-42)-Ab2 derişimlerini belirlemek amacıyla, immünoassay basamakları uygulandı. Parametrelerin optimizasyonu, kimyasal sarfiyatını önlemek için, aynı plate üzerinde farklı kombinasyonlar denenerek gerçekleştirildi. Ölçümler sonunda elde edilen floresans şiddetleri, söz konusu parametrelere karşı grafiğe geçirildi.

Polistiren 96-kuyucuklu plakalara, Şekil 3.5’de gösterildiği gibi, farklı kombinasyonla sırasıyla belli derişimlerdeki (10, 20, 30, 40, 50 ng/mL) A $\beta$  (1-42)-Ab1 çözeltisinden 100  $\mu$ L olacak şekilde eklendi ve kaplamanın sağlanması için yaklaşık 24 saat inkübasyonda bırakıldı. Bağlanmayan birincil antikorları ortamda uzaklaştırmak için yıkama işlemi yapıldı. Spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için bloke edici tampon ile kuyucuklar bloke edildi. Belli derişimde hazırlanan A $\beta$  (1-42)-Ag çözeltisinden tüm kuyucuklara 100 $\mu$ L olacak şekilde ilave edildi. İnkübasyon sonrasında yıkama çözeltisi ile yıkama yapıldı. Antijenler ile muamele edilmiş farklı derişimlerde A $\beta$  (1-42)-Ab1 kaplı kuyucuklara, yine farklı derişimlerde (1, 2, 3, 4, 5 ng/mL) B-A $\beta$  (1-42)-Ab2 çözeltisi eklenip, inkübasyona bırakıldı ve sonrasında yıkama adımına geçildi.

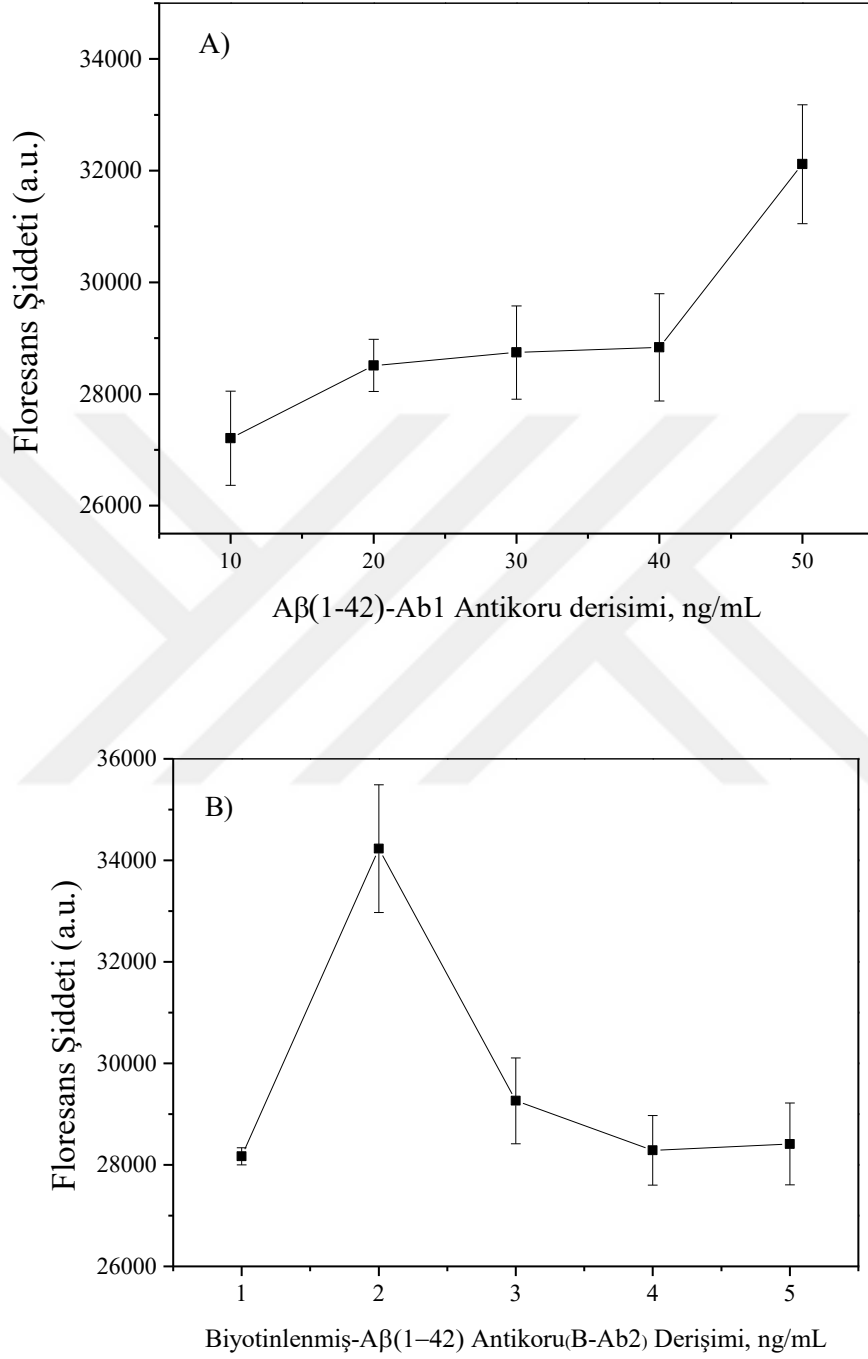
Optimize edilen dilüsyon oranında seyreltilen SA(BSA)-BHHCT-Eu(III) çözeltilerinden, her bir kuyucuğa eklendi ve plâtelere inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda yıkama yapıldı ve TR-FIA ölçümü sonrası, floresans şiddetleri, A $\beta$  (1-42)-Ab ve B-A $\beta$  (1-42)-Ab2 miktarına karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.3 A ve B).



**Şekil 4.3.** (A) A $\beta$  (1-42)-Ab1 Antikor derişim optimizasyonu (B) B-A $\beta$  (1-42)-Ab2 derişim optimizasyonu.

Şekiller incelendiğinde, floresans şiddet değerinin en yüksek olduğu değerler optimum değerler olarak alındı. Buna göre A $\beta$  (1-42)-Ab1 için 40 ng/mL, B-A $\beta$  (1-42)-Ab2 için ise 4 ng/mL değerleri optimum olarak kabul edildi.

SDI için: SA(BSA)-SD1-Eu(III) etiket için optimum A $\beta$  (1-42)-Ab1 ve B-A $\beta$  (1-42)-Ab2 derişimlerini belirlemek için, deney prosedürü, bölüm 3.8 de belirtidiği gibi, uygulandı. Elde edilen floresans şiddet değerleri birincil antikor ve biyotinlenmiş ikincil antikor derişim miktarlarına göre ayrı ayrı grafiklere geçirildi (Şekil 4.4 A ve B). En yüksek floresans değerlerinin elde edildiği miktarlar olan A $\beta$  (1-42)-Ab1 için 50 ng/mL, B-A $\beta$  (1-42)-Ab2 için ise 2 ng/mL derişim değerleri optimum olarak alındı.



**Şekil 4.4.** (A) Aβ (1-42)-Ab1 Antikoru derişim optimizasyonu ve (B) B-Aβ (1-42)-Ab2 antikoru derişim optimizasyonu.



TR-FIA yöntemi ile yapılan farklı çalışmalarda belirlenmiş optimum birincil ve ikincil antikor derişimleri Çizelge 4.2 de özetlenmiştir.

**Çizelge 4.2.** Literatürde Optimum birincil ve ikincil antikor derişimleri çalışmaları.

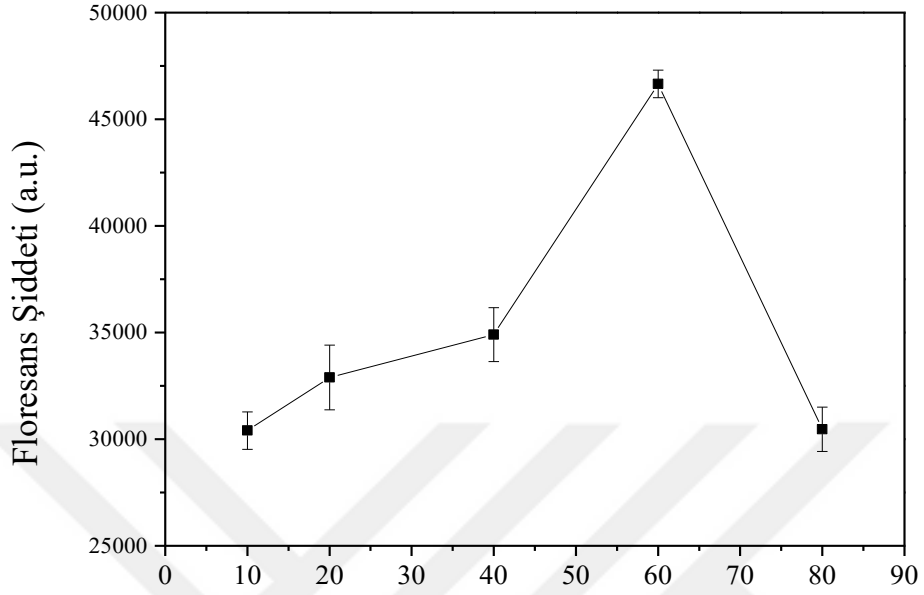
Tayini Tür	Yapılan	Ab1 miktarı	Ab2 miktarı	Kaynak
Salbutamol		0,025-0,05-0,1-0,2-0,3 mg/L	0,025-0,05-0,1-0,15-2 mg/L	(Fang vd., 2019)
IgG		0-5-10-15-20 mg/ L	-	(Niu vd., 2011)
Adenovirüs		0,5 mg/kuyu	10ng/kuyu	(Scalia vd., 1995)
Tiakloprid		1,25 mg/ kuyu	-	(Liu vd., 2013)

Literatür araştırmalarına bakıldığı zaman antikor derişimlerinin optimizasyonu çok az çalışmada bulunmakta ve çoğu çalışma sabit derişimi kullanmaktadır. Yapılan derişim optimizasyonu deneyi oluşturulan immunoassay formatı için oldukça hassas olacağı düşünülmektedir.

#### 4.1.3. A $\beta$ (1-42)-Ab1 ile A $\beta$ (1-42)-Ag antijeninin etkileşim süresinin optimizasyonu

*BHHCT için:* Antikor-antijen etkileşim süreleri, immünoassay performansını etkileyen bir parametredir ve uygun sürelerin seçimi assay güvenilirliğini artırır. Etkileşim süreleri iki basamakta çalışılmıştır. Bunun için ilk olarak A $\beta$  (1-42)-Ab1 ve A $\beta$  (1-42)-Ag'nin etkileşim süresi optimize edilmiştir.

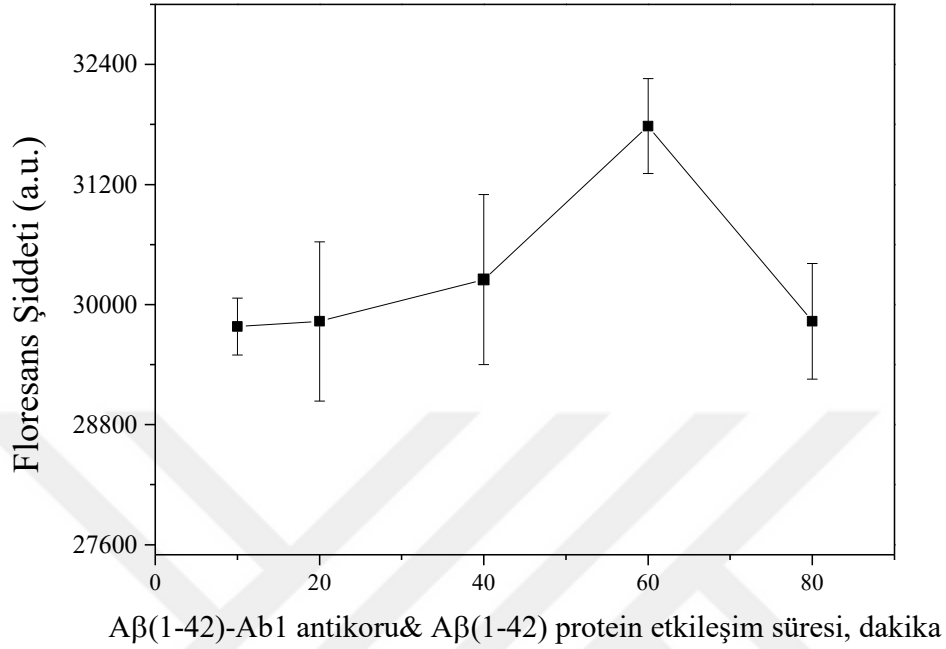
Buna göre, Bölüm 3.9 da belirtildiği gibi, A $\beta$  (1-42)-Ab1 kaplı platelere her kuyucuğa 100  $\mu$ L A $\beta$  (1-42)-Ag ilave edildi ve süreler dikkat edilerek plateler inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda yıkama yapıldı ve immünoassay basamakları uygulandı. Ölçümler sonucunda elde edilen floresans şiddetleri etkileşim sürelerine karşı grafiğe geçirildi. (Şekil.4.5). Şekil incelendiğinde 60 dakika etkileşim süresi optimum süre olarak alındı ve BBHHCT için tüm deneylerde A $\beta$  (1-42)-Ab1 ile A $\beta$  (1-42)-Ag antijeninin etkileşim süresi bu şekilde uygulandı.



Aβ(1-42)-Ab1 antikorü & Aβ(1-42) protein etkileşim süresi, dakika

**Şekil 4.5.** SA(BSA)-BHHCT-Eu(III) etiketi kullanılarak Aβ(1-42)-Ab1 ile Aβ (1-42)-Ag antijeninin etkileşim süresinin optimizasyonu.

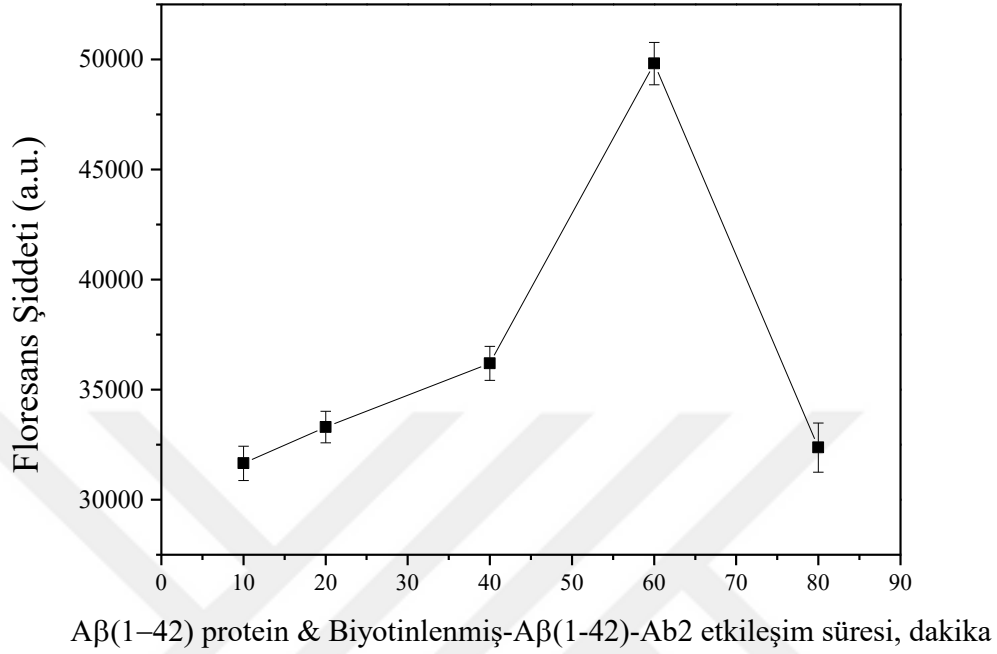
*SD1 için:* Aynı şekilde optimum etkileşim süresini belirlemek için Aβ (1-42)-Ab1 kaplı platelere Aβ (1-42)-Ag ilave edildi ve süre farkına dikkat edilerek 10, 20, 40, 60, 80 dakika inkübasyona bırakıldı. Deney prosedürü uygulanarak TR-FIA ölçümleri alındı ve floresan yoğunluğuna karşı etkileşim süreleri grafiğe geçirildi. (Şekil 4.6). 60 dakika floresans yoğunluğunun yüksek olmasından dolayı optimum inkübasyon süresi olarak belirlendi ve SD1 ligantı için yapılacak tüm deneylerde Aβ (1-42)-Ab1 ile Aβ (1-42)-Ag antijeninin etkileşim süresi 60 dakika olarak deneyler gerçekleştirildi.



**Şekil 4.6.** SA(BSA)-SD1-Eu(III) etiketi kullanılarak Aβ (1-42)-Ab1 ile Aβ (1-42)-Ag antijeninin etkileşim süresinin optimizasyonu.

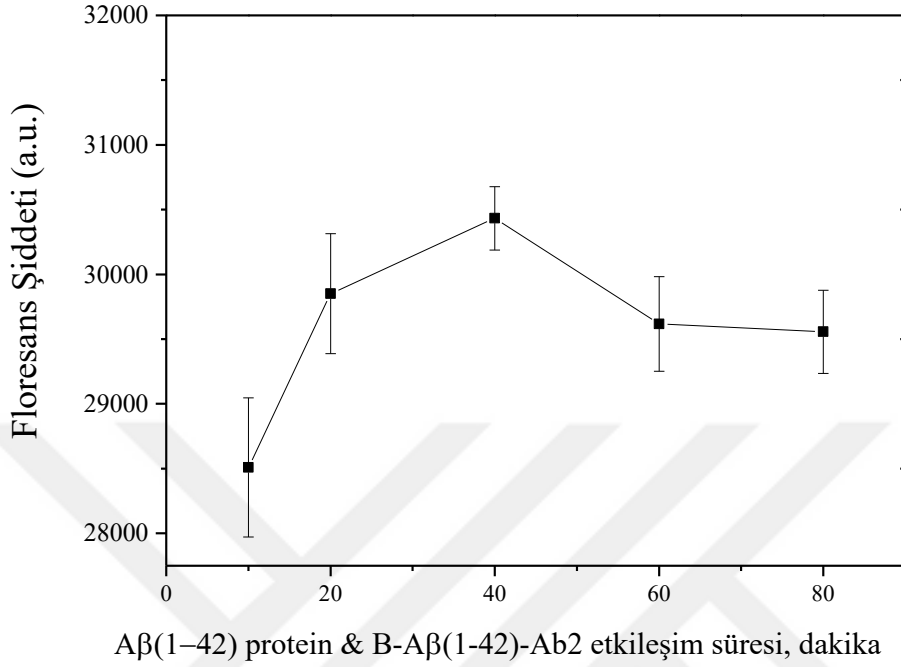
#### 4.1.4. Aβ (1-42)-Ag ve B-Aβ (1-42)-Ab1 etkileşim süresinin optimizasyonu

*BHHCT için:* etkileşim sürelerinin ikinci optimizasyon basamağında, Aβ (1-42)-Ag antijeni ile B-Aβ (1-42)-Ab2 inkübasyon süreleri optimize edildi. İmmünoassay basamakları bir önceki bölümdeki gibi uygulandı. Aβ (1-42)-Ag eklenmiş plakelere, ikincil antikor eklenip 37°C'de belli sürelerde (80, 60, 40, 20, 10 dakika) inkübasyona bırakıldı. Yıkama adımlarından sonra etiket çözeltilerinden eklenerek TR-FIA ölçümleri alındı. Floresans şiddetleri, etkileşim süresine karşı grafiklendi (Şekil 4.7). Şekil incelendiğinde, 60 dakika etkileşim süresinin uygun olduğu görüldü.



**Şekil 4.7.** SA(BSA)-BHHCT-Eu(III) etiketi kullanılarak Aβ (1-42)-Ag protein & B-Aβ (1-42)-Ab2 etkileşim süresinin optimizasyonu.

*SD1 için:* BHHCT ligandında olduğu gibi SD1 ligandında da optimizasyon süresinin 2. basamağı Aβ (1-42)-Ag antijeni ile B-Aβ (1-42)-Ab2 inkübasyon sürelerinin optimizasyonudur. Assay basamakları aynı şekilde uygulandı ve elde edilen veriler grafiğe geçirildi. (Şekil 4.8). Buna göre diğer deneylerde kullanılmak üzere etkileşim süresi 40 dakika olarak seçildi.



**Şekil 4.8.** SA(BSA)-SD1-Eu(III) etiketi kullanılarak Aβ (1-42)-Ag protein & B-Aβ (1-42)-Ab2 etkileşim süresinin optimizasyonu.

Niu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada yakalama antikoruna 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 şiddet grafikleri incelendiğinde ilk grafik için (kaplama antikoruna ile ilgili antijen etkileşimi) 60 dakikadan sonra çok az bir artış olduğu sonrasında ise floresans şiddet değerinin artmadığı gözlenmiştir 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 artış olduğu sonrasında ise floresans şiddet değerinin artmadığı gözlenmiştir ve bu sebepten optimum süre 90 dakika olarak çalışılmıştır (Niu vd., 2011).

Aşağıda her iki ligant için optimize edilen parametreler verilmiştir. (Çizelge.4.3)

**Çizelge 4.3.** Kullanılan etiketler için optimize koşullar.

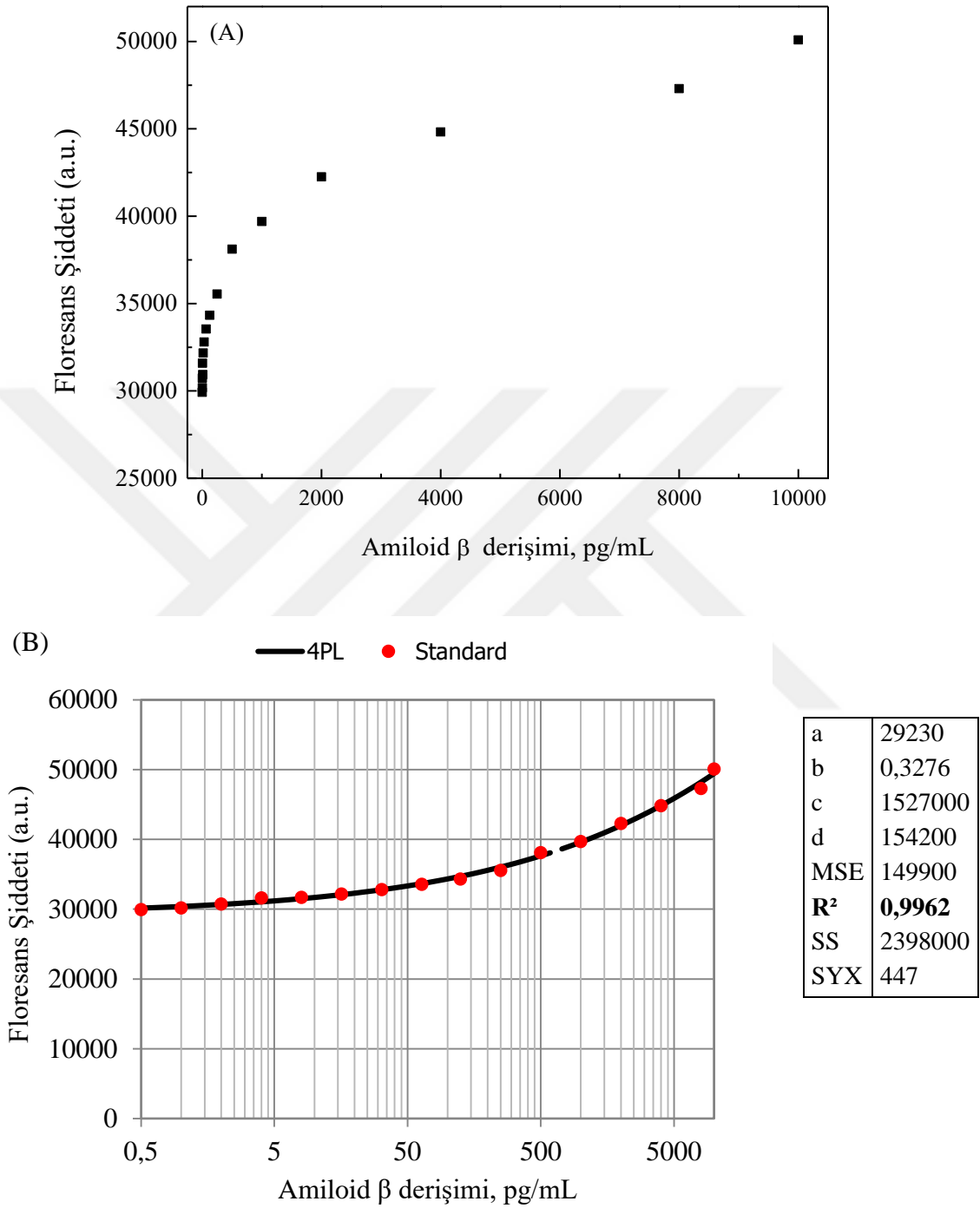
Parametre	SA(BSA)-BHHCT-Eu(III)	SA(BSA)-SD1-Eu(III)
<b>Optimize A<math>\beta</math> (1-42)-Ab<sub>1</sub> Derişimi</b>	40 ng/mL	50 ng/mL
<b>Optimize B- A<math>\beta</math> (1-42)-Ab<sub>2</sub> Derişimi</b>	4 ng/mL	2 ng/mL
<b>Optimize Ab<sub>1</sub>-Ag Zamanı</b>	60 dk	40 dk
<b>Optimize Ag-B-Ab<sub>2</sub> Zamanı</b>	60 dk	60 dk
<b>Etiket Dilüsyon Katsayısı</b>	1:50	1:50

#### 4.2. TR-FIA Yöntemi ile A $\beta$ (1-42) (pg/mL) Tayini İçin Doğrusal Çalışma Aralığının Belirlenmesi

BHHCT için; optimum koşullar altında bölüm 3.11 de anlatıldığı üzere, prosedür oluşturuldu. Bu prosedüre göre; 40 ng/mL derişimde A $\beta$  (1-42)-Ab<sub>1</sub> plateye kaplandı. 24 saat inkübasyon adımından sonra yıkama ve bloking adımı uygulandı. Kuyucuklar bloke edildikten sonra derişimi 0,5-10000 pg/mL arasında olan amiloid  $\beta$  protein çözeltisinden şekil 3.4 de gösterildiği şekilde 100  $\mu$ L olacak şekilde kuyucuklara eklendi. Antijenler optimum etkileşim süresinde (60 dakika) inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında yıkama çözeltisi ile 3 kez yıkama yapıldı.

Antikor ile antijenin etkileşimi gerçekleştikten sonra 4 ng/mL derişimde B-A $\beta$  (1-42)-Ab<sub>2</sub> kuyucuklara eklendi ve optimum etkileşim süresinde (60 dakika) inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 3 kez yıkama yapıldı. SA(BSA)-BHHCT-Eu(III) etiket çözeltisi 1:50 oranında seyreltilerek, her bir kuyucuğa 15  $\mu$ L olacak şekilde ilave edildi ve 37°C'de bir saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda yıkama çözeltisi ile 6 kez yıkama yapıldı. Deney aşamaları tamamlandıktan sonra TR-FIA ölçümleri alındı. Elde edilen floresans şiddet değerleri farklı A $\beta$  (1-42)-Ag derişimlerine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4.9 ( A )).

İmmunoassay çalışmaları temel olarak ligant bağlama prosedürleridir ve bu çalışmalarda elde edilen kalibrasyon grafikleri çoğu zaman doğrusal değildir. Bu tip durumlarda kalibrasyon grafiklerini, 4- parameter logistic (4-PL) olarak adlandırılan model ile oluşturmak daha uygun bir yaklaşımdır (Findlay ve Dillard, 2007). Bu sebepten elde edilen veriler kullanılarak amiloid  $\beta$  proteini için kalibrasyon grafiği yeniden oluşturuldu ve doğrusal çalışma aralığı belirlendi (Şekil 4.9. ( B )).



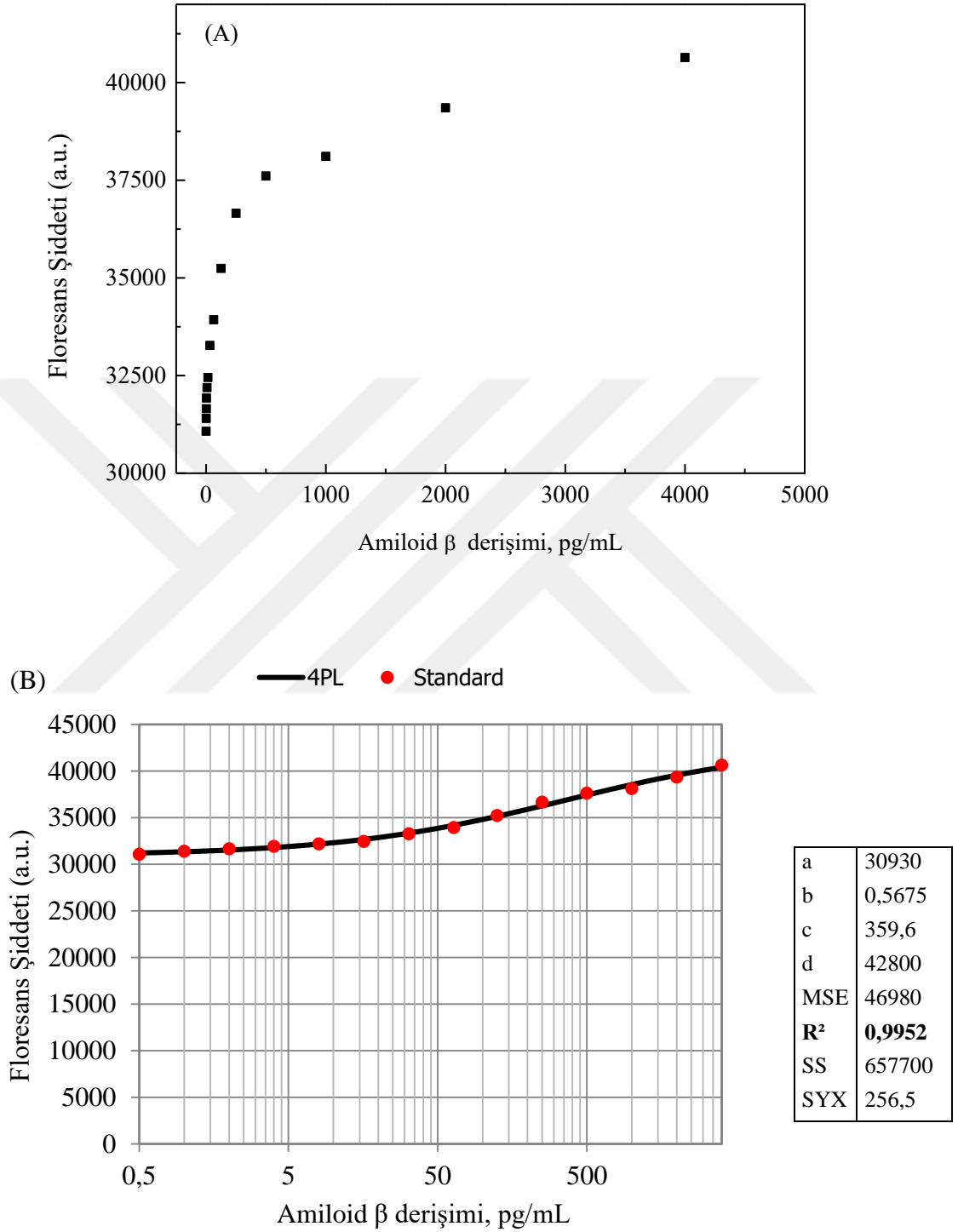
**Şekil 4.9.** (A) SA(BSA)-BHHCT-Eu(III) ile elde edilen kalibrasyon grafiği (B) 4-PL model ile elde edilen kalibrasyon grafiği.

Şekil 4.9 (B) incelendiğinde, SA(BSA)-BHHCT-Eu(III) etiket kullanılarak hazırlanan TR-FIA prosedürü sonucunda, amiloid  $\beta$  proteini için doğrusal çalışma aralığı 0,5-10000 pg/mL olarak belirlendi.

SD1 için: optimum derişim ve etkileşim süresi sonunda da benzer şekilde SD1 ligandı için immunoassay prosedürü oluşturuldu. SD1 ligandı ile hazırlanan etiket için optimum koşullar sonunda, bölüm 3.11 de anlatıldığı üzere, prosedür oluşturuldu. Bu prosedüre göre; 50g/mL derişimde A $\beta$  (1-42)-Ab1 plateye kaplandı. 24 saat inkübasyona adımından sonra yıkama ve bloke adımı uygulandı. Kuyucuklar bloke edildikten sonra derişimi 0,5-10000 pg/mL arasında olan amiloid  $\beta$  protein çözeltisinden kuyucuklara 100  $\mu$ L olacak şekilde eklendi. Etkileşim sonrası yıkama işlemi uygulandı.

Sonrasında 2 ng/mL derişimde B-A $\beta$  (1-42)-Ab2 çözeltisinden kuyucuklara eklendi ve inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 3 kez yıkama yapıldı ve SA(BSA)-SD1-Eu(III) etiket çözeltisi 1:50 oranında seyreltilerek her bir kuyucuğa 15  $\mu$ L olacak şekilde ilave edildi ve inkübasyon sonunda yıkama çözeltisi ile 6 kez yıkama yapıldı. Deney aşamaları tamamlandıktan sonra TR-FIA ölçümleri alındı. Elde edilen floresans şiddet değerleri farklı A $\beta$  (1-42)-Ag derişimlerine karşı grafiğe geçirildi (Şekil 4. 10 (A)). Benzer şekilde elde edilen grafiğin 4PL modeli oluşturuldu (Şekil 4.10 (B)).





**Şekil 4.10.** (A) SA(BSA)-SD1-Eu(III) ile elde edilen kalibrasyon grafiği (B) 4-PL model ile elde edilen kalibrasyon grafiği

Şekil 4.10 (B) incelendiğinde, SA(BSA)-SD1-Eu(III) kompleksinin etiket olarak kullanıldığı zaman, amiloid  $\beta$  protein için çalışma aralığı 0,5-4000 pg/mL olarak bulundu.

Çizelge 4.4' de tez kapsamında hazırlanan immunoassay prosedürü ile diğer bazı çalışmalar karşılaştırılmıştır.

**Çizelge 4.4.** Amiloid  $\beta$  proteininin tayini için yapılan çalışmalar

Yöntem (ASSAY)	Çalışma aralığı	Kaynak
<b>ELISA</b>	0-250 pg/mL	(Esparza vd., 2013)
<b>Magnetik boncuk temelli immünoassay</b>	25-400 pg/mL	(Kim vd. , 2015)
<b>Kuantum dot temelli immünoassay</b>	0,5-8,0 nM	(Pi vd., 2016)
<b>Kuantum dot temelli immünoassay</b>	23-450 pg/mL	(Tang vd., 2018)
<b>Elektrokemilüminesans temelli immunoassay</b>	200-1700 pg/ml	(Bittner vd. , 2016)
<b>Silikon mikroarray temelli immünoassay</b>	0-5000 pg/mL	(Gagni vd., 2013)
<b>Yöntem (BİYOSENSÖR)</b>		
<b>Kronoamperometri/ Perde baskılı elektrot</b>	20-12500 pg/mL	(de la Escosura-Muniz vd., 2015)
<b>Fotoelektrokimyasal immünosensör</b>	0,5 pg/mL-100 ng/mL	(Wang vd., 2017)
<b>Elektrokimyasal İmmünosensör</b>	100 fM - 25 pM	(Diba vd. , 2017).
<b>Fotoelektrokimyasal İmmünosensör</b>	0,05 pg mL ve 0,1 pg mL <sup>-1</sup>	(Zhang vd. , 2019)

Elde edilen veriler ışığında tez kapsamında hazırlanan TR-FIA prosedürlerinde amiloid  $\beta$  proteini için oldukça geniş çalışma aralığı elde edildiği görülmüştür. Amiloid  $\beta$  tayini için yapılan diğer çalışmalar ile kıyaslandığında oldukça tatminkâr olduğu söylenebilir.

### 4.3. Tekrarlanabilirlik

Her iki etiket komplekslerinin kullanılarak immunoassay prosedürlerinin tekrarlanabilirliği bölüm 3.12'de belirtildiği gibi çalışıldı. Belli derişimde amiloid  $\beta$  proteini için floresans şiddet değerlerinin plate to plate ve well to well olacak şekilde % BBS değerleri hesaplandı ve Çizelge 4.5 de verildi.

**Çizelge 4.5.** Tekrarlanabilirlik sonuçları.

<b>SA(BSA)-BHHCT-Eu(III)</b>		
<b>A<math>\beta</math> (1-42) Derişimi</b>	<b>Aynı Plate(%BSS)</b>	<b>Farklı Plate(%BSS)</b>
<b>250 pg/mL</b>	2,60	2,42
<b>500 pg/mL</b>	4,11	3,44
<b>1000 pg/mL</b>	4,17	4,61
<b>SA(BSA)-SD1-Eu(III)</b>		
<b>A<math>\beta</math> (1-42) Derişimi</b>	<b>Aynı Plate(%BSS)</b>	<b>Farklı Plate(%BSS)</b>
<b>250 pg/mL</b>	1,52	3,43
<b>500 pg/mL</b>	0,92	1,62
<b>1000 pg/mL</b>	2,54	4,21

% BSS (bağıl standart sapma) analitik yöntemde sonuçların birbirine olan yakınlığını ifade eder. Amiloid  $\beta$  için % BSS değerleri çizelge 4.5’de verilmiştir.

#### **4.4. Sentetik Serum Numunelerinde Amiloid $\beta$ Proteininin Tayini**

Amiloid kaskad hipotezine göre, ek olarak, klinik araştırmalar kandaki anormal A $\beta$  seviyelerinin, beyin omurilik sıvısı ve beyin dokularının Alzheimer hastalığı ilerlemesi ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir. Alzheimer hastalığında Amiloid  $\beta$ , kanıtlanmış bir spesifik biyobelirteçtir (Cummings, 2004).

Ruiz ve arkadaşlarının 2013 yılında yapmış olduğu bir çalışmada plazma amiloid  $\beta$  seviyeleri Alzheimer hastalığı için potansiyel biyobelirteç olarak araştırılmıştır. Çalışmada 140 bireyden kan örneği alınarak (51 Alzheimer hastası, 53 sağlıklı kontrol birey, 36 hafif kognitif bozukluk yaşayan bireyler ) amiloid  $\beta$  (1-40) ve amiloid  $\beta$  (1-42) değerleri farklı açılardan tespit edilmiş. Plazma örneğini seyrelttikten sonra plazma matrisinden geri kazanılan Amiloid  $\beta$  (1-42) seviyeleri; sağlıklı bireylerde 46,5 pg/ml, hafif kognitif bozukluk yaşayan bireylerde 54 pg/ml ve Alzheimer hastası bireylerde 51,5 pg/ml bulunmuştur. Plazmadaki Amiloid  $\beta$  (1-40) amiloid  $\beta$  (1-40) seviyeleri ise sağlıklı bireylerde 84,5 pg/ml, hafif kognitif bozukluk yaşayan bireylerde 95,5 pg/ml ve Alzheimer hastası bireylerde 95,5 pg/ml olarak bulunmuştur. Yapılan diğer araştırmalarda Alzheimer hastalarında Amiloid  $\beta$  (1-40) / Amiloid  $\beta$  (1-42) oranı serumdan Alzheimer hastalığının biyobelirteçi olarak kabul edilirildiği söylenmiştir(Ruiz vd., 2013; Hampel vd., 2018).

Yapılan literatür araştırmalarında insan serumunda amiloid  $\beta$  proteininin varlığı tespit edilmiştir. Beyin omurilik sıvısında (BOS) amiloid  $\beta$  proteininin ölçümü önemlidir; ancak, BOS toplanması oldukça karmaşık ve pahalıdır. Amiloid  $\beta$  plazma, serum ve diğerleri de dahil olmak üzere diğer fizyolojik sıvılarda tespit edilmesi daha çekici ve pratik olacaktır (Dai vd., 2017). Yapılan araştırmalar ışığında insan idrarında da amiloid  $\beta$  proteininin tayini mümkündür (Takata vd., 2008). Dai ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmayı referans olarak sentetik serum numunelerinde amiloid  $\beta$  tayini yapılmıştır.

Hazırlanan immunoassay prosedülerinin, numuneye uygulanabilirliği, sentetik serum numunelerinde amiloid  $\beta$  proteininin tayininin yapılmasıyla araştırıldı. Bölüm 3.13'de anlatıldığı gibi, sentetik serum numunelerine belirli miktarda amiloid  $\beta$  proteini eklendi ve immunoassay prosedürü kullanılarak her bir örnek için floresans şiddet değerleri okundu. Floresan şiddet değerleri kullanılarak, 4-PL model ile elde edilen kalibrasyon grafiğinde amiloid  $\beta$  deşişimleri belirlendi ve % geri kazanım değerleri hesaplandı. (Çizelge 4.6).

**Çizelge 4.6.** Sentetik serum numunesinde % geri kazanım değerleri.

<b>SA(BSA)-BHHCT-Eu(III)</b>		
<b>Eklene n, pg/mL</b>	<b>Bulunan , pg/mL</b>	<b>% Geri Kazanım</b>
1	1,16 $\pm$ 0,20	116
10	10,35 $\pm$ 1,13	103
100	102,12 $\pm$ 9,50	102
<b>SA(BSA)-SD1-Eu(III)</b>		
1	1,26 $\pm$ 0,13	126
10	9,60 $\pm$ 0,25	96
100	109,1 $\pm$ 10,2	109

Çizelge 4.6. incelendiğinde, sentetik serum numunelerine eklene n amiloid  $\beta$  proteininin geliştirilen immunoassay formatı ile başarılı bir şekilde belirlenebileceği söylenebilir.

## 5. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında, Alzheimer hastalığının tanı ve tedavi sürecinde biyobelirteç olarak kabul edilen Amiloid  $\beta$  ( $A\beta$  (1-42)) proteininin tayini için Zaman Gecikmeli Floroimmunoassay yöntemine dayanan immünoassay formatı geliştirilmiştir. Bu amaçla iki farklı ligant kullanılarak Eu(III) etiketler (SA(BSA)-BHHCT-Eu(III)) ve SA(BSA)-SD1-Eu(III)) hazırlandı. Elde edilen sonuçlar aşağıda kısaca özetlendi:

- İlk olarak, hazırlanan etiketlerin dilüsyon oranı çalışıldı. Elde edilen floresans şiddet değerlerinin dilüsyon oranına karşı grafiğe geçirilmesi ile her iki etiket içinde optimum dilüsyon oranının 1:50 olduğu belirlendi.
- Platelere kaplanacak olan  $A\beta$  (1-42)-Ab1 antikorun miktarı belirlendi. (SA(BSA)-BHHCT-Eu(III)) etiketi için optimum  $A\beta$  (1-42)-Ab1 derişimi 40 ng/mL olarak, SA(BSA)-SD1-Eu(III) etiketi için optimum  $A\beta$  (1-42)-Ab1 derişimi 50 ng/mL olarak seçildi.
- Antijene bağlanacak olan biyotinlenmiş ikincil antikorun miktarı  $A\beta$  (1-42)-Ab1 ile aynı zamanda optimize edildi. BHHCT ligantı için kullanılan B- $A\beta$  (1-42)-Ab2 miktarının optimum derişimi 4 ng/mL olarak, SD1 ligantı için kullanılan B- $A\beta$  (1-42)-Ab2 miktarının optimum derişimi 2 ng/mL olarak belirlendi.
- $A\beta$  (1-42)-Ab1 ile B- $A\beta$  (1-42)-Ab2 aralarındaki etkileşim süresi çalışıldı.  $A\beta$  (1-42)-Ab1 ile  $A\beta$  (1-42)-Ag ve  $A\beta$  (1-42)-Ag ile B- $A\beta$  (1-42)-Ab2 arasında en iyi etkileşimin BHHCT ligantı için 60 dakika olarak belirlendi.
- SD1 ligandı için ise  $A\beta$  (1-42)-Ab1 ile  $A\beta$  (1-42)-Ag etkileşimi 60 dk ve  $A\beta$  (1-42)-Ag ile B- $A\beta$  (1-42)-Ab2 arasındaki etkileşim süresi 40 dk olarak belirlendi.
- Etiketler için  $A\beta$  (1-42) biyomolekülü için doğrusal çalışma aralıkları 0,5-10000 pg/ml ve 0,5-4000 olduğu görüldü.
- Her iki elektrot için “plate to plate” ve “well to well” tekrarlanabilirlik çalışıldı ve sonuçların tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğu görüldü.
- Hazırlanan her iki etiket kullanılarak, sentetik serum örneklerinde amiloid  $\beta$  proteinin tayininin yapılıp yapılamayacağı araştırıldı.
- Sonuç olarak hazırlanan immunoassay prosedürlerinin oldukça hassas bir şekilde amiloid  $\beta$  tayininde kullanılabileceği sonucuna varıldı. Bu çalışmaların ışığında geliştirilen yöntemin sonraki aşamalarında bir tanı kitine dönüştürülebilme potansiyeli olduğu söylenebilir.

- Sonuç olarak tez kapsamında oluşturulan immünoassay prosedürünün amiloid  $\beta$  proteini için geniş çalışma aralığına sahip olduğu bulunmuştur.



## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Alegria-Schaffer, A., Lodge, A. ve Vattem, K. (2009). "Performing and optimizing Western blots with an emphasis on chemiluminescent detection." *Methods Enzymol* 463: 573-599.
- Amit, A. G., Mariuzza, R. A., Phillips, S. E. ve Poljak, R. J. (1986). "Three-dimensional structure of an antigen-antibody complex at 2.8 Å resolution." *Science* 233(4765): 747-753.
- Ankelo, M., Westerlund-Karlsson, A., Ilonen, J., Knip, M., Savola, K., Kankaanpää, P.; Hinkkanen, A. (2003). "Time-resolved fluorometric assay for detection of autoantibodies to glutamic acid decarboxylase (GAD65)." *Clinical Chemistry* 49(6 Pt 1): 908-915.
- Arciniegas, D. (2001). "Principles of Behavioral and Cognitive Neurology, Second Edition." *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* - 13: 421-423.
- Barron, M., Gartlon, J., Dawson, L. A., Atkinson, P. J. ve Pardon, M. C. (2017). "A state of delirium: Deciphering the effect of inflammation on tau pathology in Alzheimer's disease." *Experimental Gerontology* 94: 103-107.
- Bekris, L. M., Yu, C.-E., Bird, T. D. ve Tsuang, D. W. (2010). "Genetics of Alzheimer disease." *Journal of geriatric psychiatry and neurology* 23(4): 213-227.
- Bi, S., Zhou, H. ve Zhang, S. (2009). "Multilayers enzyme-coated carbon nanotubes as biolabel for ultrasensitive chemiluminescence immunoassay of cancer biomarker." *Biosensors Bioelectronics* 24(10): 2961-2966.
- Bittner, T., Zetterberg, H., Teunissen, C. E., Ostlund, R. E., Jr., Militello, M., Andreasson, U.; Blennow, K. (2016). "Technical performance of a novel, fully automated electrochemiluminescence immunoassay for the quantitation of beta-amyloid (1-42) in human cerebrospinal fluid." *Alzheimers Dementia* 12(5): 517-526.
- Brecht, A., Piehler, J., Lang, G. ve Gauglitz, G. (1995). "A direct optical immunosensor for atrazine detection." *Analytica Chimica Acta* 311(3): 289-299.
- Brien, J. T. ve Ballard, C. G. (2001). "Drugs for Alzheimer's disease." *the British Medical Journal* 323(7305): 123.
- Burton, D. R. (1985). "Immunoglobulin G: functional sites." *Molecular Immunology* 22(3): 161-206.
- Byrne, B., Stack, E., Gilmartin, N. ve O'Kennedy, R. (2009). "Antibody-based sensors: principles, problems and potential for detection of pathogens and associated toxins." *Sensors (Basel, Switzerland)* 9(6): 4407-4445.
- Chan, A. C. ve Carter, P. J. (2010). "Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation." *Nature Reviews Immunology* 10(5): 301-316.
- Clark, P. ve McDonald, T. (2013). Chapter 9.10 - Diabetes Mellitus. *The Immunoassay Handbook (Fourth Edition)*. Wild. Oxford, Elsevier: 783-794.
- Cummings, J. L. (2004). "Alzheimer's disease." *the New England Journal Medicine* 351(1): 56-67.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Dai, Y., Molazemhosseini, A. ve Liu, C. C. (2017). "In Vitro Quantified Determination of  $\beta$ -Amyloid 42 Peptides, a Biomarker of Neuro-Degenerative Disorders, in PBS and Human Serum Using a Simple, Cost-Effective Thin Gold Film Biosensor." *Biosensors* 7(3): 29.

Darwish, I. A. (2006). "Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances." *International journal of biomedical science : IJBS* 2(3): 217-235.

Davinelli, S., Intrieri, M., Russo, C., Di Costanzo, A., Zella, D., Bosco, P. ve Scapagnini, G. (2011). "The "Alzheimer's disease signature": potential perspectives for novel biomarkers." *Immunity - Ageing : I & A* 8: 7-7.

De La Escosura-Muniz, A., Plichta, Z., Horak, D. ve Merkoci, A. (2015). "Alzheimer's disease biomarkers detection in human samples by efficient capturing through porous magnetic microspheres and labelling with electrocatalytic gold nanoparticles." *Biosensor Bioelectronics* 67: 162-169.

De Paula, V., Radanovic, M., Diniz, B. ve Forlenza, O. (2012). "Alzheimer's disease." *Sub-cellular biochemistry* 65: 352.

Deng, W., Jin, D., Drozdowicz-Tomsia, K., Yuan, J. ve Goldys, E. M. (2010). "Europium chelate (BHHCT-Eu<sup>3+</sup>) and its metal nanostructure enhanced luminescence applied to bioassays and time-gated bioimaging." *Langmuir* 26(12): 10036-10043.

Diba, F. S., Kim, S. ve Lee, H. J. (2017). "Electrochemical immunoassay for amyloid-beta 1–42 peptide in biological fluids interfacing with a gold nanoparticle modified carbon surface." *Catalysis Today* 295: 41-47.

Dickson E. F. G., P. A., ve Diamandis E.P. (1995a). "Time-resolved detection of lanthanide luminescence ultrasensitive bioanalytical assays." *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 27: 16.

Dickson E. F. G., P. A., ve Diamandis E.P. (1995b). "Ultrasensitive Bioanalytical assays using Time-Resolved Fluorescence Detection." *Pharmacology. Therapeutics.* 66: 28.

Dixit, C. K. ve Twyman, R. M. (2019). Immunoassays | Clinical applications. *Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition)*. Worsfold, Poole, Townshend and Miró. Oxford, Academic Press: 8-14.

Dodeigne, C., Thunus, L. ve Lejeune, R. (2000). "Chemiluminescence as diagnostic tool. A review." *Talanta* 51(3): 415-439.

Doeven, E. H., Zammit, E. M., Barbante, G. J., Hogan, C. F., Barnett, N. W. ve Francis, P. S. (2012). "Selective Excitation of Concomitant Electrochemiluminophores: Tuning Emission Color by Electrode Potential." *Angewandte Chemie International Edition* 51(18): 4354-4357.

Dong, S. ve Chen, X. (2002). "Some new aspects in biosensors." *Reviews in Molecular Biotechnology* 82(4): 303-323.



**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

Du, D., Yan, F., Liu, S. ve Ju, H. (2003). "Immunological assay for carbohydrate antigen 19-9 using an electrochemical immunosensor and antigen immobilization in titania sol-gel matrix." *Journal Immunology Methods* 283(1-2): 67-75.

Esparza, T. J., Zhao, H., Cirrito, J. R., Cairns, N. J., Bateman, R. J., Holtzman, D. M. ve Brody, D. L. (2013). "Amyloid-beta oligomerization in Alzheimer dementia versus high-pathology controls." *Annals of Neurology* 73(1): 104-119.

Fang, S., Zhang, Y., Liu, X., Qiu, J., Liu, Z. ve Kong, F. (2019). "Development of a highly sensitive time-resolved fluoroimmunoassay for the determination of trace salbutamol in environmental samples." *Science of The Total Environment* 679: 359-364.

Findlay, J. W. A. ve Dillard, R. F. (2007). "Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays." *The American Association pharmaceutical journal* 9(2): E260-E267.

Gagni, P., Sola, L., Cretich, M. ve Chiari, M. (2013). "Development of a high-sensitivity immunoassay for amyloid-beta 1-42 using a silicon microarray platform." *Biosensor Bioelectronics* 47: 490-495.

Gan, S. D. ve Patel, K. R. (2013). "Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay." *Journal of Investigate Dermatology* 133(9): e12.

Georganopoulou, D. G., Chang, L., Nam, J. M., Thaxton, C. S., Mufson, E. J., Klein, W. L. ve Mirkin, C. A. (2005). "Nanoparticle-based detection in cerebral spinal fluid of a soluble pathogenic biomarker for Alzheimer's disease." *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 102(7): 2273-2276.

Gerdtsen, A. S., Dexlin-Mellby, L., Delfani, P., Berglund, E., Borrebaeck, C. A. ve Wingren, C. (2016). "Evaluation of Solid Supports for Slide- and Well-Based Recombinant Antibody Microarrays." *Microarrays (Basel)* 5(2).

Goldman, E. R., Anderson, G. P., Tran, P. T., Mattoussi, H., Charles, P. T. ve Mauro, J. M. (2002). "Conjugation of luminescent quantum dots with antibodies using an engineered adaptor protein to provide new reagents for fluoroimmunoassays." *Analytical Chemistry* 74(4): 841-847.

Gong, Y., Chang, L., Viola, K. L., Lacor, P. N., Lambert, M. P., Finch, C. E.; Klein, W. L. (2003). "Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss." *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 100(18): 10417-10422.

Haass, C. ve Selkoe, D. J. (2007). "Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide." *Nature Review Molecular Cell Biology* 8(2): 101-112.

Hagan, A. K. ve Zuchner, T. (2011). "Lanthanide-Based Time-Resolved Luminescence Immunoassays." *Analytical and bioanalytical chemistry* 400: 2847-2864.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Hampel, H., O'bryant, S. E., Molinuevo, J. L., Zetterberg, H., Masters, C. L., Lista, S. ve Blennow, K. (2018). "Blood-based biomarkers for Alzheimer disease: mapping the road to the clinic." *Nature Review Neurology* 14(11): 639-652.

Hardy, J. A. ve Higgins, G. A. (1992). "Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis." *Science* 256(5054): 184-185.

Harma, H., Soukka, T., Lonnberg, S., Paukkunen, J., Tarkkinen, P. ve Lovgren, T. (2000). "Zeptomole detection sensitivity of prostate-specific antigen in a rapid microtitre plate assay using time-resolved fluorescence." *Luminescence* 15(6): 351-355.

Harris, J. R. (2012). "Protein Aggregation and Fibrillogenesis in Cerebral and Systemic Amyloid Disease." *Subcellular Biochemistry* 65(SCBD).

Hemmila, I. (1985). "Fluoroimmunoassays and immunofluorometric assays." *Clinical Chemistry* 31(3): 359-370.

Hemmila, I., Dakubu, S., Mikkala, V. M., Siitari, H. ve Lovgren, T. (1984). "Europium as a label in time-resolved immunofluorometric assays." *Analytical Biochemistry* 137(2): 335-343.

Hicks, J. M. (1984). "Fluorescence immunoassay." *Human Pathology* 15(2): 112-116.

Hou, J.-Y., Liu, T.-C., Lin, G.-F., Li, Z.-X., Zou, L.-P., Li, M. ve 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: 93-98.

[https://www.alz.org/national/documents/brochure\\_basicsofalz\\_low.pdf](https://www.alz.org/national/documents/brochure_basicsofalz_low.pdf)

<https://microbiologyinfo.com/antigen-properties-types-and-determinants-of-antigenicity/>

<http://www.rotalab.com/docs/microplate-systems/microplate-reader/bmg-labtech-fluostar-omega-brochure.pdf>

<https://www.corning.com/catalog/cls/documents/application-notes/CLS-DD-AN-456.pdf>

<https://www.seracare.com/page-not-found/>

Hua, X., Ding, Y., Yang, J., Ma, M., Shi, H. ve Wang, M. (2017). "Direct competitive fluoroimmunoassays for detection of imidaclothiz in environmental and agricultural samples using quantum dots and europium as labels." *Science of Total Environment* 583: 222-227.

Huang, Z., Zhai, X. M., Wang, H., Deng, Q. T., Li, K., Liu, B. S.; Liu, T. C. (2018). "Simultaneous quantitation of carbohydrate antigen 125 and carcinoembryonic antigen in human serum via time-resolved fluoroimmunoassay." *Clinical Chimica Acta* 483: 222-226.

Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N. ve Ihara, Y. (1994). "Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43)." *Neuron* 13(1): 45-53.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Janeway, C. (2001). "Immunobiology" "the immune system in health and disease" 5 th. (5): 1-732.
- Jenkins, S. H. (1992). "Homogeneous enzyme immunoassay." *Journal of Immunological Methods* 150(1): 91-97.
- Jia-Ming, L., Hui, Z. G., Aihong, W., Pingping, L., Huanhuan, X., Li, L. D. ve Liu, Z. B. (2005). "Determination of human IgG by solid substrate room temperature phosphorescence immunoassay based on an antibody labeled with nanoparticles containing Rhodamine 6G luminescent molecules." *Spectrochimica Acta Part A: Mol Biomoleculer Spectroscopy* 61(5): 923-927.
- Jiang, L., Wu, J., Wang, G., Ye, Z., Zhang, W., Jin, D.; Piper, J. (2010). "Development of a visible-light-sensitized europium complex for time-resolved fluorometric application." *Analytic Chemistry* 82(6): 2529-2535.
- Kamidate, T., Maruya, M., Tani, H. ve Ishida, A. (2009). "Application of 4-iodophenol-enhanced luminol chemiluminescence to direct detection of horseradish peroxidase encapsulated in liposomes." *Analytic Science* 25(9): 1163-1166.
- Kantarci, K., Jack, C. R., Jr., Xu, Y. C., Campeau, N. G., O'brien, P. C., Smith, G. E.; Petersen, R. C. (2000). "Regional metabolic patterns in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: A 1H MRS study." *Neurology* 55(2): 210-217.
- Karp, M. T., Suominen, A. I., Hemmila, I. ve Mantsala, P. I. (1983). "Time-resolved europium fluorescence in enzyme activity measurements: a sensitive protease assay." *Journal of Applied Biochemistry* 5(6): 399-403.
- Kawas, C., Gray, S., Brookmeyer, R., Fozard, J. ve Zonderman, A. (2000). "Age-specific incidence rates of Alzheimer's disease: the Baltimore Longitudinal Study of Aging." *Neurology* 54(11): 2072-2077.
- Ke, H., Sha, H., Wang, Y., Guo, W., Zhang, X., Wang, Z. ve Jia, N. (2018). "Electrochemiluminescence resonance energy transfer system between GNRs and Ru(bpy)3(2+): Application in magnetic aptasensor for beta-amyloid." *Biosensors Bioelectronics* 100: 266-273.
- Kim, J. A., Kim, M., Kang, S. M., Lim, K. T., Kim, T. S. ve Kang, J. Y. (2015). "Magnetic bead droplet immunoassay of oligomer amyloid beta for the diagnosis of Alzheimer's disease using micro-pillars to enhance the stability of the oil-water interface." *B Biosensors Bioelectronics* 67: 724-732.
- Kindt, J. (2008). "Kuby Immunology." sixth edition (6): 1-574.
- Kozłowska, D., Foran, P., Macmahon, P., Shelly, M. J., Eustace, S. ve O'kenney, R. (2009). "Molecular and magnetic resonance imaging: The value of immunoliposomes." *Advanced Drug Delivery Reviews* 61(15): 1402-1411.
- Kusnezow, W. ve Hoheisel, J. D. (2003). "Solid supports for microarray immunoassays." *Journal Molecular Recognition* 16(4): 165-176.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Kuznetsov, Shumakovich, G., Koroleva, O. ve Yaropolov, A. I. (2001). "On applicability of laccase as label in the mediated and mediatorless electroimmunoassay: Effect of distance on the direct electron transfer between laccase and electrode." *Biosensors & bioelectronics* 16: 73-84.

Law, B. (1996). "Immunoassay A Practicle Guide." *CRS Pres*: 1-222.

Lim, S. A. ve Ahmed, M. U. (2015). "A carbon nanofiber-based label free immunosensor for high sensitive detection of recombinant bovine somatotropin." *Biosensors and Bioelectronics* 70: 48-53.

Liu, L., He, Q., Zhao, F., Xia, N., Liu, H., Li, S.; Zhang, H. (2014). "Competitive electrochemical immunoassay for detection of  $\beta$ -amyloid (1-42) and total  $\beta$ -amyloid peptides using p-aminophenol redox cycling." *Biosensors and Bioelectronics* 51: 208-212.

Liu, Y. ve Li, Y. (2001). "An antibody-immobilized capillary column as a bioseparator/bioreactor for detection of Escherichia coil O157:H7 with absorbance measurement." *Analytic Chemical* 73(21): 5180-5183.

Liu, Z., Wei, X., Ren, K., Zhu, G., Zhang, Z., Wang, J. ve Du, D. (2016). "Highly efficient detection of paclobutrazol in environmental water and soil samples by time-resolved fluoroimmunoassay." *Science of Total Environment* 569-570: 1629-1634.

Liu, Z., Yan, x., Hua, X. ve Wang, M. (2013). "Time-resolved fluoroimmunoassay for quantitative determination of thiacloprid in agricultural samples." *Analytical Methods* 5.

Lleo, A., Greenberg, S. M. ve Growdon, J. H. (2006). "Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease." *Annual Reviews Medicine* 57: 513-533.

Lott, I. T. ve Head, E. (2005). "Alzheimer disease and Down syndrome: factors in pathogenesis." *Neurobiology of Aging* 26(3): 383-389.

Lovgren, J. ve Blomberg, K. (1994). "Simultaneous measurement of NK cell cytotoxicity against two target cell lines labelled with fluorescent lanthanide chelates." *Journal Immunology Methods* 173(1): 119-125.

Maple, P., Jones, C. ve Andrews, N. (2001). "Time resolved fluorometric immunoassay, using europium labelled antihuman IgG, for the detection of human tetanus antitoxin in serum." *Journal of clinical pathology* 54: 812-815.

Maple, P. A., Gray, J., Breuer, J., Kafatos, G., Parker, S. ve Brown, D. (2006). "Performance of a time-resolved fluorescence immunoassay for measuring varicella-zoster virus immunoglobulin G levels in adults and comparison with commercial enzyme immunoassays and Merck glycoprotein enzyme immunoassay." *Clinical Vaccine Immunology* 13(2): 214-218.

Matsumoto, K., Yuan, J., Wang, G. ve Kimura, H. (1999). "Simultaneous Determination of  $\alpha$ -Fetoprotein and Carcinoembryonic Antigen in Human Serum by Time-Resolved Fluoroimmunoassay." *Analytical Biochemistry* 276(1): 81-87.

Maurer, K., Volk, S. ve Gerbaldo, H. (1997). "Auguste D and Alzheimer's disease." *Lancet* 349(9064): 1546-1549.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mccomb, S., Thiriot, A., Krishnan, L. ve Stark, F. (2013). "Introduction to the immune system." *Methods Molecular Biology* 1061: 1-20.
- Mielke, R. ve Heiss, W. D. (1998). "Positron emission tomography for diagnosis of Alzheimer's disease and vascular dementia." *Journal Neural Transmission Supplementa* 53: 237-250.
- Mirasoli, M., Deo, S. K., Lewis, J. C., Roda, A. ve Daunert, S. (2002). "Bioluminescence Immunoassay for Cortisol Using Recombinant Aequorin as a Label." *Analytical Biochemistry* 306(2): 204-211.
- Murphy, C. ve O'kenedy, R. (2017). *Immunoassays: Developments, Applications and Future Trends*.
- Muselum, M. (2000). "Principles of Behavioral and Cognitive Neurology 2nd Edition." 1-540.
- Naslund, J., Haroutunian, V., Mohs, R., Davis, K. L., Davies, P., Greengard, P. ve Buxbaum, J. D. (2000). "Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline." *Jama* 283(12): 1571-1577.
- Niu, C. G., Liu, J., Qin, P. Z., Zeng, G. M., Ruan, M. ve He, H. (2011). "A novel bifunctional europium chelate applied in quantitative determination of human immunoglobulin G using time-resolved fluoroimmunoassay." *Analytical Biochemistry* 409(2): 244-248.
- Ozansoy, M. ve Başak, A. N. (2007). "Tauopathies: A Distinct Class of Neurodegenerative Disorders." *Turk Journal Neurology* 13(1): 1-29.
- Perl, D. P. (2010). "Neuropathology of Alzheimer's disease." *Mt Sinai J Med* 77(1): 32-42.
- Pi, J., Long, Y., Huang, N., Cheng, Y. ve Zheng, H. (2016). "A sandwich immunoassay for detection of A $\beta$ 1-42 based on quantum dots." *Talanta* 146: 10-15.
- Roda, A., Pasini, P., Mirasoli, M., Michelini, E. ve Guardigli, M. (2004). "Biotechnological applications of bioluminescence and chemiluminescence." *Trends Biotechnology* 22(6): 295-303.
- Rongen, H. A., Hoetelmans, R. M., Bult, A. ve Van Bennekom, W. P. (1994). "Chemiluminescence and immunoassays." *Journal Pharmacology Biomedical Analys* 12(4): 433-462.
- Ruiz, A., Pesini, P., Espinosa, A., Pérez-Grijalba, V., Valero, S., Sotolongo-Grau, O.; Sarasa, M. (2013). "Blood amyloid beta levels in healthy, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease individuals: replication of diastolic blood pressure correlations and analysis of critical covariates." *Public Library of Science* 8(11): e81334-e81334.
- Scalia, G., Halonen, P. E., Condorelli, F., Mattila, M. L. ve Hierholzer, J. C. (1995). "Comparison of monoclonal biotin-avidin enzyme immunoassay and monoclonal time-resolved fluoroimmunoassay in detection of respiratory virus antigens." *Clinical and Diagnostic Virology* 3(4): 351-359.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Schroeder, H. W., Jr. ve Cavacini, L. (2010). "Structure and function of immunoglobulins." *The Journal of allergy and clinical immunology* 125(2 Suppl 2): S41-S52.
- Seveus, L., Väisälä, M., Syrjänen, S., Sandberg, M., Kuusisto, A., Harju, R.; Soini, E. (1992). "Time-resolved fluorescence imaging of europium chelate label in immunohistochemistry and in situ hybridization." *Cytometry* 13(4): 329-338.
- Sheng, E., Shi, H., Zhou, L., Hua, X., Feng, L., Yu, T. ve Wang, M. (2016). "Dual-labeled time-resolved fluoroimmunoassay for simultaneous detection of clothianidin and diniconazole in agricultural samples." *Food Chemical* 192: 525-530.
- Shim, Y.-N. ve Rhee, I.-s. (2003). "Development of Bioluminescence Immunoassay Using Photoprotein, Aequorin and Site-directed Immobilization." *Bulletin of the Korean Chemical Society* 24: 70-74.
- Sliwkowski, M. X. ve Mellman, I. (2013). "Antibody therapeutics in cancer." *Science* 341(6151): 1192-1198.
- Spires-Jones, T. L. ve Hyman, B. T. (2014). "The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease." *Neuron* 82(4): 756-771.
- Sung, D., Shin, D. H. ve Jon, S. (2011). "Toward immunoassay chips: Facile immobilization of antibodies on cyclic olefin copolymer substrates through pre-activated polymer adlayers." *Biosensors Bioelectronics* 26(9): 3967-3972.
- Swerdlow, R. H. (2007). "Pathogenesis of Alzheimer's disease." *Clinical interventions in aging* 2(3): 347-359.
- Takata, M., Nakashima, M., Takehara, T., Baba, H., Machida, K., Akitake, Y.; Takahashi, M. (2008). "Detection of amyloid beta protein in the urine of Alzheimer's disease patients and healthy individuals." *Neuroscience Letters* 435(2): 126-130.
- Tan, M., Wang, G., Ye, Z. ve Yuan, J. (2006). "Synthesis and characterization of titania-based monodisperse fluorescent europium nanoparticles for biolabeling." *Journal of Luminescence* 117: 20-28.
- Tang, M., Pi, J., Long, Y., Huang, N., Cheng, Y. ve Zheng, H. (2018). "Quantum dots-based sandwich immunoassay for sensitive detection of Alzheimer's disease-related A $\beta$ 1-42." *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 201: 82-87.
- Tate, J. ve Ward, G. (2004). "Interferences in immunoassay." *The Clinical biochemistry. Reviews* 25(2): 105-120.
- Teri, L., Hughes, J. P. ve Larson, E. B. (1990). "Cognitive deterioration in Alzheimer's disease: behavioral and health factors." *Journal Gerontology* 45(2): P58-63.
- Tully, E., Hearty, S., Leonard, P. ve O'Kennedy, R. (2006). "The development of rapid fluorescence-based immunoassays, using quantum dot-labelled antibodies for the detection of *Listeria monocytogenes* cell surface proteins." *International Journal Biological Macromolecules* 39(1-3): 127-134.

### KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tyas, S. L. (2001). "Alcohol use and the risk of developing Alzheimer's disease." *Alcohol Research Health* 25(4): 299-306.
- Uraipong, C., Wong, V. ve Lee, N. A. (2013). "A testosterone specific competitive enzyme immunoassay for monitoring water quality." *Bull Environmental Contamination Toxicology* 90(5): 585-590.
- Van Gool, W. A., Walstra, G. J. M., Teunisse, S., Van Der Zant, F. M., Weinstein, H. C. ve Van Royen, E. A. (1995). "Diagnosing Alzheimer's disease in elderly, mildly demented patients: the impact of routine single photon emission computed tomography." *Journal of Neurology* 242(6): 401-405.
- Vermeer, A. W., Bremer, M. G. ve Norde, W. (1998). "Structural changes of IgG induced by heat treatment and by adsorption onto a hydrophobic Teflon surface studied by circular dichroism spectroscopy." *Biochimica Biophysica Acta* 1425(1): 1-12.
- Vermeer, A. W. ve Norde, W. (2000). "The thermal stability of immunoglobulin: unfolding and aggregation of a multi-domain protein." *Biophysical Journal* 78(1): 394-404.
- Vidarsson, G., Dekkers, G. ve Rispen, T. (2014). "IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions." *Frontiers in Immunology* 5: 520-520.
- Vogt, R. F., Jr., Phillips, D. L., Henderson, L. O., Whitfield, W. ve Spierto, F. W. (1987). "Quantitative differences among various proteins as blocking agents for ELISA microtiter plates." *Journal Immunology Methods* 101(1): 43-50.
- Voller, A., Bartlett, A. ve Bidwell, D. E. (1978). "Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques." *Journal of Clinical Pathology* 31(6): 507.
- Wang, H., Peng, L., Chai, Y. ve Yuan, R. (2017). "High-Sensitive Electrochemiluminescence C-Peptide Biosensor via the Double Quenching of Dopamine to the Novel Ru(II)-Organic Complex with Dual Intramolecular Self-Catalysis." *Analytical Chemistry* 89(20): 11076-11082.
- Wild, D. ve Kusnezow, W. (2013). Chapter 3.3 - Separation Systems. *The Immunoassay Handbook (Fourth Edition)*. Wild. Oxford, Elsevier: 287-299.
- Wu, F.-B. ve Zhang, C. (2002). "A new europium beta-diketone chelate for ultrasensitive time-resolved fluorescence immunoassays." *Analytical Biochemistry* 311(1): 57-67.
- Xing, Y., Chaudry, Q., Shen, C., Kong, K. Y., Zhau, H. E., Chung, L. W.; Nie, S. (2007). "Bioconjugated quantum dots for multiplexed and quantitative immunohistochemistry." *Nature Protocols* 2(5): 1152-1165.
- Xing, Y. ve Xia, N. (2015). "Biosensors for the Determination of Amyloid-Beta Peptides and their Aggregates with Application to Alzheimer's Disease." *Analytical Letters* 48(6): 879-893.
- Yalow, R. S. ve Berson, S. A. (1959). "Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods." *Nature* 184 (Suppl 21): 1648-1649.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

Yalow, R. S. ve Berson, S. A. (1960). "Immunoassay of endogenous plasma insulin in man." *The Journal of clinical investigation* 39(7): 1157-1175.

Yan, F., Zhou, J., Lin, J., Ju, H. ve Hu, X. (2005). "Flow injection immunoassay for carcinoembryonic antigen combined with time-resolved fluorometric detection." *Journal of Immunological Methods* 305(2): 120-127.

Yiannopoulou, K. G. ve Papageorgiou, S. G. (2013). "Current and future treatments for Alzheimer's disease." *Therapeutic advances in neurological disorders* 6(1): 19-33.

Yuan, J., Matsumoto, K. ve Kimura, H. (1998). "A New Tetradentate  $\beta$ -Diketonate–Europium Chelate That Can Be Covalently Bound to Proteins for Time-Resolved Fluoroimmunoassay." *Analytical Chemistry* 70(3): 596-601.

Zhang, Y., Wang, M., Wang, Y., Feng, J., Zhang, Y., Sun, X.; Wei, Q. (2019). "Label-free photoelectrochemical immunosensor for amyloid  $\beta$ -protein detection based on SnO<sub>2</sub>/CdCO<sub>3</sub>/CdS synthesized by one-pot method." *Biosensors and Bioelectronics* 126: 23-29.

Zhang, Y., Yang, X., Qian, J., Gu, X., Zhang, J., Liu, J. ve Hu, Z. (2018). "Simultaneous detection of Mycoplasma pneumoniae IgG and IgM using dual-label time resolved fluoroimmunoassay." *Analytical Chemistry* 548: 1-6.

Zhang, Z., Liu, X., Li, Y., Huang, R., Wang, L., Li, L.; Chen, M. (2017). "A dual-label time-resolved fluorescence immunoassay (TRFIA) for screening of Coronary atherosclerosis based on simultaneous detection of Lp-PLA<sub>2</sub> and HsCRP." *Immunology Letters* 182: 12-17.

Zhu, F., Zhang, H., Qiu, M., Wu, N., Zeng, K. ve Du, D. (2019). "Dual-label time-resolved fluoroimmunoassay as an advantageous approach for investigation of diethyl phthalate & dibutyl phthalate in surface water." *Science Total of Environment* 695: 133793.



## ÖZGEÇMİŞ

**1. Adı Soyadı** Büşra YILMAZ  
e-mail: busrayilmaz0012@gmail.com

**2. Doğum Tarihi** 30.01.1995

**3. Unvanı** Biyokimyager

### 4. Öğrenim Durumu

Derece	Eğitim Birimi	Yıl
Lisans	Kütahya Dumlupınar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyokimya Bölümü	2013-2017
Yüksek Lisans	Kütahya Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya ABD	2018-Halen

### 5. Proje

D. Koyuncu Zeybek, **B. Yılmaz**. "Bazı Sentetik Renklendiricilerin Tayini için Polimer ve/veya Nanopartikül Temelli Elektrokimyasal Sensör Hazırlanması (Proje No: 2019-16). Kütahya Dumlupınar Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projesi Fonu. 2019-halen.

### 6. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan bildiri kitabında basılan bildiriler

**B. Yılmaz**, D. Koyuncu Zeybek." Amiloid beta proteininin tayini için Eu(III) etiketin kullanıldığı zaman gecikmeli florooimmünoassay yönteminin geliştirilmesi ".31. Ulusal Kimya Kongresi. 10-13 Eylül 2019. İstanbul.(SÖZLÜ)

### 7. Burs

2018/ 2 dönemi 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Bursu