

168445

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DIYAGNOSTİK AMAÇLI
ESTRADIOL- “Horseradish” PEROKSİDAZ
KONJUGATI HAZIRLANMASI VE KAREKTERİZASYONU

Biyoloji Öğretmeni F.Tuvana EKTİRİCİ

FBE Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Pro gramında
Hazırlanan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Huriye KUZU (YTÜ)

İSTANBUL, 2005

Prof. Dr. Ayşe Özer

[Signature]

Doç. Dr. İnci Arısan

[Signature]

[Signature]
Prof. Dr. Huriye Kuzu

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ	i
KISALTMA LİSTESİ	ii
ŞEKİL LİSTESİ	iii
ÇİZELGE LİSTESİ	iv
ÖNSÖZ	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
1. GİRİŞ	1
2. Estrojenlerin kliniksel önemi	2
2.1 Klinikte estrojen tayininde kullanılan immünolojik yöntemler	3
2.2 Klinikte estrojen tayininde steroid-protein konjugatlarının kullanımı	4
3. "Horseradish" peroksidaz enzimi	5
4. Steroid hormonları	7
4.1 Steroid hormonlarının genel özellikleri	7
4.2 Steroid hormonlarının etki mekanizması	8
4.3 Steroid hormonlarının yapısı	10
4.4 Steroid hormonlarının sentezi	11
4.5 Testesteron ve estrojen biosentezi	13
5.1 Kullanılan cihaz ve malzemeler	17
5.2 Kullanılan HPLC Sisteminin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri	18
5.3 Kullanılan Viskotek Sisteminin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri	18
5.4 Kullanılan u.v. Spektrofotometresinin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri	18
5.5 Kullanılan Kimyasallar	19
6 DENEYSEL ÇALIŞMA(şematik gösterimi)	20
6.1 E ₂ -6CMO-HRP konjugatının sentezi	22
6.1.1. E ₂ -6CMO-HRP konjugatının santrifüj işlemi	24
6.1.2 E ₂ -6CMO-HRP konjugatının diyaliz işlemi	24
6.1.3 Diyaliz sonrası E ₂ -6CMO-HRP örneğinde protein miktarının Lowry yöntemi ile tayini	25
6.2. E ₂ -6CMO- BSA konjugatının sentezi	27
6.2.1 E ₂ -6CMO- BSA konjugatına fluoresans madde bağlanması	28
6.3 HPLC cihazında uygulama	30
6.4 E ₂ -6CMO-HRP ve E ₂ -6CMO- BSA konjugatının FTIR cihazına	30
6.5 Spesifik antikor bağlı kuyucuklar bulunduran ticari kite, sentezlenen E ₂ -HRP konjugatının bağlanması ve ELISA okuyucusu ile gözlenmesi	31
7 SONUÇLAR	34
7.1 UV-vis. Spektrofotometre ile okunan absorbands değerleri	34
7.2 Deneysel çalışmada enzim aktivitesi tayinine bağlı absorbands değerleri	37

7.3	E2-BSA-RITC örneğinin spektrofloreometrede incelenmesi	38
7.4	HPLC cihazı ile alınan sonuçlar	40
7.5	Deneysel çalışma sırasında Viscotek cihazında alınan sonuçlar	44
7.6	FTIR cihazı ile alınan sonuçlar.....	47
7.7	ELISA okuyucusu ile elde edilen sonuçlar.....	51
8	TARTIŞMA VE DEĞERLENDİRME	54
KAYNAKLAR.....		56
ÖZGEÇMİŞ.....		57



SİMGE LİSTESİ

°C	Santigrat derece
g	gram
L	litre
ml	mililitre
μ	mikro
μl	mikrolitre
M	Molar
nm	nanometre
NaCl	Sodyum klorür
NaH ₂ PO ₄	sodyum dihidrojen fosfat
Na ₂ HPO ₄	Disodyum hidrojen fosfat
NaHCO ₃	Sodyum hidrojen karbonat
Na ₂ HCO ₃	Disodyum hidrojen karbonat



KISALTMA LİSTESİ

E ₂	Estradiol
HRP	Horseradish peroksidaz
BSA	Bovine serum albumin
RITC	Rodamin B isotiosiyanat-selit
6CMO	6-(o-karboksimetil)-oksim
CMC	N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodimid hidroklorid
E ₂ -6CMO-HRP	estradiol 6-(o-karboksimetil)-oksim-horseradish peroksidaz konjugatı
E ₂ -6CMO-BSA	estradiol 6-(o-karboksimetil)-oksim- bovine serum albumin konjugatı
E ₂ -6CMO-BSA-RITC	estradiol 6-(o-karboksimetil)-oksim- bovine serum albumin-rodamin

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 3.1	Armoracia Rusticana(“horseradish” bitkisi)	5
Şekil 3.2	Elektron döner AH varlığında gerçekleşen HRP reaksiyon döngüsü	6
Şekil 3.3	AH* serbest radikallerinin organik substratlardan derivatlanması	6
Şekil 4.1.1	Steroid hormonları (estradiol , progesteron , testesteron) ve ana metabolitleri.	8
Şekil 4.3.1	Estradiol, testesteron, progesteron açık formülleri.....	10
Şekil 4.4.1a	Adrenal steroid hormonlarının kolesterolden başlayarak sentezi.....	11
Şekil 4.4.1b	Adrenal steroid hormonlarının kolesterolden başlayarak sentezi	12
Şekil 4.5.1	Testisin Leydig hücrelerinde gerçekleşen erkek steroid hormonlarının sentezi....	13
Şekil 4.5.2	Kolesterolde meydana gelen testesteron ve androstenedionun, kadın gonadlarında major steroid hormonlarının sentezinde kullanılması	14
Şekil 4.5.3	Normal periferik dokularda ve/ veya meme kansinomasında östrojenlerin üretilmesi	16
Şekil 6.1a	Estradiolün karbon-6'dan proteine bağlanması için gerçekleştirilen reaksiyon...	21
Şekil 6.1.b	17β-estradiolün B halkası ile bovine serum albumine(BSA) bağlanması.	21
Şekil 6.5.1	ELISA okuyucusuna uygulamada mikropate içeriği	31
Şekil 6.5.2	Şema olarak ELISA cihazında uygulanan işlem	
Şekil 7.1.1	Santrifüj uygulamasından sonra “E ₂ -6CMO-HRP” nın absorpsiyon spektrumu	33
Şekil 7.1.2	Santrifüj uygulamasından sonra E ₂ -6CMO-BSA” nın absorpsiyon spektrumu .	34
Şekil 7.3.1	E2-BSA-RITC konjugatı için alınan floresans spektrumları.....	37
Şekil 7.3.2	Rodamin izotiyosiyanatın (RITC) eksitasyon ve emisyon spektrumları.....	38
Şekil 7.4	HPLC cihazı ile alınan sonuçlara bağlı absorpsiyon şekilleri.....	39
Şekil 7.5	Deneysel çalışma sırasında Viscotek cihazında alınan sonuçlara bağlı şekiller..	43

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 7.1.1 Santrifüj kullanılarak filtrasyondan sonra E ₂ -6CMO–HRP konjugatının absorbens ölçümü.....	33
çizelge 7.1.2 Santrifüj kullanılarak filtrasyondan sonra E ₂ -6CMO–BSA konjugatının absorbens ölçümü.....	34
çizelge 7.1.3 Diyaliz işlemi sonrası E ₂ -6CMO–HRP konjugatının absorbens ölçümü.....	35
çizelge 7.1.4 Diyaliz sonrası E ₂ -6CMO–HRP konjugatının Lowry yöntemi ile protein miktar tayini.....	35
çizelge 7.2.1 Santrifüj kullanılarak filtrasyondan sonra E ₂ -6CMO–HRP konjugatının aktivite tayini absorbens değerleri.....	36
Çizelge 7.2.2 Diyaliz işleminden sonra E ₂ -6CMO–HRP konjugatının aktivite tayinde okunan A ₄₀₀ değerleri.....	36
Çizelge 7.2.32. defa yapılan sentezden sonra elde edilen E ₂ -6CMO–HRP konjugatının aktivite tayin değerleri.....	36
çizelge 7.7.1 ELISA okuyucusu ile 450 nm’de okunan absorbens değerleri.....	50

ÖNSÖZ

Yüksek lisans dönemim ve çalışmalarım süresince bana bilgi ve tecrübelerinden yararlanma imkanı sunan, ilgisini, özverisini ve yardımlarını benden eksik etmeyen sevgili ve sayın hocam Prof. Dr. Huriye Kuzu' ya; yüksek lisans dönemimin ilk gününden son gününe kadar manevi desteğini ve ilgisini eksik etmeyen sayın hocam Prof.Dr. Hüseyin Afşar' a; Biyomühendislik Anabilim Dalını ve Laboratuvarlarını kuran, bu laboratuvarlarda tez çalışmamın yapılmasına imkan sağlayan, dersleriyle engin bilgisinden yararlanma imkanı sunan sayın hocam Prof. Dr. Mustafa Akdeste'ye, Biyomühendislik Laboratuvarlarındaki çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarında yardımcı ve destek olan sevgili arkadaşım Araş. Gör. Melda Altıkatoğlu' na içtenliği, doğruluğu ve yardımları için teşekkür ederim

Yaşamıma dahil oldukları günden bugüne her daim yanımda yer alan sevgili dostlarım Selenge Tarı, Tuğba Tavalı ve kardeşim Ceyda Karçal' a çalışmam sırasında gösterdikleri manevi destekten dolayı sonsuz teşekkür ederim.

Yaşamımın vazgeçilmez yapıtaşları olan biricik aileme yüksek lisans dönemim süresince gösterdikleri maddi ve manevi destekten dolayı sonsuz teşekkür ederim.



ÖZET

Kadın üreme steroid hormonu 17β -estradiol, esas olarak yumurtalıklarda ve daha az miktarda adrenal korteks, testisler ve periferik dokularda üretilmektedir. Bu hormon reproduksiyon (üreme) ve sekonder seks karakterlerinin anatomik ve fizyolojik gelişimine katkıda bulunmak tadır. Ayrıca kemik gelişimi , intraselüler kalsiyum konsantrasyonu ve ikinci mesaj molekülle rinin aktivitesini de etkilemektedir.

Biyolojik örneklerde estradiol tayini immünolojik yöntemler ile yapılmaktadır. 17β Estradiol tayininde genellikle kullanılan, bağlı spesifik antikorlar bulunduran ve radyoaktif izotoplar, farklı türde enzimler veya lüminesans maddeler ile işaretli estradiol içeren kitler ticari olarak temin edilebilmektedir.

Bu çalışma klinik laboratuvarlarında yer alan bir enzimatik kitin geliştirilmesinde kullanmak üzere, enzim ile işaretlenmiş 17β -estradiol hazırlanmasına odaklanmıştır. Bu maksatla hormon, hem grubu bulunduran bir protein olan ve molekül tartısı 40.000 dalton dolayında bulunan “horseradish” peroksidaz enzimi ile işaretlendi. “Horseradish” peroksidaz 17β -estradiol-6-(O-karboksimetil)-oksim türevine kovalent olarak bağlandı. Estradiol-HRP kovalent bağlanması FTIR ve HPLC teknikleri ile incelendi. Ticari enzimatik estradiol kitinin spesifik antikorlar bulunduran kuyucuklarına, elde edilen estradiol-HRP konjugatının bağlanması Elisa Okuyucusu vasıtasıyla gözlemlendi. Ek olarak, elde edilen Estradiol-BSA konjugatına Rodamin izotiyosiyanat kovalent olarak bağlandı. Estradiol-BSA-RITC konjugatının floresans karakteristikleri tayin edildi.

Anahtar kelimeler: 17β -estradiol-6-(O-karboksimetil)-oksim, Estradiol-HRP konjugatı, “horseradish” peroksidaz, FTIR, HPLC, Elisa

ABSTRACT

17 β -estradiol is a female sex steroid hormone produced mainly in the ovaries and to a lesser extent in the adrenal cortical, testes and peripheral tissues. This hormone helps to anatomic and physiological regulation of reproduction and secondary sex characteristics and also influences the activities of bone growth, intracellular concentration of calcium and certain second messenger molecules.

Estradiol in biologic samples(tissue culture media, human saliva,urine) have been measured by immunoassay methods. 17 β -estradiol kits used in general, for the determination of estradiol which includes bonded specific antibodies and labelled hormone with radioactive isotopes, different types of enzymes, or luminescent substances were commercially available.

This study is focused on the preparation of enzyme labeled 17 β -estradiol for the development of an enzymatic kit used in clinical laboratories. For this aim, hormone linked to "horseradish" peroxidase(HRP); which is a heme protein and has a molecular weight of about 40.000 daltons. Horseradish peroxidase covalently bonded to 17 β -estradiol, using Estradiol 17 β -6-(O-carboxymethyl)-oxime. The occurrence of estradiol- HRP covalent bond was confirmed by FTIR and HPLC techniques. The binding of estradiol-HRP conjugate to the wells of commercial enzymatic estradiol kit including specific antibody was observed by ELISA reader. In addition, Rhodamine isothiocyanate covalently bonded to obtained Estradiol-BSA conjugates. The fluorescence characteristics of the Estradiol-BSA-RITC conjugate were determined.

Key words:17 β -estradiol-6-(O-carboxymethyl)-oxime, Estradiol-HRP conjugate , horseradish peroxidase, FTIR, HPLC, ELISA

1. GİRİŞ

Serum estradiol seviyelerinin kliniksel ölçümü ovulasyon, optimum hamile kalma zamanı ve dişi seksüel maturasyonunun saptanmasında kullanılmaktadır. (Dora vd., 1979) Bu ölçüm meme, yumurtalık ve muhtemelen prostat kanserindeki rolü açısından önemlidir. Yumurtalık kanseri ile ilgili epidemiyolojik çalışmalar, bu hastalığın postmenapozal dönemde ostrojen kullanılması ile ilgili olarak ilgi görmektedir. (Roger, 2003)

Serum estradiol determinasyonu için tanımlanan metotlardan en sık kullanılanı radyoimmünolojik yöntemdir. (Sadeh vd.,1979) Bu yöntemin tanımlanmasından itibaren, steroidin enzim, kemilüminesant bileşik ya da lantanit ile işaretlenmesini temel alan birçok immünolojik yöntem geliştirilmiştir. (Mares vd.,1995) Birçok yayında bu yöntem alternatif olarak enzim immünolojik yöntemler gösterilmektedir.

Enzim immünolojik yöntemler, radyoimmünolojik yöntemle benzer teknikleri temel almaktadırlar(Sadeh vd., 1979) ve radyoizotop, fuloresan madde veya enzim işaretleyicileri içermektedirler(Mitsuteru vd., 1977; Dora vd.; 1979). Kompetitif reaksiyonlarda enzim işaretli estrojenleri kullanan(Sadeh vd.,1979) enzim immünolojik yöntemlerde maksimum duyarlılık 1:1 enzim/steroid oranı olarak belirtilmektedir. Estradiolün enzim immünolojik yönteminde yüksek spesifik aktivite ve duyarlılık gösteren “horseradish” peroksidaz (HRP) enzimi kullanılmaktadır(Mitsuteru vd., 1977).

Bu çalışma kliniksel alanda plazma estradiol seviyelerinin ölçümünde yer alan immün kitlerin geliştirilmesinde kullanılmak üzere enzim konjugatlarının hazırlanmasını içermektedir.

2. ESTROJENLERİN KLİNİKSEL ÖNEMİ :

Estrojenler, meme gelişimi, menstural siklus gibi dişi seks karakteristiklerinin gelişiminde görevlidir. Kan örneklerinde estrojen testinde, estrojenlerin en önemlileri olan estradiol, estron ve estriol seviyeleri ölçülmektedir. Hamile olmayan kadınlarda ölçülen en sık estrojen tipi estradioldür. Kanda estradiol miktarı menstural siklus süresince değişmektedir. Menapoz sonrasında miktarı oldukça düşer ancak dengeli bir seviyededir. Birey örneklerinde 17β -estradiol konsantrasyonunun genel analitiksel doğruluğu (kesinlik): erkeklerde $>147\text{pmol/l}$ ($\leq 40\text{pg/ml}$), ergenlik öncesi çocuklarda $\leq 60\text{pg / ml}$, kadınlarda foliküler fazda $30\text{-}120\text{ pg/ml}$, lütein fazda $70\text{-}200\text{ pg/ml}$, menapozda $\leq 60\text{pg / ml}$ ve post menopozal kadınlarda $\leq 20\text{ pg/ml}$ ($\leq 73\text{pmol/l}$) dir. (Barry vd., 2002)

Estriol, hamilelik sırasında plasenta tarafından üretilmektedir. Hamile kadınlarda estriol seviyelerinin ölçümü doğum anomalilerinin ya da fetusta down sendromunun belirlenmesi için kullanılmaktadır.

Estron, menapoz giren kadınlarda estrojen seviyelerinin belirlenmesi için ölçülmektedir. Kadın ya da erkek ürin örneklerinde adrenal bez, testis ve yumurtalık kanserinin belirlenmesinde total estrojen değerinin bir kısmı olarak ölçülmektedir.

Estrojenler karmaşık fizyolojiye sahip olduklarından bioaktiviteleri yararlı(estradiol kadın seks organlarının gelişiminde bir tür hormon olarak görev almaktadır.), zararlı(karsinojenler olarak adlandırılan estrojen, kinon metabolitleri ve DNA yapılarını şekillendirir.)ya da ekskrasyon ara yolunda yer alan inaktif estrojen metabolitleri olarak adlandırılmaktadır(Roger, 2003).

Serum estradiol seviyeleri kliniksel ölçümünün, ovulasyon, optimum hamile kalma zamanı ve dişi seksüel maturasyonunun saptanmasında, terapi sırasında hormon seviyelerindeki değişimin belirlenmesinde kullanılmaktadır(Dora vd.,1979). Serum estradiol seviyelerinin ölçümü meme, yumurtalık ve muhtemelen prostat kanserindeki rolü açısından önemlidir. Yumurtalık kanseri ile ilgili epidemiyolojik çalışmalar, bu hastalığın postmenapozal dönem de estrojen kullanılması ile ilgili olarak ilgi görmektedir. 17β -estradiol ve karsinojen benzo[a] piren, insan meme epitelyal hücrelerinde az miktarda fenotiplere neden olmaktadır. Estrojenlerin meme kanserine katkıda bulunma mekanizması genellikle 2 şekilde açıklanmaktadır. Birincisi, bu maddelerin artan konsantrasyonların hücre proliferasyonunu arttırdığı tarzındadır. İkincisi ise, estrojenin özellikle kinon metabolitlerinin direkt genotoksik(DNA ya direkt hasar veren

maddeler) ya da dolaylı genotoksik(hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türlerinin arttırılması yolu ile maddelerin stimule edilerek DNA hasarı sağlayan maddeler) olduğu şeklindedir. DNA hasarı ile ilgili estrogen metabolitleri kullanılarak yapılan deneysel çalışmalar, en fazla toksik etkinin 4-hidroksi metabolitlerinden(semikinon yada kinon metabolitleri) ileri geldiğini göstermiştir(Roger, 2003). 17 β -estradiol özellikle tümör başlatıcı ve ilerletici etkileri güçlendiğinden dolayı tümüyle bir karsinojen olarak kabul edilmektedir.(Maciej vd.,1998; Draisci vd., 2000; Smith vd., 1983) Estradiol biosentezindeki anahtar rolü nedeni ile aromataz enzim inhibasyonu meme kanserinin tedavisi ve önlenmesi için çok daha etkili stratejilerin geliştirilmesi için yapılan araştırma çalışmalarında temel alınmaktadır(Richard vd., 2000).

2.1 Klinikte Estrogen Tayininde Kullanılan İmmunolojik Yöntemler:

İnsan serumunda estradiol tayininde spektrofotometri, fulorometri, gaz kromatografisi, immünolojik yöntemler, HPLC, GC-MS v.b. kullanılmaktadır.(Anneke vd., 1978) Bu belirtilen yöntemlerden en yaygın olarak kullanılan radyoizotop, floresan madde veya enzim işaretleyicilerin yer aldığı immünolojik yöntemlerdir.(Mitsuteru vd., 1977; Dora vd.,1979)

İmmünolojik yöntemlerde kullanılan antikorların niteliği bunların standart antijene karşı spesifikliği ve duyarlılığı ile belirlenmektedir(Milan vd., 1983). 17 β -estradiol , estriol ve progesteron steroid molekülünün B yada C halkasında bovine serum albumine kovalent bağlanarak antijenite göstermektedir(Lindner vd., 1972). Estron ve17 β -estradiol'un immünolojik yöntemlerinde kullanılan antisera immünojenlerden meydana gelmektedir. Bu immünojenler estrogenlerin C6 pozisyonunda karboksimetiloksim köprüsü (CMO) ile protein taşıyıcılarına bağlanmasını sağlamaktadır(Pemmaraju vd., 1998).Biolojik sıvılarda yer alan estradiol için herhangi bir kromatografik seperasyon basamağı içermeyen radyoimmünolojik yöntemde, antikorların steroide karşı yüksek spesifiklik göstermesi gerekmektedir. Bu sebeple kullanılan antiseralar estrogenin A, B yada C halkasında C-3 ,C-6 ,C-7 ve C11'de estradiolün bovine serum albumin (BSA) konjugasyonu ile yükseltilmektedir(Latif ve Mandal, 1987).

Enzim immünolojik yöntemler çok sayıda avantajından dolayı bu yönetime alternatif olarak geliştirilmiştir. Enzim immünolojik yöntem estrogenler gibi hormonların pikomol seviyelerde ölçümü için geliştirilen yüksek duyarlılığa sahip bir yöntemdir. Kullanılan enzimin kimyasal modifikasyonda stabil kalabilecek şekilde yüksek spesifik aktiviteye sahip olması gerekmektedir(Exley ve Abuknesha, 1978) ve bu maksimum spesifiklik antiserumunda kullanılan

haptenin enzime konjuge edilmesi ile sağlanmaktadır. Enzim immünolojik yöntemde maksimum duyarlılık 1:1 enzim/ steroid oranı olarak belirtilmektedir. Estradiolün enzim immünolojik yönteminde kullanılan horseradish peroksidaz (HRP) enzimi tüm bu özellikleri taşımaktadır(Mitsuteru vd., 1977).

2.2 Klinikte Estrojen Tayininde Steroid-Protein Konjugatlarının Kullanımı :

Steroid-protein konjugatları steroid hormon aktivitesine dayalı çalışmalarda ve steroid bağlı konjugatların purifikasyonunda kullanılmaktadır. Birçok çalışma hedef dokularda steroid reseptörlerinin histokimyasal “detection”ı için fulorokromlar yada peroksidaz ile işaretlenen estrojen, androjen yada progesteron-BSA konjugatlarının katılımını tanımlamaktadır(Goeij vd., 1986). 17 β -estradiol, estriol ve progesteron steroid molekülünün B yada C halkasında bovine serum albumine kovalent bağlanarak antijenite göstermektedir.(Lindner vd., 1972) Enzim immünolojik yönteminde enzim işaretli hapten yada enzim işaretli antikor kullanılarak haptenler determine edilebilir. Enzim konjugatı üretiminde estrojen türevlerinin kullanılması ve immünojenin az miktarda farklılaşması sırasında yöntem duyarlılığı artmaktadır. Haptene ile immünojende yer alan taşıyıcı arasında oluşan bağ, kullanılan antikorların spesifikliğine katkı da bulunmaktadır(Bauke vd., 1975). Estrojen bağlı proteinlerin (estrojen reseptörleri yada antikorları) çalışılmasında ve serum yada diğer hayvan vücut sıvılarında estradiol yöntemi için çeşitli estradiol türevleri prob olarak hazırlanmaktadır. C6, C7 ve C17 pozisyonunda estradiol problemlerinin hazırlanması için fuloroskein ve biotin seçilmektedir(Maciej vd., 1998).

3. “HORSERADİSH-bayır turpu” PEROKSİDAZ (HRP) :

Armoracia Rusticana(bayır turpu; “horseradish” bitkisi)’nın antibiyotik özellik gösteren kökü kalsiyum, magnezyum, sodyum ve vitamin C içermektedir.(şekil3.1) Peroksidaz enzimi bu kökten elde edilmektedir. ELISA, immünoboyama(immunoblotting) gibi tekniklerde enzimatik işaretleyici olarak kullanılan bu enzim genellikle antikorlara, lektinlere ya da haptenlere bağlanmaktadır.



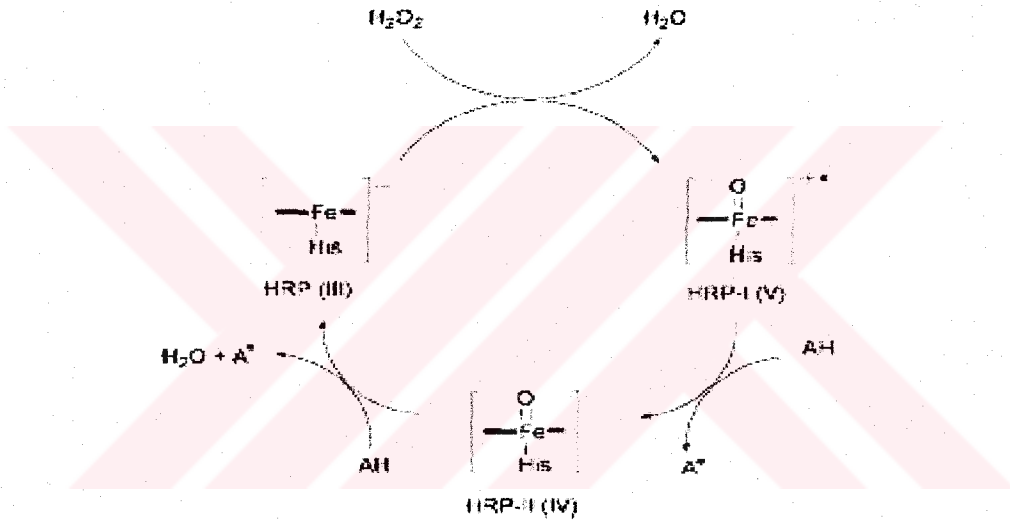
Şekil 3.1 *Armoracia Rusticana*(“horseradish” bitkisi)(www.thais.it/.../schedeit/sc_0028a.htm)

Peroksidazlar demir(III) porfirinler sınıfında yer almaktadır. İçerdikleri proteinler hidrojen peroksit ile gerçekleşen substratların oksidasyonunu katalizlemektedir(Mitsuteru vd., 1977).

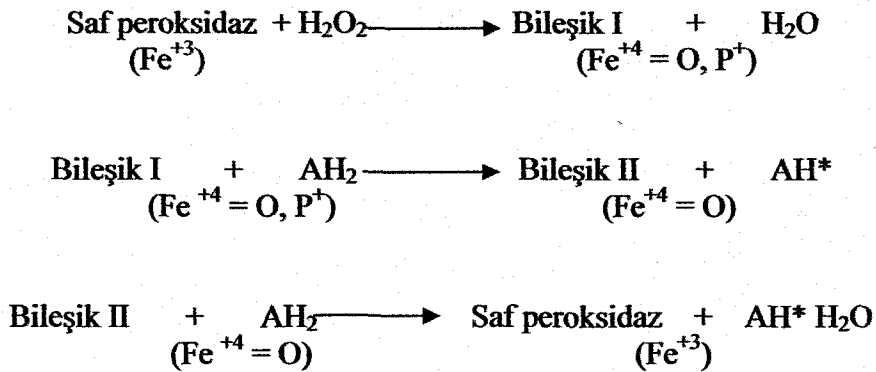
H_2O_2 ’ye karşı en duyarlı metodlar; florometrik ve elektrokimyasal metodlardır. H_2O_2 ve yön temde kullanılan substrat arasındaki reaksiyonu floroscance şiddeti yada elektron transfer derecesinin hızlandırılmasındaki subsequent değişim ile enzimatik olarak katalizlemektedir(Razo la vd., 2000). Okside ürünlerin spektrofotometrik ölçümünü içeren kimyasal metodlar peroksit aktivitesi çerçevesinde gerçekleşmektedir(Moody vd., 2001). Enzim immunolojik yöntemlerde H_2O_2 varlığında HRP işaretlenmesinin indirekt determinasyonunda aromatik aminler ve

fenolik bileşikler gibi kromojenik AH elektron donörleri sıklıkla kullanılmaktadır. (Degrand vd., 2001)

Peroksidaz reaksiyon döngüsünün birinci basamağını saf peroksidazın (HRP) ferihem protatik grubunun H_2O_2 ile gerçekleşen 2 elektron oksidasyonu oluşturmaktadır. Bu basamak oksiferil demir ($Fe^{+4}=O$) ve bir porfirin katyon radikali içeren intermediate HRP-I bileşiği (demirin formal oksidasyon bölgesi:V) formasyonu ile sonuçlanmaktadır. Reaksiyonun ikinci basamağın da HRP-II bileşiğinin şekillenmesi gerçekleşmektedir. Bu olay HRP-I bileşiğinin elektron do nörü AH ile bir elektron redüksiyonu sonucunda oluşmaktadır. (Oksidasyon bölgesi IV). Reaksiyonun son basamağında bir önceki basamakta eklenen elektron AH'den ayrılır ve enzim tekrardan reaksiyonun başlangıç bölgesine döner.(şekil 7) (Degrand vd., 2001)



Şekil 3.2 Elektron donör AH varlığında gerçekleşen HRP reaksiyon döngüsü.
(HEM'in proksimal bölgesinde koordine edilen histidin aminoasidini belirtmektedir.)
(His:Histidin aminoasidi)



Şekil 3.3 AH^* serbest radikalleri dismutant ya da dimerize organik substratlarından (AH_2) derivatlanmaktadır.

4. STERÖİD HORMONLARI

4.1 Steroid Hormonlarının Genel Özellikleri:

Çok hücreli organizmalarda devamlı değişen dış ve iç çevreye uyumda, lüzumlu yanıtların düzenlenmesini sağlamak için intrasellüler haberleşmeyi gerçekleştiren mekanizmalara gereksinim vardır. Bu işlevleri yerine getiren iki sistem gelişmiştir. Bunlar, sinyalleri yapısal bir sistem aracılığı ile ileten sinir sistemi ve spesifik bezler tarafından salgılanan hormonların komşu ve uzak dokular üzerinde etkili olduğu endokrin sistemdir (Noyan, 1996; Robert vd., 2003).

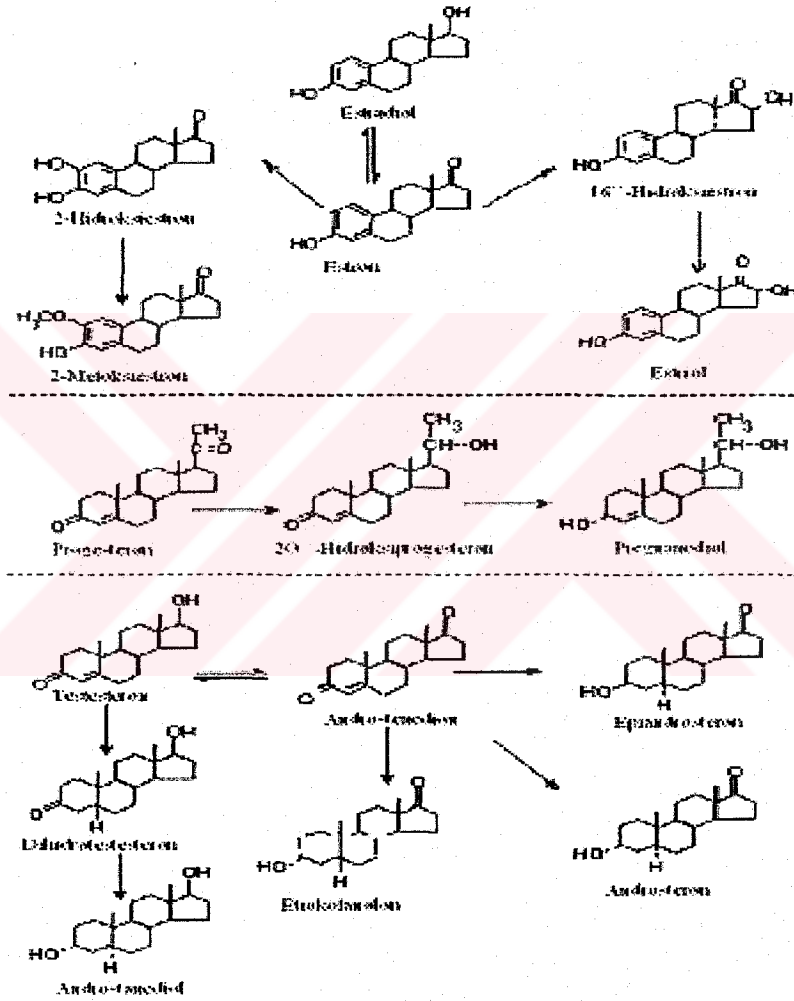
Endokrin bezlerinden salgılanan hormonlar, polipeptid yapıda hormonlar ve steroid hormonları (kolesterol, testosteron, androstenedion, estrogen) olarak iki ana gruba ayrılmaktadır.

Hücresel düzeyde hormon etkisi, hormonun kendi reseptörüne bağlanması ile başlar. Hormonlar hücrede reseptörlerinin bulunduğu yer ve hormon etkisini iletilmesini sağlayan ikinci habercinin yapısı dikkate alınarak sınıflandırılmaktadırlar. Estrojenler, androjenler, tiroid hormonları v.d. hücre içi reseptörlere bağlanırken, follikül stimule edici hormon (FSH), tiroid stimule edici hormon (TSH), luteinize edici hormon (LH) v.d. hücre yüzey reseptörlerine bağlanmaktadır. Hücre yüzey reseptörlerine bağlanan hormonlar için cAMP, cGMP, kalsiyum ve ya fosfotidil inozitol (veya herikisi) ve henüz belirlenemeyen bazı ikinci haberciler görev yapmaktadır. (Robert vd., 2003)

Hormon salgılanmasını gerçekleştiren spesifik bezler endokrin bezleri olarak adlandırılmaktadır. Salgılar doğrudan doku sıvısına (hücrelerarası boşluğa) bırakılır ve buradan da kana geçerler. İnsanlarda bulunan başlıca endokrin bezleri; hipofiz bezi, tiroid bezi, paratiroid bezi, adrenal bez, pankreasın Langerhans adacıkları, testis ve ovariumdur. Bunlardan başka endokrin fonksiyonu olan bazı organlar ve dokular da vardır. Örneğin böbrek renin ve eritropoetin, timus bezi timopoetin, corpus pineale melatonin, mide mukozası gastrin, bağırsak mukozası sekretin salgılamaktadır. (Noyan, 1996)

Ovarium ve testislerde yumurta ve spermlerin oluşumu yanında sekonder seks karakteristiklerinin gelişimi ve farklılaşmasını regüle eden steroid hormonları (androjenler ve estrogenler) da üretilmektedir.

Kadın (ovarium) ve erkek (testis) gonadlarında, estrogenlerin ve androjenlerin üretilmesinde belirgin farklılıklar vardır. Steroid hormonlarının birçok major grubu adrenal korteks tarafın danda üretilmekte ve salgılanmaktadır(Smith vd.;1983). Gonadlar ve adrenal korteks gibi en dokrin organlardan salgılanan steroidler spesifik reseptörleri vasıtası ile hedef dokularda etki göstermektedir. Steroid hormona bağlı hedef dokuların çeşitli biyolojik tepkileri bu hormon ların serum ya da plazma konsantrasyonlarından etkilenmektedir(Hironobu vd., 1998; Yasuhiro vd.; 2003). Steroid hormonları ve ana metabolitlerinin açık formülleri şekil 1.1 'de verilmektedir.

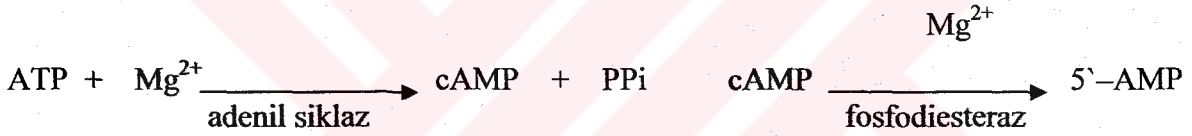


Şekil 4.1.1 Steroid hormonları (estradiol , progesteron , testesteron) ve ana metabolitleri.www.

4.2 Steroid Hormonlarının Etki Mekanizması:

Hücresel düzeyde hormon etkisi, plazma membranında spesifik reseptörlerine bağlanması ile başlamaktadır. Genellikle protein yapısında olan reseptörler hormonlara yüksek afinite ve spesifiklikte bağlanmaktadır. Hormonlar reseptörün konumu ve hücre içerisinde hormonal etkinin uyarılmasında kullanılan ikinci habercinin ya da sinyalin yapısına göre sınıflandırılmaktadırlar.(Robert vd., 2003)

Steroid hormonlarının(estrojenler,androjenler ve progesteron) reseptörleri hücre stoplazmasının da yer almaktadır. Reseptörlerin hormonlara bağlanması sonucu ikinci habercilerin hücre membranına difüzyonu gerçekleşir. 3',5'siklik adenosin monofosfat (cAMP) başlıca bilinen ikinci habercidir. cAMP hücre plazma membranına bağlı adenilat siklaz enziminin katalizlediği reaksiyon ile magnezyum varlığında ATP' den meydana gelmektedir. cAMP'nin intrasellüler düzeyleri çeşitli hormonların etkisiyle artırılır ya da azaltılır, ve bu etki bir dokudan diğeri ne değişir.(Smith vd.; 1983) Adenilat siklaz aktivitesi ile artan cAMP seviyesine bağlı olarak hücre içi kalsiyum konsantrasyonu da artmaktadır.



cAMP'nin ikinci haberci olarak yer aldığı tüm dokularda, cAMP ile aktive edilen protein kinazlar bulunmaktadır. Bu durum, cAMP etkisinin protein kinazlar aracılığı ile olduğu kanısını uyandırmıştır. Protein kinazlar hücredeki birçok proteini, özellikle de enzimleri fosforile eder. Hemen bütün uyarı-reaksiyon sistemlerinde hücrenin uyarılması ile cAMP'nin artması ve hücre içi kalsiyumun artması birlikte gerçekleşir (Smith vd.; 1983).

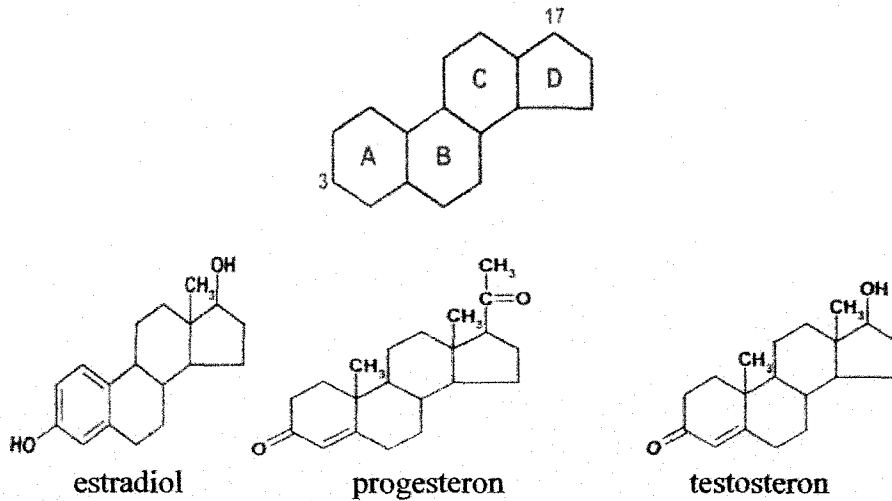
İkinci haberci cAMP'nin etkisi hücrenin özel karakterine göre değişir. Örneğin, cAMP karaciğerde glikozun sentezini ve kana verilmesini artırır; adrenal kortekste ise ACTH (adenokortikotropik hormon) etkisi altında steroid hormonlarının sentezini ve salgılanmasını artırır. Adenohipofiz hormonlarından FSH ve LH gonadotropinleri hücre membranı reseptörlerine bağlanarak adenil siklaz enzim aktivasyonu sağlamaktadırlar. Sentezlenen cAMP'nin spesifik protein kinazları aktive etmesi sonucu hedef dokuda yanıt oluşmaktadır.

Dokuda (hücrede) cAMP düzeyi,birbirine zıt iki enzim aktivitesinin dengesini temsil eder. Bunlar adenilat siklaz ve fosfodiesteraz enzimleridir. Adenilat siklaz ATP 'den cAMP oluşma

sını etki eder; fosfodiesteraz ise cAMP'yi 5'-AMP'ye hidrolize eder ve cAMP etkisini ortadan kaldırır.(Noyan, 1996)

4.3 Steroid Hormonlarının Yapısı:

Steroid hormonlar prekürsörleri ve metabolitleri, sübstitüe grupların sayısı, konumu ve sterokimyasal konfigürasyonlarına göre farklılık göstermektedir. Tüm steroid hormonları yapılarında, A-D olarak belirlenmiş 4 adet halkanın yer aldığı siklopentanoperhidropenanten halkası ortaktır. Ek karbonlar C10, C13 pozisyonunda ya da bir yan zincir şeklinde C17 pozisyonunda bulunmaktadır. Asimetrik karbon atomları stereoizomeriye imkan sağlamaktadır. C10 ve C13 pozisyonunda yer alan açıl metil grupları (C19 ve C18) halka sisteminin önünde çıkıntı meydana getirmektedir ve bu gruplar referans noktaları olarak görev almaktadırlar. Bu gruplar ile aynı düzlemde yer alan nükleer substitüsyonlar cis ve β olarak tayin edilmektedirler. Çifte bağlar başlangıç karbonlarının numaralarına bağlı olarak belirtilirler(Robert vd., 2003). C19 steroidleri olarak adlandırılan androjenler; C17 pozisyonunda karbon yan zincirinden yoksun steroidler sınıfında yer almaktadır. 2 açıl metil grubu, C17 pozisyonunda oksijen (keton ya da β -hidroksil), 3-keton ve 4,5 çifte bağ içermektedirler. Testislerde yer alan testosteron prototipik bir androjendir. C21 steroidler olarak adlandırılan progesteron ve adrenal kortikal steroidler 2 açıl metil grubu ve C17 pozisyonunda 2 karbon yan zinciri içermektedir. C18 steroidler olarak adlandırılan 17- β estradiol (β -estradiol ya da estradiol olarak da adlandırılmaktadır.) gibi estrogenler tek açıl metil grubu içermektedir. Tüm steroid hormonlarından farklı olarak, estrogenler aromatik halkaya (halka A) sahiptirler. C17 hidroksil grubunda esterifikasyon gerçekleşebilir. (şekil 2).(Smith vd.;1983; Robert vd., 2003)

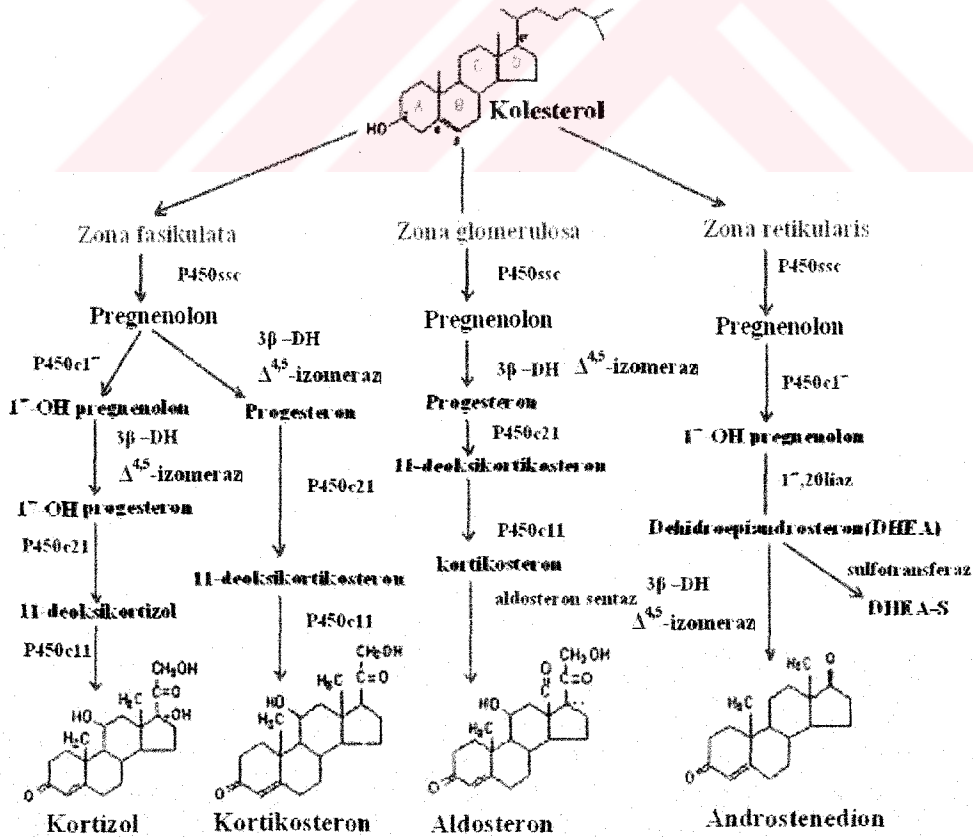


Şekil 4.3.1 Estradiol , testosteron , progesteron açık formülleri

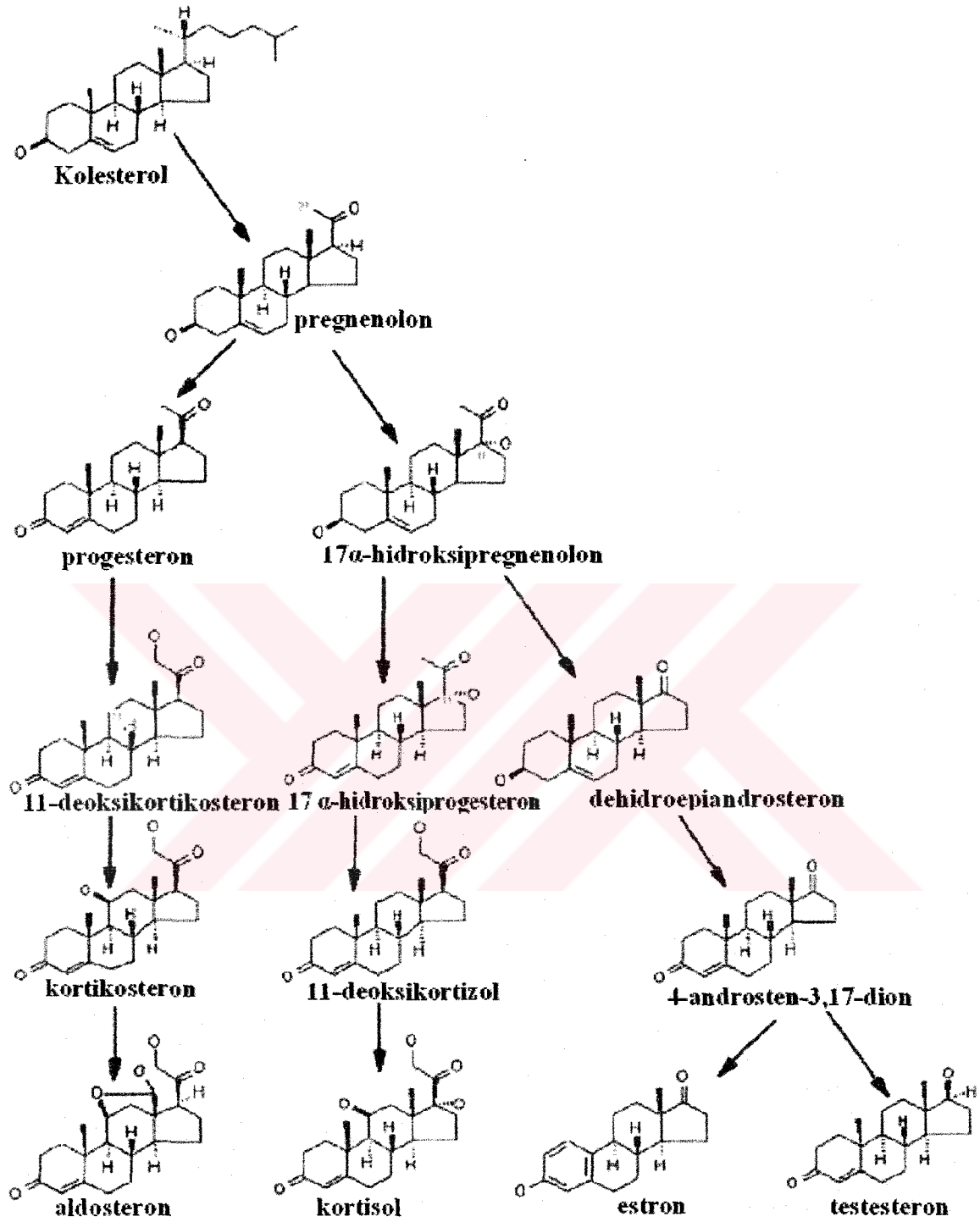
4.4 Steroid Hormonlarının Sentezi :

Adrenal korteks zona glomerulosa, zona fasciculata ve zona reticularis olmak üzere üç tabaka dan oluşmaktadır. Karbohidrat metabolizmasını regüle eden glukokortikoidler (kortizol ve kortikosteron) zona fasciculatada üretilmektedir. Kortizol sekresyonu kortikotropin salgılatıcı hormon(CRF) tarafından düzenlenen ACTH(adrenokortikotropik hormon) salgılanmasına bağlıdır. Dokuda sodyum, potasyum seviyelerini regüle eden mineralokortikoidler(aldosteron) en dışta yer alan zona glomeruloza tabakasında ve erkek gonadlarında(testisler) üretilen steroid lere benzer etki gösteren androjenler(dehidroepiandrosteron) en içte yer alan zona retikularis tabakasında üretilmektedir. Aldosteron üretiminin primer düzenleyicileri renin anjiotensin sistemi ve potasyumdur. Aldosteron sekresyonu adenohipofizden salınan ACTH (Adrenokortikotropik Hormon) salgılanmasına bağlıdır. (Noyan, 1996)

Tüm steroid hormonlarının (androjenler, estrogenler, progesteron ve adrenal kortikal steroid leri) biosentezi asetil CoA'dan sentezlenen kolesterolden başlamaktadır. (şekil 3) (Smith vd.; 1983; Robert vd., 2003)) Kolesterolden başlayarak steroid hormonlarının sentezi şekil 1.3a ve 1.3b'de verilmektedir.



Şekil 4.4.1a Adrenal steroid hormonlarının kolesterolden başlayarak sentezi.



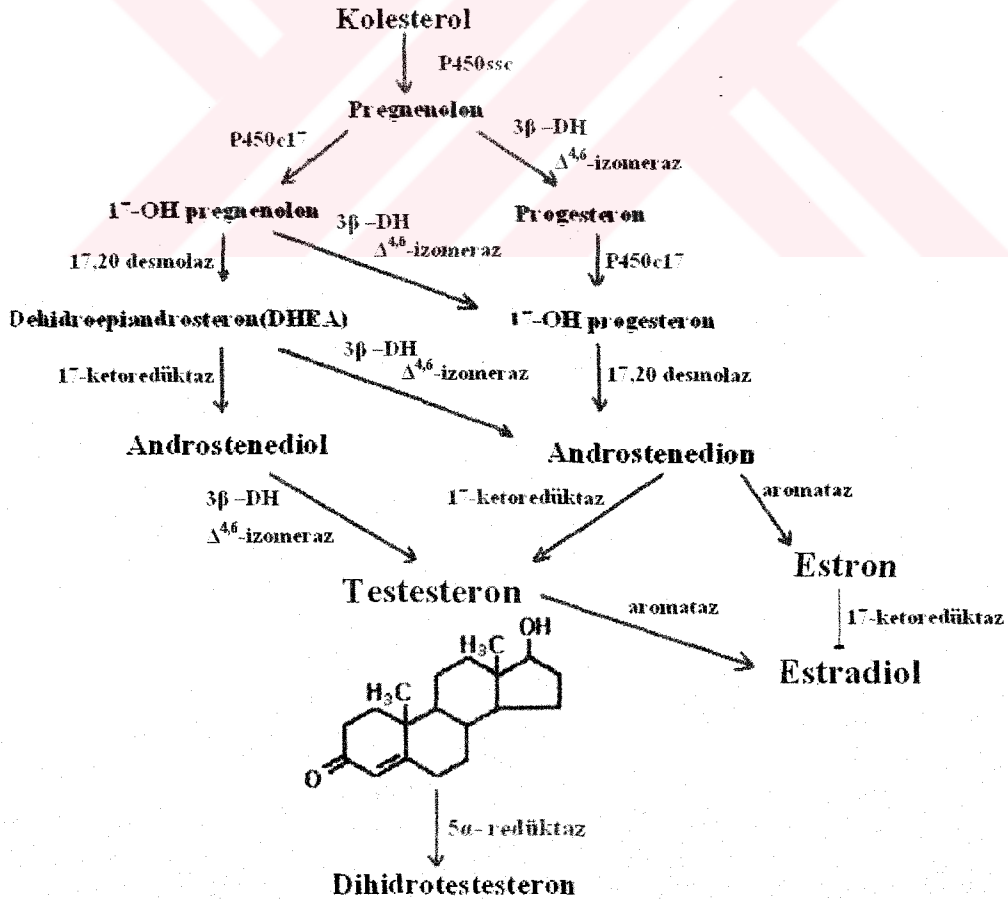
Şekil 4.4.1b Adrenal steroid hormonlarının kolesterolden başlayarak sentezi.
(www.drashirleydecampos.com.br/noticias.php?no...)

4.5 Testesteron ve Estrojen Biyosentezi:

Erkek ve kadın gonadları birçok steroid hormonu üretmekle birlikte bunların en önemlileri testesteron ve estradioldür. Bu hormonların biyosentez kontrolü FSH (folikül stimüle hormon) ve LH (lüteinize edici hormon) sekresyonu ile sağlanmaktadır. (Noyan, 1996)

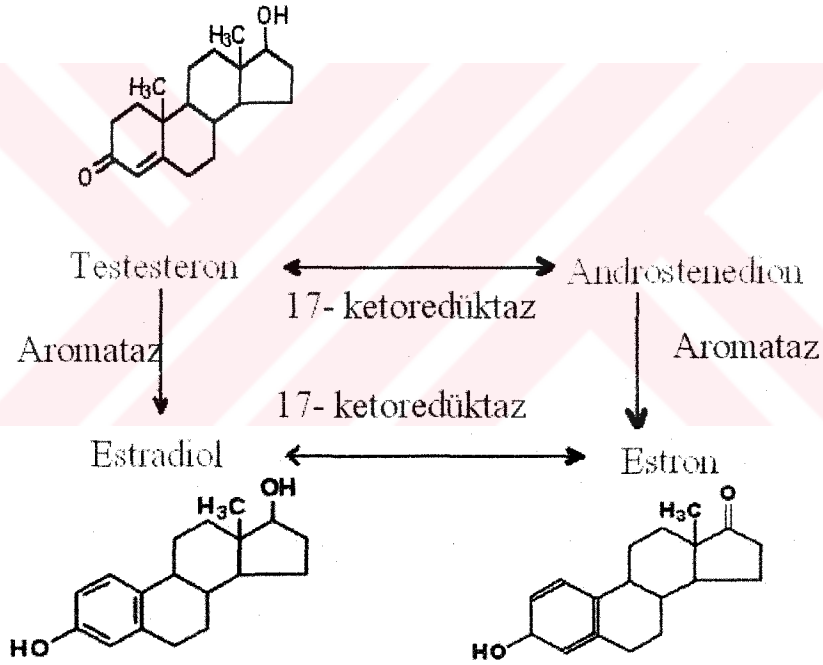
Bu iki hormonun sekresyonu hipotalamustan salınan GnRH(gonadotropin-releasing hormon), steroid hormonları ve kompleks geri besleme (feed back) sistemindeki diğer faktörler ile regüle edilmektedir(Noyan, 1996).

LH hormonu Leydig hücrelerine bağlanarak Leydig hücre hormonu olan testesteronun üretilmesini stimüle etmektedir. Testesteron plazmaya salındıktan sonra androjen bağlama proteini (ABP) ile sertoli hücrelerine taşınmaktadır ve burada testesteron dihidrotestesterona indirgenmektedir. Plazmaya taşınan testesteron ve dihidrotestesteron spesifik gonadal steroid bağlama globulinini (GBG) ile hedef dokulara taşınmaktadır. Testesteron üretimi sertoli hücrelerinde de gerçekleşebilmektedir ancak bu üretim FSH ile regüle edilmektedir. (şekil 4) (Noyan, 1996)



Şekil 4.5.1 Testisin leydig hücrelerinde gerçekleşen erkek steroid hormonlarının sentezi.

Estrojenler, ovumun “theca interna” ve “theca granulosa” hücrelerinde sentezlenmektedir. LH ovumun “thecall” hücrelerinde androstenedion ve testosteron sentezini stimule etmektedir. “Thecall” hücrelerine bağlanan LH’ ın granulosa hücrelerine difüzyonuna yanıt olarak “thecall” hücre androjenleri üretilmektedir. Aromataz enzimi ovum ve diğer birkaç dokunun endoplazmik retikulumunda yer almaktadır.(Noyan, 1996) Granulosa hücrelerinde aromataz enzimi FSH ile stimule edilmektedir ve androjenlerin estrojenlere dönüşümünü sağlamaktadır. Bu enzim ayrıca androjenlerin A halkasının aromatisasyonunun sonlanmasını sağlayan hidroksilasyon ve dehidratasyonda da görev almaktadır(Smith vd.; 1983). Granulosa hücre estrojenlerinin büyük bir kısmı foliküler sıvıya, “thecall hücre” estrojenlerinin büyük bir kısmı da estrojen sirkülasyonuna salınmaktadır. Sirkülasyona salınan estrojenler, testosteron transportunda kullanılan aynı globulin (GBG) ile hedef dokulara taşınmaktadır.(Şekil 5) (Noyan, 1996).

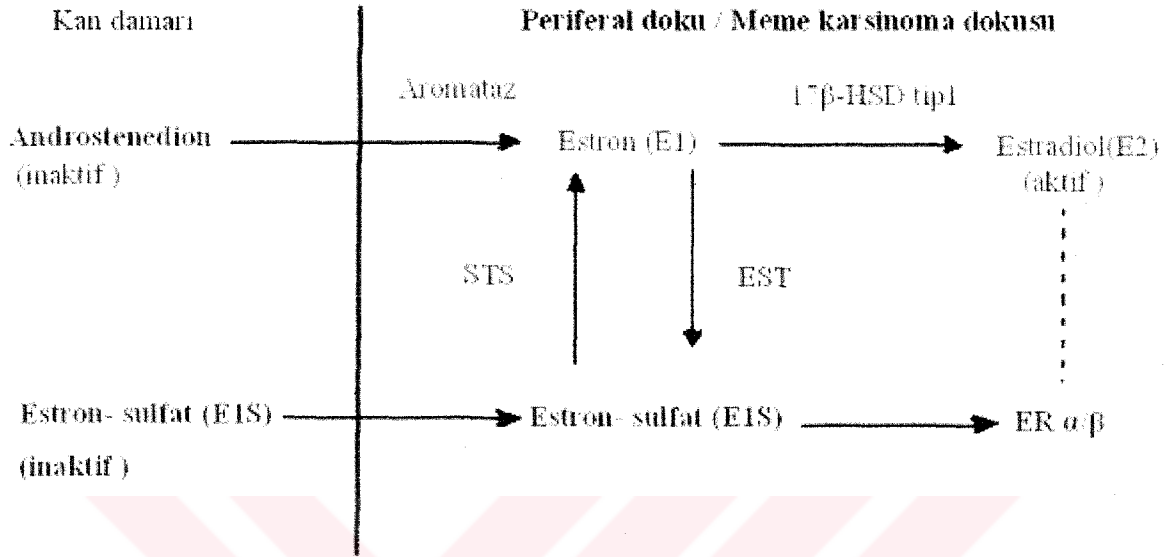


Şekil 4.5.2 Kolesterolde meydana gelen testosteron ve androstenedionun, kadın gonadlarında major steroid hormonlarının sentezinde kullanılması.

Estrojen, insan fetal gelişiminde ve dişi üreme sisteminde önemli role sahiptir. Premenepozal kadınlarda estrojen üretiminin asıl kaynağı ovaryumdur. Erkeklerde ve postmenapozal kadınlarda estrojenler adrenal ve ovarian kaynaklı androjenlerin dönüşümü ile üretilmektedir (Yasuhiro vd., 2003). Adrenal korteks ,ovaryum ve/veya testisten salınan androstenedion yada C19 steroidlerin estrona dönüşümü deri, kas, yağ ve kemiği içeren periferel dokularda gerçekleşmektedir. Bu dönüşüm estrojen biosentezinde limit derece basamağı olan aromataz enzim kompleksini katalizlemektedir. Aromataz enzim kompleksi aromataz sitokrom P450 (aromataz) ve NADPH-sitokrom P450 redüktaz(flavoprotein) olmak üzere iki polipeptitten oluşmaktadır. Aromataz enzimi C19 steroid substratını bağlamada ve estrojenlerin karakteristik fenolik A halkasının formasyonunu oluşturan bir seri reaksiyonu katalizlemekte görev almaktadır (Hironobu vd., 1998). Dokuda aromataz miktarı glukokortikoidler, phorbol esterler, siklik nükleotitler, prostoglandinler ve IL-6 sitokinler ile regüle edilebilir(Richard vd., 2000).

Periferel dokularda aromataz enzimi ile oluşan estron(E1), estron sulfotransferaz enzimi (EST) ile estron sulfata (E1S) dönüşmektedir.(Yasuhiro vd., 2003) Estron sulfotransferaz enzimi(EST) 3-hidroksil pozisyonunda estrojenlerin sulfokonjugasyonunu katalizleyen metabolik bir enzimdir. Bu yolla sulfatlanın estrojenler estrojen reseptörü ile birbirini etkileme yeteneğini kaybederler. Bu nedenle hormonal yönden inaktiftirler(Yue-ming vd.; 1999). Estron sulfotransferaz enzimi tüm erkek ve kadın karaciğer, böbrek, beyin, adrenal bezler gibi dokularda aktivite göstermektedir.(Yasuhiro vd.; 2002) Özellikle karaciğerde sistemik estrojen hemeostazisinin sürdürülmesinde görev almaktadır(Yue-ming vd.; 1999).

Estron sulfataz enzimi içeren birkaç vücut dokusu biyolojik yönden inaktif olan estron sulfatın estrona hidrolizini sağlamaktadır. Estrojen daha sonra 17β -hidroksisteroid dehidrogenaz HSD tipI enzim etkisi ile estradiol(E2) dönüşmektedir (şekil 1.6), (Girish vd.; 1998).



Şekil 4.5.3 Normal periferel dokularda ve/ veya meme karsinomasında ostrojenlerin üretilmesi.

Estrojenler dokularda inaktif formda depolanmaktadır ve ihtiyaç halinde bu depolanan estrojenler aktive edilerek kullanılmaktadır. Estron ve estradiol sınırlı miktarda olmalarına rağmen estrojen işaretleyicileri olarak kullanılmaktadır. Estron sulfamat bu işaretleyicilere göre daha belirgin avantajlara sahiptir.(Girish vd.; 1998) Biyolojik yönden inaktif olan estron sulfat (E1S) plazma estrojenin major dönüşüm formudur. Periferel kanda estron sulfat uzun yarılanma ömrüne sahiptir.(Yasuhiro vd., 2003) Serum konsantrasyonları estradiol ve estron serum konsantrasyonlarından on-yirmi kat daha yüksektir.(Girish vd.; 1998)

5. MATERYALLER

5.1 Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

Laboratuvar ELISA okuyucusu	: Thermolabelsystem
Laboratuvar karıştırıcısı	: Heidoloph MR 3001
Laboratuvar pHmetre cihazı	: İmolab
Laboratuvar su banyosu	: Kerman
HPLC sistemi	: Schimadzu Program Class VP.
Viskotek sistemi	: Viscotek 4 detektörlü SEC-HPLC-GPC
U.V. Visible Spektrofotometresi	: Model V-530 JASCO Program
Kullanılan malzemeler	:
♦ Otomatik pipet	: 0-50 µl, 100-1000 µl
♦ Beher	: 50ml, 100 ml, 500 ml, 1 L
♦ Ependorf tüpleri	

5.2 Kullanılan HPLC Sisteminin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri:

Kolon	: Silika jel kolon(jel filtrasyon kolonu)
Dedektör	: UV-VIS dedektör (SPD-10AV)
Mobil faz	: PBS; pH= 7,0; %0,05 NaN ₃
Akış hızı	: 1ml / dakika
Kolon sıcaklığı	: 25 °C
Dalga boyu	: 280 nm

5.3 Kullanılan Viskotek sisteminin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri:

Kolon	: TOSOH G 5000 PWXL
Dedektör	: Viscotek Triple Detector Array (TDA 302)
Mobil faz	: PBS; pH= 7,0; %0,05 NaN ₃
Akış hızı	: 0,8 ml/ dakika
Kolon sıcaklığı	: 25 °C
Dalga boyu	: 280 nm

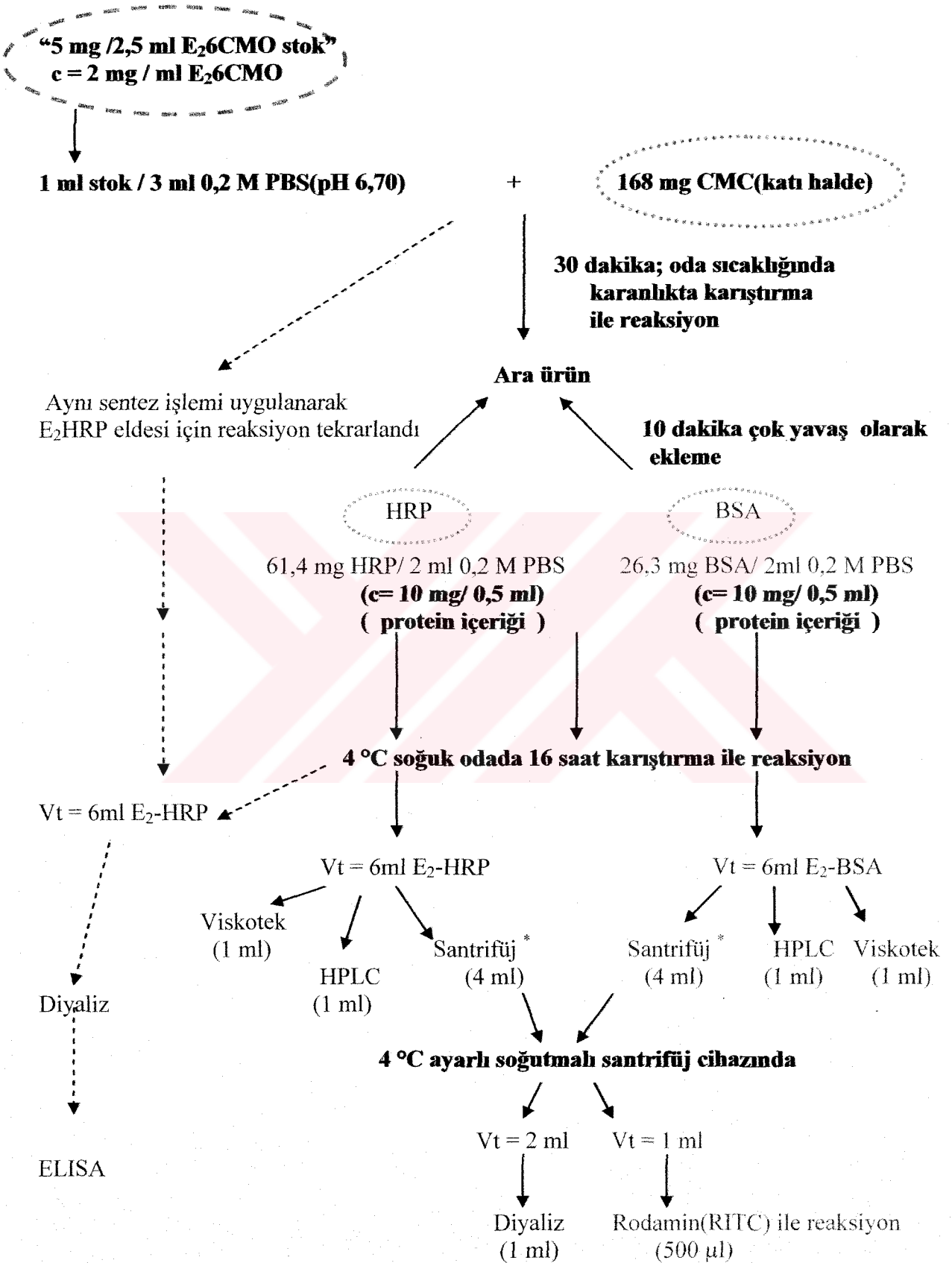
5.4 Kullanılan UV.vis. Spektrofotometresinin Teçhizat ve Çalışma Parametreleri:

Optical System	: single monochromator
Detektör	: silikon fotodiod (S1337)
Işık kaynağı	: deuterium lamp : 190 to 350 nm halogen lamp : 390 to 1100 nm

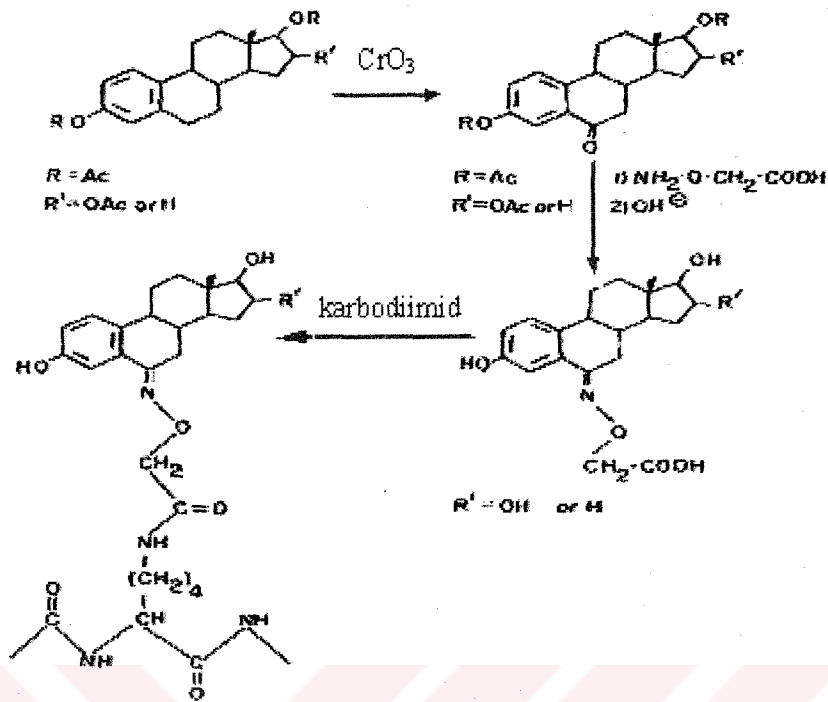
Kullanılan Kimyasal Maddeler	Üretici Firma	Lot No.
Estradiol – 6 CMO	Fluka	451411/1
CMC	Sigma	063K1115
HRP	Fluka	049137/1
BSA	Sigma	117H1346
RITC B(rodamin)	Sigma	18F5012
NaH ₂ PO ₄	Sigma	411460
Na ₂ HPO ₄	Fluka	446288
NaCl	Sigma	33000
NaHCO ₃	Sigma	6014
Na ₂ HCO ₃	Sigma	7795

EIA İçin Kullanılan İmmün Kit	Üretici Firma	Özellik
17β-Estradiol kit	Diameta	96 kuyucuklu

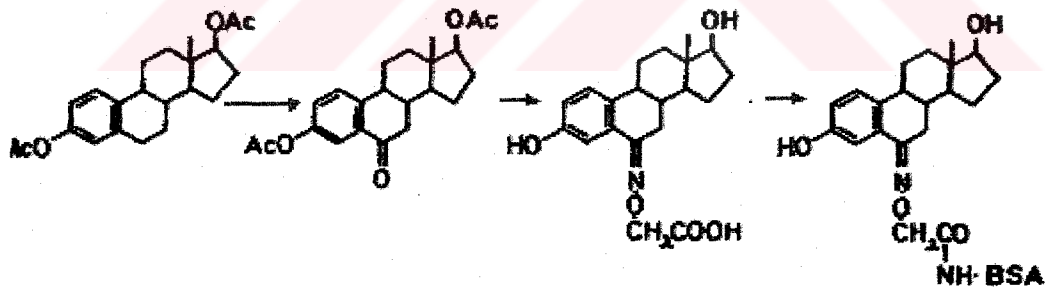
6. DENEYSEL ÇALIŞMA :



* *: gözenek genişliği 10.000 olan filitreden süzme ile protein hariç diğer maddelerin uzaklaştırılması



Şekil 6.1.a Estradiolün karbon-6'dan proteine bağlanması için gerçekleştirilen reaksiyon.



Şekil 6.1.b 17 β -estradiolün B halkası ile bovine serum albumine(BSA) bağlanması.

6.1 E₂-HRP Konjugatının Sentezi

a) kullanılan çözeltiler:

1. 0.2 M PBS(fosfat) tampon çözeltisi
2. 1 ml stok (5mg / 2.5 ml Estradiol – 6 CMO stoğu) / 3 ml PBS tamponu
3. 168 mg katı halde CMC (1-siklohegzil-3-(2morfoniloetil)karbodiimid meto-p-toluen sulfonat)
4. 61.4 mg HRP / 2ml PBS tampon çözeltisi

b) kullanılan çözeltilerin hazırlanması:

1. 0.2 M PBS(fosfat) tampon çözeltisi hazırlanması:

$$\text{a) NaH}_2\text{PO}_4 \quad 31.202 \text{ g/ mol } M_w \times 0.2 \text{ mol} = 1.56 \text{ g NaH}_2\text{PO}_4 \quad (2.1)$$

$$\text{b) Na}_2\text{HPO}_4 \quad 53.614 \text{ g/ mol } M_w \times 0.2 \text{ mol} = 2.6807 \text{ g Na}_2\text{HPO}_4 \quad (2.2)$$

$$\text{c) NaCl} \quad 58.44 \text{ g/ mol } M_w \times 0.2 \text{ mol} = 0.584 \text{ g NaCl} \quad (2.3)$$

NaH₂PO₄ ve Na₂HPO₄ belirtilen miktarda tartılarak 1 L destile suda çözüldü, karışıma 0.2 mol NaCl eklendi ve pH 6.7 ye ayarlandı.

2. 5mg / 2.5 ml Estradiol – 6 CMO stok çözeltisinin hazırlanması :

Deneysel çalışmada kullanılacak E₂-6CMO'nun 2mg / ml konsantrasyonda olması gerekmektedir. Bu nedenle satın alınan 5mg Estradiol-17β-6-(O-karboksimetil)-oksim (E₂-6CMO) 2,5 ml 0,2 M PBS tamponunda çözdürüldü ve E₂-6CMO stok elde edildi.

3. 61.4 mg / 2ml HRP çözeltisinin hazırlanması :

Deneysel çalışmada kullanılacak enzimin protein konsantrasyonu 10 mg / 0.5 ml olması gerekmektedir. Daha önce satın alınan enzim örneğinin %65 protein içerdiği belirlenmişti. Bu durum dikkate alınarak 61,4 mg HRP (satın alınan) tartıldı ve 2 ml 0,2 M PBS tamponda çözdürülerek HRP enzim stok çözeltisi hazırlandı.

c) hesaplamalar :

Satın alınan HRP enziminin % protein içeriğini belirlemek için, 0.5 mg enzim tartıldı ve 1 ml 0.01 M PBS tamponda çözüldü. Elde edilen çözeltinin UV-vis. Spektrofotometrede PBS'e karşı 280 nm de absorbans değeri 0.4337 olarakokundu. Buna bağlı olarak protein miktarı aşağıda verildiği gibi hesaplandı.

$$A_{280} / 1.34 = 0.4337 / 1.34 = 0.3236 \text{ mg} \quad (2.4)$$

0.5 mg HRP 0,3236 mg protein miktarı içeriği

100 mg X mg

X = %65 protein içeriği olduğuna göre ;

100 mg 65 mg protein miktarı içeriği

X mg 10 mg protein miktarı içeriği

$$X = 15,38 \text{ mg HRP} / 0,5 \text{ ml PBS} = 61,4 \text{ mg HRP} / 2 \text{ ml PBS} \quad (2,5)$$

Bu şekilde deneyde kullanılacak HRP çözeltisi elde edildi.

d) deneyin yapılışı

Estradiol-17 β -6-(O-karboksimetil)-oksim (E₂6CMO)' in HRP enzimi ile konjugasyonu , Exley ve Abuknesha (1978) geliştirdikleri metoda bağlı olarak gerçekleştirildi. 1 ml E₂6CMO stok / 3 ml 0,2 M PBS çözeltisine, beher içinde magnetik karıştırıcıda karıştırılarak katı halde 168 mg CMC eklendi. Beherin üstü folyo ile kapatıldı ve reaksiyonun gerçekleşmesi için oda sıcaklığında otuz dakika karıştırıcıda bekletildi. Meydana gelen ara ürüne 61,4 mg / 2ml HRP enzimi, yaklaşık on dakika sürede çok yavaş olarak eklendi. 6 ml reaksiyon içeriği 4 °C 'ye ayarlı soğuk odada, magnetik karıştırıcıda karıştırılarak tüm gece bekletildi.

6.1.1 E2-6CMO – HRP Konjugatının Santrifüj İşlemi :

Ertesi gün alınan 6 ml enzim konjugatının 2 ml'si viskoteke ve HPLC cihazına verildi. Kalan 4ml enzim konjugatı, içerisinde bulunan protein hariç diğer kimyasalları uzaklaştırmak için ve daha konsantre bir enzim konjugatı elde etmek için, gözenek boyutu 10.000 olan filtre kullanılarak 4 °C 'ye ayarlı soğutmalı santrifüjde 12 000 devir/dakika hızla 30 dakika santrifüjlendi.

6.1.2 E2-6CMO – HRP Konjugatının Diyaliz İşlemi:

Sentezi yapılan E₂HRP konjugatı diyaliz membranına alındı, iki ucu bağlandıktan sonra 1 L distile su ile doldurulan beher içerisine yerleştirildi. 4 C° ' ye ayarlı soğuk odada beher içinde ki destile su karıştırılarak bir gece bekletildi. Diyaliz işleminden sonra UV-vis. Spektrofotometrede yapılan ölçümden protein konsantrasyonu hesaplandı ve enzimin aktivitesi tayin edildi.

• Enzim aktivitesi tayini:

35 °C ' ye ayarlı su banyosunda,10 dakika sürede gerçekleşen reaksiyon için kullanılan çözeltiler ;

- ◆ 895 µl 0.2 M PBS
- ◆ 10 µl o-dianisidin
- ◆ 10 µl % 3 'lük H₂O₂
- ◆ 10 µl HRP enzim çözeltisi
- ◆ 75 µl H₂SO₄ (10 dakika sonunda reaksiyonu sonlandırmak için eklenir.)

Çözeltiler yukarıda verilen sıraya göre eklendikten sonra reaksiyonun gerçekleşmesi için on dakika beklendi ve H₂SO₄ ' ün katılması ile reaksiyona son verildi. UV-vis. Spektrofotometre de 400 nm'de tampona karşı absorbans değerleri okundu.

6.1.3 Diyaliz Sonrası E2-6CMO-HRP Örneğinde Protein Miktarının Lowry(Folin-Ciocalteu) Yöntemi ile Tayini:

a) kullanılan çözeltilerin hazırlanması :

1. A çözeltisi : %2' lik Na_2CO_3 (0,1 N NaOH içerir.)
2. B çözeltisi : 1:1 oranında karıştırılan ve taze olarak hazırlanan %1' lik CuSO_4 , %2' lik NaK tartarat
3. C çözeltisi: 50 ml A çözeltisi ve 1 ml B çözeltisi
4. folin çözeltisi: fosfomolibdat ve fosfotungistik asid çözeltisi
5. stok standart çözeltisi:
serum fizyolojik(% 0,9 NaCl distile suda çözündürülerek hazırlandı.)
%5' lik, %10' luk, %15' lik mg/ ml BSA
1:1 oranda alınarak 0,5 ml olarak hazırlandı.
6. protein örneği: 200 μl E2-6CMO-HRP konjugat örneği

b) deneysel çalışma:

çizelge 6.1.3 Çift tekrar olarak çalışılan deneysel işlemde uygulanan yöntem

	Stok standart BSA	Serum fizyolojik	Çözelti C	Follin reaktifi
Standart 1 (%5 BSA)	25 μl	475 μl	3 ml	100 μl
Standart 1 (%5 BSA)	25 μl	475 μl	3 ml	100 μl
Standart 2 (%10 BSA)	50 μl	450 μl	3 ml	100 μl
Standart 2 (%10 BSA)	50 μl	450 μl	3 ml	100 μl
Standart 3 (%15 BSA)	75 μl	425 μl	3 ml	100 μl
Standart 3 (%15 BSA)	75 μl	425 μl	3 ml	100 μl
Kör	---	500 μl	3 ml	100 μl
Kör	---	500 μl	3 ml	100 μl
Örnek	---	400 μl	3 ml	100 μl
Örnek	---	400 μl	3 ml	100 μl

Tüplere tabloda belirtilen sıra ve miktarda stok standart çözeltisi, serum fizyolojik ve çözelti C konularak on dakika beklendi. Bu tüplere follin reaktifi eklenerek otuz dakika bekletildi. UV-vis. spektrofotometrede 500 nm'de işlemde kullanılan köre karşı absorbans değerleri okundu.

6.2 E₂-BSA Konjugatının Sentezi:

a) kullanılan çözeltiler:

1. 0.2 M PBS tampon çözeltisi
2. 1 mg stok (5mg / 2.5 ml Estradiol – 6 CMO stoğu) / 3 ml PBS tamponu
3. 168 mg katı halde CMC (1-siklohegzil-3-(2morfoniloetil)karbodiimid meto-p-toluen sulfonat)
4. 26.3 mg BSA / 2ml PBS tampon çözeltisi

b) kullanılan çözeltilerin hazırlanması:

1. 26,3 mg /2ml BSA(bovine serum albumin) çözeltisinin hazırlanması:

10 mg / 0.5 ml konsantrasyonda BSA çözeltisi; BSA örneğinin protein içeriği dikkate alınarak, 26.3 mg BSA tartılıp 2 ml PBS tamponda çözülerek hazırlandı.

c) hesaplamalar :

Deneyisel çalışmada kullanılan enzimin 10 mg / 0.5 ml protein miktarına karşılık olan BSA miktarı hesaplandı. Bunun için satın alınan BSA dan 160 mg tartılarak 4 ml 0.2 M PBS tamponda çözüldü. Elde edilen çözeltinin UV-vis. spektrofotometrede 280 nm'de absorbans değeri 2.046 olarak okundu. Bu değere bağlı olarak protein miktarı hesaplandı.

$$A_{280} / 1.34 = 2.046 / 1.34 = 1,52 \text{ mg} \quad (2,6)$$

160 mg BSA 15,2 mg protein miktarı içeriği

100 mg X mg

X = %76 protein içeriği olduğuna göre ;

100 mg 76 mg protein miktarı içeriği

X mg 10 mg

$$X = 13,15 \text{ mg BSA} / 1 \text{ ml PBS} = 26,3 \text{ mg BSA} / 2 \text{ ml PBS} \quad (2,7)$$

Bu şekilde deneyde kullanılacak BSA çözeltisi elde edildi.

Estradiol-17 β -6-(O-karboksimetil)-oksim (E₂6CMO)' in BSA'ya bağlanması ve santrifüj işlemi uygulanması E₂-HRP konjugatının sentezinde olduğu gibi Exley ve Abuknesha (1978) geliştirdikleri metoda bağlı olarak gerçekleştirildi.

6.2.1 E₂-6CMO-BSA Konjugatına Floresans Madde Bağlanması:

a) kullanılan çözeltiler:

1. 116 μ l 0.1 M karbonat tampon çözeltisi
2. 500 μ l E₂-6CMO-BSA konjugatı
3. 334 μ l RITC(rodamin izo tiyosiyanat)

b) kullanılan çözeltilerin hazırlanması:

1. 0.1 M Karbonat tampon çözeltisi:

$$\text{a) NaHCO}_3 \quad 84,01 \text{ g/mol } M_w \times 0.05 \text{ mol} = 4.2 \text{ g NaHCO}_3 \quad (2,8)$$

$$\text{b) Na}_2\text{HCO}_3 \quad 105,99 \text{ g/mol } M_w \times 0.05 \text{ mol} = 5.3 \text{ g Na}_2\text{HCO}_3 \quad (2,9)$$

NaHCO₃ ve Na₂HCO₃ belirtilen miktarda tartılarak 500 ml distile suda çözdürüldü ve pH 9.5'e ayarlandı.

2 . RITC(rodamin) çözeltisi:

0.0021 g RITC B(rodamin) tartılarak 30 ml karbonat tamponda çözüldü.

c) hesaplamalar :

- 0,20007 mg / ml BSA protein bulunmakta, dolayısıyla 500 µl'de 0.100035 mg BSA ($A_{280}/1.34$) bulunmakta.

- 0.0021 g / 30 ml RITC ; 7 x 10 g / 1ml RITC hazırlandı.

- $n(\text{RITC}) / n(\text{BSA}) = 30$ alındı..

$$\text{a) BSA : } 0.10035 \times 10^{-3} \text{ g} / 69000 \text{ g/mol } M_w = 1.4543 \times 10^{-9} \text{ mol BSA} \quad (2,10)$$

$$\text{RITC : } 1.4543 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \times 30 = 4.363 \times 10^{-8} \text{ mol RITC} \quad (2,11)$$

$$7 \times 10^{-5} \text{ g} / 536.1 \text{ g/mol } M_w = 1.3057 \times 10^{-7} \text{ mol / ml RITC} \quad (2,12)$$

$$4.363 \times 10^{-8} \text{ mol} \times 1000 \mu\text{l} / 1.3057 \times 10^{-7} \text{ mol / ml} = 334 \mu\text{l RITC} \quad (2,13)$$

b) deneyin yapılışı :

116 µl 0.1 M karbonat tampon çözeltisi, 500 µl E₂-6CMO-BSA konjugatı ve 334 µl RITC (rodamin) karışımı hafifçe vortekslendikten sonra oda sıcaklığında tüm gece bekletildi. Ertesi gün alınan 1 ml E₂-6CMO-BSA-RITC konjugatı Sephadex G50 içeren kolona uygulandı. UV monitörde maksimum absorpsiyon gösteren 5. ile 9. tüp arasında, tüp içerikleri toplandı. 10.000 gözenek boyutlu filtre kullanılarak, 4 °C 'ye ayarlı soğutmalı santrifüj cihazında otuz dakikalık santrifüj işlemi sonucu ufak moleküllü maddeler uzaklaştırıldı. Elde edilen E₂-6CMO-BSA-RITC konjugatının UV-vis. spektrofotometrede ve Spektrofluorometrede absorpsiyon ve fluoresans spektrumları alındı.

Enzim konjugatından 100 µl alınarak 2900µl etil alkol ile 3 ml' ye tamamlandı ve Spektrofluorometrede fluoresans spektrumu, spektrofotometrede absorpsiyon spektrumu alındı. Ayrıca 10 mg RITC(rodamin) tartılarak 5 ml etil alkolde çözöldü. Bu örnekten 100 µl alınarak etil alkol ile 10 ml ' ye tamamlandı ve spektrofotometrede absorpsiyon spektrumu alındı. Bu spektrumdan 280 nm'de absorpsiyon değeri 0,072 ve 545 nm'de absorpsiyon değeri 0,158 olarak okundu. Bu RTIC örneğinin de spektrofluorometrede fluoresans spektrumları alındı.

6.3 HPLC Cihazında Uygulama :

a) kullanılan çözeltiler:

1. 0.01 M PBS(fosfat) tampon çözeltisi
2. 1mg HRP(satın alınan)/ 1 ml PBS tamponu
3. 2mg HRP(satın alınan)/ 1 ml PBS tamponu
4. 1ml E₂- 6CMO-HRP konjugatı reaksiyon içeriği/ 3ml PBS tamponu
5. 1ml E₂-6CMO – BSA konjugat reaksiyon içeriği/ 3ml PBS tamponu
6. 61.4 mg HRP/ 1ml PBS tampon
7. 26,3 mg BSA/ 1ml PBS tampon

b) uygulama:

Sentez işlemi sonucu elde edilen 6ml E₂- 6CMO-HRP konjugatından 1ml alındı ve bu çözeltiliye 3ml PBS tampon eklendikten sonra cihaza verildi. Aynı işlem 6 ml olarak sentezlenmiş olan E₂-6CMO – BSA için de uygulandı. Konjugatlar için alınan kromatogramlar HRP enzimi ve BSA için alınan kromatogramlarla kıyaslandı.

6.4 E₂-6CMO-HRP ve E₂-6CMO – BSA Konjugatının FTIR Cihazına Uygulaması:

Sentezlenen E₂- 6CMO-HRP ve E₂-6CMO – BSA konjugatlarından ayrı ayrı 2 mg tartıldı. Her bir konjugat örneğine 98 mg KBr eklendi, iyice karıştırıldı, pelletlendi ve cihaza verildi. Ayrıca HRP, BSA ve estradiolden 1 mg örnek tartıldı ve 99 mg KBr eklenerek cihaza verildi.

6.5 Spesifik Antikor Bağlı Kuyucuklar Bulunduran Ticari Kite, Sentezlenen E₂-HRP Konjugatının Bağlanması ve ELISA Okuyucusu ile Gözlenmesi:

Sentezlenen E₂-HRP konjugatının ELISA uygulamasında 17 β -estradiol kiti kullanıldı.

Kullanılan kit anti-estradiol IgG (antikor) ile kaplı 96 kuyucuklu mikroplate, farklı estradiol konsantrasyonuna sahip 4 standart, inkübasyon tamponu, ticari estradiol-HRP konjugatı, TMB-substratı (renk reaktifi) ve reaksiyonu durdurma çözeltisi (kuvvetli asid) içermektedir.

a) kullanılan çözeltiler:

1. Estradiol standartları (sulu çözelti) (1 ml)
(S1: 10 pg/ml; S2: 60 pg/ml; S3 : 400 pg/ml; S4 : 2000 pg/ml estradiol konsantrasyonu)
2. İnkübasyon tamponu (50 mM fosfat tamponu pH 7.4 ; 1 gr/L BSA) (30ml)
3. TMB(tetrametil benzidin)-substrat (0,25 gr/L H₂O₂-TMB) (12 mL)
4. Durdurma(stop) solusyonu (0,15 mol/L sülfürik asit) (12 mL)
5. Ticari Estradiol-HRP konjugatı (0,4 ml)
6. Sentezlenen Estradiol-HRP konjugat numunesi
7. Seyreltik konjugat
8. 0,2 M PBS tampon

b) kullanılan çözeltilerin hazırlanması:

1. Farklı konsantrasyonlarda E₂-HRP konjugatı çözeltilerinin hazırlanması:

- a) 250 μ l E₂-HRP konjugatı / 750 μ l inkübasyon tamponu (N1)
- b) 500 μ l E₂-HRP konjugatı / 500 μ l inkübasyon tamponu (N2)
- c) 750 μ l E₂-HRP konjugatı / 250 μ l inkübasyon tamponu (N3)
- d) 100 μ l E₂-HRP konjugatı / 900 μ l 0,2 M PBS tamponu (N4)
- e) 200 μ l E₂-HRP konjugatı / 800 μ l 0,2 M PBS tamponu (N5)
- f) 250 μ l E₂-HRP konjugatı / 750 μ l 0,2 M PBS tamponu (N6)
- g) 500 μ l E₂-HRP konjugatı / 500 μ l 0,2 M PBS tamponu (N7)

3. Ticari konjugatın seyreltik çözeltisinin hazırlanması:

10 μ l ticari estradiol-HRP konjugatı 1 ml inkübasyon tamponuna eklendi ve 5 dakika magnetik karıştırıcıda bekletildi.

c) deneysel çalışma:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B ₀	S4	N4									
B	B ₀	S4	N4									
C	S1	N1	N5									
D	S1	N2	N5									
E	S2	N3	N6									
F	S2	N	N6									
G	S3	N _x	N ⁷									
H	S3	N _x	N ⁷									

Şekil 6.5.1

B₀ kuyucuğu: 100 µl inkübasyon tamponu ve 100 µl seyreltik ticari konjugat

S1 kuyucuğu: 100 µl standart 1 ve 100 µl seyreltik ticari konjugat

S2 kuyucuğu: 100 µl standart 2 ve 100 µl seyreltik ticari konjugat

S3 kuyucuğu: 100 µl standart 3 ve 100 µl seyreltik ticari konjugat

S4 kuyucuğu: 100 µl standart 4 ve 100 µl seyreltik ticari konjugat

N1 kuyucuğu: 100 µl N1 ve 100 µl standart 4

N2 kuyucuğu: 100 µl N2 ve 100 µl standart 4

N3 kuyucuğu: 100 µl N3 ve 100 µl standart 4

N kuyucuğu: 100 µl konjugat numunesi ve standart 4 (seyreltme yapılmadı.)

N_x kuyucuğu: 100 µl konjugat numunesi ve standart 2 (seyreltme yapılmadı.)

N4 kuyucuğu: 100 µl N4

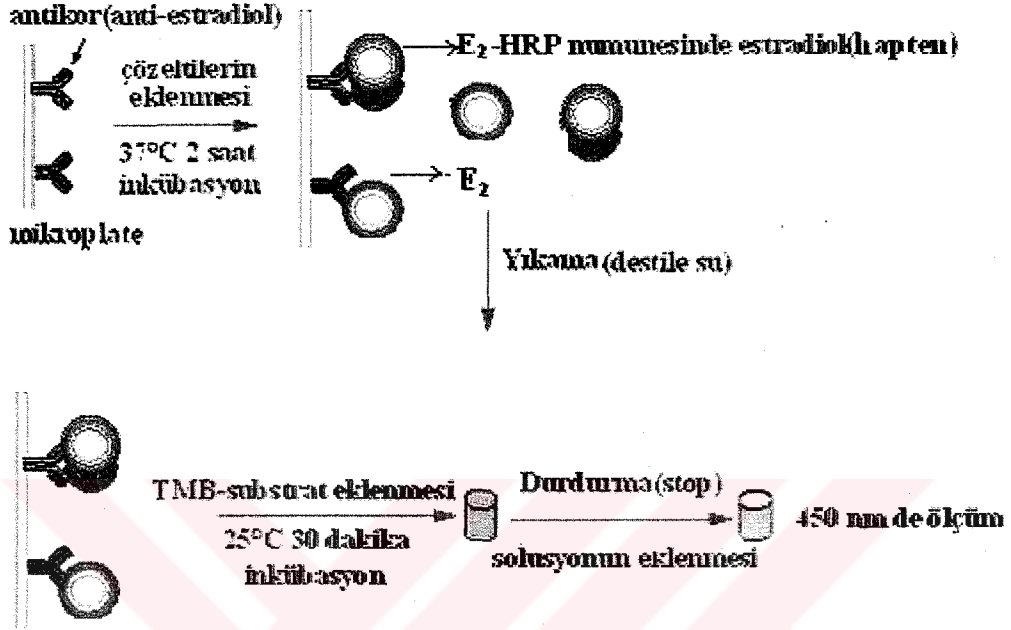
N5 kuyucuğu: 100 µl N5

N6 kuyucuğu: 100 µl N6

N7 kuyucuğu: 100 µl N7

Şekil 6.5.1' de belirtildiği şekilde çözeltiler kuyucuklara konuldu. 37°C de 25 dakika inkübasyon ve sonra 5 dakika çalkalama olmak üzere toplam 2 saat inkübasyon yapıldı. Inkübasyon sonrası mikropate cihazdan alınarak destile su ile üç kere yıkandı ve her kuyucuğa 100 µl TMB substratı eklendi. Substratın eklenmesi ile konjugat bağlanmasını belirten mavi renk görüldü (şekil 8.7.3). Tekrar cihaza verilen mikropate 25°C de 30 dakikalık inkübasyon

işlemi uygulandı. Bu süre sonunda mikropate cihazdan çıkarıldı ve her kuyucuğa 100 µl reaksiyon durdurma (stop) çözeltisi eklendi (şekil 8.7.4, 5, 6). Kuyucukların sarı renk aldığı görüldü ve 450 nm absorbans değerleri okundu (çizelge 14).



Şekil 6.5.2 Şema olarak ELISA cihazında uygulanan işlem (www.labmaster.fi/.../elisakits/troponin-i.htm)

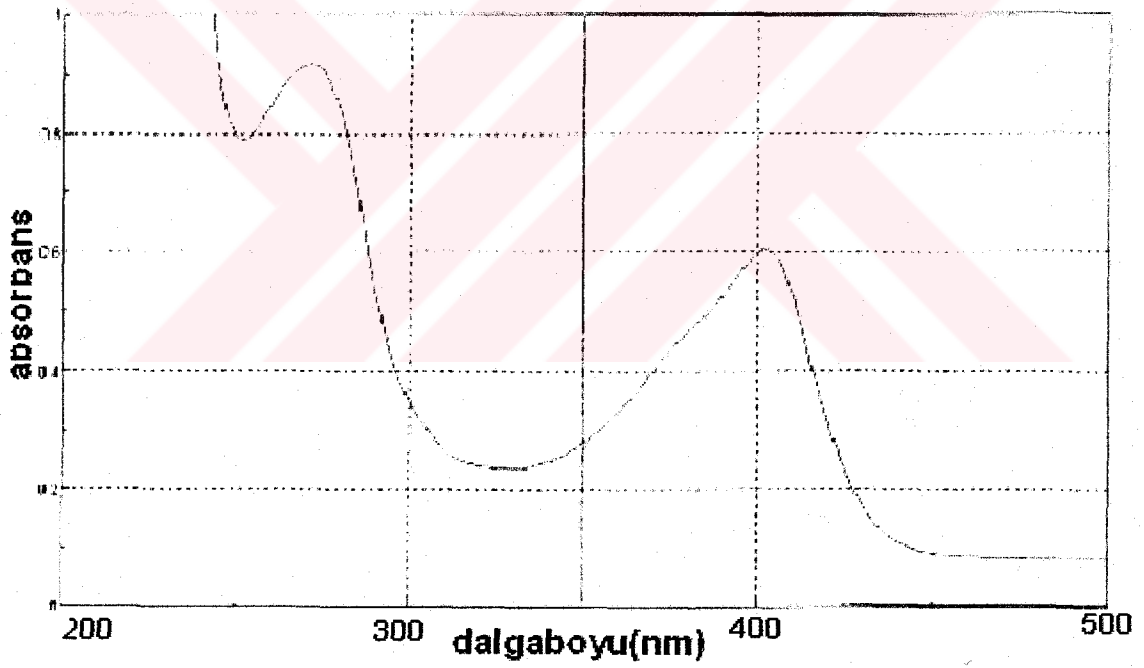
7. SONUÇLAR:

7.1 UV-vis. Spektrofotometre ile Okunan Absorbans Değerleri:

Santrifüj kullanılarak filtrasyondan sonra E₂-6CMO–HRP konjugatının on kat seyreltilerek 0,2 M PBS tampona karşı okunan A₂₆₀, A₂₈₀, A₄₀₂ absorbans değerleri

çizelge 7.1.1

A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₄₀₂	A ₂₈₀ / 1.34
0.850	0.832	0.604	0.621mg/ml(0.621x10=6.21mg/ml)

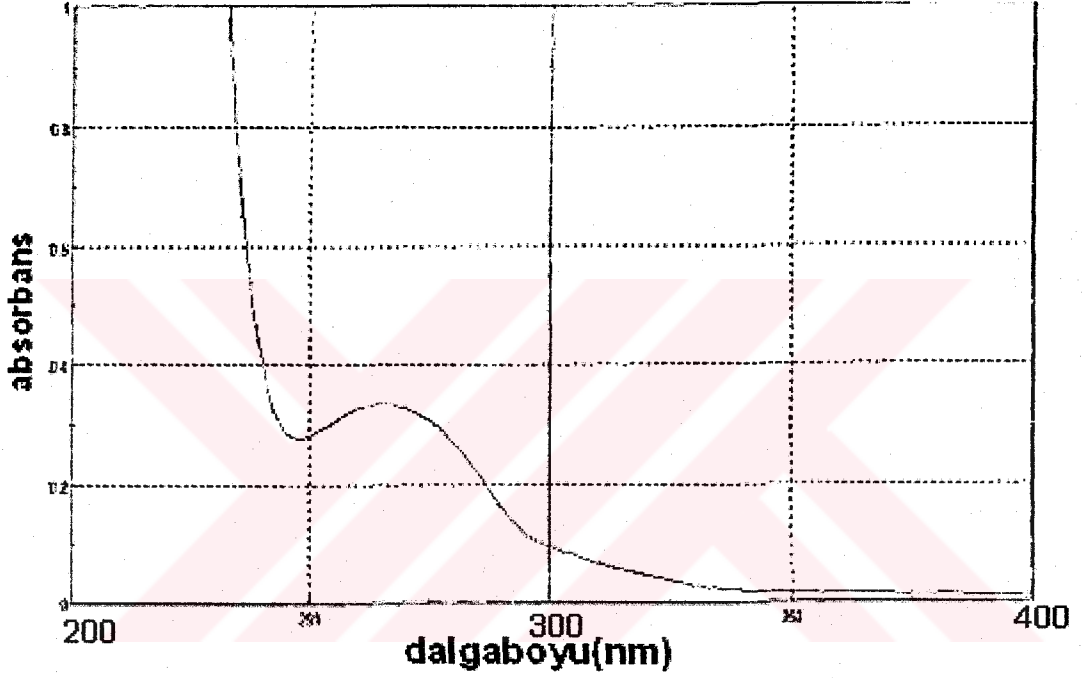


Şekil 7.1.1 Santrifüj uygulamasından sonra “E₂-6CMO–HRP” nın absorpsiyon spektrumu.

Santrifüj kullanılarak filtrasyondan sonra E₂-6CMO-BSA konjugatının on kat seyreltilerek 0,2 M PBS tampona karşı okunan A₂₈₀ absorbans değeri

Çizelge 7.1.2

A ₂₈₀	A ₂₈₀ / 1.34
0.604	0.2007mg/ml(0.2007x10=2.0007mg/ml)



Şekil 7.1.2 Santrifüj uygulamasındansonra “E₂-6CMO-BSA” nın absorpsiyon spektrumu

Diyaliz işleminden sonra E₂-6CMO–HRP konjugatının on kat seyreltilerek 280 nm’ de 0,2 M PBS tampona karşı okunan absorbens değeri

çizelge 7.1.3

A ₂₈₀	0.277
------------------	-------

2. defa tekrarlanan konjugat sentezinde elde edilen E₂-6CMO–HRP konjugatının on kat seyreltilerek 0,2 M PBS tampona karşı okunan A₂₈₀, A₂₇₅, A₄₀₂ absorbens değerleri

çizelge 7.1.4

A ₂₈₀	A ₂₇₅	A ₄₀₂
0,479	0,496	0,402

Diyaliz sonrası E₂-6CMO-HRP konjugatının Lowry (Folin-Ciocalteu) yöntemi ile protein miktarının tayininde UV-vis. spektrofotometrede 500 nm’de, köre karşı okunan absorbens değerleri

Çizelge 7.1.5

	A ₅₀₀ I	A ₅₀₀ I	A ₅₀₀ ortalama
Standart 1	0,076	0,080	0,078
Standart 2	0,141	0,147	0,144
Standart 3	0,209	0,208	0,208
Örnek	0,525	0,535	0,530

7.2 Deneyisel Çalışmada Enzim Aktivitesi Tayinine Bağlı Absorbans Değerleri:

Santrifüj kullanılarak filtrasyondan sonra E₂-6CMO–HRP konjugatının aktivite tayinde okunan A₄₀₀ değerleri

Çizelge 7.2.1

A ₄₀₀ I	A ₄₀₀ II	A ₄₀₀ III	A ₄₀₀ (ortalama)
0.447	0.447	0.480	0.458

Diyaliz işleminden sonra E₂-6CMO–HRP konjugatının aktivite tayinde okunan A₄₀₀ değerleri

Çizelge 7.2.2

A ₄₀₀ I	A ₄₀₀ II	A ₄₀₀ (ortalama)
0.321	0.360	0.340

2. defa yapılan sentezden sonra elde edilen E₂-6CMO–HRP konjugatının aktivite tayinde okunan A₄₀₀ değerleri

Çizelge 7.2.3

A ₄₀₀ I	A ₄₀₀ II	A ₄₀₀ (ortalama)
0,420	0,480	0,419

7.3 E₂-6CMO-BSA-RITC Örneğinin Spektrofluorometrede İncelenmesi

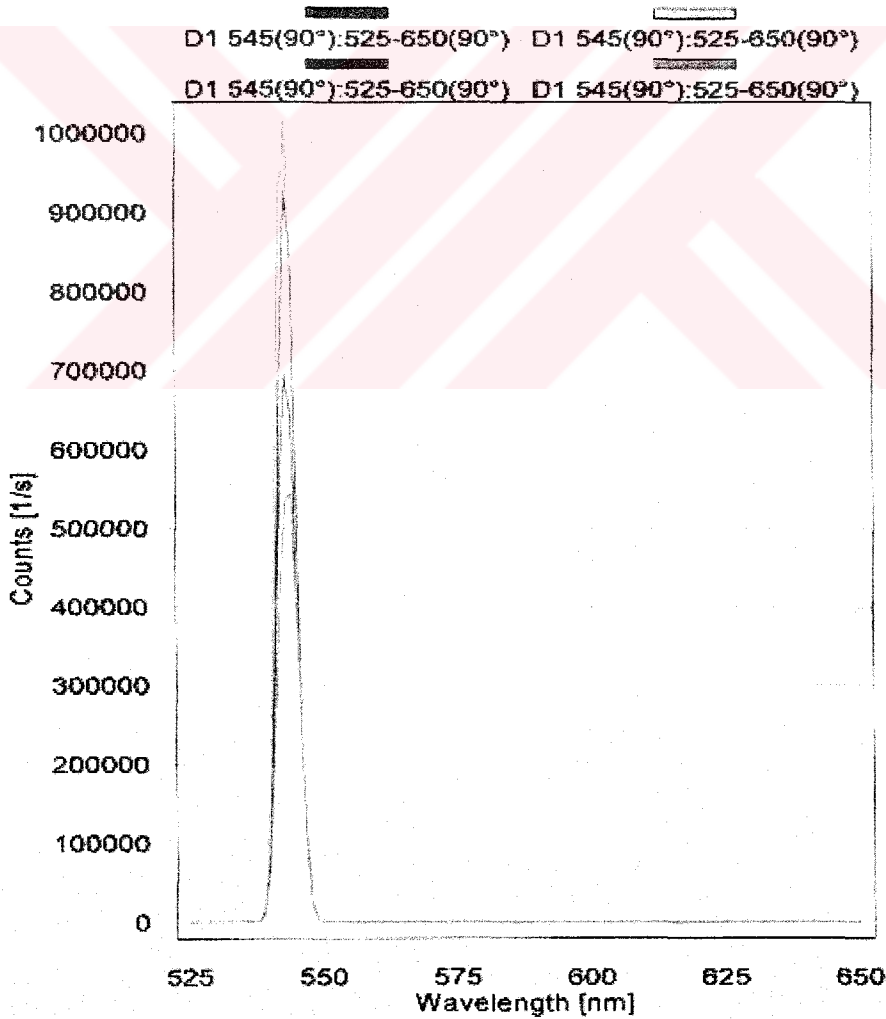
100 μ l E2-BSA-RITC alındı ve 2900 etil alkol eklenerek 3 ml' ye tamamlandı. Bu çözelti ile E2-BSA-RITC için spektrofluorometrede en uygun uyarma $\lambda_{\text{max}} = 545 \text{ nm}$ olduğu görüldü ve $I_{\text{max}} = 550000$ okundu(---). 3 ml'ye tamamlandıktan sonra elde edilen, yukarıda verilen çözeltiden 1 ml alındı ve buna,

1ml distile su eklendikten sonra $\lambda_{\text{max}} = 545 \text{ nm}$ $I_{\text{max}} = 700000$ (—)

2ml distile su eklendikten sonra $\lambda_{\text{max}} = 545 \text{ nm}$ $I_{\text{max}} = 1000000$ (---)

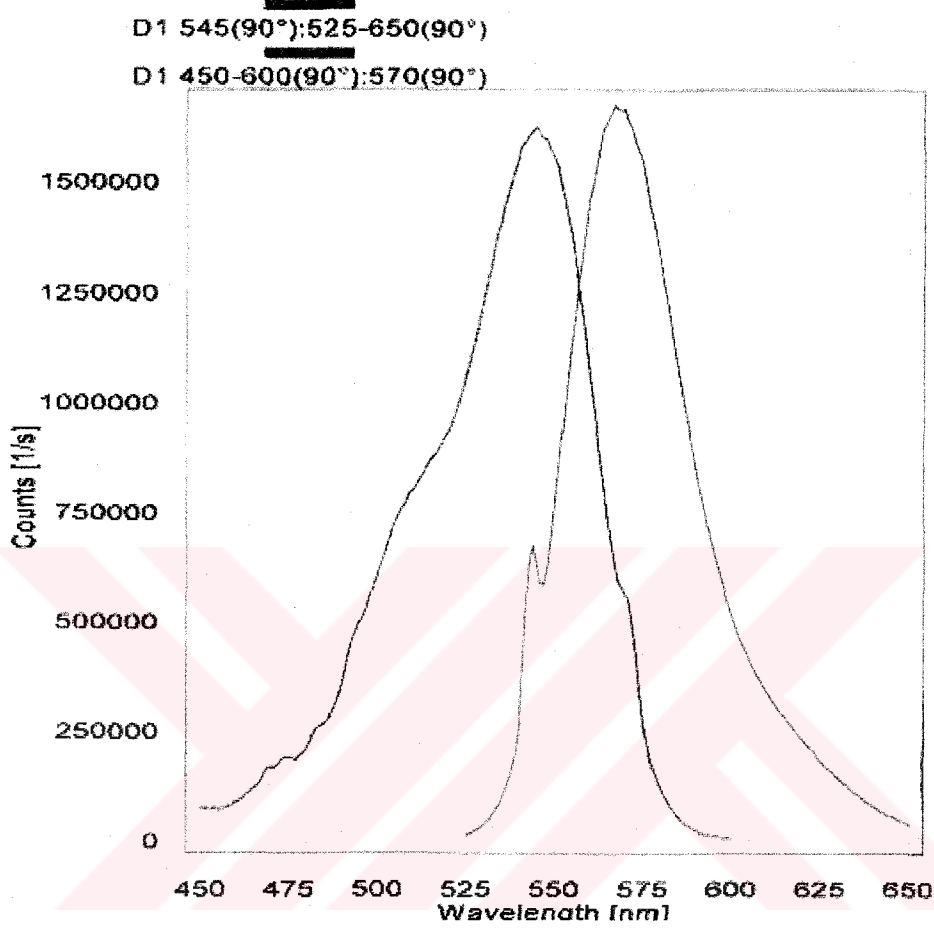
3ml distile su eklendikten sonra $\lambda_{\text{max}} = 545 \text{ nm}$ $I_{\text{max}} = 900000$ (—)

değerleri elde edildi. Bu değerlerin okunduğu fluoresans spektrumları aşağıda verilmiştir.



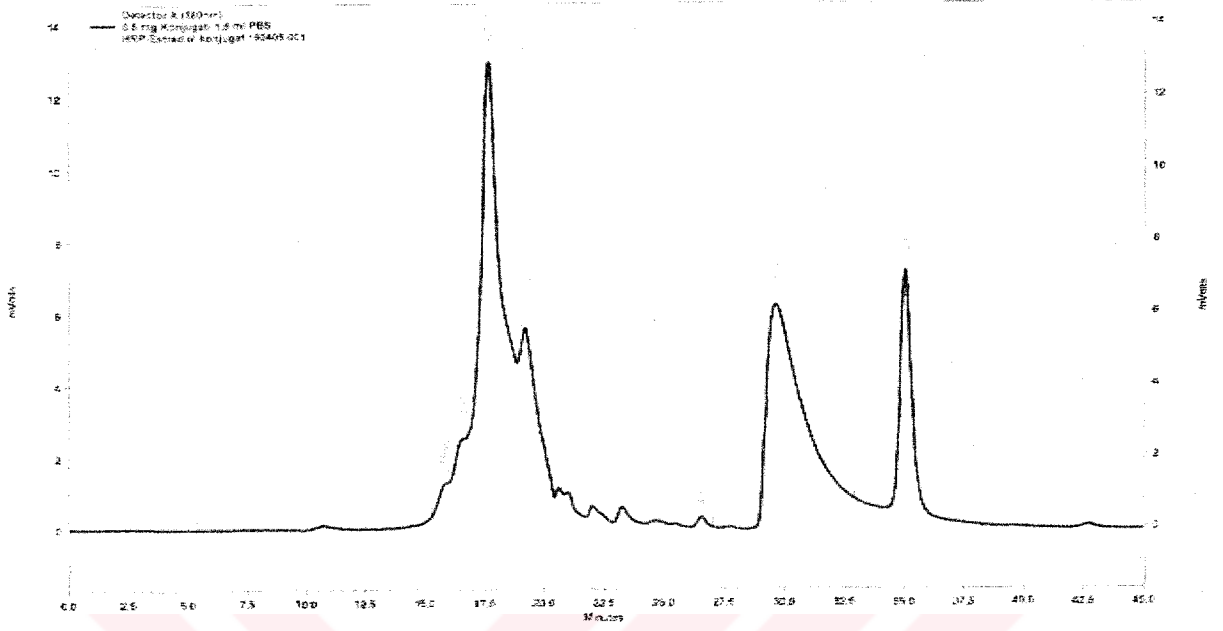
Şekil 7.3.1 E2-BSA-RITC konjugatı için alınan fluoresans spektrumları.

E2-BSA-RITC konjugatı için bu fluoresans spektrumları alınmadan önce, rodamin izotiyosiyanat (RITC) için aşağıda verilen uyarma (eksitasyon) ve emisyon spektrumları elde edildi.

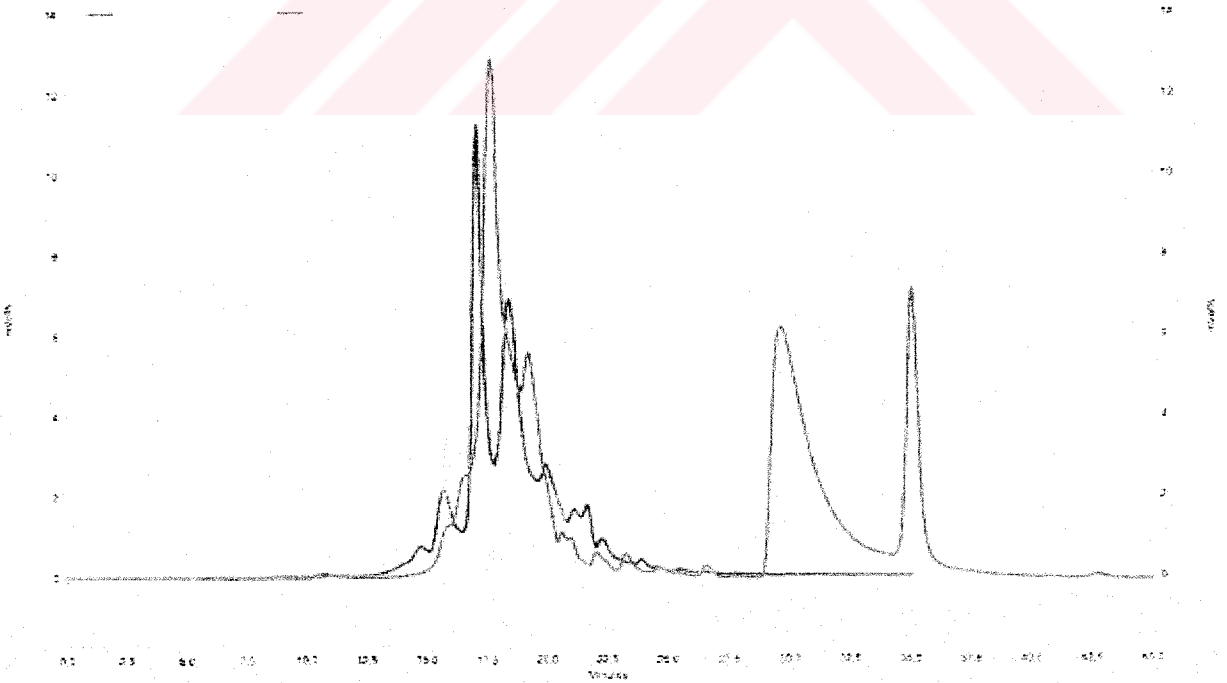


Şekil 7.3.2 Rodamin izotiyosiyanatın (RITC) etil alkoldeki çözeltisinin (10mg/5ml) eksitasyon ve emisyon spektrumları.

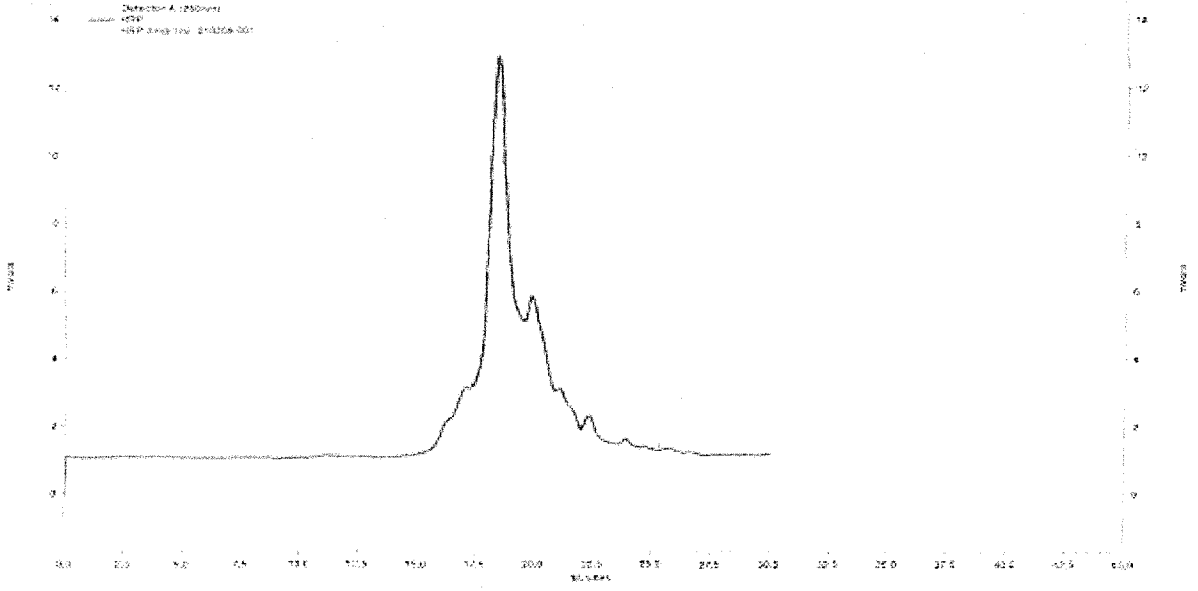
7.4 HPLC Cihazı ile Alınan Sonuçlar:



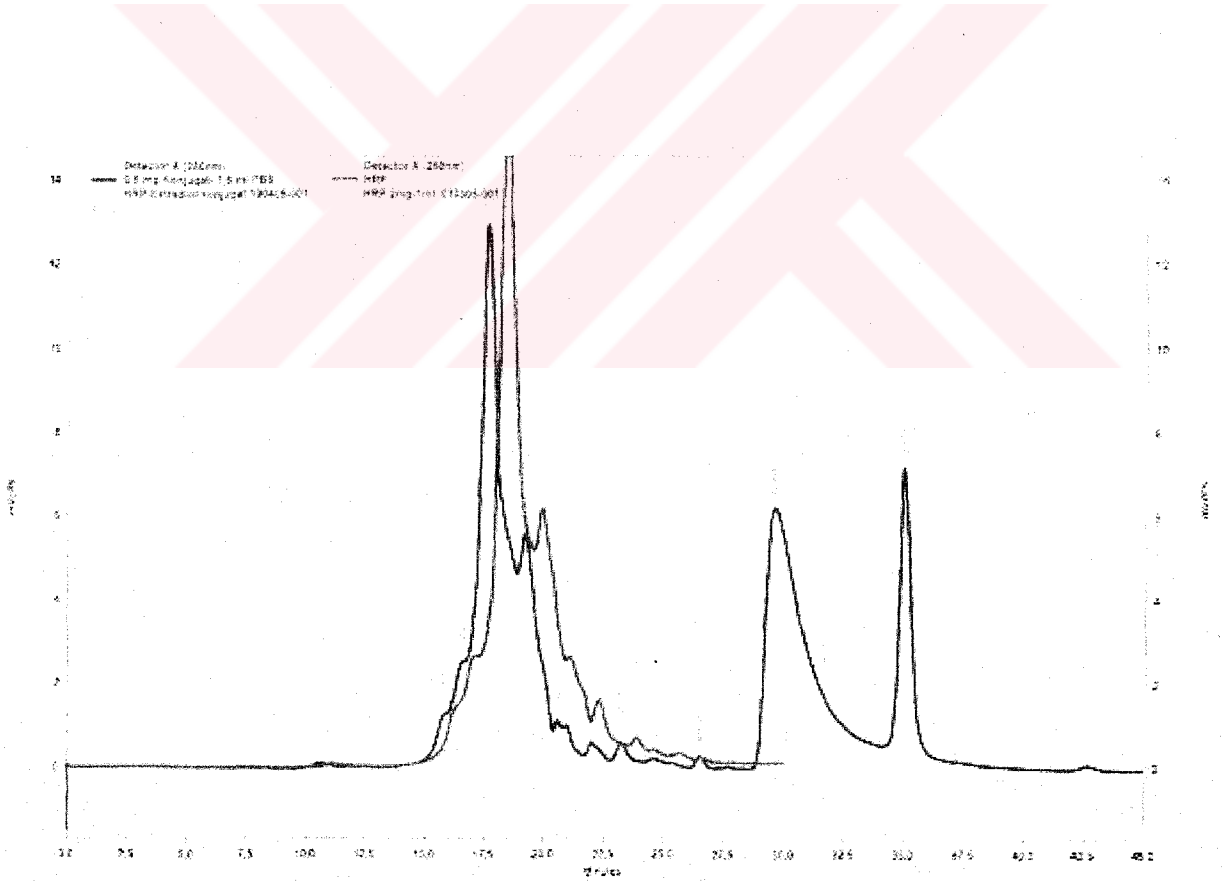
Şekil 7.4.1 1 ml E₂-HRP konjugatı / 3 ml PBS (Absorpsiyon detector, A₂₈₀)



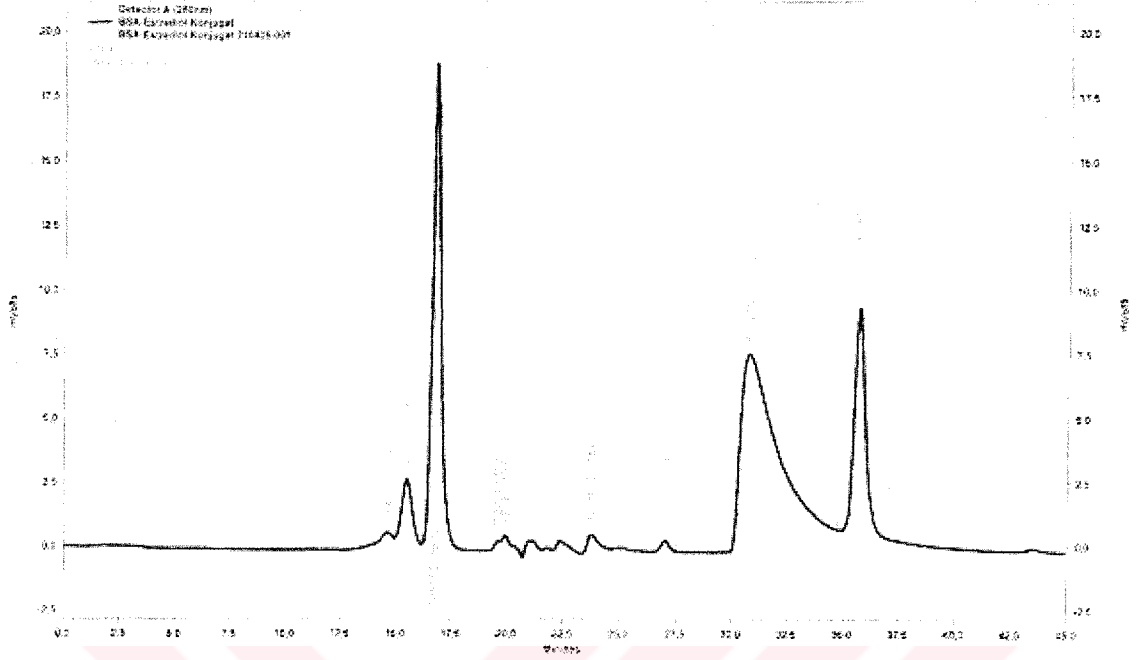
Şekil 7.4.2 — Satın alınan 1 mg HRP / 1ml PBS — 1 ml E₂HRP konjugatı / 3 ml PBS
(Absorpsiyon detector, A₂₈₀)



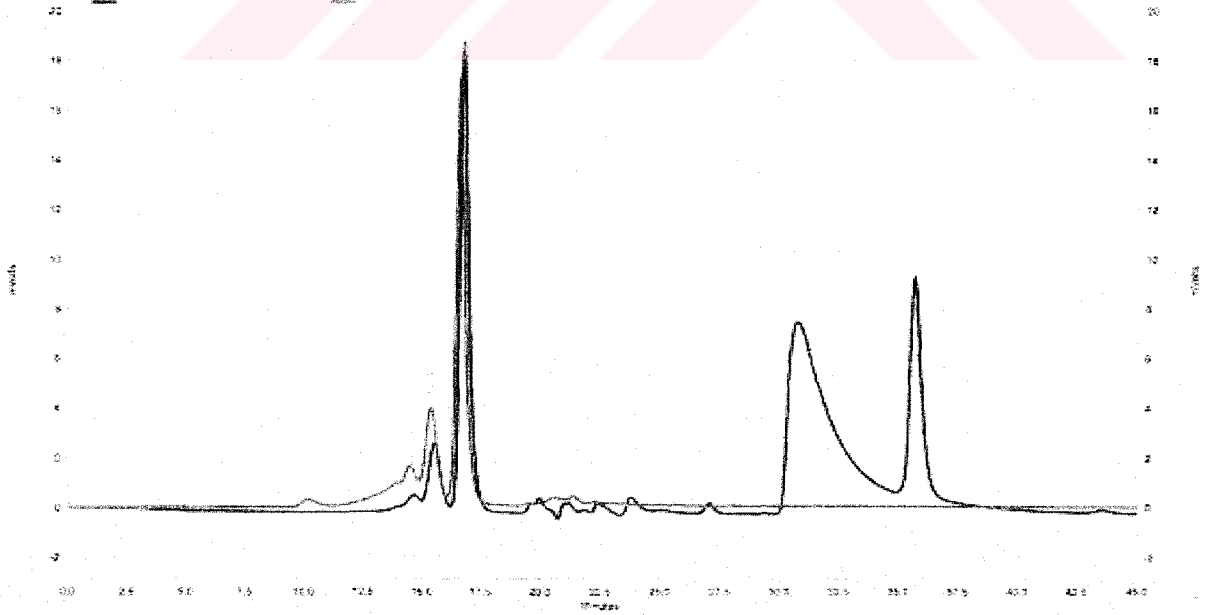
Şekil 7.4.3 — Satın alınan 2 mg HRP / 1ml PBS (Absorpsiyon detector, A_{280})



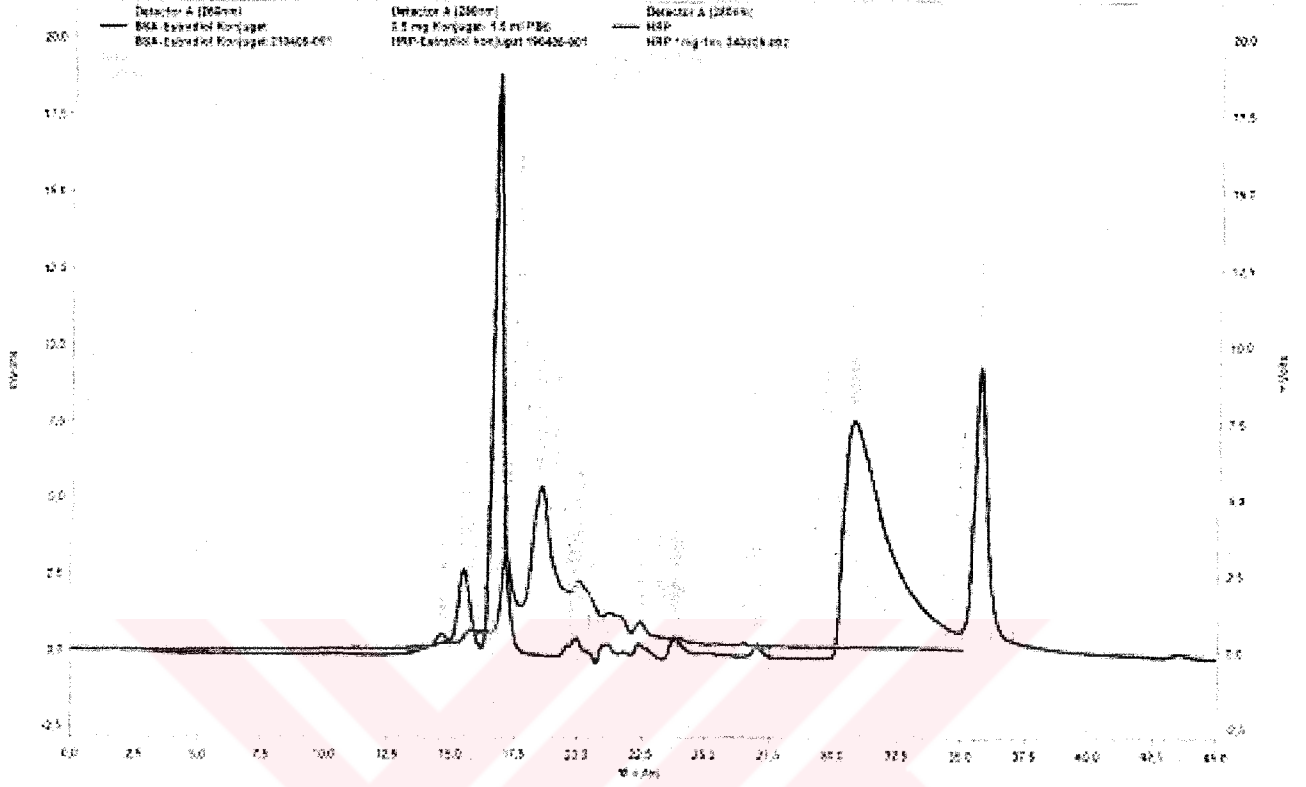
Şekil 7.4.4 — Satın alınan 2mg HRP / 1ml PBS — 1 ml E_2 -HRP konjugatı / 3 ml PBS (Absorpsiyon detector, A_{280})



Şekil 7.4.5 1 ml E₂-BSA konjugatı / 3 ml PBS (Absorpsiyon detector, A₂₈₀)

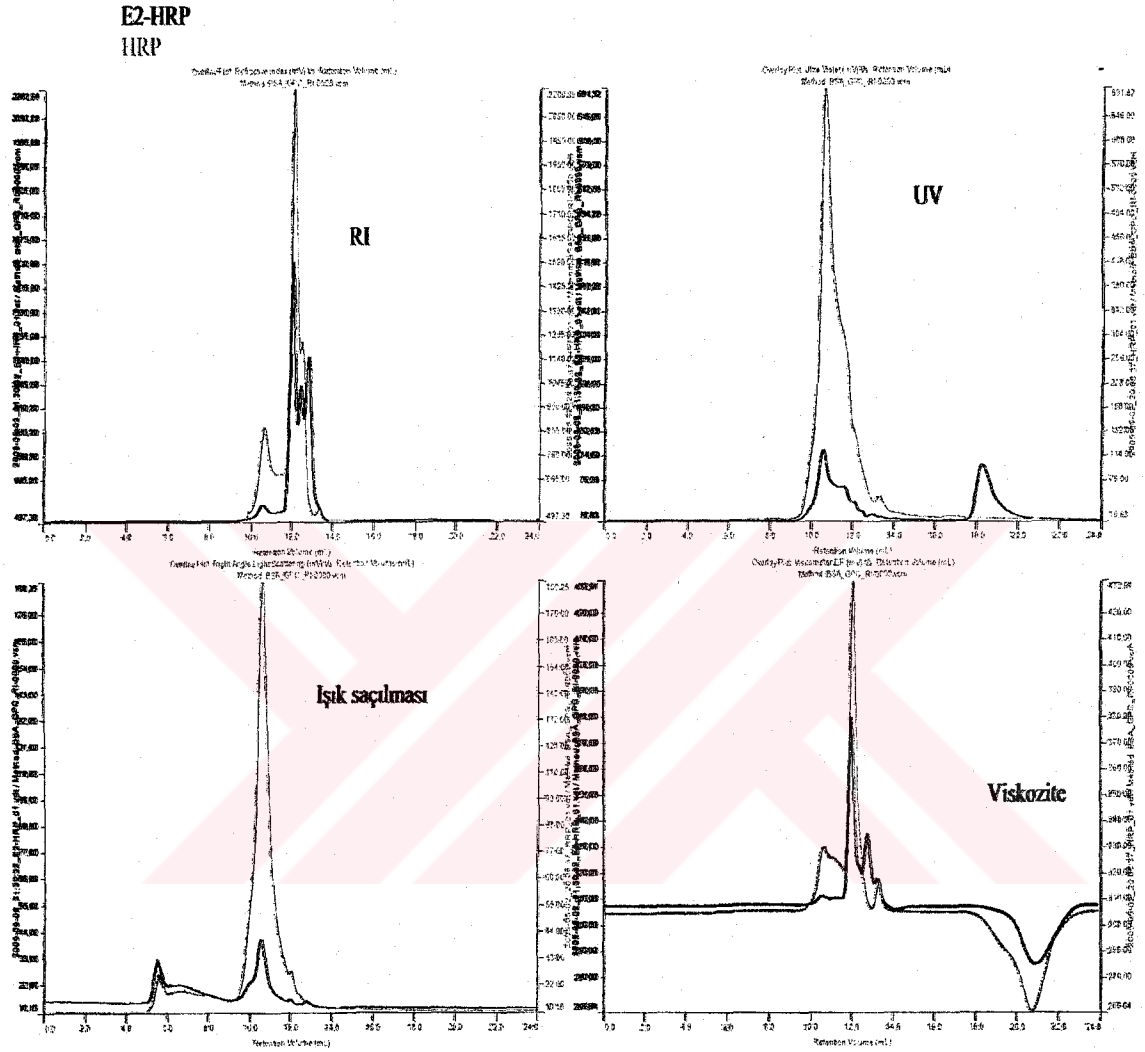


Şekil 7.4.6 — 1 ml E₂-BSA konjugatı / 3 ml PBS — Satın alınan 1 mg BSA / 1ml PBS (Absorpsiyon detector, A₂₈₀)



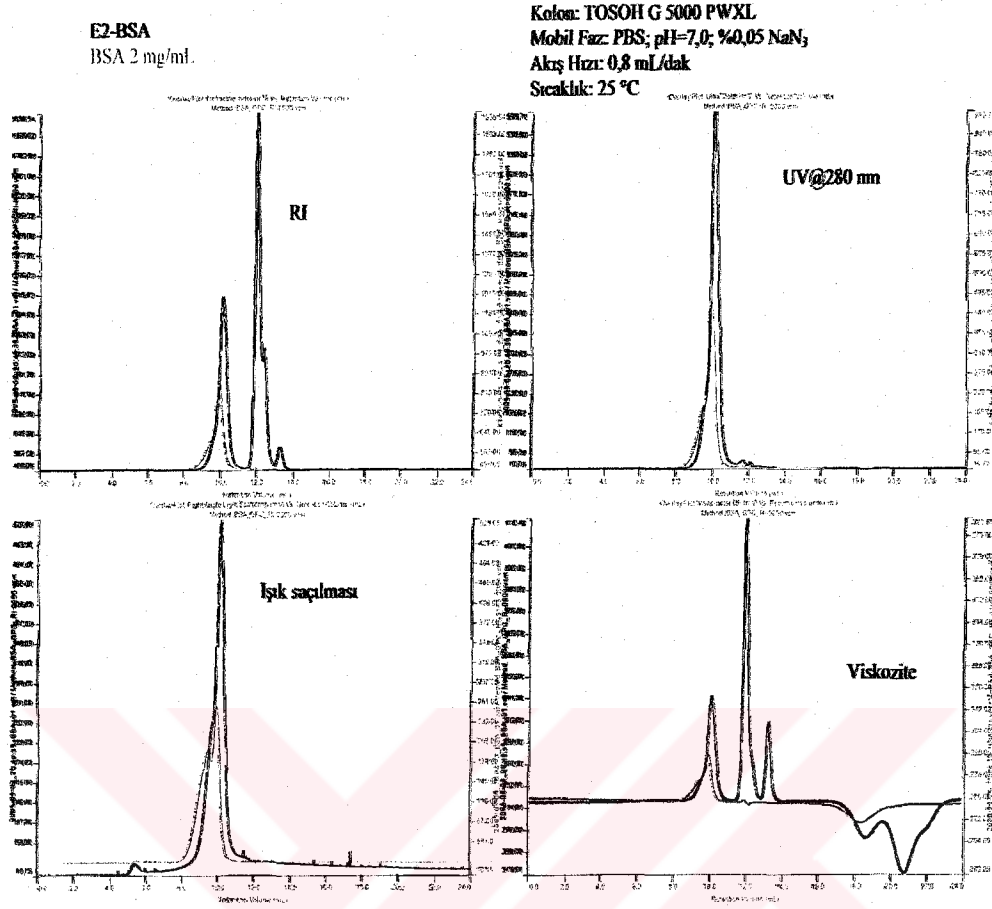
Şekil 7.4.7 1 ml E₂-BSA konjugatı / 3 ml PBS — 1 ml E₂-HRP konjugatı / 3 ml PBS
 — Satın alınan 1 mg HRP / 1ml PBS (Absorpsiyon detector, A₂₈₀)

7.5 Deneysel Çalışma Sırasında Viscotek Cihazından Alınan Sonuçları:



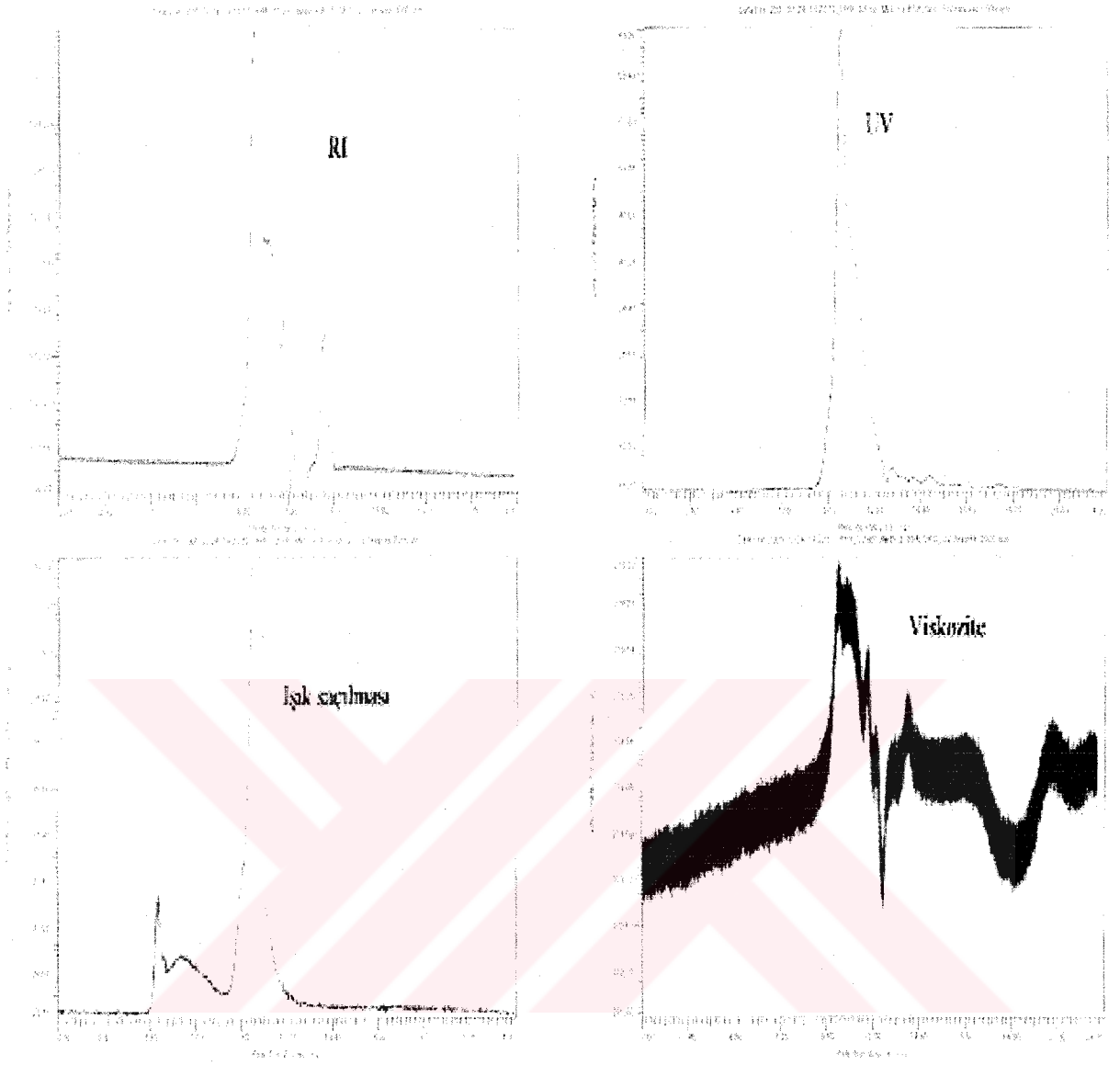
Şekil 7.5.1 1ml E2-6CMO-HRP reaksiyon içeriği / 1ml 0,01 M PBS tampon

1mg HRP/ 1ml 0,01 M PBS tampon



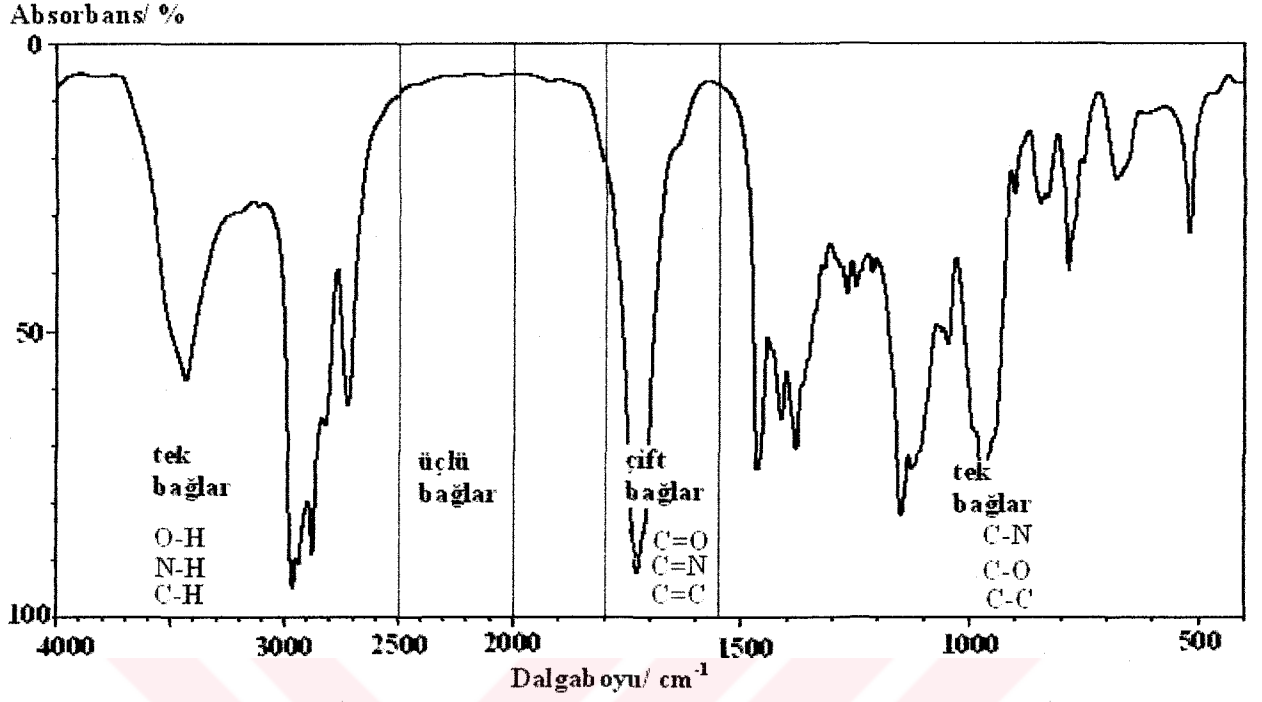
Şekil 7.5.2 1ml E2-6CMO- BSA reaksiyon içeriği / 1ml 0,01 M PBS tampon

2 mg BSA / 1ml 0,01 M PBS tampon



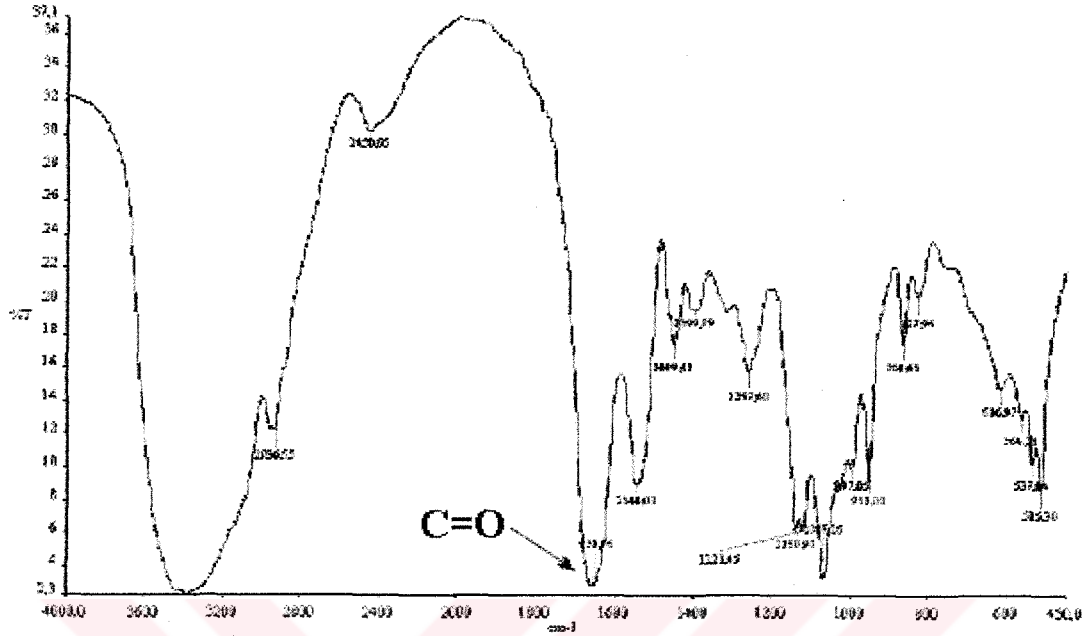
Şekil 7.5.3 Satın alınan 1mg HRP/ 1ml 0,01 M PBS tampon

7.6 FTIR Sonuçları:

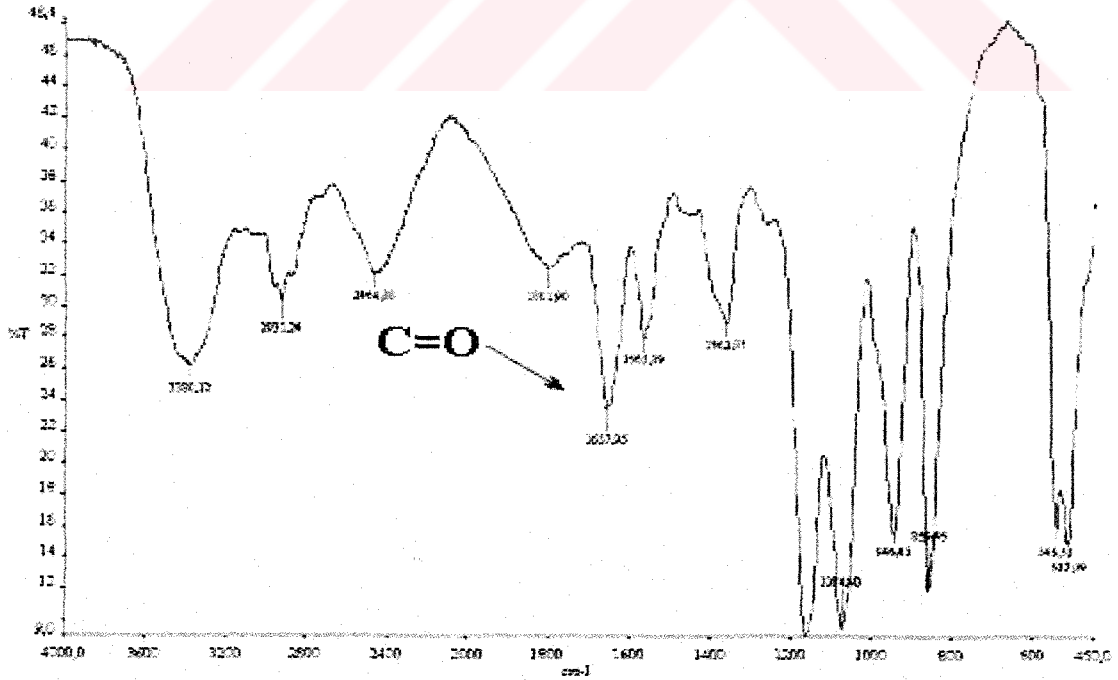


	dalgaboyu
C=O	1715
O-H	3600
N-H	3500
C-O	1100
C=C	1650
C≡C	2150
C-H	3000
C≡N	2250

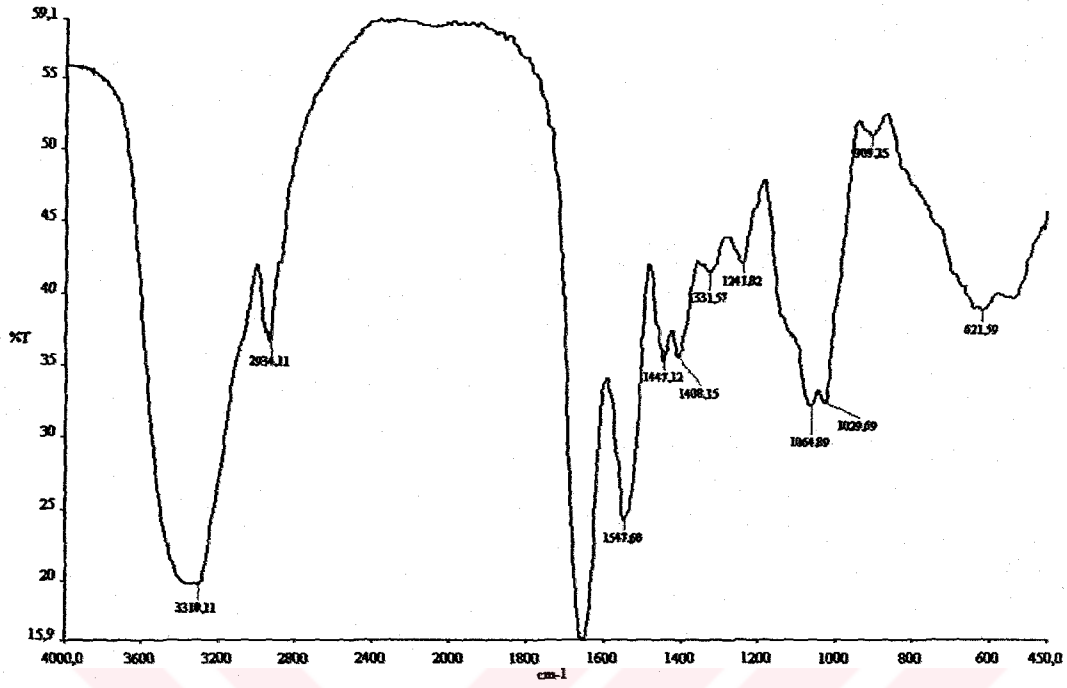
Şekil 7.6.1 FTIR spektrumunda bağların genel absorpsiyon değerleri(www.chem.ucalgary.ca)



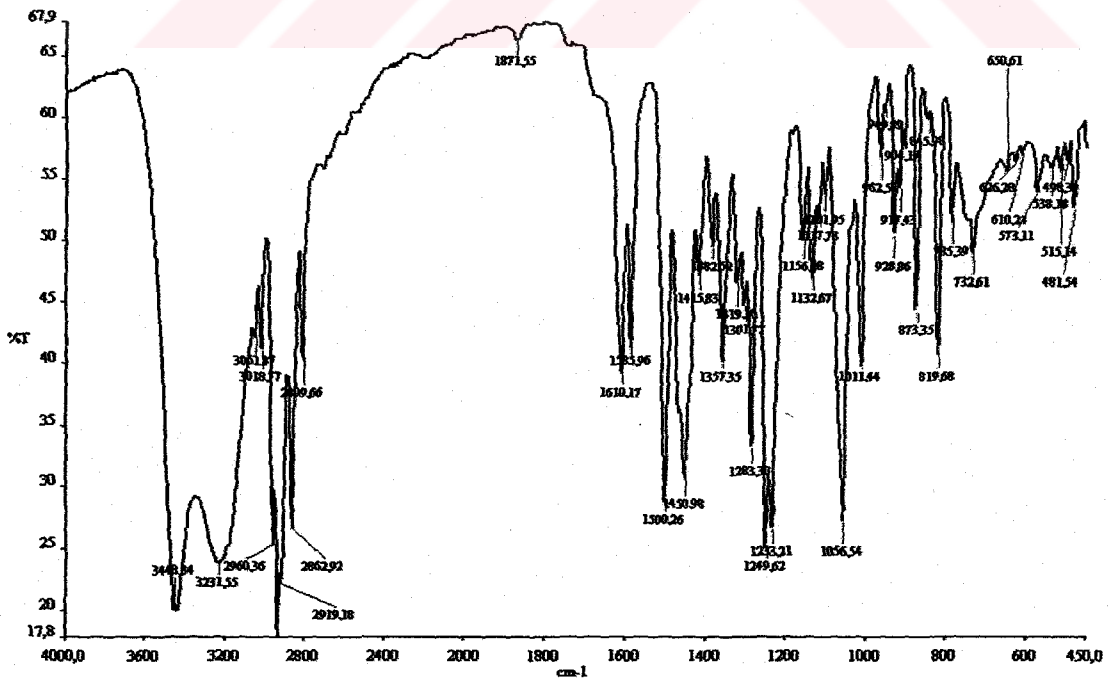
Şekil 7.6.1 2 mg E2-6CM0-HRP reaksiyon içeriği/ 98 mg KBr



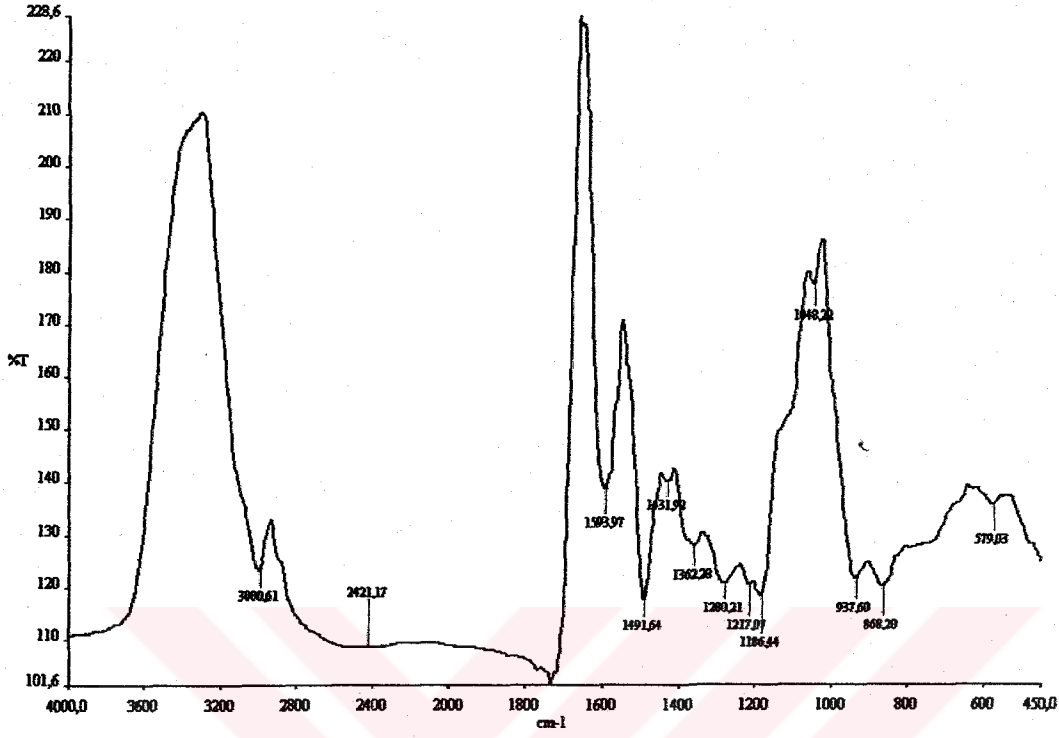
Şekil 7.6.2 2 mg E2-6CM0-BSA reaksiyon içeriği/ 98 mg KBr



Şekil 7.6.3 Satın alınan 1 mg HRP/ 99 mg KBr



Şekil 7.6.4 Satın alınan 1 mg estradiol/ 99 mg KBr



Şekil 7.6.5 Satın alınan 1 mg BSA/ 99 mg KBr

7.7 ELISA Okuyucusu ile Elde Edilen Sonuçlar:

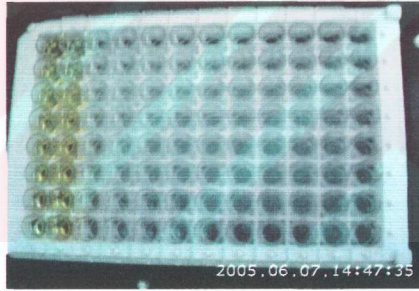
ELISA okuyucusu ile 450 nm’de okunan absorbands değerleri

çizelge 7.7.1

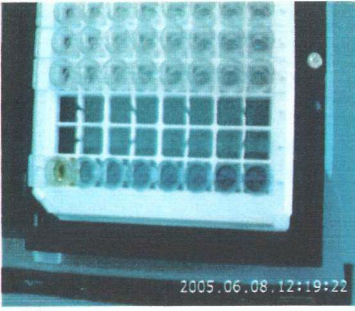
	A ₄₅₀ I	A ₄₅₀ I I
B ₀	1,799	1,808
S1	1,471	1,458
S2	0,909	0,965
S3	0,536	0,490
S4	0,302	0,390
N1	1,823	-----
N2	3,830	-----
N3	4,572	-----
N	4,929	-----
N _x	4,938	-----
N4	1,356	1,331
N5	2,355	2,339
N6	2,917	3,353
N7	5,209	4,941



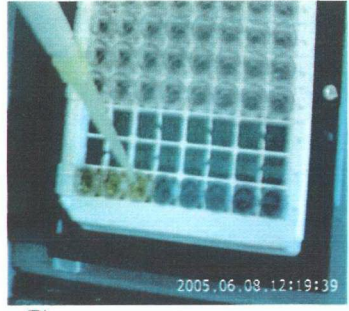
Şekil 7.7.1a Inkübasyon sona erdiğinde kuyucuklara TMB- substrat eklenmesinden sonra çeşitli koyulukta mavi renkli çözelti oluşması.



Şekil 7.7.1b Inkübasyon sonrası kuyucuklara durdurma solusyonunun eklenmesi ile farklı koyulukta sarı renkli çözelti oluşması



(A)

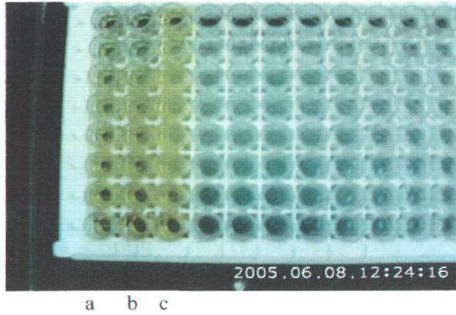


(B)



(C)

Şekil 7.7.2 Farklı konsantrasyonlarda E_2 -HRP konjugatının yer aldığı kuyucuklara substrat (TMB) eklenmesi ile mavi renkli çözelti oluşması (A); ve işlemin devamında durdurma çözeltisi eklenmesi ile rengin sarıya dönmesi (B ve C) görülmektedir.



Şekil 7.7.3 Şekil 7.7.1(a, b) ve Şekil 7.7.2(c)' de belirtilen reaksiyon sonucu farklı koyulukta sarı renkli çözelti oluşumunun birlikte gösterimi.

8. TARTIŞMA VE DEĞERLENDİRME

Klinik laboratuvarlarında estrojen tayini radyoizotopik enzimatik veya lüminesans kitler ile yapılmaktadır. Çalışmamızda bu kitlerin geliştirilmesinde kullanılmak üzere enzim Estradiol-konjugatlarının hazırlanması amaçlanmıştır. Estradiol-enzim konjugatları, immün kitlerin içerdği kuyucuklara önceden immobilize edilmiş antikorlara bağlanarak serum estradiol seviyelerinin ölçülmesine ve estradiol reseptörlerine bağlanarak estradiol pozitif kanser dokusunun incelenmesine imkan sağlamaktadır.

Yapılan çalışmada E_2 -HRP, E_2 -BSA ve E_2 -BSA-RITC kovalent konjugatları Estradiol-6-(O-karboksimetil)-oksim türevi üzerinden sentezlendi. Elde edilen konjugatlar UV-Vis. Spektrofotometre, FTIR, HPLC, Viscotek cihazları kullanılarak karakterize edildi. Ayrıca “Quanta-Master” Spektrofluorometrede E_2 -BSA-RITC konjugatının fluoerans spektrumları alındı.

E_2 -HRP, E_2 -BSA konjugatlarının FTIR spektrumlarında 1715 nm’de gözlenen band kovalent bağlanmanın olduğunu belirtmektedir. HPLC ve Viskotek cihazlarında HRP enzimi, BSA ve bunların estradiol ile elde edilen konjugatları için alınan kromatogramlar az da olsa farklı oldu. E_2 -BSA-RITC konjugatının sentezini takiben diyalizden sonra, rodamin için eksitasyon ve emisyon spektrumları alındı.

Sentezlenen E_2 -HRP konjugatının spesifik antikor bulunduran ticari kite bağlandığı, renk reaktifinin eklenmesinden sonra enzim kataliziyle gerçekleşen reaksiyonun asid çözeltisi ilavesi sonucu durdurulmasından sonra ELISA okuyucusu ile değerlendirildi. Ayrıca işlemin sonunda kuyucuklarda oluştuğu gözlenen sarı renkli çözelti fotoğraf makinesi ile görüntülendi.

KAYNAKLAR

- Adamczyk, M., Mattingly, P., G., Reddy, R., E., Synthesis of 6 β -Aminoestradiol and Its Biotin, Acridinium, and Fluorescein Conjugates, *Steroids*, 63(3), (March 1998): 130-134
- Anneke, M., G., Bosch, D., M., Dijkhuizen, B., K., Van Weemen, Enzyme Immunoassay for Total Oestrogens in Pregnancy Plasma or Serum, *Clinica Chimica Acta*, 89(1), (2 October 1978): 59-70
- Bauke, K., Van, W., Anton H., W., Schuurs, M., The influence of Heterologous Combinations of Antiserum and Enzyme-labeled Estrogen on The Characteristics of Estrogen Enzyme-Immunoassays, *Immunochemistry*, 12(8), (August 1975): 667-670
- Barry, G., Parsons, G., H., Possley R., M., Daniel, S., Midgley, A., Ultrasensitive Semiautomated Chemiluminescent Immunoassay for Estradiol, *Clinical Chemistry* 2002 ; 48:1584-1586.
- Degrand, C., Martre, A., Limoges, B., Schöllhorn, B., Determination of Horseradish Peroxidase and a Peroxidase-like Iron Porphyrin at a Nafion-modified Electrode Analyst, 2001, 126(6) , 887-891
- Draisci, R., Purificato, I., Quadri, F., Volpe, G., Compagnone, D., Palleschi, G., Development of an Electrochemical ELISA for the Screening of 17 β -Estradiol and Application to Bovine Serum, *Analyst*, 2000, 125(8), 1419-1423
- Fránek, M., Bursa, J., Hruska, K., Characteristics of Antibodies Against 17 β -Estradiol in Homologous and Heterologous Systems of Radioimmunoassay, *Journal of Steroid Biochemistry*, 19(3), (September 1983): 1371-1374
- Girish, N., Jehangir, S., Kalyani, D., Khosravi, J., Diamandi, A., Gimpel, T., Castracane, V. D., Patel, S., Frank, Z. Rapid, S.convenient radioimmunoassay of estrone sulfate, *Clinical Chemistry* 1998; 44: 244-249
- Goeij, A., F., Van Zeeland, J.K., Beek, C., J., Bosma, F., T., Steroid-Bovine Serum Albumin Conjugates: Molecular Characterization and Their Interaction with Androgen and Estrogen Receptors, *Journal of Steroid Biochemistry*, 24(5), (May 1986): 1017-1031
- Hironobu, S. ve Nobuhiro, H. (1998), Intratumoral Aromatase in Human Breast, Endometrial, and Ovarian Malignancies, *Endocrine Reviews*, 19(5): 593-607.
- Latif, N., A., ve Mandal, C., Liposome as an Adjuvant for the Production of Estradiol Antibodies, *Immunology Letters* 15 (3), (July 1987): 237-242
- Lindner, H., R., Perel, E., Friedlander, A., Zeitlin, A., Specificity of Antibodies to Ovarian Hormones in Relation to the Site of Attachment of the Steroid Hapten to the Peptide Carrier, *Steroids*, 19(3), (March 1972): 357-375
- Moody, A., Setford, S., Saini, S., Peroxidase Enzyme Sensor for On-line Monitoring of Disinfection Processes in the Food Industry, *Analyst*, 2001, 126(10), 1733-1739
- Numazawa, M., Haryu, A., Kurosaka, K., Nambara, T., Picogram order Enzyme Immunoassay of Oestradiol, *FEBS Letters*, 79 (2), (15 July 1977): 396-398
- Razola, S., S., Aktas, E., Viré, J., C., Kauffmann, J., M., Reagentless Enzyme Electrode Based on Phenothiazine Mediation of Horseradish Peroxidase for Subnanomolar Hydrogen Peroxide Determination, *Analyst*, 2000, 125(1), 79-85
- Roger W., Giese, Advances Measurement of Endogenous Estrogens: Analytical Challenges and Recent Journal of Chromatography A, 1000(1-2), (6 June 2003): 401-412

Sadeh, D., Sela, E., Hexter, C., S., Novel Enzyme Immunoassay for 17β -Estradiol, *Journal of Immunological Methods*, 28(1-2), (10 July 1979): 125-131

Santen, R.J., M.D.1, Harold, A.H., M.D.2, use of aromatase inhibitors in breast carcinoma, *Journal of Women's Cancer*, 2 (3), 121-134, 2000

Yasuhiro, M., Taisuke, N., Takashi, S., Darnel, A., Takuya, M., Chika, K., Kumiko, H., Yukimasa, S., Hideaki, K., Hironobu, S., Systemic Distribution of Steroid Sulfatase and Estrogen Sulfotransferase in Human Adult and Fetal Tissues, *J Clin Endocrinol Metab* 2002 87(12): 5760-5768

Yasuhiro, N., Yasuhiro, M., Takashi, S., Taisuke, N., Darnel, A., Takuya, M., Chika, T., Haruo, S., Tadashi, I., Shoki, T., Shogo, Y., Hironobu, S., Steroid Sulfatase and Estrogen Sulfotransferase in the Atherosclerotic Human Aorta, *Am J Pathol* 2003 ;163: 1329-1339.

Yue-ming, Q. ve Wen-Chao, S. (1999), Regulation of Estrogen Sulfotransferase Expression in Leydig Cells by Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate and Androgen, *Endocrinology*, 140 (3): 1048-1053

İNTERNET ADRESLERİ

www.thais.it/.../schedeit/sc_0028a.htm

www.drashirleydecampos.com.br/noticias.php?no...

www.labmaster.fi/.../elisakits/troponin-i.htm

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi	14.06.1975	
Doğum yeri	Kdz.Ereğli	
Lise	1987-1994	Kdz.Ereğli Anadolu Lisesi
Lisans	1994-1999	Marmara Üniversitesi Atatürk Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümü
Yüksek Lisans	2002-2005	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı

