

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Q HUMMA HASTALIĞINA KARŞI AŞI MODELİ OLUŞTURULMASI
AMACIYLA SENTETİK POLİMERLERİN
LİPOPOLİSAKKARİTLERLE KONJUGATLARININ
GELİŞTİRİLMESİ VE YAPILARININ İNCELENMESİ

Pelin PELİT ARAYICI

DOKTORA TEZİ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Biyomühendislik Programı

Danışman

Doç. Dr. Serap DERMAN

Eş Danışman

Doç. Dr. Mesut KARAHAN

Nisan, 2021

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Q HUMMA HASTALIĞINA KARŞI AŞI MODELİ OLUŞTURULMASI
AMACIYLA SENTETİK POLİMERLERİN
LİPOPOLİSAKKARİTLERLE KONJUGATLARININ
GELİŞTİRİLMESİ VE YAPILARININ İNCELENMESİ

Pelin PELİT ARAYICI tarafından hazırlanan tez çalışması 22.04.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Biyomühendislik Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Serap DERMAN

Yıldız Teknik Üniversitesi

Danışman

Doç. Dr. Mesut Karahan

Üsküdar Üniversitesi

Eş Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Serap DERMAN, Danışman

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Adil Allahverdiyev

Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Emrah Şefik ABAMOR

Yıldız Teknik Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Kadriye KIZILBEY

İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Murat TOPUZOĞULLARI

Yıldız Teknik Üniversitesi

Danışmanım Serap DERMAN sorumluluğunda tarafımca hazırlanan “Q Humma Hastalığına Karşı Aşı Modeli Oluşturulması Amacıyla Sentetik Polimerlerin Lipopolisakkaritlerle Konjugatlarının Geliştirilmesi ve Yapılarının İncelenmesi” başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Pelin PELİT ARAYICI



Bu alışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'nün 2016-07-04-DOP05 numaralı projesi, TÜBİTAK Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Doktora Burs Programı (2211/C) ve 113Z938 nolu 2513-TÜBİTAK- Slovakya Bilimler Akademisi (SAS) ile İkili İş birliğı Programı kapsamında desteklenmiştir.

Minicik oğullarım Aras'ım ve Uraz'ıma...

TEŞEKKÜR

Önce yüksek lisans sonrasında doktora çalışmalarında vefatına kadar tez danışmanlığımı yapan, tez konumu belirleyen, tez çalışmalarım süresince yaptığı değerlendirmeler ile çalışmamın her yönü ile ilerlemesinde yardımcı olan, bu gelişmiş teknoloji ile çalışmama olanak sağlayan, ne yazık ki 06 Nisan 2020'de aramızdan ayrılan, değerli bilim insanı kıymetli hocam, rol modelim, öğrencisi olabildiğim için kendimi şanslı saydığım, rahmetle, minnetle ve özlemle andığım, hem çok saygı duyduğum hem de annem gibi sevdiğim merhume Sn. Doç. Zeynep MUSTAFAEVA AKDESTE' ye en içten teşekkürlerimi sunarım.

Derman'S Lab Araştırma Grubu'nun baş araştırmacısı, Danışmanım, her konuda sonsuz desteğini hissettiğim ve akademik ilerlememde büyük rolü olan genç ve başarılı bilim insanı Sn. Doç. Dr. Serap Derman'a bana güvendiği, inandığı, grubunun ve laboratuvarının kapılarını açtığı, yeni bakış açıları kazanmamı ve yeni alanlara yönelmemi sağladığı için çok teşekkür ederim.

Lisans eğitimimden itibaren akademik hayatımı yönlendirmemde büyük rolü ve desteği olan saygıdeğer hocam eş danışmanım Sn. Doç. Dr. Mesut Karahan'a teşekkür ederim.

Bölümümüzün kurulmasında emekleri geçen Sn. Prof. Dr. Mamed Mustafaev Akdeste ve Prof. Dr. Huriye KUZU'ya, bölümümüzün değerli bölüm başkanı, öğretim üyeleri ve asistanlarına, Kimya-Metalurji Fakültesi Dekanlığına ve Fen Bilimleri Enstitüsüne,

Doktora tezime mali destekte bulunan YTÜ-BAP Koordinatörlüğü'ne ve TÜBİTAK BİDEB 2211/C Yurtiçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı'na;

Bu tez çalışması süresince yapmış oldukları değerlendirmeler ile doktora çalışmama verdikleri destekten ötürü Doktora Tez İzleme Jüri Üyeleri Sn. Prof. Dr. Nesrin Emekli'ye ve Sn. Prof. Dr. Korkut Ulucan'a, takdir ve desteğini her daim hissettiğim Sn. Prof. Dr. Adil Allahverdiyev, Doç. Dr. Emrah Şefik Abamor ve çalışma gruplarına; değerli yönlendirme ve destekleri için Dr. Öğr. Üyesi Murat Topuzoğulları'na ve Dr. Öğr. Üyesi Kadriye Kızılbey'e, KMC-306-307'de çalışan tüm arkadaşlarıma ve KME-306'da beni destekleyen ofis arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Lisans, yüksek lisans ve doktora... YTÜ'de geçen yıllar... Ekürim, değerli arkadaşım, bilim yoldaşlarımdan Sn. Dr. Tayfun ACAR'a ve tez konusundaki destekleri ve motivasyonundan dolayı Sn. Dr. Burcu UÇAR ACAR'a çok teşekkür ederim. Her zaman bir telefon kadar yakınımda olan hem arkadaş hem kızkardeş Sn. Yüksek Mühendis Hatice Kübra Büyükbayraktar'a teşekkürler.

Hayatım boyunca beni her konuda destekleyen, fedakar, özverili, hakkını ödeyemeyeceğim canım annem Tülin Pelit ve babam Faik Pelit, benim harika ailem, hem torunlarınız adına hem kendim için çok teşekkür ederim, iyi ki varsınız, her zaman her koşulda arkamda olduğunuz için çok şanslıyım.

Hayat ışıklarım, şükür sebeplerim, biricik yavrularım, minicik oğullarım Aras'ım ve Uraz'ım, beni sonsuz sevgiyle tanıştırdığınız, gülücükleriniz, agucuklarınız ve o güzel bakışlarınızla bana hayat motivasyonu sağladığınız, bana bu harika annelik duygusunu yaşattığınız için çok teşekkür ederim.

Pelin PELİT ARAYICI

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	ix
KISALTMA LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xi
TABLO LİSTESİ	xvi
ÖZET	xvii
ABSTRACT	xix
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	3
1.3 Hipotez	3
2 GENEL BİLGİLER	5
2.1 Q Humması Hastalığı	5
2.1.1 Tanımı ve Tarihçesi	5
2.1.2 Etkeni	6
2.1.3 Klinik Bulgular ve Patojenisi	9
2.1.4 Epidemiyoloji	12
2.1.5 Tanı	16
2.1.6 Tedavi	21
2.1.7 Korunma ve Kontrol	22
2.1.8 Aşılar	23
2.1.9 Gelecekteki yönlendirmeler	25
2.2 Lineer Polimer Özellikteki Antijen Taşıyıcılar	27

2.2.1	Polioksidonyum (POX)	27
2.2.2	Poli(N-Vinil-2-Pirolidon-ko-Akrilikasid) P(VP-ko-AA)	29
2.3	Polielektrolit-Antijen Kompleksleri	30
2.4	Biyokonjugasyon ve Çapraz Bağlama Reaktifleri	31
3	DENEYSEL ÇALIŞMALARDA KULLANILAN ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ	33
3.1	Kullanılan Malzemelerin ve Cihazların Listesi	33
3.1.1	Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasalların Listesi	33
3.1.2	Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazların Listesi	35
3.2	Deneylerde Kullanılan Çözeltiler	36
3.3	Kullanılan Ölçüm Yöntemleri	38
3.3.1	GPC (Jel Geçirgenlik-Moleküler Eleme Kromatografisi)	38
3.3.2	Boyut ve Zeta Potansiyel Ölçümleri	38
3.3.3	FTIR Spektroskopisi	39
3.3.4	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC)	39
3.3.5	ELISA	40
3.3.6	Konjugatların Saflaştırılması	42
4	DENEYSEL KISIM	
	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	
4.1	Lipopolisakkarit İzolasyonu	44
4.1.1	<i>Coxiella burnetii</i> hücrelerinin kültüre alınması ve saflaştırılması	44
4.2	Poli(N-Vinil-2-Pirolidon-ko-Akrilikasid) polimerinin sentezi:	44
4.3	Komplekslerin Hazırlanması ve Konjugatların Sentezi	46
4.3.1	LPS ile komplekslerin hazırlanması	46
4.3.2	Konjugatların Oluşturulması	49
4.4	<i>In Vivo</i> Deneyler	58

5 DENEY SONUÇLARI	65
5.1 LPS İzolasyonuna ait Sonuçlar	65
5.2 Polimerlere ait Bulgular	66
5.3 Komplekslerin ve Konjugatların Analizlerine Ait Bulgular.....	73
6 SONUÇ VE ÖNERİLER	110
6.1 LPS nin izolasyonuna ve Karakterizasyonuna ait Tartışma	110
6.2 Polimerlerin Sentezine ve Karakterizasyonuna Ait Tartışma	110
6.3 Komplekslerin ve Konjugatların Analizine Ait Tartışma.....	111
6.3.1 LPS ile Komplekslerin Analizine Ait Bulgular.....	111
6.3.2 Konjugatların Oluşuma Ait Tartışma.....	120
6.4 ELISA Deneylerine Ait Tartışmalar	
6.4.1 ELISA Kaplamada Kullanılması İçin Gerçekleştirilen LPS-BSA Konjugatlarına Ait Tartışma.....	124
6.4.2 ELISA Platelerine LPS Kaplamada Standardizasyon Çalışmasına Ait Tartışma.....	126
6.4.3 Dolaylı ELISA Yöntemi Kullanılarak Farelerden Alınan Serum Örneklerinde Fiziksel Karışım, Metal Kompleksleri ve Biyokonjugatlara Karşı Oluşan Antikor Miktar Tayini Sonuçlarına Ait Tartışma.....	126
KAYNAKÇA	129
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	142

SİMGE LİSTESİ

Å	Angström
Da	Dalton
dak	Dakika
°C	Derece santigrat
g	Gram
kDa	Kilodalton
L	Litre
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mMol	Milimol
mV	Milivolt
n	Mol
M	Molarite
ng	Nanogram
nm	Nanometre
ζ	Zeta potansiyel

KISALTMA LİSTESİ

BSA	Bovin (Sığır) Serum Albumin
CDC	Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri (Centers for Disease Control and Prevention)
DCM	Diklormetan
DMSO	Dimetil sülfoksit
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid
ELISA	Enzim Bağlı İmmün Assay
FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
FT-IR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (Fourier transform infrared spectroscopy)
GPC	Moleküler eleme kromatografisi (Gel permeation chromatography)
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (High performance liquid chromatography)
LC-MS	Sıvı kromatografi-kütle spektroskopisi (Liquid chromatography-mass spectroscopy)
LPS	Lipopolisakkarit
NaCl	Sodyum klorür
PAA	Poliakrilikasit
PBS	Fosfat tamponlu tuz (Phosphate buffered saline)
pH	Hidrojenin gücü (Power of hydrogen)
PNFP	Paranitrofenil fosfat
PVA	Polivinilalkol
Q-Fever	Query Fever
RI	Kırılma indisi
RALS	Işık saçılması
SEM	Taramalı elektron mikroskopisi (Scanning electron microscopy)
UV	Ultraviolet
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (The World Health Organization)

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1 Coxiella burnetti 'nin elektron mikroskop görüntüsü [43]	7
Şekil 2. 2 Polioksidonyumun Yapısı [21]	28
Şekil 2. 3 Poli(N-Vinil-2-Pirolidon-ko-Akrilikasid)' in yapısı [112]	29
Şekil 2. 4 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür molekülünün kimyasal yapısı [122]	32
Şekil 4. 1 Poli(N-Vinil-2-Pirolidon-ko-Akrilikasid) polimerinin sentezinin şematik gösterimi.....	44
Şekil 4. 2 P(VP-ko-AA) polimerinin sentezine ait deney düzeneğinin şematik gösterimi.....	45
Şekil 4. 3 P(VP-ko-AA)-LPS Fiziksel kompleks hazırlanış şeması.....	46
Şekil 4. 4 Polioksidonyum-LPS fiziksel kompleks hazırlanış şeması.....	47
Şekil 4. 5 P(VP-ko-AA)- Cu ²⁺ -LPS komplekslerinin hazırlanış şeması	48
Şekil 4. 6 Polioksidonyum-Cu ²⁺ -LPS komplekslerinin hazırlanış şeması	49
Şekil 4. 7 EDC kullanılarak gerçekleştirilen biyopolimer-LPS konjugatının sentez mekanizması [150].....	50
Şekil 4. 8 Ardışık hidroksil gruplarının periyodat oksidasyonu ile aldehit gruplarına dönüştürülmesi [130]	50
Şekil 4. 9 LPS' nin NaIO ₄ ile oksidasyon mekanizması	51
Şekil 4. 10 Lipopolisakkaritin aldehit türevinin oluşumuna ait hazırlanış şeması.....	52
Şekil 4. 11 Aldehit içeren moleküllerin amin türevlerinin oluşturulmasına ait genel mekanizması	53
Şekil 4. 12 Amin türevlerinin oluşturulmasına ait reaksiyon mekanizması	53
Şekil 4. 13 LPS'nin amin türevlerinin oluşturulmasına ait hazırlanış şeması.....	53
Şekil 4. 14 H ₂ N-LPS'nin biyopolimerle konjugasyonuna ait reaksiyon mekanizması	54
Şekil 4. 15 NH ₂ -LPS'nin P(VP-ko-AA) ile Konjugasyonunun hazırlanış şeması	55
Şekil 4. 16 H ₂ N-LPS'nin POX ile konjugasyonunun hazırlanış şeması	56
Şekil 4. 17 Kloranhidridin eldesi	56
Şekil 4. 18 Polimer-LPS konjugatı	57
Şekil 4. 19 LPS-P(VP-ko-AA) konjugatının SOCl ₂ yöntemi ile konjugasyon hazırlanış şeması.....	58
Şekil 4. 20 Balb/c türü farelerimiz.....	59
Şekil 4. 21 Balb/c fareye karıncıktan enjeksiyon yapılışı.....	59
Şekil 4. 22 Fare serumlarının alınması ve serumlarının ayrıldığı santrifüj aşamaları işlemleri	62
Şekil 5. 1 LPS molekülünün Zetasizer a) boyut dağılımı ve b) zeta potansiyel grafiği	65
Şekil 5. 2 LPS molekülünün FTIR spektrumu	66
Şekil 5. 3 P(VP-ko-AA)' ye ait GPC kırılma indisi kromatogramı.....	67
Şekil 5. 4 P(VP-ko-AA)'ye ait GPC ışık saçılması kromatogramı	67
Şekil 5. 5 Sentezlenen Poli (N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) polimerinin GPC kırılma indisi kromatogramına göre molekül ağırlığı tayini.....	68

Şekil 5. 6 P(VP-ko-AA) polimerinin a) boyut dağılımı ve b) zeta potansiyel grafiği	69
Şekil 5. 7 Akrilik asit, vinil pirolidon monomerlerine ve sentezlenen P(VP-ko-AA) polimerine ait FTIR spektrumu	70
Şekil 5. 8 P(VP-ko-AA) polimerine ait NMR spektrumu	71
Şekil 5. 9 POX polimerinin Zetasizer a) boyut dağılımı ve b) zeta potansiyel grafiği	72
Şekil 5. 10 POX polimerine ait FTIR spektrumu	72
Şekil 5. 11 LPS-P(VP-ko-AA) fiziksel komplekslerinin Zetasizer a) boyut dağılımı ve b) zeta potansiyel grafiği	73
Şekil 5. 12 LPS-P(VP-ko-AA) fiziksel kompleksine ait FTIR spektrumu	74
Şekil 5. 13 LPS, P(VP-ko-AA) ve LPS-P(VP-ko-AA) fiziksel kompleksine ait karşılaştırmalı FTIR spektrumu	74
Şekil 5. 14 LPS-POX fiziksel komplekslerinin Zetasizer a) boyut dağılımı ve b) zeta potansiyel grafiği	75
Şekil 5. 15 LPS-POX fiziksel kompleksine ait FTIR spektrumu	75
Şekil 5. 16 P(VP-ko-AA)-Cu ²⁺ -LPS-1 kompleksinin Zetasizer a) boyut dağılımı ve b) zeta potansiyel grafiği	76
Şekil 5. 17 P(VP-ko-AA)-Cu ²⁺ -LPS-2 kompleksinin Zetasizer a) boyut dağılımı ve b) zeta potansiyel grafiği	76
Şekil 5. 18 P(VP-ko-AA)-Cu ²⁺ -LPS-1 FTIR spektrumu	77
Şekil 5. 19 P(VP-ko-AA)-Cu ²⁺ -LPS-2 Kompleksine ait FTIR spektrumu	78
Şekil 5. 20 CuSO ₄ .5H ₂ O'a ait FTIR spektrumu	78
Şekil 5. 21 LPS, P(VP-ko-AA)-Cu ²⁺ -LPS-1 Kompleksi (Komp.1) ve P(VP-ko-AA) ve LPS'ye ait karşılaştırmalı FTIR spektrumu	79
Şekil 5. 22 POX-Cu ²⁺ -LPS-1 kompleksine ait Zetasizer a) boyut dağılımı ve b) zeta potansiyel grafiği	80
Şekil 5. 23 POX-Cu ²⁺ -LPS-2 kompleksine ait Zetasizer a) boyut dağılımı ve b) zeta potansiyel grafiği	80
Şekil 5. 24 POX-Cu ²⁺ -LPS-1 Kompleksine ait FTIR spektrumu	81
Şekil 5. 25 POX-Cu ²⁺ -LPS-2 Kompleksine ait FTIR spektrumu	81
Şekil 5. 26 LPS'nin aldehit türevinin FTIR spektrumu	82
Şekil 5. 27 n _{P(VP-ko-AA)} /n _{LPS} oranları 0,5; 1 ve 2 olan konjugatlara ait LPS ve polimer ile kıyaslamalı GPC Kırılma İndisi kromatogramı	83
Şekil 5. 28 n _{P(VP-ko-AA)} /n _{LPS} oranları 0,5; 1 ve 2 olan konjugatlara ait LPS ve polimer ile kıyaslamalı GPC UV kromatogramı	83
Şekil 5. 29 n _{P(VP-ko-AA)} /n _{LPS} oranları 0,5; 1 ve 2 olan konjugatlara ait LPS ve polimer ile kıyaslamalı GPC Işık Saçılması kromatogramı	84
Şekil 5. 30 LPS'ye (♣) ait HPLC kromatogramı	85
Şekil 5. 31 P(VP-ko-AA)' ya (♣) ait HPLC kromatogramı	85
Şekil 5. 32 LPS (♣); P(VP-ko-AA) (♣) ve n=0,5 oranındaki LPS- P(VP-ko-AA) (♣) konjugatına ait kıyaslamalı HPLC Kromatogramı	86
Şekil 5. 33 LPS (♣); P(VP-ko-AA) (♣) ve n=1 oranındaki LPS- P(VP-ko-AA) (♣) konjugatına ait kıyaslamalı HPLC Kromatogramı	86
Şekil 5. 34 LPS (♣); P(VP-ko-AA) (♣) ve n=2 oranındaki LPS- P(VP-ko-AA) (♣) konjugatına ait kıyaslamalı HPLC Kromatogramı	87
Şekil 5. 35 LPS (♣); P(VP-ko-AA) (♣); LPS- P(VP-ko-AA) oranlarına ait n=0,5 (♣); n=1(♣); n=2(♣) ait kıyaslamalı HPLC Kromatogramı	87

Şekil 5. 36 Karbodiimid yöntemiyle sentezlenmiş olan $n_{P(VP-ko-AA)}/n_{LPS}=0,5$ oranındaki konjugatın FTIR analiz sonucu	88
Şekil 5. 37 Karbodiimid yöntemiyle sentezlenmiş olan $n_{P(VP-ko-AA)}/n_{LPS}=1$ oranındaki konjugatın FTIR analiz sonucu	88
Şekil 5. 38 Karbodiimid yöntemiyle sentezlenmiş olan $n_{P(VP-ko-AA)}/n_{LPS}=2$ oranındaki konjugatın FTIR analiz sonucu	89
Şekil 5. 39 Karbodiimid yöntemiyle sentezlenmiş olan $n_{P(VP-ko-AA)}/n_{LPS}=0,5$ (♣); 1(♣); 2(♣) oranlarındaki konjugatların karşılaştırmalı FTIR analiz sonucu	89
Şekil 5. 40 $n_{P(VP-ko-AA)}/n_{LPS}=0,5; 1; 2$ oranlarındaki konjugatlara ait polimer ile karşılaştırmalı zeta potansiyel değerleri (mV cinsinden).....	90
Şekil 5. 41 n_{POX}/n_{LPS} oranları 0,5; 1 ve 2 olan konjugatlara ait LPS ve polimer ile kıyaslamalı GPC Kırılma İndisi kromatogramı	91
Şekil 5. 42 n_{POX}/n_{LPS} oranları 0,5; 1 ve 2 olan konjugatlara ait LPS ve polimer ile kıyaslamalı GPC UV kromatogramı	91
Şekil 5. 43 n_{POX}/n_{LPS} oranları 0,5; 1 ve 2 olan konjugatlara ait LPS ve polimer ile kıyaslamalı GPC Işık Saçılması Kromatogramı	92
Şekil 5. 44 Polioksidonyuma (POX) (♣) ait HPLC kromatogramı.....	93
Şekil 5. 45 LPS (♣); POX (♣) ve $n=0,5$ oranındaki LPS-POX (♣) konjugatına ait kıyaslamalı HPLC Kromatogramı.....	93
Şekil 5. 46 LPS (♣); POX (♣) ve $n=1$ oranındaki LPS-POX (♣) konjugatına ait kıyaslamalı HPLC Kromatogramı.....	94
Şekil 5. 47 LPS (♣); POX (♣) ve $n=2$ oranındaki LPS-POX (♣); konjugatına ait kıyaslamalı HPLC Kromatogramı.....	94
Şekil 5. 48 LPS (♣); POX (♣); LPS-POX konjugatının $n=0,5$ (♣); $n=1$ (♣); $n=2$ (♣) oranlarına ait kıyaslamalı HPLC Kromatogramı	95
Şekil 5. 49 Karbodiimid yöntemiyle sentezlenmiş olan $n_{POX}/n=0,5$ oranındaki konjugatın FTIR Spektrumu.....	95
Şekil 5. 50 Karbodiimid yöntemiyle sentezlenmiş olan $n_{POX}/n_{LPS}=1$ oranındaki konjugatın FTIR Spektrumu.....	96
Şekil 5. 51 Karbodiimid yöntemiyle sentezlenmiş olan $n_{POX}/n_{LPS}=2$ oranındaki konjugatın FTIR Spektrumu.....	96
Şekil 5. 52 Karbodiimid yöntemiyle sentezlenmiş olan $n_{POX}/n_{LPS}=0,5$ (♣); 1(♣); 2(♣) oranlarındaki konjugatların karşılaştırmalı FTIR Analiz Sonucu	97
Şekil 5. 53 Polioksidonyum-LPS Konjugatlarına ait polimer ve LPS kıyaslamalı zeta potansiyel değerleri	97
Şekil 5. 54 $SOCl_2$ varlığında sentezlenen LPS- P(VP-ko-AA) konjugatına (♣) ait HPLC kromatogramı	98
Şekil 5. 55 LPS (♣); P(VP-ko-AA) (♣) ve $SOCl_2$ yöntemi ile sentezlenmiş $n=0,5$ oranındaki LPS-P(VP-ko-AA) (♣) konjugatına ait kıyaslamalı HPLC Kromatogramı	99
Şekil 5. 56 LPS (♣); $SOCl_2$ yöntemi ile sentezlenmiş $n=0,5$ oranındaki LPS- P(VP-ko-AA) (♣) konjugatı ve LPS çözeltisi ilave edilen $n=0,5$ oranındaki LPS- P(VP-ko-AA) (♣) konjugatına ait kıyaslamalı HPLC Kromatogramı	100
Şekil 5. 57 Tiyonil klorür yöntemi ile sentezlenmiş P(VP-ko-AA)-LPS konjugatına ait FTIR spektrumu	100
Şekil 5. 58 1.Yöntemle sentezlenmiş LPS-BSA Konjugatı (♣), 2. Yöntemle sentezlenmiş LPS-BSA konjugatı (♣), 3. Yöntemle sentezlenmiş LPS-BSA	

konjugatı (♣), BSA proteinine (♣) ait GPC Işık Saçılması Kromatogramı	101
Şekil 5. 59 ELISA platelerinin LPS ile kaplanma standardizasyonu.....	102
Şekil 5. 60 LPS (♦), P(VP-ko-AA) (♦), LPS- P(VP-ko-AA) Fiziksel Kompleksi (♦), LPS- P(VP-ko-AA) Konjugatı n=1 oranı (♦) ve LPS- P(VP-ko-AA) Konjugatı n=2 oranı (♦) enjekte edilen farelerden 58 gün boyunca aralıklarla alınan serumlardaki antikor miktarlarının karşılaştırılması	103
Şekil 5. 61 LPS (♦), P(VP-ko-AA) (♦), LPS- P(VP-ko-AA) Fiziksel Kompleksi (♦), LPS-Cu ²⁺ -P(VP-ko-AA) kompleksi 1. oranı (♦) ve LPS-Cu ²⁺ -P(VP-ko-AA) kompleksi 2. oranı (♦) enjekte edilen farelerden 58 gün boyunca aralıklarla alınan serumlardaki antikor miktarlarının karşılaştırılması	105
Şekil 5. 62 LPS (♦), POX (♦), LPS-POX Fiziksel Kompleksi (♦), LPS-POX Konjugatı (♦) için enjekte edilen farelerden 58 gün boyunca aralıklarla alınan serumlardaki antikor miktarlarının karşılaştırılması	106
Şekil 5. 63 LPS (☐), POX (☐), LPS-POX Fiziksel Kompleksi (☐), LPS-Cu ²⁺ -POX Konjugatı (☐) için LPS-Cu ²⁺ -POX Kompleksi 2. oranı (☐) enjekte edilen farelerden 58 gün boyunca aralıklarla alınan serumlardaki antikor miktarlarının karşılaştırılması.....	107
Şekil 5. 64 LPS (♦), P(VP-ko-AA) (♦), LPS- P(VP-ko-AA) Konjugatı n=1 oranı (♦), LPS- P(VP-ko-AA) Konjugatı n= 2 oranı (♦) ve LPS-P(VP-ko-AA)-Freund's Adjuvantı (♦), LPS+Freund's Adjuvantı (♦) enjekte edilen farelerden 51 gün boyunca aralıklarla alınan serumlardaki antikor miktarlarının karşılaştırılması	108
Şekil 5. 65 LPS (♦), LPS-IFA (♦), LPS- BSA-Freund's Adjuvantı (♦) enjekte edilen farelerden 51 gün boyunca aralıklarla alınan serumlardaki antikor miktarlarının karşılaştırılması.....	109
Şekil 6. 1 LPS, P(VP-ko-AA) ve LPS-P(VP-ko-AA) fiziksel kompleksinin Z-ave değerlerinin kıyaslamalı grafiği.....	112
Şekil 6. 2 LPS, P(VP-ko-AA) ve LPS-P(VP-ko-AA) fiziksel kompleksinin zeta potansiyel değerlerinin kıyaslamalı grafiği	113
Şekil 6. 3 LPS, POX ve LPS-POX fiziksel kompleksinin Z-ave değerlerinin kıyaslamalı grafiği.....	114
Şekil 6. 4 LPS, POX ve LPS-POX Fiziksel kompleksinin zeta potansiyel değerlerinin kıyaslamalı grafiği.....	115
Şekil 6. 5 LPS, P(VP-ko-AA) ve P(VP-ko-AA)-Cu ²⁺ -LPS-1 ve P(VP-ko-AA)-Cu ²⁺ -LPS- 2 kompleksinin Z-ave değerlerinin kıyaslamalı grafiği.....	116
Şekil 6. 6 LPS ile polimerin bakır metali varlığında oluşturduğu kompleks yapısının şematik gösterimi.....	116
Şekil 6. 7 LPS, P(VP-ko-AA) ve P(VP-ko-AA)-Cu ²⁺ -LPS-1 (Komp.1) ve P(VP-ko-AA)- Cu ²⁺ -LPS-2 (Komp. 2) kompleksinin zeta potansiyel değerlerinin kıyaslamalı grafiği.....	117
Şekil 6. 8 LPS, POX, POX-Cu ²⁺ -LPS1 (Komp. 1) ve POX-Cu ²⁺ -LPS2 (Komp. 2) kıyaslamalı Z-Ave (d.nm) değerleri.....	118
Şekil 6. 9 LPS, POX, POX-Cu ²⁺ -LPS1 (Komp. 1) ve POX-Cu ²⁺ -LPS2 (Komp. 2) kıyaslamalı zeta potansiyel değerleri (mV)	119
Şekil 6. 10 P(VP-ko-AA) ve LPS-P(VP-ko-AA) konjugatlarının n=0,5; 1 ve 2 oranlarının RALS ve UV alanları.....	121

Şekil 6. 11 POX ve LPS-POX konjugatlarının 0,5; 1 ve 2 oranlarına ait pik alanları	123
Şekil 6. 12 1. yöntemle, 2. yöntemle ve 3. yöntemle sentezlenen LPS-BSA konjugatlarının BSA kıyaslamalı pik alanlarına ait grafik.....	125

TABLO LİSTESİ

Tablo 3. 1 Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar 33

Tablo 4. 1 Kafes numaraları, fare sayıları ve enjekte edilen maddenin içeriği 60

Q Humma Hastalığına Karşı Aşı Modeli Oluşturulması Amacıyla Sentetik Polimerlerin Lipopolisakkaritlerle Konjugatlarının Geliştirilmesi ve Yapılarının İncelenmesi

Pelin PELİT ARAYICI

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Doç. Dr. Serap DERMAN

Eş-Danışman: Doç. Dr. Mesut KARAHAN

Biyopolimerlerin lipopolisakkarit, protein, peptid ve diğer biyomoleküllerle komplekslerinin oluşturulması ve konjugasyonu tıp, eczacılık, biyoteknoloji ve biyomühendislik alanlarında uygulamalar için çeşitli yenilikler getirmektedir. Son zamanlarda polimer-biyomolekül kompleks ve konjugatları proteinlerin saflaştırılmasında, enzim kararlılığının arttırılmasında, yeni nesil aşı sistemleri ve tanı kitlerinin geliştirilmesinde, biyosensör üretimi, kontrollü ilaç salımı ve doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmaktadırlar.

Q hummasının etiyolojik ajanı lipopolisakkarit yapısındaki *Coxiella burnetii*'dir. Q humması tüm dünyada en sık görülen zoonotik hastalıklardan biridir. İnsanlarda meydana getireceği kalıcı enfeksiyonlar Q hummasının kronik formuna yol açabilir ve sıklıkla ölümcül olabilmektedir. Ancak bu hastalığa karşı sentetik aşı geliştirilmesine zemin hazırlayacak olan Polimer-Lipopolisakkarit kompleks ve konjugatları geliştirilmesi temelinde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Tez kapsamında hastalık etkeni olarak antijenik *Coxiella burnetii* lipopolisakkariti ve adjuvan olarak Poli(vinilpirolidon-ko-akrilikasid) ve polioksidonyum biyopolimerleri kullanılmıştır. Belirtilen biyopolimerler ve lipopolisakkarit kullanılarak, (1) fiziksel karışımla Polimer-lipopolisakkarit kompleksleri, (2) Bakır metal iyonu aracılığı ile 3'lü Polimer-Bakır-lipopolisakkarit kompleksleri ve (3) çapraz bağlayıcı aracılığı ile biyokonjugatlar oluşturulmuş ve karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir.

Hazırlanan bu kompleks ve konjugatların Balb/c farelerde aşı adayı olarak değerlendirilmeleri ELISA metoduyla, oluşturdukları antikor seviyeleri saptanarak gerçekleştirilmiştir. Alınan en iyi antikor seviyesi oranındaki kompleks ve konjugatımızın aşı prototipi olarak tespiti yapılmıştır.

Tez sonucunda yeni tip aşı prototipi üretilmesi tezin önemli çıktılarından biri olmuştur. Gelecekte patent başvurusu yapılarak aşı ve/veya teşhis amaçlı bir kit olarak değerlendirilmesi için ileri çalışmalarının yapılması planlanmaktadır. Yapılan bu çalışmanın farklı hastalıklar için de üretilecek aşı ve tanı kitleri çalışmalarına alt yapı ve bilgi birikimi açısından büyük katkısı olacağını ve ülkemizin dışa bağımlılığını azaltmada yardımcı olacağını düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Q humması, LPS, bakır kompleksleri, biyokonjugat, ELISA, Balb/c

Development and Structure Analysis of Synthetic Polymers and Lipopolysaccharide Conjugates to Form a Vaccine Model for Q Fever

Pelin PELİT ARAYICI

Department of Biongeneering

PhD. Thesis

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Serap DERMAN

Co-advisor: Assoc. Prof. Dr. Mesut KARAHAN

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

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

Within the scope of the thesis, antigenic *Coxiella burnetii* lipopolysaccharide as a disease agent and Poly (vinylpyrrolidone-co-acrylic acid) and polyoxidonium biopolymers were used as an adjuvant. By using the specified biopolymers and lipopolysaccharide, (1) Polymer-lipopolysaccharide complexes with physical

mixture, (2) Polymer-Copper-lipopolysaccharide complexes via copper metal ion and (3) bioconjugates were formed by means of crosslinker and their characterization was performed.

These complexes and conjugates were injected into Balb/c mice and antibody levels were determined by ELISA method. We have determined that the best antibody level ratio of the complex and conjugate is the vaccine prototype.

New types of vaccine prototypes were produced with the outputs obtained from the thesis. It is planned to commercialize it as a vaccine and diagnostic kit with its patents in the future. We think that this study will be a great contribution to the construction of vaccines and diagnostic kits to be produced for different diseases and will eliminate the foreign dependency of our country.

Key Words: Q fever disease, LPS, copper complexes, bioconjugate, ELISA, Balb/c

1.1 Literatür Özeti

Tüm dünyada yaygın olan Q ateşi, *Coxiella burnetii* (*C. burnetii*) adı verilen zorunlu hücre içi ve gram negatif kokobasillerin neden olduğu zoonotik ve bulaşıcı bir enfeksiyondur [1, 2]. Antarktika ve muhtemelen Yeni Zelanda dışında tüm dünyada endemik olan bu hastalık eklem bacaklılar, kuşlar, evcil ve vahşi hayvanların yanı sıra insanları da etkilemektedir [3].

İnsanlarda Q ateşi asemptomatik olabilir veya semptomları influenza veya atipik pnömoni ile karıştırılabilir. Birincil bulaşma yolu, *C. burnetii* ile kontamine olmuş toz ve damlacıkların solunmasıdır, ancak insanlara doğrudan temas yoluyla da bulaşabilir [4, 5]. Q humması iyi bilinmemekle birlikte, uzman merkezlerden araştırma toplanması ve *C. burnetii*'nin Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri tarafından bir biyoterörizm ajanı olarak tanımlanması, hastalığın aşinalığını artırmıştır. Bu nedenle bu hastalık için teşhis ve önleme büyük önem taşımaktadır [6].

C. burnetii, pleomorfik gram negatif kokobasil ve yaklaşık 0,2 ila 0,4 µm genişliğinde ve 0,4 ila 1 µm uzunluğunda küçük bir bakteridir [7, 8]. LPS'ler, gram negatif bakterilerin dış zarlarının ana bileşenlerinden biridir. Güçlü immünostimülatörler olarak kabul edilen LPS'ler, dış zarların fiziksel organizasyonu ve işlevi için ve dolayısıyla bakteri büyümesi ve üremesi için gereklidir. *Coxiella burnetii*'nin LPS membranı, bağışıklık sisteminde baskın bir antijendir [9, 10]. *C. burnetii*'nin iki ayrı fazı, hayvanlardan ve insanlardan izole edilen patojenik faz I ve embriyo yumurtalarında veya doku kültürlerinde tekrarlanan pasajlarla elde edilen avirulan faz II' dir [11]. Ancak sadece faz I *C. burnetii* içeren veya bundan hazırlanan aşılardan koruyucu olarak kabul edildiği unutulmamalıdır [12]. Bu tez kapsamında, Q

humması hastalığına karşı aşı geliştirilmesi çalışmalarında virulan faz I (Nine Mile I (RSA 493)) LPS ile çalışılmıştır.

Sentetik polimerlerin protein, lipopolisakkarit gibi biyomoleküllerle konjugatları ve kompleksleri, biyoteknoloji, aşı, tanı kiti, ilaç gibi alanlarda yüksek avantajları nedeniyle son yıllarda çok önemli olmuştur. Sentetik polimerler ile oluşturulan konjugatlar ve kompleksler, antijenler için önemli bir taşıyıcı olarak kullanılır ve etkili ve daha güçlü bir bağışıklık tepkisi sağlar [13, 14].

Günümüzde klasik yöntem [Q-Vax® (formalinle inaktive edilmiş tam hücre aşısı), Coxevac® veteriner aşısı (inaktive Coxiella burnetii bakterisi), canlı M-44 Q ateş aşısı] ile üretilen aşılar Q hummasına karşı kullanılmaktadır [15-17]. Ancak klasik yöntemlerle üretilen bu aşıların bilinen dezavantajları, günümüzde hala önemli olan bu hastalığa karşı yeni nesil aşıların üretilmesi gerekliliğine işaret etmektedir [18].

Yeni nesil polimerik aşı sistemlerinde immünojenliği arttırmak için antijenik biyomoleküller lineer özellikteki polimerlere bağlanabilmektedir. Bu tez kapsamında kullanılan Poli(N-Vinil-2-Pirolidon-ko-Akrilikasid) P(VP-ko-AA) ve Polioksidonyum (POX) polimerik aşı sistemlerinde sıklıkla tercih edilen ve biyomoleküllere kovalent bağlarla bağlanan lineer özellikteki taşıyıcı polimerlerdir [19, 20].

Polioksidonyum, N-oksitlenmiş polietilen piperazin türevi, sentetik, suda çözünür, toksik olmayan ve polikasyonik immünomodülatör bir polimerdir. İlk sentetik polimer aşısı olan Grippol, 1997 yılında influenza virüs proteinlerini Polioksidonyum (POX) ile birleştirerek elde edilmiş ve Rusya'da milyonlarca insan aşılanmıştır. Biyouyumlu bir polimer olan polioksidonyum, yeni nesil aşılarla immünoadjuvan olarak kullanılmaktadır [21, 22].

Poliakrilik asit (PAA), adjuvan olarak kullanılabilen, zayıf sentetik polielektrolitlerden yüksek moleküler ağırlıklı bir anyonik polimerdir. Ancak yüksek toksisitesi nedeniyle immünolojide geniş kullanım alanı bulamamıştır. Bu nedenle, akrilik asit ile N-vinil-2-pirolidonun kopolimeri P(VP-ko-AA) biyouyumlu olması nedeniyle immünolojik sistem için bir adjuvan olarak kullanılabilir [23].

İmmünojenik olmayan sentetik polielektrolitler (PE) (negatif veya pozitif yüklü polimerler), çeşitli sistemlerde immünoadjuvan aktivite gösterir ve bunların aşılama öncesi verilen antijenlerle kompleksleri / konjugatları hastalığa karşı koruma sağlar [24].

Konjugatlar çapraz bağlama yolu ile elde edilir ve çapraz bağlama iki ya da daha fazla molekülün bir kovalent bağ yoluyla kimyasal olarak bağlanması prosesine denir. Bu süreçte bağlananlardan birinin biyomolekül olması durumunda biyokonjugasyon olarak adlandırılır. [23, 25, 26]. Karboksil ve amin grupları arasında amid bağının oluşumuna aracılık etmek için kullanılan karbodiimidler (CDI), sıfır uzunlukta çapraz bağlama maddeleri olarak sınıflandırılır. 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC), polimerlerin antijenler ile bağlanmasında aktif bir rol oynar [23, 27, 28].

1.2 Tezin Amacı

Tez önerisinin amacı zoonotik olan Q humması hastalığına karşı hedefe yönelik yeni nesil aşı modeli olarak antijen-polimer kompleks ve biyokonjugatların aşı formülasyonu olarak sentezidir. Bu çalışmada ilk kez olarak; Q hummasına sebep olan *C. Burnetii* bakterisinin dominant antijeni LPS'nin polioksidonyum (POX) ve P(VP-ko-AA) polimerik adjuvanlarıyla kompleks ve biyokonjugatlarının sentezlenmesi ve elde edilen aşı formülasyonlarının Balb/c farelere verilerek immün yanıtlarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Sentezlenen kompleks ve konjugatlardaki antijen/polimer optimum oranlarının belirlenmesiyle, Q hummasına karşı yeni nesil polimerik aşı adayları olarak saptanması hedeflenmiştir.

1.3 Hipotez

Q humması; tüm dünyada yaygın olarak görülen, semptomlarının diğer hastalıklarla karıştırılmasından dolayı tanısı ve tedavisi geciken, akut formunun tedavi edilememesi sebebiyle de kronikleşerek ölüme sebebiyet verebilen bir zoonoz hastalıktır. Bu hastalığa karşı dünyada aşı çalışmaları olmasına rağmen var olan aşılarda mevcut dezavantajları biyoterrorizm ajanı olarak da görülen Q hummasına karşı etkin, ucuz ve yan etkileri olmayan bir aşının geliştirilmesini gerekli kılmaktadır.

Bu sebepler doğrultusunda tez çalışmasının **hipotezi**; *C. burnetii* bakterisinden izole edilmiş virulan faz I LPS ile sentetik adjuvan özellikli POX ve P(VP-ko-AA) polimerlerinin fiziksel kompleksleri, metal aracılığı ile oluşturulan 3'lü polimer-metal-LPS kompleksleri ve çapraz bağlı konjugatlarının tek başına LPS'ye kıyasla iyileştirilmiş antijenik özellik göstererek yüksek antikor titreleri oluşturabileceğidir. Bu hipotezi doğrulamak için bu tez çalışmasında *C. burnetii*'den izole edilen LPS ile POX ve P(VP-ko-AA)'nın kompleks ve konjugatları sentezlenerek karakterize edilmiş ve sonrasında Balb/c farelere immunizasyonları gerçekleştirilerek antikor yanıtları değerlendirilmiştir.

Elde edilen sonuçlar önerilen hipotezi doğrulamış ve kompleksleşme ya da konjugasyon ile beraber tek başına LPS'ye oranla daha yüksek antikor titrelerinin elde edildiği saptanmıştır. Böylece tez kapsamında üretilmiş olan aşı formülasyonlarının aşı çalışmaları için güçlü adaylar olduğu ve ileriki aşamalarda elde edilen antikor kullanılarak tanı kitlerinin de oluşturulabileceği değerlendirilmiştir. Elde edilen verilerin devletler ve toplumlar için hem sağlık hem ekonomik hem de güvenlik sebepleri ile önemini koruyan Q humması için yapılacak olan aşı ve tanı kiti çalışmalarına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2.1 Q Humması Hastalığı

2.1.1 Tanımı ve Tarihçesi

Q humması, tüm dünyada yaygın olarak görülen, *Coxiella burnetii* adlı zorunlu hücre içi ve gram-negatif bir kokobasilin neden olduğu zoonotik ve bulaşıcı bir enfeksiyondur [1, 2]. Antartika ve muhtemelen Yeni Zelanda hariç tüm dünyada endemik olan bu hastalık eklem bacaklıları, kuşları, evcil ve yabani hayvanları ve insanları etkilemektedir [3].

İnsanlarda Q humması genellikle asemptomatik veya hafif grip benzeri bir enfeksiyon olarak kendini gösterir. İlk bulaşma yolu, *C. burnetii* ile kontamine olmuş toz ve damlacıkların solunmasıdır, ancak insanlara doğrudan temas yoluyla da bulaşabilir [29, 30].

Hastalık ilk kez 1937 yılında Avustralya' nın Brisbane şehrinde, Edward Holbrook Derrick tarafından, mezbaha çalışanlarında meydana gelen ateş ve grip benzeri semptomlar gösteren hastalığı tanımlamak için kullanılmıştır. Hastalığın ilk kelimesi, şüpheli anlamında kullanılan "query" kelimesinin baş harfi, ikinci kelimesi ise yüksek vücut sıcaklığı anlamına gelen "fever" kelimesi alınarak "Q fever" (Q humması; Q ateşi) olarak adlandırılmıştır [31, 32]. Ayrıca Avustralya Q humması, mezbaha ateşi, Nine Mile ateşi ve Balkan Gribi gibi hastalığın sıkça görüldüğü yerler ve meslek grupları ile ilişkilendirilen isimlerle de anılmaktadır [33].

Q humması patojeni, Derrick' in hastalarından aldığı kan, idrar ve bunların aktarılmasıyla enfekte edilmiş kobay karaciğerinden Frank Macfarlane Burnet and Mavis Freeman tarafından izole edilmiştir. Başlangıçta bir Rickettsia türü olarak tanımlanmıştır. Gordon Davis ve Dr. Herald Rea Cox, 1938 yılında ABD'de Montana Eyaletindeki Nine-Mile bölgesinden toplanan kenelerin kobaylarda patojen olduğunu gözlemlemiş ve etkeni izole edilmiştir. Cox, bu etkene *Rickettsia diaporica*

adını vermiştir. Derrick tarafından da hastalığın etkeni *Rickettsia burnetii* olarak adlandırılmıştır. Günümüzde kabul gören adı *Coxiella burnetii*, Burnet ve Cox'un araştırmalarını onurlandırma amacıyla belirlenmiştir [5, 34, 35].

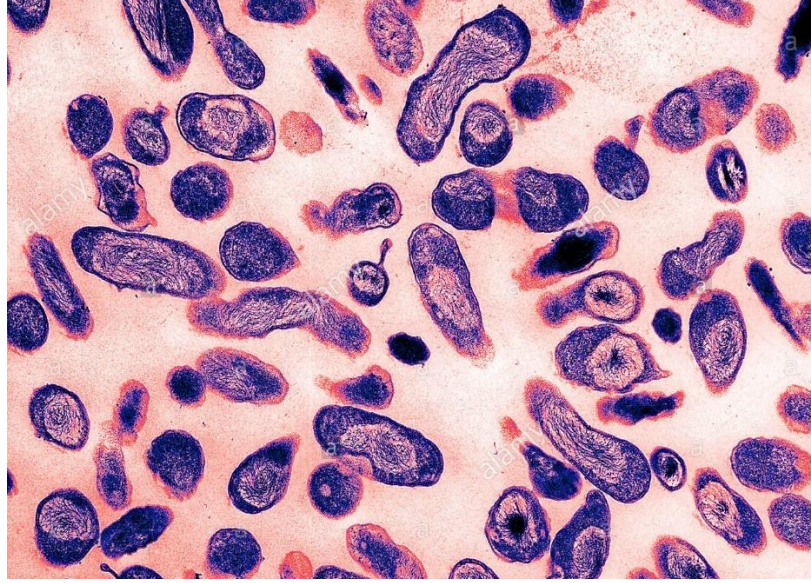
Başlangıçta karışık epidemiyolojik bilgiler elde edilse de 2. Dünya Savaşı sırasında karşılaşılan ateşli solunum hastalığı salgınları Q hummasının klinik özelliklerini aydınlatmaya yardımcı olmuştur. 1941 yılında Bulgaristan, İtalya, Kırım, Yunanistan, Ukrayna ve Korsika'da 1000' den fazla Alman askerinde kuru öksürük ve sıklıkla pneumonia içeren rahatsızlık "Balkan gribi" olarak isimlendirilmiştir. İtalya, Yunanistan ve Korsika'daki Müttefik birlikleri arasında 1944-5 kışı ve ilkbaharında sekiz ateşli hastalık salgını meydana gelmiştir. Meydana gelen olgulardan kan ve balgam örnekleri incelenmiş ve sorumlu etken deney hayvanlarında izole edilmiştir. Balkan gribi ajanının ABD'de incelenmesi sonucunda Q humması ajanıyla aynı olduğu görülmüştür. Bu durum Q humması hastalığının sadece Avustralya ve Amerika' da görülmediğini kanıtlamıştır [36, 37].

2.1.2 Etkeni

Sınıflandırılması. Q humması etkeni *Coxiella burnetii* türü, bakteri aleminin *Proteobacteria* filumunun *Gammaproteobacteria* sınıfı, *Legionellales* takımı, *Coxiellaceae* ailesi ve *Coxiella* cinsinde yer almaktadır [38]. Filogenetik olarak ilişkili olduğu bakteriler arasında *Legionellaceae*, *Francisellaceae*, *Pseudomonaceae* ve diğer *Gammaproteobacteria* bulunur [39].

Morfolojik ve Moleküler yapısı. *Coxiella burnetii* (*C. burnetii*) pleomorfik, hareketsiz, kapsülsüz, flagellasız ve zorunlu hücre içi bir mikroorganizmadır. *C. burnetii* gram negatif kokobasil ve yaklaşık 0.2 - 0.4 µm genişliğinde ve 0.4 - 1 µm uzunluğundaki boyutlarda küçük bir bakteridir [40, 41]. *Coxiella burnetii* 'nin elektron mikroskobu görüntüsü Şekil 2.1'de gösterilmiştir.

Hücre duvarı, diğer gram negatif bakterilere peptidoglikan, lipopolisakkarit, lipoprotein ve protein içeriği açısından benzer bir yapı göstermektedir, ancak gram boyama yöntemi ile boyanmazlar. Gimenez, Stamp, Macchiavello, Castaneda metoduyla Giemsa ve Modifiye Ziehl-Neelsen yöntemiyle boyanabilmektedir. En hızlı yöntem ayırım için asit solüsyonu içermesinden dolayı Gimenezdir [42].



Şekil 2. 1 *Coxiella burnetii* 'nin elektron mikroskop görüntüsü [43]

Dış membranının dışa dönük yüzeyinde bulunan lipopolisakkaritler zarların fiziksel organizasyonu ve işlevi ve dolayısıyla bakteri büyümesi ve çoğalması için gereklidirler. Bakterilerin konakçı savunma sistemi tarafından özel olarak tanınması ve ortadan kaldırılmasında rol oynarlar. LPS'ler, fagositler tarafından bakteri alımını ve kompleman aktivasyonunu engelleyebilir ve bu nedenle bakteriyel virülansda önemli bir rol oynarlar. LPS'lerin, öldürücü toksisite ve pirojenite gibi biyolojik aktivite sergilediğini ve bu şekilde birçok gram negatif bakterinin patojenik potansiyeline katkıda bulunabileceğini literatürde belirtilmektedir. Ayrıca, LPS'ler güçlü immünostimülatör olarak kabul edilen B hücrelerini, granülositleri ve mononükleer hücreleri güçlü bir şekilde aktive etmektedir [44].

Gram negatif bakterilerin LPS' leri ortak yapısal özellikleri paylaşır ve genellikle endotoksinin ana biyoaktivitesinden sorumlu olan lipid A olarak bilinen hidrofobik bileşen, uzun zincirli O-antijen polisakkaridi (O-PS) ve iç ve dış çekirdekten oluşmaktadır [44-46]. Sadece LPS bakteriyel virülans ile ilişkilendirilmiştir [47].

Faz Varyasyonu. Hücre duvarındaki lipopolisakkarit (LPS) yapısı ve konak hücre içinde üreyebilmeleri *C.burnetii*' nin virülans faktörleridir [48]. Konakçı sisteme bağlı olarak büyüme sırasında faz değişimine uğrar ve Faz I (PI) ve Faz II (PII) olarak tanımlanan iki farklı antijenik form oluşturur [49].

Genel olarak kabul edilen faz varyasyonu tanımı, çeşitli çevresel koşullar altında bakterinin hücre yüzey yapılarının anahtar görevi gören geri dönüşümlü mekanizmasını ifade eder. Buna karşılık *C. Burnetii*' de bu faz varyasyonu geri dönüşümsüz olarak gerçekleşmektedir [44]. *Enterobacteriaceae* familyasındaki bakterilerde gözlemlendiği gibi, *C. burnetii*'de gözlemlenen faz varyasyonu Faz I denilen düzgün (smooth) bir formdan Faz II olarak bilinen pürüzlü (rough) bir forma geçişidir. Faz I formu doğal kaynaklardan izole edilmiştir ve *C. burnetii*'nin virülan formu olarak tanımlanmıştır [7].

Virülan bir faz I, doğadan izole edilirken, nispeten avirülan faz II, hücre kültürü ve embriyonlu yumurta gibi immünolojik açıdan yetersiz konakçıdaki tekrarlayan seri pasajlardan sonra gelişmektedir. Bu bulgu ilk kez Bengtson tarafından bildirilmiş ve Stoker ve Fiset tarafından daha ayrıntılı olarak açıklanmıştır. Faz varyasyonu fenomeni birçok açıdan, birçok gram-negatif bakteride bulunan iyi bilinen S → R varyasyonuna benzediği varsayılmıştır ancak bu fenomenin doğası şimdiye kadar tam anlamıyla açıklanamamıştır [50, 51]. *C. burnetii* faz varyasyonu sırasında, LPS I'in O-polisakkarit zincirinde gözle görülür bileşimsel ve yapısal değişiklikler beklenmektedir. Yapısal modifikasyonların PI-LPS 'nin biyolojik özelliklerini büyük ölçüde etkilediği varsayılmaktadır. PI-LPS 'nin diğer şekerlerin yanı sıra, diğer enterobakteriyel LPS'lerde bulunmayan iki olağandışı şeker kalıntısı - virenoz (6-deoksi-3-C-metilguloz) ve dihidrohidroksistreptoz [3-C-(hidroksimetil) liksoz] içerdiği bildirilmiştir [50]. PII-LPS varyantında O-PS zinciri ve dış çekirdek oligosakkarit içinde bulunan bilinmeyen şeker kalıntıları eksiktir [9].

Bu tez kapsamında, Q humması hastalığına karşı aşı geliştirilmesi çalışmalarında virülan faz I (Nine Mile I (RSA 493)) LPS ile çalışılmıştır.

Yaşam Döngüsü. *C. burnetii*, çevresel olarak kararlı bir küçük hücre varyantı (small-cell varyant-SCV) ve replikatif büyük hücre varyantı (large-cell varyant-LCV) olmak üzere sırasıyla yaklaşık 0.3 ve 2.0 µM boyutlarında iki farklı hücre tipinin yer aldığı karmaşık bir yaşam döngüsüne sahiptir. LCV'ler ile SCV'ler arasındaki yapısal farklılıkların (karışık bir zar yapısı ve büyük bir elektron yoğunluğu) SCV stabilitesini arttırdığı tahmin edilmektedir. LCV' lerle karşılaştırıldığında, SCV'ler düşük metabolik aktiviteye ve ozmotik ve fiziksel stres faktörlerine karşı artan

dirence sahiptir. Bu direnç özelliklerinin SCV tarafından çevresel kararlılığı desteklediği düşünülmektedir [52, 53]. SCV'lerin *C. burnetii* hastalığının bulaşmasında ve patogeneğinde önemi belirtilmektedir. SCV'ler, hücreden ayrılıp komşu konak hücrelerini infekte etmektedir. Konak hücre membranına bağlanarak hücre içine alınır ve metabolik olarak aktif olan LCV formuna dönüşür. Bu dönüşümü başlatan yollar tam anlamıyla bilinmemekle beraber hipotez olarak pH değeri, enzim sistemleri ve besin kaynaklarının sebep olduğu öne sürülmüştür. LCV'ler, geniş bir periplazmik aralığa ve hafif elektron yoğunluğuna sahiptir [52, 54, 55].

2.1.3 Klinik Bulgular ve Patojenisi

Birincil enfeksiyon meydana geldikten sonra, *C. burnetii* monositlere ve makrofajlara girer. Enfeksiyon yoluna (solunum veya gastrointestinal) bağlı olarak, akciğerlerdeki alveolar makrofajlar veya karaciğerdeki Kupffer hücreleri birincil hedef hücrelerdir. Avirulan faz II formu fagolizozomal yolla hızla yok edilirken, virulan faz I formu canlı kalır. Makrofajlarda, *C. burnetii*, metabolizmasını ve çoğalmasını destekleyen büyük asidik vakuollerde bulunur [56]. Akut enfeksiyon sırasında, faz I ve II *C. burnetii* antijenlerine karşı IgM antikorları ve faz II antijenlerine karşı IgG antikorları gelişir. Kronik Q humması olan hastalarda, faz I ve II'ye karşı yüksek seviyelerde IgG ve IgA antikorları mevcuttur. *C. burnetii* enfeksiyonunun kontrolü, T hücresi aracılı bağışıklık mekanizmalarına bağlıdır. Bununla birlikte, bakterilerin tamamen ortadan kaldırılması sağlanamamaktadır. Kötü huylu malignitesi olan hastalar, insan immün yetmezlik virüsü (HIV) ile enfekte olanlar ve hamile kadınlar, bir ilk yanıt aldıktan sonra, kronik ve sıklıkla ölümcül olabilen enfeksiyonun nüksetmesini yaşayabilir. *C. burnetii* ile akut enfeksiyon sırasında alınan biyopsi örnekleri, birkaç organizma ile derin bir hücresel yanıt ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, kronik enfeksiyon sırasında, biyopsi örnekleri yüksek sayıda organizma gösterir, ancak sınırlı bir hücresel yanıt gösterir [56].

Tıpkı diğer bulaşıcı hastalıklarda olduğu gibi, bu enfeksiyon da mikrop ve konakçı ile ilgili faktörlere bağlıdır. *C. burnetii* tek bir mikrobun bile enfeksiyon üretme

kapasitesine sahip olabildiği çok yüksek enfeksiyon kapasitesine sahip bir mikroorganizmadır [57].

İnsan *C. burnetii* enfeksiyonu, iki tür veya biçimde olabilen sistemik bir enfeksiyondur: akut Q humması ve kronik Q humması [57].

Q hummasının ortaya çıkışı son derece değişkendir: akut hastalığa (grip benzeri sendromdan şiddetli pnömoniye kadar değişen) veya kronik hastalığa (esas olarak endokardit olarak kendini gösterir) yol açabilir. İnsanlarda akut ve kronik Q ateşi arasında ve semptomlara ve klinik belirtilere bağlı olarak pnömoni, endokardit, hepatit ve nörolojik belirtiler arasında ayırım yapılır [58]. Kronik Q ateşi, 6 aydan uzun süren enfeksiyon olarak tanımlanır ve akut Q ateşinden sonra hastaların %5'inde görülür [59].

Akut Q ateşi, faz II antijene karşı faz I antijene karşı olanlardan daha yüksek bir antikor seviyesi ile karakterize edilirken, faz I antijenine karşı yüksek düzeyde antikor, kronik Q ateşi ile ilişkilidir [60].

Q humması vakalarının yaklaşık %60' ının asemptomatik olduğu, geri kalan %40' ın ise hafif grip benzeri klinik semptomlar, solunum bulguları ve/veya hepatit gösterdiği belirtilmektedir. Bu semptomatik enfekte bireylerin sadece %2-5' inin hastaneye yatırılması gerekir [61].

Yaş, cinsiyet ve belirli tıbbi durumlar gibi konağa ait faktörlerin hastalık tablosunda rol oynadığı düşünülmektedir. 15 yaşından büyük hastaların klinik semptomlar gösterme olasılığı daha yüksektir. Q hummasının çocuklarda nadiren ortaya çıktığı düşünülse spesifik olmayan belirtilerinden eksik raporlanabildiği düşünülmektedir. Çocuklarda semptomlar ortaya çıktığında, hastalığın belirtileri ister akut ister kronik olsun, yetişkinlerdekine benzer bir görünüm sergilemektedir [58].

Hamilelik sırasında, Q ateşi çoğunlukla asemptomatiktir, ancak spontan abortus, rahim içi büyüme geriliği, rahim içi fetal ölüm, oligoamnios ve prematüre doğum gibi obstetrik komplikasyonlara neden olabilir [59].

- *Akut Q humması*: Akut Q hummasının tipik bir şekli yoktur ve klinik belirtiler hastadan hastaya büyük ölçüde değişir. Kuluçka süresinin yaklaşık 20 gün olduğu tahmin edilmektedir (14–39 gün aralığı). Akut Q hummasının en sık görülen klinik

belirtileri, şiddetli baş ağrıları, miyaljiler, artraljiler ve öksürük ile ilişkili ateşli bir hastalıktır. Ana semptomlar ateş, pulmoner belirtiler ve yüksek karaciğer enzim seviyeleri bir arada bulunabilir [62].

Atipik pnömoni, akut Q hummasının en yaygın bilinen formlarından biridir. Vakaların çoğu klinik olarak asemptomatik veya hafiftir, kuru öksürük, ateş ve minimal oskültatuar anormallikler ile karakterize edilir, ancak bazı hastalar akut solunum sıkıntısı ile başvurur. Göğüs röntgeni üzerindeki bulgular spesifik değildir. Semptomların süresi 10 ile 90 gün arasında değişmektedir ve ölüm oranı 0.5'ten % 1.5 arasında değişir. Pnömoni, Kanada Nova Scotia, İspanya Bask ülkesi ve İsviçre'de akut Q hummasının başlıca belirtisidir; Fransa, Ontario, Kaliforniya ve Avustralya'da hepatit akut Q hummasının baskın şeklidir [62].

Uzun süreli ateşe genellikle şiddetli baş ağrıları eşlik eder. Ateş 39 ila 40 °C' ye ulaşabilir ve genellikle tüm gün yüksek kalır. Ancak tedavi edilmeyen hastalarda ateş 5 ila 57 gün sürebilir. Yaşlı hastalarda ateşin süresi daha uzundur [62].

Hepatit dünya çapında akut Q hummasının sık görülen bir belirtisidir. Fransa, İspanya, İsrail, Portekiz ve Tayvan gibi hastalığın endemik olduğu ülkelerde pnömoniden daha siktir. Yüksek karaciğer enzimleri hemen hemen tüm vakalarda ateş, titreme ve baş ağrısı ile ilişkilidir. Baş ağrısı, *C. burnetii* hepatitini viral hepatitten ayıran ilk raporlarda bile önerilmiştir. Eşlik eden diğer bulgular iştahsızlık, kusma ve bazen ishal ve ağrılı hepatomegalidir [63].

Kardiyak tutulum akut Q ateşi vakalarının %2'sinde bulunur ve miyokardit başlıca ölüm nedenidir. Q humması hastalığının perikarditin klinik belirtileri göğüsteki ağrının yanında gelen ateş olmakla beraber spesifik olmadığı görülür.

Bununla birlikte, *C. burnetii*, Güney Fransa'da perikarditin ana nedenidir ve İspanya ve Birleşik Krallık'ta sık görülen bir durumdur [62].

Q hummasıyla ilişkili nörolojik belirtiler nadirdir ve 3 ana nörolojik durum vardır: (1) meningoensefalit veya ensefalit; (2) lenfositik menenjit ve (3) periferik nöropati. Q ateşinin farklı klinik görünümünde baş ağrısı siktir. Bununla birlikte, menenjit veya meningoensefalit gibi diğer daha ciddi komplikasyonlar da tanımlanmıştır. Diğer belirtiler arasında purpurik döküntü ve akut lenfadenit yer alır [57, 62].

- *Kronik Q Humması*: Kronik Q ateşi, özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda ve komorbiditeleri olanlarda akut hastalıktan aylar veya yıllar sonra sinsice gelişebilir. Hamilelik, immünosupresyon, kalp kapakçığı lezyonları ve vasküler anormallikler gibi belirli rahatsızlıkları olan kişiler, kronik Q ateşi geliştirmeye daha yatkındır. Akut vakaların yaklaşık %5-15'i kronikleşir. Belirtiler arasında endokardit, vaskülit, osteomiyelit, hepatit, interstisyel akciğer fibrozu ve uzun süreli veya tekrarlayan ateş bulunur [49, 58, 59].

Kronik Q ateşinin en yaygın formu olan endokardit (%60- %70), tüm endokardit vakalarının %3 ila %5'ini temsil eder. Klinik ve ekokardiyografik bulgular, tipik akut bakteriyel endokardit bulgularından farklıdır ve kan kültürleri negatiftir ve sıklıkla tanıda gecikmelere neden olur. Klinik görünüm semptom olmaması durumundan konjestif kalp yetmezliğine kadar değişmektedir [58].

Coxiella-endokardit, vakaların % 25'ine kadar ölümcül olabilir [61].

Vasküler enfeksiyonlar ikinci en yaygın kronik hastalık şeklidir. Ölüm oranı yüksektir (% 25); ancak cerrahi tedavi, daha iyi sonuçlar ile ilişkilidir [58].

Kronik Q ateşinin nadir belirtileri arasında osteomiyelit, granülomatöz hepatit ve kronik pulmoner enfeksiyonlar bulunur. Ek olarak, akut Q ateşi enfeksiyonu sonrası hastalarda kronik yorgunluk sendromu bildirilmiştir [58].

Fiziksel ve Kimyasal Etkenlere Direnç: *C. burnetii* fiziksel ve kimyasal etkenlere karşı dayanıklıdır. pH 4,5'e kadar asitlere karşı stabilite, sıcaklık (15 dakika boyunca 70 ° C'ye kadar), UV ışığı ve basınç (300000 kPa'ya kadar) karşı direnç ve %10 salin içinde 6 aydan fazla ve 4°C'de (muhtemelen 10 aydan fazla) yaşama yeteneği göstermektedir. Bununla birlikte, *C. burnetii* %1 lizol, %5 H₂O₂, %0,5 hipoklorit, %70 etanol (30 dakika için), %5 kloroform, formaldehit veya pastörizasyon (40 saniye boyunca en az 72°C) ile öldürülür [61].

2.1.4 Epidemiyoloji

-*Coğrafi Dağılım*; 1955'te Q ateşinin beş kıtada 51 ülkede ortaya çıktığı bilinmekte ve 1990-2000 yılları arasında hastalık 8 ülkede daha rapor edilmiştir. Ayrıca, seroepidemiolojik araştırmalar, diğer bazı ülkelerde Q hummasının varlığını

göstermiştir [64]. Antartika ve muhtemelen Yeni Zelanda dünyada Q ateşinin görülmediği iki yerdir [3].

Q hummasının epidemiyolojisinde farklı coğrafi bölgelerde dikkate değer bir çeşitlilik vardır. Çoğu Avrupa ülkesinde, düşük hastalık insidansı nedeniyle Q humması nispeten daha az ilgi çekmektedir. Son yıllardaki salgınlar genellikle sınırlı boyuttadır ve çoğu durumda Q humması enfeksiyonunun kaynağı tanımlanmamıştır [64].

Dünya çapında bir dağılıma sahiptir, ancak nadiren rapor edilmektedir, muhtemelen *C. burnetii* tarafından sunulan teşhis zorluklarından ve birçok ülkede vakaların bildirilmesi gerekliliğinin olmamasından kaynaklanmaktadır; Fransa, Almanya, İspanya, Yunanistan, Kuzey İrlanda, Avusturalya ve ABD gibi bazı ülkelerde bildirim zorunlu hastalıklar listesinde yer almaktadır [37, 61]. Bu nedenle, hastalığın insidans rakamları büyük ölçüde değişir. Güney Fransa'da, akut Q humması insidansı yılda 100.000 kişi başına yaklaşık 50 vakadır; Avustralya'da (milyon kişi başına 38 vaka), Birleşik Devletler'de ise milyon kişi başına 0,28 vakadır [58, 59]. Yılda 1.000.000 kişide yaklaşık 1 vaka Q humması endokarditi tanısı almaktadır. Avrupa'da akut Q hummasının en çok görüldüğü zamanlar ilkbahar ve yaz mevsiminin başlarıdır. Avrupa ve Kuzey Amerika'daki birçok ülkede büyük Q humması salgınları rapor edilmiştir [59]. Q humması birden fazla tür arasında büyük bir rezervuarla devam eder ve düzenli olarak daha küçük salgınlara yol açar [61].

Türkiye'de Q hummasının varlığı hayvanlarda ilk defa 1946-1947 senelerinde sütlerden *C. burnetii*'nin izole edilmesiyle saptanmıştır. Hastalığın Türkiye'de yaygınlığı, sonrasında yapılan ve çoğu serolojik olan çalışmalarla araştırılmıştır [31]. Payzın [65] tarafından yapılan çalışmada Türkiye'nin farklı bölgelerinden elde edilen 2.181 serum, Q humması antikorları açısından incelenmiş ve Q humması vakalarının en azından aşağıdaki bölgelerde veya şehirlerde meydana geldiği gösterilmiştir: Adana, Aksaray, Amasya, Antalya, Çorum, Diyarbakır, Erzurum, Eskişehir, Gaziantep, Giresun, Kastamonu, Kayseri, Konya, Isparta, İstanbul, İzmir, Malatya, Manisa, Maraş, Samsun, Sivas, Tekirdağ, Trabzon ve Van. 2010 yılına kadar ülkemizden akut Q humması olgu bildirimleri kısıtlı sayıdadır ve kronik olgu

bildirimi yoktur [66]. Özbey ve ark. tarafından Q humması epidemiyolojisi üzerine yapılan derleme çalışmasında; 2001 yılında Elazığ'da %20, Malatya'da %20, Bingöl'de %27,95 ve Muş'ta %27,27 oranlarında seropozitiflik bulunduğu belirtilmiştir. Başka bir Q humması seroprevalans çalışmasında; 2004 yılında il merkezlerinden toplanan serum örneklerinde Antalya'da %13,2, Diyarbakır'da %6 ve Samsun'da %1,8 seropozitiflik tespit edilmiştir [31].

Hastalık Türk halkı tarafından "eski hastalık" (old disease) adı altında bir hayvan enfeksiyonu olarak bilinmekte ve Türkiye genelinde insanlarda ve hayvanlarda enfeksiyonun görülmesi, bu ülkede yeni bir hastalık olmadığını düşündürmektedir [65].

-*Rezervuarları: Coxiella burnetii'* nin sebep olduğu klinik hastalık büyük ölçüde insanla sınırlı olsa da çok çeşitli omurgalı ve omurgasız konakçıları enfekte edebilir [63, 67]. Bu nedenle Q humması, çok çeşitli konakçıları etkileyen bir zoonozdur. Atlar, domuzlar, köpekler, kediler, develer ve bufalolar ile tavuk, güvercin, ördek, kaz ve hindi gibi yabani ve evcil kuşlar herhangi bir klinik belirti göstermeden enfekte olabilir [67].

Bununla birlikte, insan enfeksiyonları için memeliler arasındaki en önemli rezervuarlar sığır, koyun ve keçilerdir [67, 68]. Ancak çoğu seroepidemiolojik çalışma yaklaşık 30 yıl önce yapıldığından, bu evcil hayvanlarda Q hummasının gerçek güncel prevalansı bilinmemektedir. Enfeksiyon koyun veya keçilerde düşüklere ve sığırlarda kısırlığa yol açar. Enfeksiyon kanıtı, çeşitli kene, pire, akar, sinek ve diğer eklembacaklı türlerinde de gösterilmiştir [67, 69]. Keneler organizmayı kan emerek alır ve dışkılarıyla iletir. Bununla birlikte, çeşitli araştırmalar, yalnızca *Dermacentor reticulatus* gibi bazı türlerin rezervuar olarak önemli olabileceğini düşündürmektedir [68].

-*Bulaşması; C. burnetii*, en bulaşıcı insan patojenlerinden biridir. 10 bakteriden daha az bir doz enfeksiyona neden olabilir. Organizmalar spora benzer, bu nedenle toz ve fomitlerde aylarca yaşayabilir. Aerosol haline getirildikten sonra bulaşıcı kaldığı ve rüzgarla 18 km yayıldığı belgelenmiştir. Bu nedenle, enfekte kişilerin genellikle doğrudan hayvan maruziyeti geçmişi olmadığı görülmektedir [69].

Hayvanlar tipik olarak, *C. burnetii*'yi, ya doğum ürünleriyle doğrudan temas yoluyla ya da enfeksiyöz aerosollerin solunması yoluyla, diğer enfekte hayvanlara maruz bırakarak edinirler. Çoğu hayvan kalıcı, nispeten asemptomatik enfeksiyona sahiptir. Enfekte hayvanlar antikor üretir, ancak patojeni ortadan kaldıramaz [70].

İnsan enfeksiyonlarının çoğunun çiftlik hayvanlarıyla ilişkili olduğu düşünülürken, yaban hayvanları (kanguru ve üç parmaklı tembel hayvan) ve evcil hayvanlarla temas yoluyla enfeksiyon bildirilmiştir. Enfekte çiftlik hayvanlarında, bakteriler doğum ürünlerinde, vajinal mukusta, idrarda, dışkıda veya sütte önemli miktarlarda yayılabilir. Doğum ürünlerindeki bu yüksek bakteri yükü güçlü bir enfeksiyon kaynağıdır. Gebe olmayan çiftlik hayvanlarında, *C. burnetii* enfeksiyonu neredeyse asemptomatiktir. Hayvancılık türlerinde Q hummasının en önemli klinik sunumları, düşük, ölü doğum, kısırlık, endometrit ve mastit gibi üreme anomalileridir. En yüksek *C. burnetii* konsantrasyonları (doku gramı başına 10^9 organizmaya kadar), ya düşüktükten sonra ya da canlı doğumdan sonra enfekte çiftlik hayvanlarının plasentalarında bulunur. Düşük, daha önce herhangi bir klinik semptom olmaksızın, en sık olarak gebeliğin sonunda meydana gelir [71].

Organizma çevrede oldukça stabildir yüksek direnci nedeniyle bulaşıcı organizmalar, hem yakın çevrede hem de enfekte hayvanların yünlerinde döküldükten sonra aylarca mevcut kalabilir [71].

İnsanlara en yaygın bulaşma şekli kontamine aerosollerin inhalasyonudur (aerosolizasyon). Kaynak genellikle memelilerin (özellikle keçiler, koyunlar veya sığırlar) enfekte olmuş doğum ürünleridir. Hava örnekleri doğum sürecini takip eden en az 14 gün boyunca pozitif kalır [69, 71]. Enfekte hayvanlarla çalışan laboratuvar personeli de risk altındaki gruptur [62]. Enfekte veya sağlıklı sürüler veya insan popülasyonu arasında aerosollerin inhalasyonu genellikle rüzgar ve arazinin topografyası dahil olmak üzere dağılmayı destekleyen belirli çevresel koşullarla ilişkilendirilir. Yüksek rüzgar hızları, açık araziler, yüksek hayvan yoğunlukları ve yüksek sıcaklıklar, Q hummasının bulaşması için risk faktörleri olarak tanımlanmıştır [71].

İnhalasyon, *C. burnetii* enfeksiyonunun en önemli yolu iken, sütteki *C. burnetii* prevalansı göz önüne alındığında, sütün sindirim yoluyla tüketilmesi potansiyel bir

bulaşma yolu olarak incelenmiştir. Araştırmalar sığır, keçi ve koyunlardan elde edilen süt ve süt ürünlerinde *C. burnetii* DNA'sının varlığını göstermiştir. Çiğ keçi sütü tüketen insanlarda yüksek oranda *C. burnetii* seropozitifliği gösterilmiştir. Bununla birlikte, ham ürünlere erişen bireylerin kırsal bir ortamda yaşama ve çiftlik hayvanlarıyla temas gibi diğer potansiyel enfeksiyon yollarına maruz kalma olasılıkları artmaktadır. Bakteri sütte yaygın şekilde görülmesine rağmen, süt ürünlerinin sindirim yoluyla tüketilmesi birincil bulaşma yolu olarak görülmemektedir [63, 71].

Q hummasının bulaşıcı olmadığı düşünülmektedir, ancak nadiren de olsa insan-insan geçişi gerçekleşebilir. Çiftlik hayvanlarında olduğu gibi, enfekte kadınlardan alınan doğum ürünleri hem hastane personeli hem de aynı birimdeki diğer hamile kadınlar için bir enfeksiyon kaynağı olabilir. Kan nakli yoluyla bulaşma ve cinsel yolla bulaşmanın potansiyel bir risk olduğuna dair kanıtlar da vardır [71].

Bu kontaminasyon şekli insanlarda kanıtlanmamış olsa da keneler *C. burnetii* enfeksiyonunun bulaşmasında rol oynayabilir. Bu, kenelerde diğer eklembacaklılardan kaynaklanan patojenlerle *C. burnetii* ortak enfeksiyonunun saptanmasıyla gösterilmiştir [63].

2.1.5 Tanı

Q humması iyi bilinmemekle birlikte, uzman merkezlerden araştırma toplanması ve *C. burnetii*'nin Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri tarafından bir biyoterörizm ajanı olarak tanımlanması, hastalığın aşinalığını artırmıştır. Bu nedenle bu hastalık için tanı ve önlem büyük önem taşımaktadır [72].

-Klinik Örneklerin Toplanması ve Kullanılması

C. burnetii oldukça bulaşıcı bir ajandır ve laboratuvarından bulaşan Q humması vakaları tanımlanmıştır. Bu nedenle, *C. burnetii* ile enfekte olduğu düşünülen vakalara ait tüm malzemeler ve örnekler gerekli kişisel korunma ekipmanlarını (eldiven ve maske) kullanan deneyimli personel tarafından alınmalı ve sadece biyogüvenlik düzeyi 3 laboratuvarlarında incelenmelidir. Aynı önlemler, *C. burnetii* ile enfekte olmuş hücre kültürleri veya *C. burnetii* ile enfekte hayvanlar ile

ilgilendirken de uygulanmalıdır. *C. burnetii* ile enfekte hayvanlarla çalışan laboratuvar personeline, aşılama değerlidir [73, 74].

Q hummasının klinik semptomları diğer birçok hastalıktan ayırt edilemez ve doğru teşhis için laboratuvar testlerini gerekli kılar [75].

2.1.5.1 Spesifik Olmayan Laboratuvar Tanısı

Akut Q humması; Lökosit sayısı akut Q humması olan hastalarda genellikle normaldir. Bununla birlikte hastaların %25' inde yüksek lökosit sayısı vardır. Eritrosit sedimentasyon hızı yükselebilir ve hastaların %25' inde trombositopeni görülebilir. Karaciğer enzim seviyeleri, hastaların %85' inde yükselmiştir. Uzayan ateş sırasında, normal bir lökosit sayısı, trombositopeni ve yüksek hepatik enzim seviyelerinin birlikteliği Q hummasını çağırır. Otoantikorlar genellikle Q humması seyrinde bulunur, ancak gerçek önemi hala bilinmemektedir. Bu otoantikorların bir kısmı, antimitokondriyal antikorlar ve anti-düz kas antikorları akut Q hummasında tarif edilmiştir. Akut Q humması olan bir hastada hem immünoglobulin G (IgG) hem de IgM antikardiyolipin antikorları tespit edilmiş ve iyileşmenin ilk 2 ayında IgM'nin erken kaybolduğunu gözlenmiştir [73].

Kronik Q humması; Q humması endokarditinde klinik ve biyolojik semptomlar, mikroorganizmaya karşı gelişen hücresel aracılı inflamatuvar yanıt ile ilişkilidir. Kan kültürleri negatif kalır. Anemi, yüksek eritrosit sedimentasyon hızı ve poliklonal hipergamaglobülinemi gibi laboratuvar bulguları olağandır. Lökosit sayısı normal, artmış veya azalmış olabilir. Trombositopeni ve yüksek karaciğer enzim seviyeleri yaygın olarak bulunur. Kreatinin seviyesi ve mikrohematüri ile karakterize edilen böbrek tutulumu yaygındır. Kronik Q hummasında kriyoglobulinler ve otoantikorlar (romatoid faktör, anti-düz kas veya antinükleer antikorlar) sıklıkla görülmektedir [73].

2.1.5.2 Spesifik Laboratuvar Tanısı

Esas olarak Q hummasının laboratuvar tanısı serolojik inceleme ile antikorların belirlenmesine dayanmaktadır. Çeşitli laboratuvar çalışmaları mevcuttur, ancak immüno Floresan testi ile antikor tespiti, yüksek duyarlılığı ve özgüllüğü nedeniyle

en yaygın kullanılan yöntemdir. Polimeraz zincir reaksiyonu hastalıkta erken dönemde *C. burnetii* varlığını tespit etmek için kullanılmaktadır [58, 76].

Dokularda *C. burnetii* saptanması. *C. burnetii*'nin dokularda saptanması, özellikle kronik Q humması nedeniyle tedavi gören hastalarda bilgilendiricidir. Örnekler taze veya formalin fiksasyonu ve parafine gömüldükten sonra test edilebilir. Valvüler veya vasküler örnekler en değerlidir. Peroksidaz bazlı yöntem, ELISA ve monoklonal antikorlar ile yapılan testler gibi çeşitli teknikler mevcuttur [56, 73, 77].

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR, PCR). PCR, hücre kültürlerinde ve klinik örneklerde *C. burnetii* DNA'sını tespit etmek için başarıyla kullanılmıştır. Bu yöntem çok hassas ve spesifiktir ve ancak yalnızca özel araştırma laboratuvarlarında yapılmalıdır. *C. burnetii*'ye özgü genlerden türetilen primerlerin mevcudiyeti, parafine gömülü dokularda bile bu bakterinin tespiti için basit ve güvenilir bir yöntem sağlamıştır. Dahası, PCR'nin donmuş örneklerle geriye dönük teşhis ve kronik Q humması nedeniyle tedavi edilen hastaların takibinde standart kültür tekniklerinden daha duyarlı olduğu kanıtlanmıştır [73]. Ek olarak, PCR testi, IgG anti-faz I titrelerinde kalıcı yükselmeler olan hastalarda kronik enfeksiyonun serolojik tanısının doğrulanmasında yardımcı olur [59].

***C. burnetii*'de kültür.** *C. burnetii*'nin izolasyonu, aşırı bulaşıcılığı nedeniyle yalnızca biyogüvenlik seviyesi 3 laboratuvarlarında olmalıdır. Bu mikroorganizma, örneklerin geleneksel hücre kültürlerine (maymun böbrek hücreleri, Vero hücreleri) veya embriyonlanmış tavuk sarısı keselerine veya fareler veya kobaylar gibi laboratuvar hayvanlarına aşılama ile izole edilebilir. Artık daha az sıklıkla kullanılsalar da bu yöntemler, birden çok bakteri ile kontamine olmuş dokulardan izolasyon gerektiren durumlarda veya faz II hücrelerden faz I *Coxiella* antijenleri elde etmek için yararlı olmaya devam etmektedir. Virüs kültürü için ticari olarak temin edilebilen hücre mikrokültür sistemlerindeki son gelişmeler, hücrede bakterilerin, özellikle de *C. burnetii*'nin izolasyonunda iyileşmeye izin vermiştir [73].

In vitro kültürler için HEL hücreleri gibi bir dizi hücre dizisi kullanılabilir. Kan, beyin omurilik sıvısı, kemik iliği, kalp kapakçığı, vasküler anevrizma veya greft, kemik

biyopsisi, karaciğer biyopsisi, süt, plasenta ve düşükten sonraki fetal örnekler dahil olmak üzere birçok insan örneği *C. burnetii* kültürü için uygundur [74].

Q hummasının serolojik tanısı. Klinik teşhis zor olduğundan, çoğu durumda Q ateşinin teşhisi serolojiye dayanır. Çeşitli yöntemler tanımlanmıştır: mikroaglutinasyon (MA), kompleman fiksasyon testi (KBT), radioimmunoassay (RIA), indirekt immünfloresan antikor testleri (IFA), indirekt hemoliz testi, ELISA, enzim bağlantılı immünosorbent floresan testi, dot immunoblot ve Western immunoblot [73]. Tanıda hangi testin seçileceği, özgüllüğü, duyarlılığı, pozitif tahmin değeri, maliyeti ve gerekli antijen miktarı gibi kriterler göz önüne alınarak yapılır. En güvenilir ve yaygın olarak kullanılan yöntemler, dolaylı immünofloresans, kompleman fiksasyonu, ELISA ve mikroaglutinasyondur [73].

- *İndirekt immünfloresan testi (IFA)*; Q hummasının serolojik tanısı için referans yöntemdir. En basit ve en doğru serolojik tekniklerden biridir [73]. Hastalığın ilk 2 haftasında Q humması hastalarının serumlarındaki immünoglobulin M (IgM) antikorlarını saptamak için kullanılmaktadır. Tek bir serum örneğinde IFA testi kullanılarak anti-*C. burnetii* IgM antikorunun tahmin edilmesinin, insanlarda akut enfeksiyonun doğrulanmasında yararlı olduğu kanıtlanmıştır. IFA yöntemi, kompleman fiksasyon testinden daha duyarlı ve spesifiktir; ancak ELISA'dan daha az hassastır. Bu nedenle, Q humması serolojisi için immünofloresan eşik değerinin doğrulanması, tanının oluşturulması için önemli olmalıdır [78].

- *Kompleman fiksasyon testi (KBT, CFT)*; oldukça spesifik olan bu test duyarlılıktan yoksundur. IFA ile karşılaştırıldığında IFA'dan daha az spesifiktir. Ayrıca, immünfloresan testinden daha fazla zaman alır. Serumlar, faz II antijenlere karşı test edilmeden önce ısıyla inaktive edilir. Bu yöntem hem anti-faz I hem de II antikorlarını tespit eder. Sonuçların yorumlanması akut ve iyileşme dönemi serum örneklerini gerektirir. Serokonversiyon, immünofloresan testi veya ELISA'dan daha sonra kompleman fiksasyon testi ile tespit edilir (semptomların başlangıcından 10 ila 20 gün sonra) [73]. KBT' nin duyarlılığı ve özgüllüğü de yakın zamanda Avrupa Birliği'nde Q humması için tanı ve vaka tanımlarına standart bir yaklaşım öneren Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) tarafından ELISA ve PCR teknolojisinin benimsenmesiyle sorgulanmıştır [79].

- *ELISA (the enzyme-linked immunosorbent assay)*; İlk olarak 1983 yılında ELISA, Q humması tanısında kompleman fiksasyonundan daha spesifik ve duyarlı olarak tanımlanmıştır. IFA' ya göre daha duyarlı bir test olduğu belirtilmiştir [73]. Bir salgın sırasında serum örneklerinin IFA ile taranması zahmetli olduğundan, kolaylık sağlamak için IgM faz II'ye yönelik enzime bağlı immünosorbent analizi (ELISA) kullanılır [80].

Teknik olarak, mikrotitre plakaları saflaştırılmış *C. burnetii* antijenleri ile kaplanmıştır. %0.1 Tween 20 içeren fosfat tamponlu salin içinde seri olarak seyreltilmiş serumlar daha sonra antijenlerle inkübe edilir ve alkalın fosfatazla konjuge tavşan anti-insan IgG, IgM ve IgA ile antikorlar tespit edilir. Hem anti-faz I hem de II antikorları tespit edilir [73].

ELISA'da kullanılan antijen çoğunlukla faz I veya faz II *C. burnetii*' nin tam hücre preparatıdır. Biyogüvenlik seviyesi (BSL)-3 laboratuvarında *C. burnetii* kültürleme ve saflaştırma tehlikesi ve zorluğu nedeniyle, antijenler çoğu klinik laboratuvarında bulunmaz. Q humması için ticari olarak temin edilebilen ELISA testleri bulunmasına rağmen, serolojik test sonuçları aynı kiti kullanan farklı laboratuvarlar arasında önemli ölçüde farklılık gösterebilir. Bu, tüm hücre antijeninin hazırlanmasındaki doku kültürü proteinlerinden kaynaklanıyor olabilir [81, 82].

-*Western-Blot*; Q hummasının teşhisi için hem spesifik hem de duyarlı bir yöntem olarak bildirilmiştir. Zaman alıcı bir yöntem olduğu için tarama için uygun değildir [73].

-*Dot-immunoblotting*; immünfloresans deneyi ve ELISA kadar duyarlı ve spesifik bir testtir ve kompleman fiksasyon testinden daha duyarlıdır. Tarama testi olarak önerilmektedir [73].

-*Mikroaglutinasyon Testi (MA)*; basit ve duyarlıdır ve *C. burnetii*'ye karşı erken bir antikor yanıtını tespit edebilir, ancak büyük miktarlarda antijen gerektirme dezavantajına sahiptir [73, 83]. Kompleman fiksasyon testinden daha yüksek duyarlılığa sahiptir [84].

İndirekt hemoliz testi; 1990 gibi erken bir tarihte indirekt hemoliz testi önerilmiştir. Bu testin oldukça hassas ve spesifik olabileceğini ve kronik Q hummasının takibine hizmet edebileceği öne sürülmüştür [73].

Radioimmunoassay (RIA); IgM antikor-yakalama prensibine dayanan bu teknikte ¹²⁵I kullanır ve bu nedenle radyoaktivite donanımlı laboratuvarlarda yapılmalıdır [73, 85].

2.1.6 Tedavi

Akut Q hummasında genellikle herhangi bir tedavi uygulanmadan iyileşme görülmesine rağmen, gelişebilecek komplikasyon ve kronik enfeksiyon ihtimallerine karşı tedavi uygulanmalıdır. Tanısı doğrulanmış veya şüpheli semptomatik olgular tedavi edilmelidir. Özellikle semptomların ilk üç günü antibiyotik tedavisine başlanırsa etkili olur [37].

Hem akut hem de kronik Q humması için antimikrobiyal ajanlarla tedavi önerilmektedir. Akut Q humması için çeşitli tedaviler kullanılmıştır, ancak doksisisiklin referans tedavi olarak kabul edilir. Doksisisiklinin, tedavinin başlangıcından sonra ortalama 2-3 günlük bir sürede ateşi düşürdüğü, tedavi edilmeyen ise ateşin ortalama 12.5 gün sonra düzeldiği görülmüştür. *β*-laktamların *C. burnetii* üzerinde çok az etkisi vardır, ancak makrolidler, ko-trimoksazol, kinolonlar ve rifampin ile bazı başarılar bildirilmiş, ancak bunların hiçbiri doksisisiklin kadar etkili olmadığı görülmüştür. ABD Hastalık Kontrol Merkezleri ve Q humması çalışma grubundan Q humması tedavisi ve yönetimi için yeni kılavuzlar, iki hafta boyunca günde iki kez 100 mg doksisisiklinli yetişkinlerde akut Q humması için birincil tedavi önermektedir [86].

Kronik Q hummasının tedavisi tarihsel olarak çok daha zor olmuştur. Doksisisiklin etkili olanıdır, ancak uzun süreli tedaviden sonra nöksler 1980'lerde ve 1990'larda yaygındır. Doksisisiklin ve klorokin kombinasyonunun tek başına doksisisikline göre çok daha fazla bakterisidal aktiviteye sahip olduğu *in vitro* deneylerle gösterilmiştir. Kronik Q humması, tedavi edilmezse yüksek hastalık ve ölüm oranlarına yol açar, bu da yüksek risk altındaki hastalar için önleyici tedbirleri kritik hale getirir. Q humması tedavisi, uzun süreli antimikrobiyal ilaç tedavisinden, tercihen 18-24 ay

süreyle doksisisiklin ve hidroksiklorokin kombinasyonundan oluşur. Doksisisiklin ve hidroksiklorokin kombinasyonunun, Q humması endokardit hastalarının kötü sonuçlarını azaltmada etkili olduğu gösterilmiştir [86-88].

Hamilelik, Q humması tedavisi için bir zorluktur. İnsanlarda, hamilelik sırasında Q humması, spontan düşükler, intrauterin büyüme geriliği ve intrauterin fetal ölüm ile ilişkilendirilmiştir. Birçok kadın hamilelik sırasında serolojik bir kronik Q ateşi profili geliştirir ve canlı bakteri, tedaviden sonra bile hamileliğin sonunda hastalardan izole edilebilir. CDC'nin mevcut önerisi, akut Q humması olan kadınları gebeliğin son altı haftasına kadar ko-trimoksazol ile tedavi etmek ve kronik Q humması serolojik profili geliştiren kadınlara doğum sonrası 12 ay boyunca doksisisiklin ve hidroksiklorokin vermek şeklindedir. Doksisisiklin, fetüse yönelik risk nedeniyle hamilelik sırasında risklidir. ABD Gıda ve İlaç İdaresi, doksisisiklini gebelik kategorisi D'ye yerleştirir, bu da hamilelik sırasında doksisisiklin alınırsa fetus için pozitif risk kanıtı olduğunu gösterir [86, 89].

Q humması görülme sıklığı yaşla birlikte artmasına ve çoğu vaka yetişkinlerde görülmesine rağmen, çocuklar da *C. burnetii* ile enfekte olabilir ve semptomatik Q humması olabilir. Akut Q humması olan çocuklar için tedavi önerilir ve 8 yaşın üzerindeki çocuklar için mevcut tedavi kılavuzları, günde iki kez 2,2 mg / kg'lık bir dozda (doz başına 100 mg'ı geçmeyecek şekilde) iki haftalık bir doksisisiklin tedavisi gerektirir. 8 yaşın altındaki çocuklar için doksisisiklin tedavisi, diş lekesi riski gibi ek sorunları gündeme getirir. Bu nedenle, 8 yaşın altındaki çocuklar için, CDC tarafından 1:5 oranında bir trimetoprim ve sülfametoksazol karışımı (ko-trimoksazol) önerilmektedir. Trimetoprim bileşeni için 4-20 mg / kg'lık (doz başına maksimum 800 mg) bir doz aralığı önerilir [86, 90].

2.1.7 Korunma ve Kontrol

İnsandan insana bulaşma son derece nadir olduğundan ve Q humması esas olarak kontamine partiküllerin aerosolizasyonu ile geçen bir hastalık olduğundan, önleme tedbirleri, insanların ve özellikle risk altındaki kişilerin hayvan ve çevre kirliliğine maruz kalmasını önlemeyi amaçlamaktadır [60, 91].

Hayvan ve çevre kirlenmesini önlemek ve azaltmak için birkaç eylem önerilebilir. Enfeksiyonun yayılmasını önlemek için, yeni bir hayvanı Q humması bulunmayan sürüye sokarken özel dikkat gösterilmelidir. Doğum, hastalığın bulaşması için kritik olduğundan, enfekte sürülerde doğumun yapıldığı yer ve doğum için kullanılan her gereç dezenfekte edilmelidir. Patojeni yayabilecek plasentalar ve fetüsler, evcil veya vahşi etçiller tarafından yutulmalarını önlemek için koruyucu giysiler giyen kişiler tarafından mümkün olan en kısa sürede alınmalı ve imha edilmelidir. Gübrenin serpilmesi asla rüzgar estiğinde yapılmamalı ve tarlaya yayılmadan önce gübrenin üzeri örtülmelidir. Tetrasiklinlerle antibiyotik tedavileri, düşüklerin sayısını ve doğum sırasında dökülen *C. burnetii* miktarını azaltmak için kullanılabilir. Süt pastörizasyonu veya enfekte sürülerin sütünün sterilizasyonunun düzenli olarak yapılması tavsiye edilir. Q humması geniş çapta yetersiz teşhis edildiğinden, pratisyenlerin yanı sıra profesyonel olarak maruz kalan bireyler (örn. geviş getiren ve geviş getiren ürünlerle çalışan kişiler, veteriner hekimler, geviş getiren hayvanları inceleyen araştırmacılar dahil laboratuvar çalışanları), enfekte sürülerin ve avcılarının bulunduğu alanların yakınında yaşayan insanlar, hastalığın çeşitli semptomları hakkında bilgi sahibi edindirilmelidir. Risk gruplarında hastalığı gerçekten önlemenin tek yolu aşılama [60].

2.1.8 Aşılar

İnsanlarda ve hayvanlarda kullanılan mevcut aşılar, formalinle öldürülmüş tam hücre aşı preparatlarını (WCV) ve kloroform metanolle ekstrakte edilmiş bakteri kalıntısını (CMR) içerir [60]. WCV'den farklı olarak, birden fazla CMR dozu, yan etkiler olmaksızın uygulanabilir [92].

Günümüze kadar insanlara uygulanmak üzere dört tip Q humması aşısı geliştirilmiştir. Bunlar: formalinde inaktive edilmiş tam hücre *C. burnetii* faz I aşısı (O-Vax®; Commonwealth Serum Laboratories), canlı-atenüe M-44 ve 1/m-44 aşısı, faz I hücrelerinin triklor asetik ile muamelesiyle elde edilmiş çözünabilir subünit aşısı (kemovaccine) ve kloroform-metanolda işlem görmüş *C. burnetii* faz I subünitini içeren aşı (CMR) [37]. Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylı Q humması aşısı bulunmamaktadır [58].

Formalin ile inaktive edilmiş tam hücreli *C burnetii* aşısı, faz I hücresel aşı, Henzerling suşu Q-Vax® (CSL Limited, Parkville, Victoria, Australia) Avustralya'da yaygın olarak üretilmiş, lisanslanmıştır ve kullanılmıştır [93]. Etkinliği, 200 mezbaha çalışanı arasında bir randomize kontrol çalışmasında test edilmiştir. 15 aylık takip süresince kontrol grubunda yedi vaka olduğu ve aşılanan grupta hiç vaka olmadığı görülmüştür [63]. 1981 ve 1989 yılları arasında 4000 kişide kullanılmış, aşının tam ve kalıcı bir koruma sağladığı ve şiddetli Q humması vakalarını (kilo kaybı, pnömoni, hepatit veya başka herhangi bir atipik görünümle birlikte 2-6 haftalık ateşli bir hastalık olarak karakterize edilen) önlediği sonucuna varılmıştır. Bugün kullanımda olan en kapsamlı test edilmiş Q humması aşısı "Q-Vax®" tır [94]. Mezbaha çalışanlarına tek doz aşı uygulaması yapıldıktan sonra 3. ayda %80 olan bağışıklık cevabının 20. ayda %60'a düştüğü, doğal yola gelişen Q hummasına beş yıl süreyle koruyuculuk sağladığı gösterilmiştir [37]. 2002 yılında Avustralya'da ulusal olarak finanse edilen bir aşılama programı başlatıldı. Programa bağlılık mezbaha çalışanları arasında %100 ve çiftçilerde %43'tür. Bu kampanyadan sonra Q humması bildirimi %50 azaldı ve hastaneye yatış sayısı da azalmıştır. Ne yazık ki, özellikle etkene önceden maruz kalan kişilere uygulandığında, hafif ile şiddetli advers reaksiyonlara neden olabilir. Hastalar aşılama öncesi Q ateşi için kutanöz test (Q-Vax® deri testi) ile değerlendirilmelidir. Aşılama yerinde reaksiyonlardan kaçınmak için aşılama öncesi serolojik test ve 0,02 mg aşı ile deri testi önerilir [60, 63, 68, 94, 95].

ABD'de formalinle inaktive edilmiş bir tam hücre aşısı (IND 610), araştırma amaçlı olarak kullanılmıştır. Henzerling suşunun faz I hücrelerinden hazırlanmış ve iyi bir güvenlik ve etkinlik profiline sahiptir. Bununla birlikte, aşılama öncesi deri testinin varsayılan önemi, bu ürünün biyoterörizmle ilgili kullanım gibi herhangi bir potansiyel geniş ölçekli kullanımda dikkatlice değerlendirilmesi gerekecek ve pratik olmayacaktır. IND 610 aşısı şu anda mevcut değildir [94].

Zayıflatılmış mikroorganizmalar genellikle Q humması aşıları olarak kullanılmasa da eski Sovyetler Birliği'ndeki Yunan "Grita" türünden M-44 olarak adlandırılan faz II zayıflatılmış suş geliştirilmiştir. Bu aşı, insanlarda yan etkilere neden olabilir ve kobaylarda miyokardit, hepatit, karaciğer nekrozu, granülom oluşumu ve dalak

iltihabına neden olmuştur. İnsan aşıları, anti-faz I antikorları geliştirmede ve anti-faz II seviyeleri değişken ve düşük titrede idi [17, 96].

Veteriner hekimliği alanında, geviş getiren hayvanların Q hummasına karşı korunmasında iki aşı, Chlamyvac FQ® (Merial, France) ve Coxevac® (CEVA Santé Animale, France) ticari olarak mevcuttur. İnaktive edilmiş *C. burnetii* faz II partikülleri ve bir *Chlamydia* bileşeni içeren bir tam hücre aşısı olan Chlamyvac FQ®, yalnızca Fransa'da onaylanmıştır. İnaktive edilmiş faz I partiküllerini içeren Coxevac® için Avrupa'da lisanslanma süreçleri devam etmektedir. Coxevac ile aşılama, düşük insidansının azalmasını sağlamıştır [16, 68, 97].

Taşıyıcıya bağlı, rekombinant DNA ile üretilen veya *C. burnetii* epitoplarından türetilen sentetik peptid alt birim aşılılarıyla immünizasyonun sağlanması yeni çalışmaların gündemindedir. Faz I lipopolisakkarit ve çeşitli yüzey proteinleri, alt birim aşılarda geliştirilmesi için adaylardır [94]. Faz I LPS'ye özgü monoklonal antikorun, bir fare enfeksiyon modelinde koruyucu olduğu gösterilmiştir [15]. Faz I LPS'nin koruyucu epitopunu taklit eden ve farelerde koruyucu antikor tepkisi ortaya çıkaran bir peptid dizisi (m1E41920) KLH proteini ile konjuge edilerek kullanılmış ve Q hummasına karşı güvenli ve etkili bir aşı geliştirmek için faydalı olabileceği belirtilerek Q hummasına karşı bir sentetik peptid aşısı geliştirmenin uygulanabilirliği gösterilmiştir [98, 99].

Faz I *C. burnetii* hücrelerinin kloroform-metanol ile ön muameleye tabi tutulmasıyla faz I aşılardan meydana gelen yan etkilerin ortadan kaldırılabilmesi öngörülmektedir. Bu tür bir kloroform-metanol kalıntısı bazlı aşının insanlarda kullanılması önerilmiştir [74, 96].

Ancak klasik yöntemlerle üretilen bu aşılarda bilinen dezavantajları, günümüzde hala önemli olan bu hastalığa karşı yeni nesil aşılarda üretilmesi gerekliliğine işaret etmektedir [18]. Açık ki, ön tarama gerektirmeyen güvenli, üretimi kolay ve etkili bir aşının geliştirilmesi gereklidir.

2.1.9 Gelecekteki yönlendirmeler

Son yirmi yılda serolojik tanı ve kronik hastalıkların tedavisinde büyük gelişmeler görülmüş ve genom haritası çıkarılmıştır. Q-humması immünolojisi bir sorun

olmaya devam etmektedir. Bakteri fagolizozomda gelişimi, canlı organizmanın kalıcılığının neden olduğu uzun vadeli sekel, spesifik antijenlerin kalıcılığı, bölgelere göre hastalık insidansı, meslek ve yaş grubu, hastalık şiddetinde varyasyon gibi bilgilere hangi grupların aşılacağına karar vermek ve Q humması hakkında farkındalık yaratmak için ihtiyaç vardır. Akut enfeksiyon tedavisinin uzun vadeli sekelleri önleyip engellemeyeceği ve çocuklar ve hamile kadınlar için en iyi antibiyotiğin ne olduğu hala bilinmemektedir. Doksisisiklin ile daha yeni antibiyotikleri karşılaştıran yetişkinlerde randomize bir çalışma memnuniyetle karşılanacaktır. Aşılama öncesi taramayı gerektirmeyen bir aşı, özellikle uzak bölgelerde erişilebilirliği artıracaktır [8].

C. burnetii biyolojik bir silah için tüm gereksinimleri karşılar: sürekli olarak sakatlığa neden olur; büyük ölçekte üretilebilir, üretim, depolama ve nakliye koşullarında sabit kalır; verimli bir şekilde yayılabilir ve yayıldıktan sonra yıllarca geçerli kalır. Q humması, büyük ölçekli yayılma potansiyeline sahip olmasına rağmen, kategori A ajanlarının (çiçek hastalığı, şarbon, veba, botulizm, tularemi ve viral hemorajik ateşi) potansiyel olarak neden olduğu büyük ölümler için kapasitesinden yoksun olduğundan, B kategorisi biyolojik terörist ajan olarak kabul edilir. Bununla birlikte, kategori A ajanları ile karşılaştırıldığında, Q humması yaygın bulunabilirliği, aerosol haline getirilmiş kullanım için doğal potansiyeli, çevresel stabilite ve büyük miktarlarda bulaşıcı materyal üretme olasılığı nedeniyle biyolojik bir silah olarak kullanım için daha uygun olabilir [94].

Q hummasının devletlere ve topluma maliyeti oldukça yüksektir. NSW ve Queensland'den elde edilen Workcover verilerini kullanan bir çalışmada, Avustralya genelinde yılda yaklaşık 322 Q humması şikayeti olduğunu ve 1.3 milyon dolara (iddia başına ortalama 4.037 \$) mal olduğunu tahmin etmiştir. Kronik Q humması ile ilişkili maliyetler iyi belgelenmemiştir ve bu nedenle ölçülmesi zordur. Bununla birlikte, mesleki olarak edinilen kronik Q hummasının gelişmesini takiben işverenlerine karşı teamül hukuku davası açan kişilerle yasal uzlaşma sağlanmıştır ve bu ödemeler yaklaşık 1,1 milyon ABD dolarını bulmaktadır [100].

Hollanda'da 2007-2011 döneminde Q humması salgınını kontrol etmeye yönelik ekonomik etki çalışmaları maliyetlerin önemli olduğunu ortaya koymuştur. Yapılan

çalışmada Q humması salgınının toplumsal maliyetinin yaklaşık 250-600 milyon Euro olduğu hesaplanmıştır [101].

Tüm bu sağlık, ekonomik ve güvenlik sebeplerinden dolayı *C. burnetii* üzerine devam eden incelemeler, çaresiz çözüme ihtiyaç duyan iki araştırma alanı olarak aşı geliştirme ve hastalığın tanısı üzerinde yoğunlaşmaktadır.

2.2 Lineer Polimer Özellikteki Antijen Taşıyıcılar

Çeşitli yapılara sahip lineer sentetik polimerlerin immüno-uyarıcılar olarak pratik kullanımı çok çekici görünmüştür çünkü ilk olarak sentetik polimerlerin kendileri immünojenik değildir. Temel amaç, insan uygulamasına uygun sentetik polimerlerin, yan etkiler olmaksızın sentezlenmesidir. Sentetik polimerler, tipik antijenler (proteinler, lipopolisakkaritler vb.) ile karışımlara dahil edildiklerinde, birkaç kat bağışıklık tepkisini arttıran immüno-uyarıcılar olarak görev yaparlar. Ayrıca, kendi başlarına yeterince aktif olmayan tek tek bakteriyel veya viral antijenler, sentetik polimerlere kimyasal olarak bağlanırsa spesifik immün tepkisini indükler. Önceden uygulanan bu tür konjugatlar, organizmaları ilgili bakteri veya virüslerin mutlak ölümcül dozlarından korur [21].

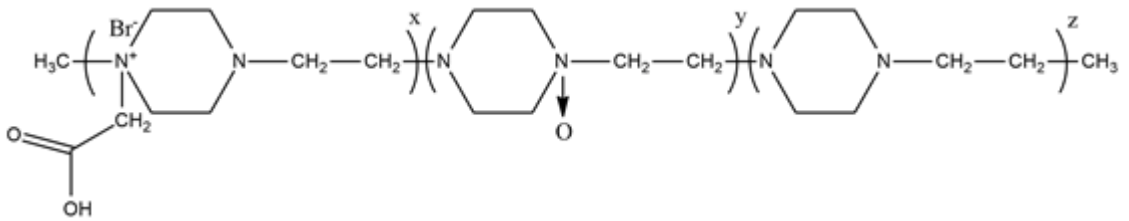
Lipolisakkaritlere karşı antikor üretiminde immünojenliği arttırmak için bu biyomoleküller lineer özellikteki polimerlere bağlanabilmektedir. Bu tez kapsamında kullanılan Poli(N-Vinil-2-Pirolidon-ko-Akrilikasid) P(VP-ko-AA) ve polioksidonyum (POX) polimerik aşı sistemlerinde sıklıkla tercih edilen ve biyomoleküllere kovalent bağlarla bağlanan lineer özellikteki taşıyıcı polimerlerdir [19, 20].

2.2.1 Polioksidonyum (POX)

Polioksidonyum, N-oksitlenmiş polietilen-piperazin türevi, sentetik, suda çözünür, toksik olmayan ve polikasyonik immünomodülatör bir polimerdir. Biyouyumlu bir polimer olan polioksidonyum, özellikle aşılar için bir immün adjuvan olarak kullanılmaktadır. Akut ve kronik hastalıkların tedavisi için bir immün modülatör olarak kullanılır [21, 22, 102-104].

1,4-diaminobisiklo (2,2,2) oktan (DABCO) (trietilendiamin) çeşitli nedenlerden dolayı başlangıç monomeri olarak seçilmiştir (teknik, ekonomik parametreler).

"Canlı" zincir mekanizması yoluyla polimerizasyonu, çok dar bir moleküler kütle dağılımına sahip poli-1,4-etilenepiperazin oluşumuna yol açar. Toksik olmayan polikasyonik immünostimülan "polioksidonyum", birimlerinin belirli bir fraksiyonunun hidrojen peroksit ile N-okside oksidasyonu ve ardından oksitlenmemiş amin gruplarının bromoasetik asit ile kısmi kuaternizasyonu yoluyla bu polimerden sentezlenmiştir. 1,4-etilenepiperazin, 1,4-etilenepiperazin-N-oksit ve (N karboksimetilen) -1,4-etilenepiperazinyum bromürün suda çözünür üçlü bir kopolimeri olan polioksidonyumun sentez ve yapısal formülünün şeması Şekil 2. 2'de gösterilmiştir [21].



Şekil 2. 2 Polioksidonyumun Yapısı [21]

Şu anda Rusya'da başarıyla kullanılan ilk Pastör olmayan aşı olan "Grippol" aşısı, influenza virüsünün protein antijenleri olan hemagluttinin ve nöroaminidazın polioksidonyuma kovalent konjugasyonu ile elde edilmiştir ve endüstriyel ölçekte üretilmektedir. Rusya Federasyonu Ulusal Aşılama Programı, Rusya'da Grippol ailesi aşılarının kullanımını onaylamıştır. İlk alt birim Rus aşısı Grippol, 1996 yılında tescil edilmiştir. O zamandan beri, "polimer adjuvan-saf antijenler" kullanma ilkesini uygulayan tek bir teknolojik platforma dayalı olarak birkaç Grippol aşısı geliştirilmiş ve onaylanmıştır: Grippol, Grippol plus, pandemik MonoGrippol plus ve Grippol Quadrivalent. . Tüm Grippol ailesi aşıları yüksek güvenlik profiline sahiptir. Yaklaşık 50 milyon kişinin katıldığı bir analize göre, yirmi yılı aşkın süredir bu aşılardan yetişkinler, çocuklar ve yaşlılar için güvenli ve etkili olduğu kanıtlanmıştır [21, 105-108].

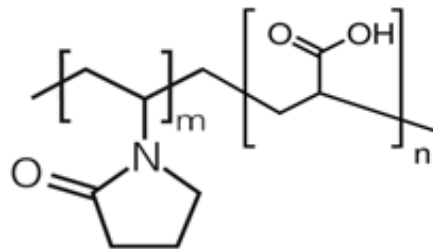
Elçiçek vd. yaptıkları bir çalışmada POX kullanılarak leishmaniasis karşı atenué olmuş aşı modelinin geliştirilmesinin mümkün olduğunu göstermişlerdir. POX'a maruz kalan Visceral leishmaniasis (VL) etkeni *L.infantum* promastigotlarının *in vitro* makrofaj kültürlerindeki enfektifliklerinin ve oluşturdukları hücre

yanıtlarının, *in vivo* olarak ise parazite karşı oluşan hümmoral ve hümmresel immün yanıtın incelenmesi sonucunda leishmaniasise karşı attenüe aşı modelinin oluşturulmasında yeni bir yaklaşımın geliştirilmesi olmuştur [109].

Zorba vd. yaptığı bir çalışmada *Leishmania tropica* tüm yüzey antijenleri ile polioksidonyum adjuvantını kullanarak immünize edilmiş farelerde 8. immünizasyon sonucunda antikor düzeyinin kontrole göre yaklaşık 5.5 kat arttığını saptamış, Freund's adjuvanına karşı ilk kez olarak toksik olmayan FDA onaylı POX'un daha etkin olduğu ortaya çıkmıştır [110].

2.2.2 Poli(N-Vinil-2-Pirolidon-ko-Akrilikasid) P(VP-ko-AA)

Poliakrilik asit (PAA), adjuvan olarak kullanılabilen, zayıf sentetik polielektrolitlerden yüksek moleküler ağırlıklı bir anyonik polimerdir. Ancak yüksek toksisitesi nedeniyle immünolojide geniş kullanım alanı bulamamıştır. Bu nedenle, akrilik asit ile N-vinil-2-pirolidonun kopolimeri P(VP-ko-AA) biyoyumlu olması nedeniyle immünolojik sistem için bir adjuvan olarak kullanılabilir [23]. Rafikov ve meslektaşları, N-vinil-2 pirolidonun akrilik asit ile kopolimerlerinin belirgin bir bağışıklık uyarıcı etkiye sahip olduğunu ve biyoyumlulukları nedeniyle immünolojik sistem için bir yardımcı madde olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Kızılbey ve ark. melanoma kanserine karşı aşı geliştirmek amacıyla P(VP-ko-AA)'ın adjuvant olarak kullanıldığı peptid-polimer kompleks ve konjugatlarının farelere uygulandığı *in vivo* çalışmalarında P(VP-ko-AA)'ın peptidin immün yanıtı arttırmada etkili olduğunu göstermişlerdir [111]. P(VP-ko-AA)'nin yapısı Şekil 2.3' de gösterilmiştir.



Şekil 2. 3 Poli(N-Vinil-2-Pirolidon-ko-Akrilikasid)' in yapısı [112]

Bir çalışmada *Salmonella* polisakkariti ile iki çeşit konjugat farelere uygulanmıştır. Konjugat 1 için, bakteriden izole edilen polisakkarit antijen (PS) ve P(VP-ko-AA);

konjugat 2 için ise PS ve flagellin proteinleri, aynı P(VP-ko-AA) ile konjuge edilmiştir. 14-30 gün sonra, konjugasyonlardan oluşan aşı formulasyonlarının uygulandığı fareler ile kontrol grubu paralel olarak öldürücü dozda antijene maruz bırakılmıştır. Tüm aşı formülasyonunu alan bağışıklı hayvanlar iyileşirken kontrol grubundaki hayvanların öldüğü görülmüştür. Polisakkariti tek başına içeren antijen madde ile aşılama korumanın tamamen olabilmesi için etken maddenin konjugat 2' ye göre 10 kat fazla olması gerekmiştir. Antijen olarak tek başına polisakkaritin makul dozları neredeyse hayvanları korumamıştır [113].

2.3 Polielektrolit-Antijen Kompleksleri

İmmünojenik olmayan sentetik polielektrolitler (PE) (negatif veya pozitif yüklü polimerler), çeşitli sistemlerde immünoadjuvan aktiviteyi ortaya çıkarır ve bunların aşılama öncesi verilen antijenlerle kompleksleri / konjugatları hastalığa karşı koruma sağlar [24]. Polielektrolit-antijen kompleksleri kovalent olmayan etkileşimlerin birçoğu ile oluşabilir. Elektrostatik kuvvetler zıt yüklü grupları içeren tüm etkileşimleri esnek bir şekilde tanımlamaktadır. Polielektrolit kompleksleri timusa bağlı antijenleri timusa bağlı olmayan immünojenlere çevirme imkanı sağlamaktadırlar [114].

Üçlü komplekslerde taşıyıcı olarak kullanılan PE, henüz kontrol edilemeyen enfeksiyonlara karşı sentetik aşılama üretme yolunu sağlayan kararlı bir kompleks (yani organizmanın bağışıklık tepkisini birkaç kat artırır, ancak aynı zamanda etkili bağışıklık koruması sağlar) oluşturmak için mikrobiyal ve viral antijenlerle sıkı bir şekilde bağlanır. PE makromolekülleri, antijen bağlanması için karşılık gelen elektrostatik veya hidrofobik grupları içermez, biyolojik sistemler üzerindeki etki / etkilerine yol açabilen taşıyıcı polimerin modifiye edilmesi gerekir [21]. Kararlı bir kompleks hem bir bağışıklık tepkisi geliştirmek hem de etkili bağışıklık sağlamak için önemlidir. Özellikle suda çözünür polielektrolit-mikrobiyal antijen konjugatları ve Cu^{2+} gibi metal iyonları ile polimer-metal-antijen biyokompleksleri aşı için rol modeldir [115]. Bu polikomplekslerden bazıları güçlü immünojenite ortaya koyar ve yüksek düzeyde immünolojik koruma sağlar [116-118]. Polielektrolit-metal-antijen 3'lü komplekslerinin oluşturulma yöntemi, bileşenlerin kimyasal yapısında kayda değer bir değişikliğe neden olmadan PE'nin antijen molekülüne bağlanmasını

destekleyen küçük konsantrasyonlarda metal katkı maddelerinin (Fe^{3+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} , vb.) kullanılmasından oluşur. Bu tür PE-metal-antijen polikompleksleri, antijen, geçiş metal iyonları ve PE'lerin solüsyonlarının farklı pH değerlerinde suda basitçe karıştırılmasıyla elde edilmektedir [119].

2.4 Biyokonjugasyon ve Çapraz Bağlama Reaktifleri

Çapraz bağlama iki ya da daha fazla molekülün bir kovalent bağ yoluyla kimyasal olarak bağlanma prosesine denir. Bu proseste bağlananlardan birinin biyomolekül olması durumunda biyokonjugasyon olarak adlandırılır. Biyokonjugasyon reaksiyonları, küçük moleküllü antijenlerin verilmesi için en önemli yöntemlerden biridir. Biyokonjugatların geleneksel yöntemlerle sentezi, makromoleküllerin sulu çözelti içindeki fonksiyonel gruplar tarafından aktivasyonu ile gerçekleşir. Spesifik fonksiyonel gruplara (primer aminler, sülfidril gibi) kimyasal olarak bağlanabilen ve iki ya da daha fazla reaktif uç içeren moleküllere çapraz bağlayıcı reaktifler denir [23, 25, 26].

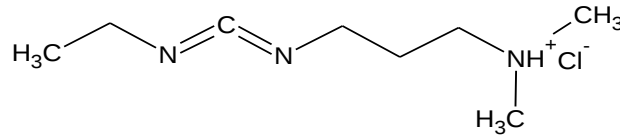
Çapraz bağlayıcı reaktifler aktif bağın sağ ve solundaki R grupları aynı olduğunda homobifonksiyonel, farklı R grupları olduğunda ise heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar olarak sınıflandırılırlar [120]. Homobifonksiyonel çapraz bağlama reaktifleri seçici gruplarına göre amino grubuna (NHS esterleri vb.), sülfidril grubuna (bis-maleimidler vb.) ve karboksil grubuna yönelen (diazo bileşikler vb.) reaktifler olmak üzere sınıflandırılır. Heterobifonksiyonel çapraz bağlama reaktifleri yaygın olarak kullanılan ve yöneldikleri seçici gruplara göre amino ve sülfidril grubuna, karbonil ve sülfidril grubuna, amino ve karboksil grubuna, amino grubuna yönelen ve fotoreaktif grup içeren vb. olmak üzere sınıflandırılmıştır [121].

Karboksil ve amin grupları arasında amid bağlarının oluşumuna aracılık etmek için kullanılan karbodiimidler (CDI) sıfır uzunlukta direkt (zero-length) çapraz bağlama maddeleridir ve özel bir alt bölüm olarak sınıflandırılır.

1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür (EDC ya da EDAC), polimerlerin antijenler ile bağlanmasında aktif bir rol oynar. Temel olarak EDC mekanizması, polimerlerin karboksil gruplarını EDC ile modifiye etmek ve aktif

polimer gruplarına bir amid bağı oluşturarak antijenlerin amino gruplarını kovalent olarak bağlamaktır [23, 27, 28].

EDC mekanizması daha ayrıntılı açıklanacak olursa: kovalant konjugasyon gerçekleştirilmesi için yapılan karbodiimid aktivasyonu 2 basamakta gerçekleşmektedir. Polimerdeki karboksil gruplarının aktivasyonu ile aktif hale getirilen karboksil grupları ve antijenin amino grupları arasında kondenzasyon reaksiyonu oluşmaktadır. Birinci basamakta karboksil grubu karbodiimide saldırır ve sonucunda ara ürün olarak kararsız O-açilisoüre oluşmaktadır. Bu ara ürün antijendeki amino gruplarına saldırmaktadır ve sonucunda polimer ile antijen arasında çapraz bağlanma gerçekleşmektedir [122].



Şekil 2. 4 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür molekülünün kimyasal yapısı [122]

Nalbantsoy vd. 2010 yılında yaptıkları çalışmada *Salmonella Enteritidis*'in lipopolisakkaridine (LPS) özgü monoklonal antikorlar (Mabs), Balb / c farelerinin LPS ile sentetik polimer bağışıklılaştırma modelinde geleneksel hibridoma yöntemi ile değerlendirmişlerdir. Hayvanlar adjuvan özellikli sentetik polimerlerden Poliakrilik asit ile oluşturulan LPS-PAA ve LPS-Cu²⁺-PAA kompleksleri ile immünize edilmiştir. Tanıya yönelik ileriye dönük olarak uygulanabilecek *Salmonella Enteritidis*'e karşı LPS'ye özgü Mab üretilmesinde LPS aracılı PE kompleksleri ile immünize edilmesinin, immün tanımda daha etkili olduğunu belirtmişlerdir [123].

DENEYSEL ÇALIŞMALARDA KULLANILAN ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ

3.1 Kullanılan Malzemelerin ve Cihazların Listesi

3.1.1 Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasalların Listesi

Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar marka ve katalog numaraları ile birlikte Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3. 1 Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar

1-Vinil-2-pirolidon	Fluka	95060
Benzoil peroxide	Fluka	33581
Akrilik asit anhydrous	Fluka	01730
Kobalt naftanat	Fluka	60830
Tetrahidrofuran (THF)	J.T. Baker	9441
Etil asetat	Riedel-de Häen	27227
Sodyum dihidrojen fosfat, (NaH_2PO_4)	Riedel-de Haën	04361
Sodyum hidrojen fosfat, ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	Fluka	71647
Sodyum klorür, (NaCl)	Fluka	71376

Tablo 3.1 Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar (devamı)

Sodyum hidroksit, (NaOH)	Fluka	06203
Hidroklorik asit, (HCl)	Riedel-de Haën	07102
Sodyum azid, (NaN ₃)	Applichem	A1430
Skim Milk Powder	Fluka	70166
4-Nitrophenyl phosphate di(tris) salt	Sigma	N-3254
Bakır (II) sülfat pentahidrat, CuSO ₄ .5H ₂ O	Sigma-Aldrich	209198
1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC)	Sigma	E-7750
Sodyum dihidrojen fosfat, (NaH ₂ PO ₄)	Riedel-de Haën	04361
Sodyum hidrojen fosfat, (Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O)	Fluka	71647
Sodyum klorür, (NaCl)	Fluka	71376
Dietileter	Riedel-de Haen	24005
Tiyonil Klorür	Fluka	88952
Etilendiamin	Aldrich	240729-79-21

Tablo 3.1 Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar (devamı)

Sodyum borhidrür	Aldrich	452874
Sodyum periyodat	Fluka	71862
Gliserol	Sigma	G5516
Dekstran	Sigma	D-5251
Bovine serum albumin	Sigma	A-4503
Freund's Adjuvant	Sigma	F-5506
Antimouse Polyvalent Immunoglobulins (G, A, M)- Alkaline Phosphatase antibody produced in goat	Sigma	A0162
Ultra-pure water	Millipore MilliQ system	

3.1.2. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazların Listesi

- Sartorius CP 225D Hassas Terazı
- Precisa XB 220A Terazı
- Eppendorf Pipet (0,5-10µL, 20-200µL, 100-1000µL)
- IKAMAG Çoklu Karıştırıcı
- WTW pH level 1 pH metre
- Telstar Liyofilizatör CRY 000S-80
- Heildolph MR 3000 Manyetik Karıştırıcı

- Heildolph MR 3001 Isıticılı Manyetik Karıştırıcı
- Milipore-Q Gradient Ultra Saf Su Cihazı
- Hettich Eba20 Santrifüj Cihazı
- Eppendorf GL010 Santrifüj Cihazı
- Heraeus Biofuge Stratos Santrifüj Cihazı
- Viscotek 4 Detektörlü GPC (SEC) Sistemi
- Zetasizer Nano ZS Boyut ve Zetapotansiyel ölçüm cihazı
- ATR Aparatlı FT-IR Spektrofotometresi (Shimadzu, Prestige 2100)
- Shimadzu HPLC Sistemi (UV Detektörlü)
- BioTek Synergy HT ELISA reader
- BioTek ELx50 ELISA yıkayıcı
- Benmari (sıcak su banyosu)

3.2 Deneylerde Kullanılan Çözeltiler

3.2.1 0,01 M 'lik PBS Tamponu (pH=7,2)

2,68 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($M_w=268,07$ g/mol) tartılarak 1 L' lik balon joje içerisindeki 450 ml ultra saf suda çözülür. Aynı zamanda 1,56 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($M_w=156,01$ g/mol) tartılarak belirli bir miktar ultra saf suda çözünür. Hazırlanan NaH_2PO_4 çözeltisi balon jojedeki Na_2HPO_4 çözeltisinin üzerine eklenir ve tekrar karıştırılır. Bu karışıma son olarak 8,77 g NaCl eklenir, karıştırılır, pH'ı ölçülerek 7,2 'ye ayarlanır. Ultra saf su kullanılarak çözeltinin son hacmi 1 L'ye tamamlanır.

3.2.2 100 mM'lık NaHCO_3 Tamponunun Hazırlanması

1,68 g NaHCO_3 tartılıp, belirli bir miktar distile H_2O 'da çözülür. pH'ı 8 olacak şekilde pH ayarlaması yapılır. Son hacim 200 ml' ye tamamlanır.

3.2.3 Sodyum Sitrat Çözeltisi

0,22 g D-(+) Glukoz ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$; $M_w=180,16$ g/mol) tartılır ve 3 ml ultra saf suda çözünür. 0,08 g sitrik asit $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3$ ($M_w= 258.07$ g/mol) tartılır ve 3 ml ultra saf suda çözünür. 0,23 g sodyum sitrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $M_w= 294.10$ g/mol) 3 ml ultra saf suda çözünür. Bu üç çözelti birbirine eklenir ve son hacim ultra saf su ile 1 L'ye tamamlanır.

3.2.4 0,5 M PBS Tamponu (pH=7,2)

5,22 g potasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4 ; $M_w=174$ g/mol) tartılır ve 0.5 L ultra saf suda çözünür. 2,72 g potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4 ; $M_w=136$ g/mol) tartılarak belirli bir miktar ultra saf suda çözünür. K_2HPO_4 baz çözeltisi üzerine KH_2PO_4 asid çözeltisi eklenir. 0,15 M olacak şekilde 8,77g NaCl eklenir. pH 7,2' ye ayarlanır. Son hacim 5 litreye tamamlanır ve kaba süzgeç kağıdı ile süzülür.

3.2.5 Yıkama Tamponu

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

3.2.6 Substrat Tamponu

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

3.2.7 %0,1 Süt Tozu Çözeltisi

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

3.2.8 Polivalent İmmünoglobulin Alkalın Fosfataz Çözeltisinin Dilüsyonu

0,5 M 30 ml PBS (pH 7,2) çözeltisi üzerine 15 μ l polivalent immünoglobulin alkalın fosfataz eklenir ve vorteksle karıştırılarak 1/2000 dilüsyonu hazırlanır.

3.2.9 4-nitrofenil Fosfat Substrat Çözeltisinin Hazırlanması

4-nitrofenil fosfattan ($C_6H_5NO_2 \cdot P(OC_4H_9)_3$; $M_w= 461,4$ g/mol) 2,5 mg alınıp 25 ml substrat tamponunda çözünür ve karanlıkta saklanır.

3.3 Kullanılan Ölçüm Yöntemleri

Çalışmamız kapsamında GPC (Jel Geçirgenlik-Moleküler Eleme Kromatografisi), Boyut ve Zeta Potansiyel Ölçümleri, FTIR Spektroskopisi, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ve ELISA yöntemlerinden faydalanılmıştır.

3.3.1 GPC (Jel Geçirgenlik-Moleküler Eleme Kromatografisi)

Polimerler ve polimer-LPS konjugatlarının GPC analizleri üçlü dedektör sistemine sahip Viscotek TDA302 GPC kullanılarak gerçekleştirildi. Üçlü dedektör sistemi, kırılma indisi (RI; 660 nm), dik açılı ışık saçılımı (RALS; 670 nm) ve UV dedektörlerinden oluşur. Dedektörler 1.0 ml/dk akış hızında PBS mobil fazı kullanılarak sığır serum albümini (BSA) monomer piki ($M_n = 66$ kDa) çözeltisi ile kalibre edilmiştir. GPC verilerinin edinimi ve analizi için 4.6.0 (Malvern Panalytical Ltd., UK) yazılımı kullanılmıştır. Analizler Shim-pack Diol-300 (500 mm x 7.9 mm) kolonu kullanılarak oda sıcaklığında yapılmıştır. Mobil faz izokratik, 1.0 ml / dakika akış hızında ve pH 7.2 fosfat tamponu (PBS) kullanılmıştır. Kolonların biyolojik bozunmasını önlemek için mobil faz solüsyonlarına %0.05 NaN_3 eklenmiştir. Tüm çözeltiler 0.45 μ m'lik Millipore selüloz nitrat filtre ile süzölmüş ve kullanmadan önce degaze edilmiştir [124-126].

3.3.2 Boyut ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

Bir konjugat stabilitesi ve işlevselliği zeta potansiyelinin, boyutunun ve çevresel iyonik koşulların güçlü bir fonksiyonudur. Foton korelasyon spektroskopisinde(PCS) dinamik ışık saçılması (DLS) yöntemi partikül boyutu dağılımını ve partikül boyutunu belirlemek için kullanılır. DLS' de, bir çözeltideki parçacıklardan saçılan ışığın yoğunluk dalgalanmaları tespit edilir ve ilişkilendirilerek bir difüzyon katsayısı elde edilir. Difüzyon katsayısı elde etmek için çeşitli algoritmalar vardır, kümülan analizi Z-Ave adı verilen bir ortalama boyut verir. Algoritma ne olursa olsun, DLS' nin verdiği boyut hidrodinamik çaptır ve çözelti özelliklerinden etkilenir. DLS, Brownian hareketine dayalı olarak bir çözücüdeki partiküllerin boyutunu hesaplar. Homojen bir çözelti içindeki maddenin hidrodinamik çapı difüzyon katsayısı Stokes Einstein denklemi ile belirlenir. DLS ölçümü, monodispers ve polidispers malzemeler için uygundur, ancak DLS ölçümü

yüksek boyutlu numuneler için uygun değildir. DLS, geniş ölçüm aralığı sayesinde en yaygın ve oldukça basit ölçüm tekniğine sahiptir. DLS tekniğinin temel avantajı, ölçümlerin kısa sürede yapılabilmesi ve aparat maliyetinin düşük olmasıdır.

Sentezlenen kompleks ve biyokonjugatların partikül boyutu analizi, 4.0 mV He-Ne lazer (633 nm) ile donatılmış bir Zetasizer Nano ZS (Malvern) cihazı ile DLS tekniği kullanılarak yapıldı. Çözeltiler için 0.8872 cP viskozite ve 1.330 kırılma indisi kullanılarak 25 ± 0.1 °C'de otomatik modda ve 3 tekrarlı olarak ölçümler yapıldı. Tüm numuneler, ölçümlerden önce 0.20 µm RC membran filtre (Sartorius) ile filtre edildi [127, 128].

Elektroforetik ışık saçılımı (ELS), hassasiyeti, doğruluğu ve çok yönlülüğü nedeniyle askıdaki partiküllerin zeta potansiyelinin belirlenmesi için en iyi yöntemdir. Zeta potansiyeli, malzemenin yapısına ve ortama, örneğin pH, iyonik kuvvet ve hatta partikül süspansiyonundaki iyonların türüne bağlı olarak değişir. Bir çözeltideki bir numunenin zeta potansiyeli (ζ) Henry denklemi kullanılarak elektroforetik hareketliliğinden (UE) hesaplanabilmektedir. Kompleks ve biyo-konjugatların Zeta potansiyeli (ζ) ölçümleri, Zetasizer Nano ZS cihazında kapiler kuvvetlerde 25 ± 0.1 °C'de otomatik modda 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Ölçümler, viskozite, 0.8872 cP; dielektrik sabiti, 79; f (ka), 1,50 (Smoluchowski) parametrelerinde gerçekleştirildi. Tüm numuneler, ölçümlerden önce 0.20 µm RC-membran filtre (Sartorius) ile filtre edildi [127, 128].

3.3.3 FTIR Spektroskopisi

Örneklerin Furier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi kullanılarak fonksiyonel grup analizleri IR Prestige 21 FTIR Spektrofotometre (Shimadzu, Japonya) ile gerçekleştirildi. FT-IR spektrumları kompleks ve konjugatlar için ATR modunda kaydedildi. Ölçüm aralığı $4000-600\text{ cm}^{-1}$, örnek başına tarama sayısı 16 ve çözünürlük 4 cm^{-1} olarak ölçümler alındı [129].

3.3.4 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC)

Biyokonjugatların analizi HPLC' de, Shimadzu Model LC-6AD pompası ile Shim-Pack Diol-300 (500 mm x 7.9 mm) kolonu kullanılarak oda sıcaklığında yapıldı. 1,0mL/dak. akış hızıyla uygun tamponlar kullanılarak gerçekleştirilen analizlerde 20µl hacimlik

numuneler analiz edilmek üzere 0,22 µm'lik enjektör filtresiyle süzülerek cihaza verildi ve 280 nm'de Shimadzu SPD-10AV VP Model UV-VIS Dedektörü ile incelendi [130].

3.3.5 ELISA

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) testi antijen-antikor reaksiyonunu gerçekleştirmede en çok tercih edilen ve kullanılan metottur [131]. Enzim bağlantılı bir konjugat ve enzim substratı kullanılarak elde edilen renk değişimi yoluyla antijen-antikor reaksiyonlarını gösteren ve biyolojik sıvılardaki moleküllerin varlığını ve konsantrasyonunu belirlemeye yarayan kantitatif analitik bir yöntemdir. Bir antikorum kendi antijeni dışındaki bir moleküle bağlanmasının neredeyse imkansız olması sebebiyle peptidler / proteinler, hormonlar, vitaminler ve ilaçlar gibi çok düşük konsantrasyonlu moleküller, kendileri için geliştirilen antikorlara veya antijenlere karşı yüksek düzeyde özgüllük gösterir [132].

ELISA ve radyoimmunoassay (RIA) tekniklerinin temel prensibi 1941 yılına dayansa da, RIA yöntemi ilk olarak 1960'larda Yalow ve Berson tarafından endojen plazma insülin seviyesini ölçmek için kullanılmıştır. Aslında, ELISA yöntemi aynı anda iki araştırma ekibi tarafından aynı anda icat edilmekle beraber ELISA yöntemine büyük ölçüde 2005 yılında ölen İsviçreli bilim adamları Engvall ve Perlmann öncülük etmiştir. Bu iki araştırmacı, 1971'de RIA yöntemini modifiye ederek ELISA yöntemini geliştirmiştir. Diğer bir deyişle RIA'daki etiketli antijen ve antikor radyoizotoplarını radyoaktif iyot 125 yerine enzimlerle birleştirerek immünolojik ELISA yöntemini geliştirmişlerdir ve tavşan serumundaki IgG seviyelerini belirlemek için bu yeni yöntemi kullanmışlardır. Aynı yıl farklı bir araştırma ekibi, EIA (enzim immunoassay) yöntemi ile yaban turpu peroksidaz (EC 1.11.17) enzimini kullanarak idrardaki insan koryonik gonadotropin (hCG) miktarlarını ölçmeyi başarmıştır. Zaman içinde farklı uygulama alanları bulan ve gittikçe geliştirilen bu yöntem, dünya çapında araştırma ve tanı laboratuvarlarında rutin olarak kullanılan bir yöntem haline gelmiştir [132-134].

ELISA, enzim etiketli antijenleri ve antikorları kullanır; en yaygın kullanılan enzimler alkalın fosfataz (EC 3.1.3.1) ve glikoz oksidazdır (E.C.1.1.3.4). Sıvı fazdaki antijen, genellikle 96 oyuklu mikrotitre plakalara kaplanır. Antijenin spesifik bir

antikora bağlanmasına izin verilir, bu da daha sonra ikincil, bir enzimle birleştirilmiş antikor tarafından tespit edilir. Enzim için bir kromojenik substrat, antijenin varlığını gösteren görünür bir renk değişikliği veya floresan verir. Niceliksel veya niteliksel ölçümler, bu tür kolorimetrik okumalara göre değerlendirilebilir [135].

ELISA testinin basit prosedüre sahip olması, antijen-antikor reaksiyonu nedeniyle yüksek özgüllük ve duyarlılığının olması, yüksek verimlilikle çalışması, genellikle güvenli, çevre dostu ve uygun maliyetli olması gibi avantajları vardır. Antikor hazırlamanın zahmetli ve pahalı olması, mikropate yüzeyinin yetersiz bloke olması nedeniyle yanlış pozitif veya negatif sonuç olasılığı ve antikor kararsızlığı gibi sebepler ELISA testinin dezavantajı olarak sayılabilir [136].

Bir ELISA testi dört genel adım kullanılarak yapılır. Bu adımlar i) kaplama (antijen veya antikor ile), ii) bloklama (tipik olarak sığır serum albümini [BSA] ilavesiyle) iii) tespit etme iv) son okumadır. Temel adımlarda değişiklik yapılarak çeşitli ELISA türleri kullanılmıştır. Doğrudan (Direkt) ELISA, Dolaylı (indirekt) ELISA, Sandviç ELISA, Rekabetçi ELISA olmak üzere 4 temel ELISA türü vardır. Her türün kendine özgü bir avantajı vardır [137].

Hem direkt hem de indirekt ELISA'lar antijenin ELISA plakalarına kaplanmasıyla başlar. Direkt ELISA'da, birincil saptama antikor, doğrudan ilgili proteine bağlanır. Direkt ELISA yönteminin diğer yöntemlere göre avantajları arasında ikincil antikor dolayısıyla meydana gelebilecek çapraz reaktivite ihtimalinin olmamasıdır. Ayrıca indirekt ELISA ile karşılaştırıldığında yöntemde daha az adım uygulandığı için daha hızlı olduğu görülmektedir. Dezavantajları, diğer ELISA türlerine kıyasla düşük duyarlılığı ve yüksek reaksiyon maliyetidir [137, 138]. Dolaylı ELISA, direct ELISA dan farklı olarak 2 antikor gerektirir. Bunlar i) ilgili proteine bağlanan bir birincil saptama antikor ii) bu antikora tamamlayıcı olan ikincil bir enzim bağlantılı antikordur. Dolaylı ELISA'nın hassasiyeti, doğrudan ELISA' ya göre daha yüksektir. Bir çok birincil antikoru kullanılabilmesi bu yöntemin daha az maliyetli ve daha esnek olarak kullanılabilmesi avantajını sunar. Çapraz reaktivite riski dolaylı ELISA'nın tek önemli dezavantajıdır [137].

Sandviç ELISA' nın, plate kuyularına kaplanan bir yakalayıcı antikor ile başlaması onu diğer ELISA'lardan ayırmaktadır. Antijenler iki antikor katmanı (yakalayıcı ve

saptama antikorları) arasına sıkıştırıldığı için "sandviç" olarak adlandırılır. Tüm ELISA çeşitleri arasında en yüksek hassasiyete sahip olan yöntemdir. Çok zaman gerektirmesi ve maliyetli olması en büyük dezavantajlarıdır. "Eşleşen çift" ve ikincil antikorları gerektirmesi Sandviç ELISA'nın diğer dezavantajlarından [137].

Rekabetçi ELISA'da iki spesifik antikör, bir enzimle konjüge edilmiş antikör ve test serumunda bulunan başka bir antikör (serum pozitifse) kullanılır. İki antikörün kuyularda birleştirilmesi, antijene bağlanma için bir rekabete izin verecektir. Bir renk değişikliğinin varlığı, testin negatif olduğu anlamına gelir çünkü enzime bağlı antikör antijenlere bağlanır (test serumunun antikörlerine değil). Testin pozitif olduğunu ve test edilen serum içerisinde aranan antikörlerin varlığını rengin olmaması göstermektedir. Dezavantajları olarak düşük özgülüğü ve seyreltik numunelerde kullanılamaması sayılabilir. Avantajları arasında belirli bir serumda bir çok türdeki antijenleri ölçebilmesi ve küçük antijenler için kullanılabilmesi sayılabilir [137].

3.3.6 Konjugatların Saflaştırılması

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

Santrifüjlü filtrasyon ile gerçekleştirilen saflaştırma işleminde içlerinde farklı boyutlara sahip moleküllerin ayrılmasını sağlayacak özellikteki mebranların olduğu membranlı santrifüj tüpleri; konjugatlar sentezlenirken oluşan ya da reaksiyona girmeyen safsızlık olarak kabul edeceğimiz küçük moleküllerin ayrılmasında tercih edilmektedir. Bu amaçla saflaştırılacak çözelti bu tüplere belirtilen limitlerde doldurulur ve tüpün santrifüj edilmesiyle membranın gözeneklerinden küçük moleküllerin geçmesi ile saf konjugat üst fazda kalmaktadır. Bu şekilde konjugat saflaştırılmış olmaktadır [121, 139].

Diyaliz işleminde maddeler, kimyasal potansiyellerinin büyük olduğu alandan küçük olduğu alana doğru kendiliğinden hareket etmektedirler [121]. Tez kapsamında LPS-OH türevlerinin saflaştırılmasında diyaliz işlemi kullanılmıştır. Ancak membranlı santrifüj tüplerine göre fazla zaman alması ve daha uğraştırıcı bir

işlem olması, diğer saflaştırma işlemlerimiz için membranlı santrifüj tüplerini kullanmaya yönelmemize neden olmuştur.

4.1 Lipopolisakkarit İzolasyonu

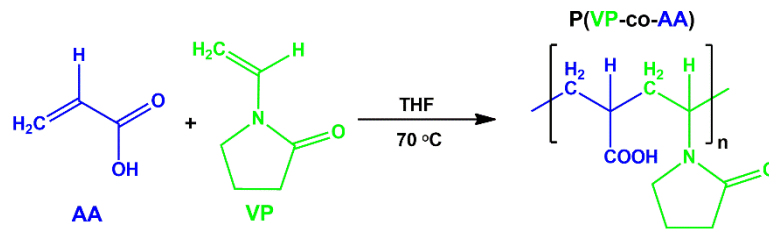
Tezde kullanılan *C. burnetii* hücresinin dominant antijeni virülan faz I LPS' nin izolasyonu Slovakya Bilimler Akademisi tarafından gerçekleştirilmiştir.

4.1.1 *Coxiella burnetii* hücrelerinin kültüre alınması ve saflaştırılması

Virülan faz I'de serolojik olarak *C. burnetii* S suşu (Nine Mile I (RSA 493)), WHO Rickettsial Referans ve Araştırma Enstitüsü, Viroloji Enstitüsü, Slovak Bilimler Akademisi, Bratislava, Slovak Cumhuriyeti'nin suş koleksiyonundan alınmıştır. Bakteri, tarif edildiği gibi [140, 141] embriyo haline getirilmiş tavuk yumurtalarında çoğaltılmıştır. Kültüre alındıktan sonra, faz I hücreleri, eter ile tekrarlanan ekstraksiyon işlemleri ve santrifüj ile saflaştırılmıştır [9, 10, 142]. *C. burnetii* hücrelerinden lipopolisakkaritin izolasyonu sıcak fenol / su prosedürü ile yapılmıştır. LPS ve Lipid A analizleri gaz kromatografisi (GC) ve GC-kütle spektrometere (GC-MS) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir [143].

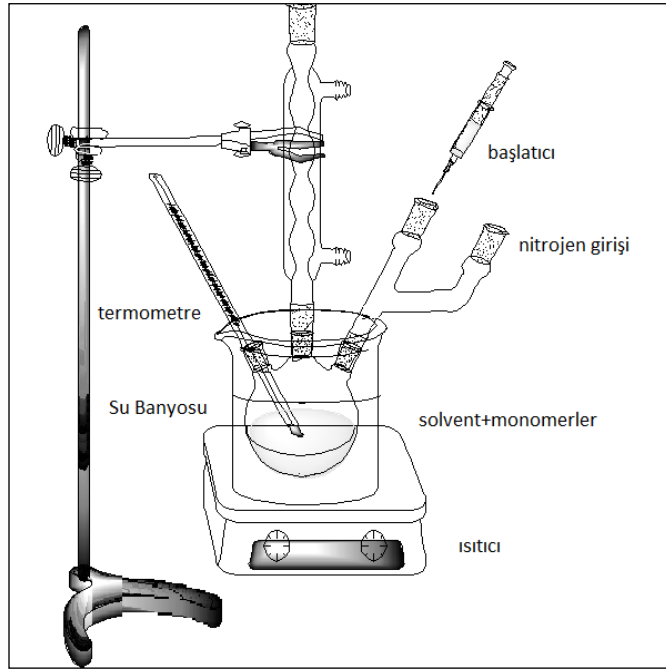
4.2 Poli(N-Vinil-2-Pirolidon-ko-Akrilikasid) polimerinin sentezi:

Yapay polimerik aşı sistemlerinde kullanılmak üzere sentezlenen polimerlerin (kopolimerlerin) belirli fizikokimyasal özelliklere sahip olması ve biyouyumlu olması beklenir.



Şekil 4. 1 Poli(N-Vinil-2-Pirolidon-ko-Akrilikasid) polimerinin sentezinin şematik gösterimi

P(VP-*ko*-AA) polimerinin sentezinde literatürden [144] faydalanılmıştır. Akrilik asit (48 g) ve vinilpirrolidon-2 (111 g) 350 g THF içerisinde karıştırılmıştır. Benzoil peroksit (318 mg) ve kobalt naftanat (32 mg) akrilik asit ve vinilpirolidon karıştırılırken ortama eklenir. Bu işlemler esnasında sıcaklık 65-70 °C' de tutulur. Polimerizasyon N₂ gazı varlığında 3 saat devam ettirilmiştir. P(VP-*ko*-AA) polimeri kirli beyaz kristalin katı şeklinde elde edilmiştir. Reaksiyon sonucunda çökelti olarak elde edilen kopolimer filtre edilmiştir ve 40 °C' de vakum etüvünde kurutulmuştur. Reaksiyon sonucunda verim %98,5 olarak hesaplanmıştır. Su içerisinde çözünürlüğü yüksektir. Sentezlenen polimerlerin karakterizasyonu FT-IR analizi ile gerçekleştirilmiş, molekül ağırlığı (M_w) hesaplaması yine 3 detektörlü GPC cihazında elde edilen sonuçlar ile yapılmıştır.



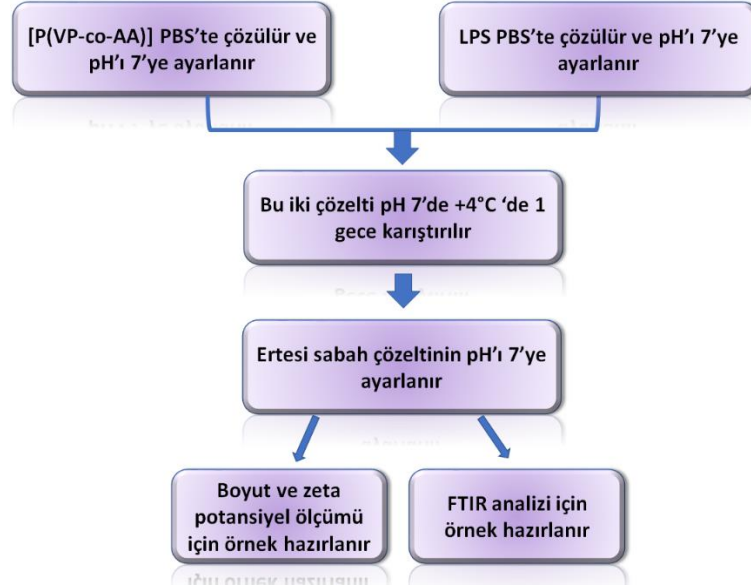
Şekil 4. 2 P(VP-*ko*-AA) polimerinin sentezine ait deney düzeneğinin şematik gösterimi

4.3 Komplekslerin Hazırlanması ve Konjugatların Sentezi

4.3.1 LPS ile komplekslerin hazırlanması

4.3.1.1 P(VP-ko-AA)-LPS Fiziksel Kompleks Hazırlanması:

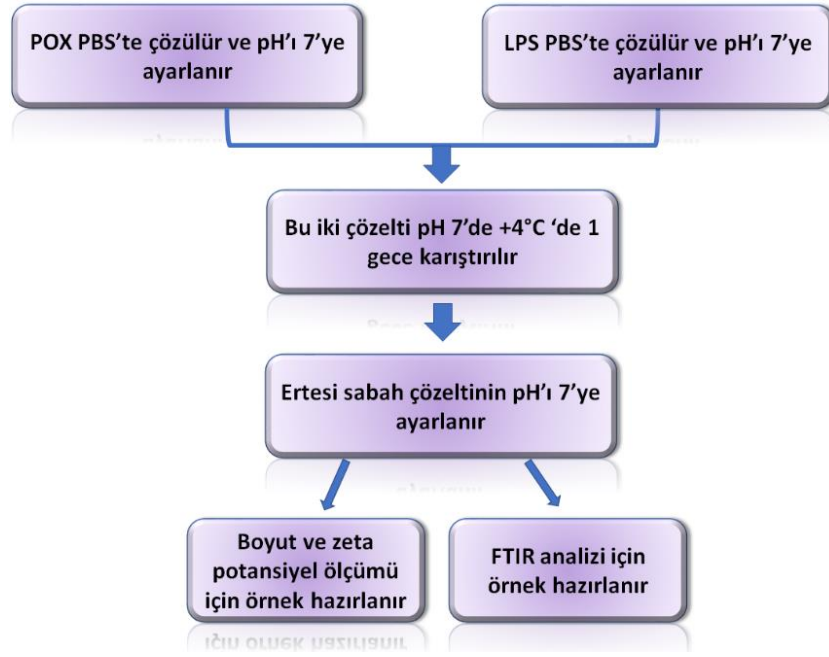
1:1 kütleli oranındaki LPS ve P(VP-ko-AA) kompleksleri 2 mg/ml P(VP-ko-AA) ve 2 mg/ml LPS'nin pH=7 tamponundaki çözeltilerinin gece boyunca karıştırılması ile hazırlanmıştır. Hazırlanış şeması Şekil 4.3.'de verilmiştir.



Şekil 4. 3 P(VP-ko-AA)-LPS Fiziksel kompleks hazırlanış şeması

4.3.1.2 Polioksidonyum-LPS Fiziksel Kompleks Hazırlanması:

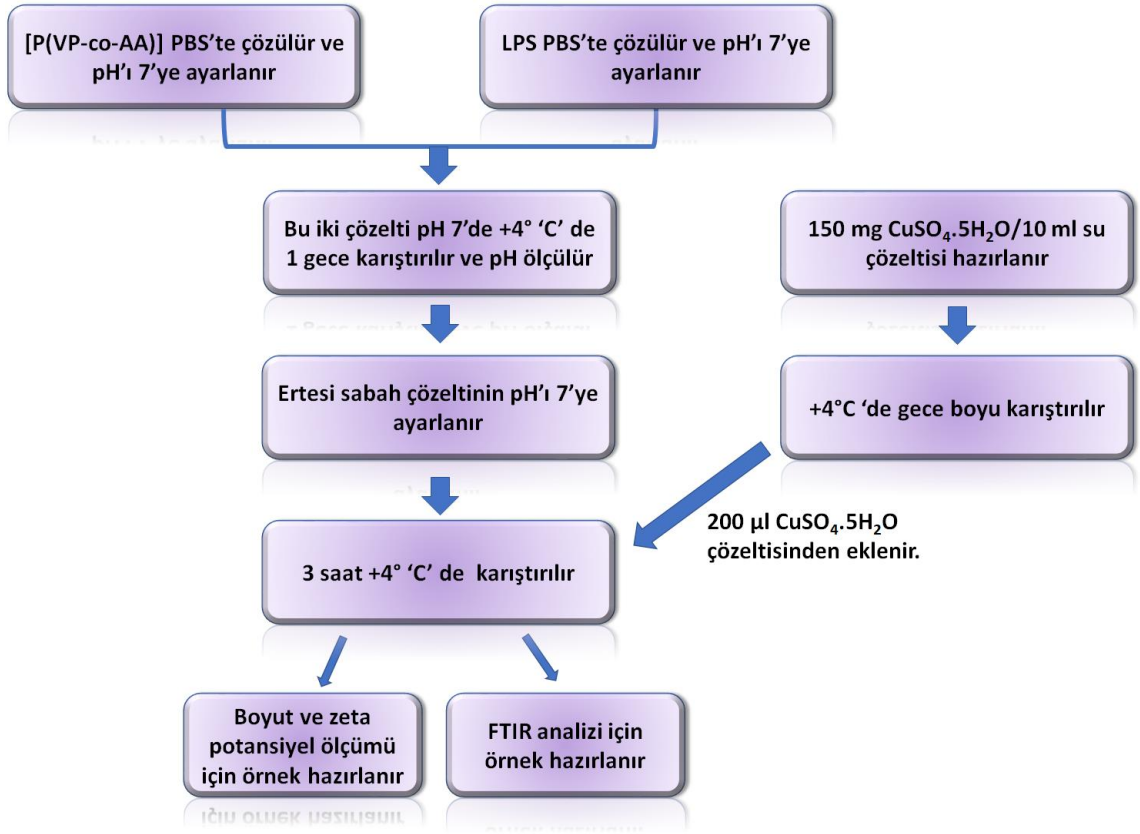
1:1 kütleli oranındaki LPS ve POX kompleksleri 2 mg/ml POX ve 2 mg/ml LPS'nin pH=7 tamponundaki çözeltilerinin gece boyunca karıştırılması ile hazırlanmıştır. Hazırlanış şeması Şekil 4.4' de verilmiştir.



Şekil 4. 4 Polioksidonyum-LPS fiziksel kompleks hazırlanış şeması

4.3.1.3 P(VP-ko-AA)-Cu²⁺-LPS Komplekslerinin Hazırlanması:

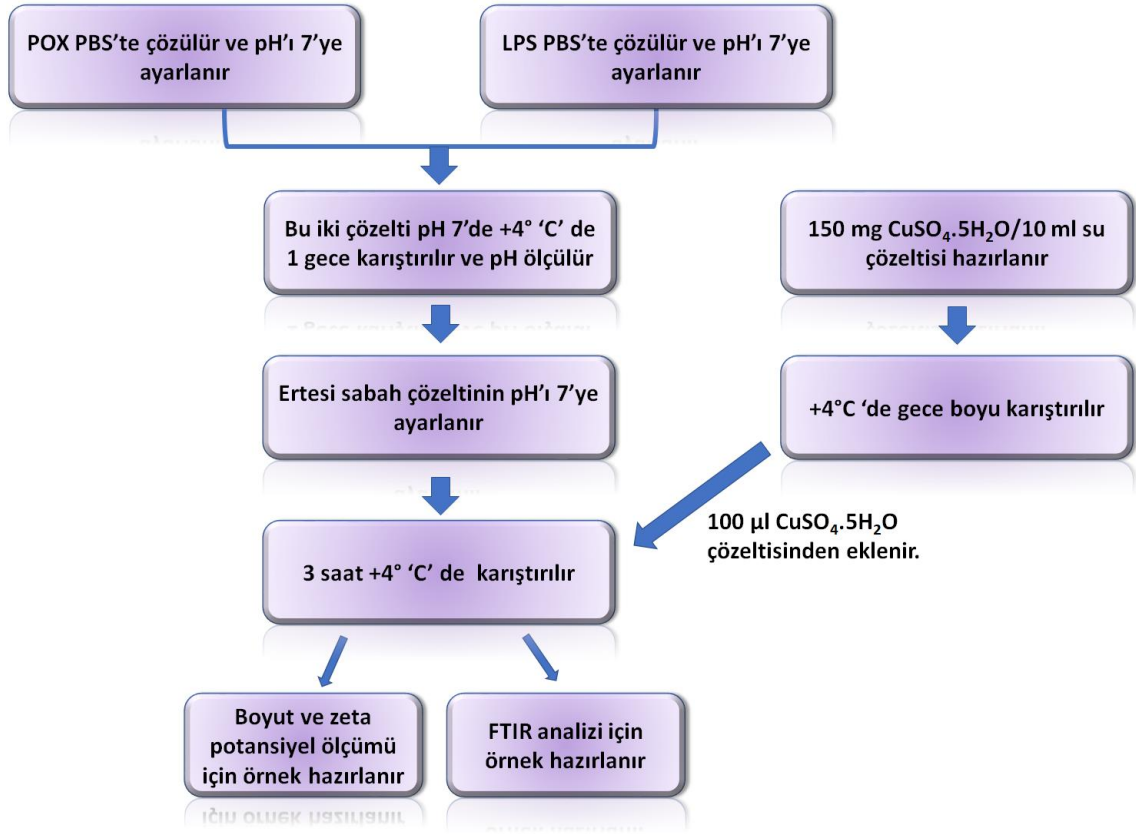
1:1 kütleli oranındaki LPS ve P(VP-ko-AA) kompleksleri 2 mg/ml P(VP-ko-AA) ve 2 mg/ml LPS'nin pH=7 tamponundaki çözeltilerinin gece boyunca karıştırılması ile hazırlandı. 150 mg CuSO₄.5H₂O 10 ml suda çözölerek stok çözelti hazırlandı ve 1 gece +4°C'de bekletildi. Fiziksel komplekse 200 µl CuSO₄.5H₂O stok çözeltisinden eklendi. 3 saat +4°C' de karıştırıldı. Literatürde yer alan [145-149] geçiş metalleri ile polimer-protein kompleks çalışmalarından faydalanılarak elde edilen üçlü komplekslerin yapı analizi gerçekleştirildi. 3'lü komplekslerin hazırlanış şeması Şekil 4.5' de verildi. Elde edilen kompleksler deney hayvanlarına verilerek antikor seviyeleri tespit edildi. 2 farklı kompleks (P(VP-ko-AA)-Cu²⁺-LPS-1 ve P(VP-ko-AA)-Cu²⁺-LPS-2) oluşturulmuş ve analizleri gerçekleştirildi.



Şekil 4. 5 P(VP-ko-AA)- Cu²⁺-LPS komplekslerinin hazırlanış şeması

4.3.1.4 Polioksidonyum-Cu²⁺-LPS kompleksleri Hazırlanması:

1:1 kütle oranındaki LPS ve POX kompleksleri 2 mg/ml POX ve 2 mg/ml LPS'nin pH=7 tamponundaki çözeltilerinin gece boyunca karıştırılması ile hazırlandı. 150 mg CuSO₄·5H₂O 10 ml suda çözülerek stok çözelti hazırlandı ve 1 gece +4°C' de bekletildi. Fiziksel komplekse 100 µl CuSO₄·5H₂O stok çözeltisinden eklendi. P(VP-ko-AA) polimerine oranla daha az bakır metali kullanmamızın sebebi, bakır metallerinin çözeltide çökmesidir. 3 saat +4°C' de karıştırıldı [145-149]. 200 µl bakır sülfat kullanılarak 2. kompleks hazırlandı. Komplekslerin hazırlanış şeması Şekil 4.6' da gösterildi.

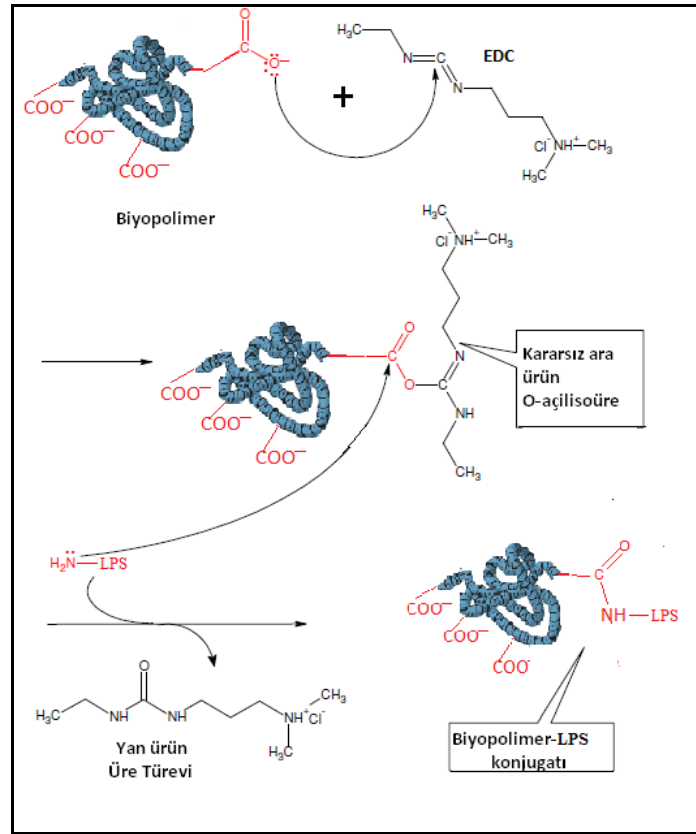


Şekil 4. 6 Polioksidonyum-Cu²⁺-LPS komplekslerinin hazırlanış şeması

4.3.2 Konjugatların Oluşturulması

4.3.2.1 EDC Kullanılarak Konjugatların Oluşturulması

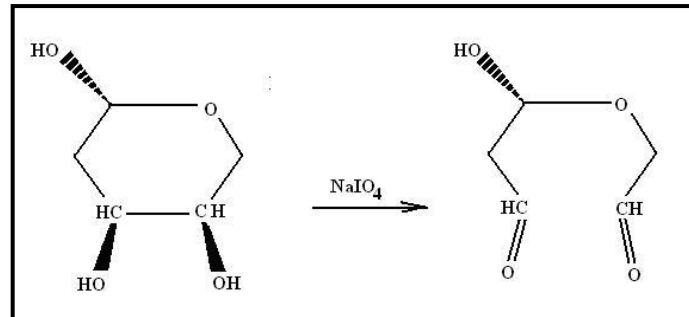
Bu yöntemle konjugatların oluşturulması için öncelikle LPS'nin OH gruplarının NH₂'ye modifiye edilmesi gerekmektedir. Bu aşama 2 adımdan oluşmaktadır. İlk olarak sodyum periyodat ile LPS' nin aldehit türevi oluşturulmakta ve 2. adımda etilendiamin ve sodyumborhidrür ile NH₂ gruplarının eklenmesi ve Schiff baz indirgenmesi gerçekleşmektedir. NH₂-LPS oluşturulduktan sonra Biyopolimer-LPS konjugatları EDC çapraz bağlayıcısı kullanılarak sentezlenmiştir. EDC kullanılarak gerçekleştirilen biyopolimer-LPS konjugasyon mekanizması Şekil 4.7' de gösterilmiştir.



Şekil 4. 7 EDC kullanılarak gerçekleştirilen biyopolimer-LPS konjugatının sentez mekanizması [150]

İlk Adımda: LPS nin NaIO₄ ile oksidasyonu: Diollerin yükseltgenmesi

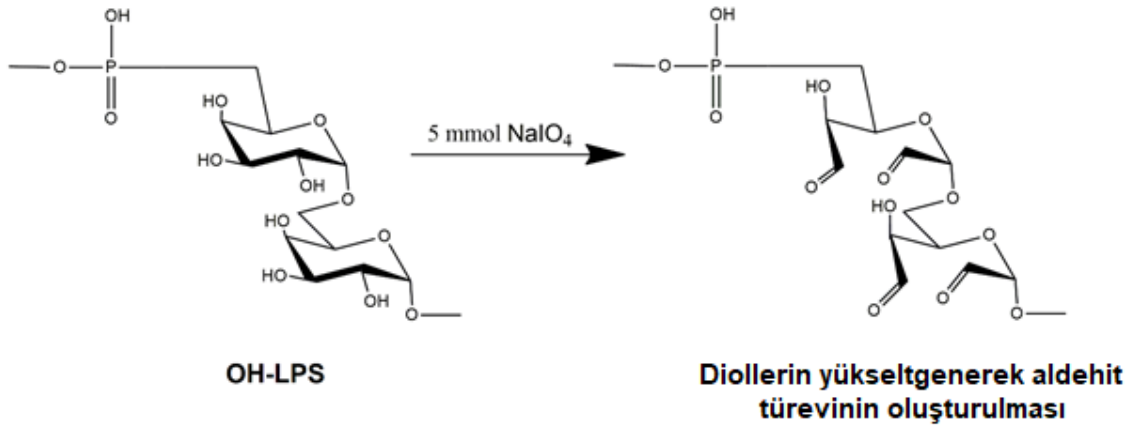
Periyodat oksidasyonu, şeker rezidülerinin (göreceli olarak reaktif olmayan hidroksil gruplarının) amin grupları ile reaksiyona girebilecek aldehit gruplarına dönüştürmede kullanılan yöntemlerden biridir. Periyodat, ardışık hidroksil grubu taşıyan C-C bağlarını kırmaktadır ve -OH gruplarını yükseltgeyerek yüksek oranda reaktif aldehit grupları oluşturmaktadır.



Şekil 4. 8 Ardışık hidroksil gruplarının periyodat oksidasyonu ile aldehit gruplarına dönüştürülmesi [130]

-LPS'nin aldehit türevinin oluşumu

Oksidasyon mekanizması Şekil 4.9'da gösterilen LPS-Aldehit türevinin eldesi literatürde belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir [151]. 3mg LPS 3 ml PBS (pH 7)'de çözülmüş ve 5mM NaIO₄ (Sodyum periyodat) LPS çözeltisinin üzerine yavaş yavaş karıştırılarak eklenmiştir (ışıktan korunarak). Oda sıcaklığında ve karanlıkta 6 saat karıştırılmış reaksiyonun sönümlenmesi için çözelti ml' si başına 0,1ml gliserol eklenerek oda sıcaklığında ve karanlıkta 6 saat karıştırmaya devam edilmiştir. Sonrasında diyaliz ile saflaştırma gerçekleştirilmiştir. Liyofilizatörde kurutma yapılarak elde edilen lipopolisakkaritin aldehit türevinin oluşumuna ait hazırlanış şeması Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



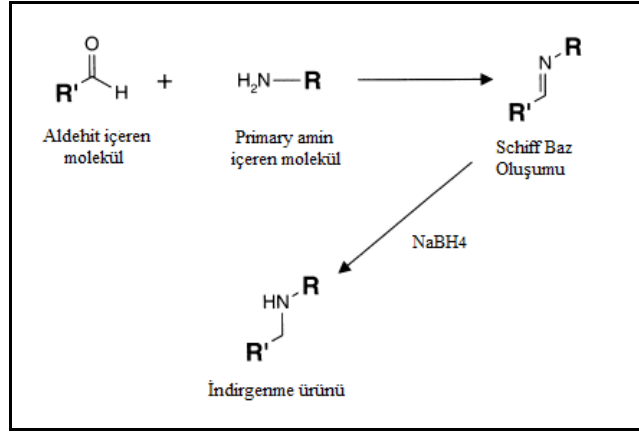
Şekil 4. 9 LPS' nin NaIO₄ ile oksidasyon mekanizması



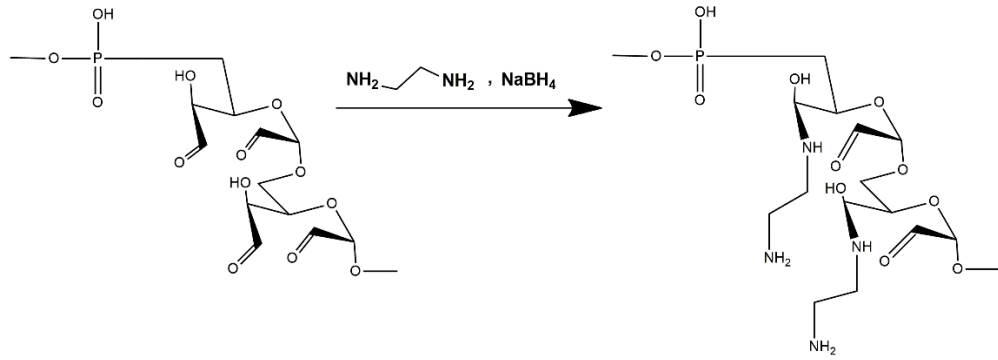
Şekil 4. 10 Lipopolisakkaritin aldehit türevinin oluşumuna ait hazırlanış şeması

2. Adım: LPS'nin Amin türevlerinin oluşturulması: ($\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$ ve NaBH_4 ile)

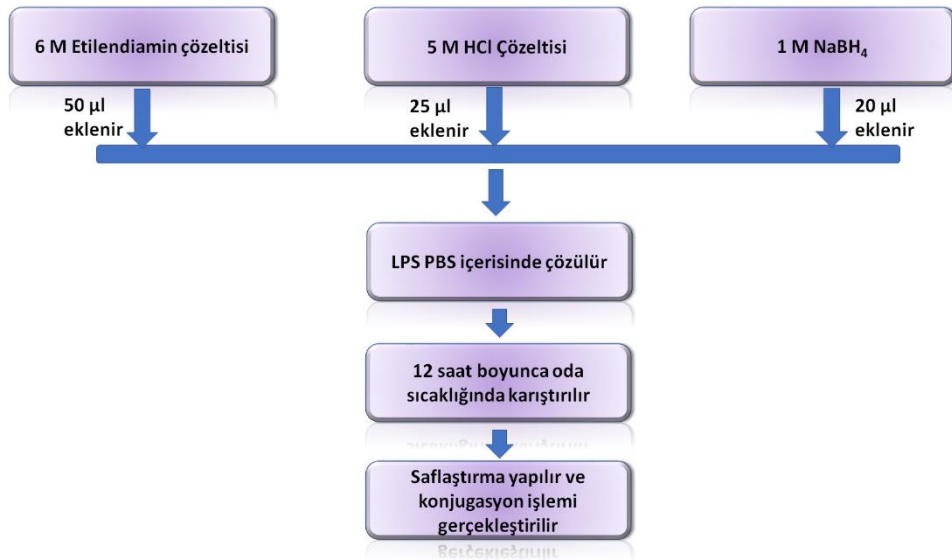
Literatürden faydalanılarak LPS' nin amin türevlerinin oluşturulmasında 1mg LPS-aldehit/1ml PBS (pH 7) çözeltisi hazırlanır ve 2 saat karıştırılmıştır [151]. 50 μl 6M etilendiamin çözeltisi, 25 μl 5 M HCl çözeltisi ve 20 μl 1 M sodyum borhidrür (NaBH_4) çözeltisi LPS-aldehit çözeltisine ilave edilerek 12 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Membranlı saflaştırma tüpleri kullanılarak saflaştırma yapılmıştır. Aldehit içeren moleküllerin amin türevlerinin oluşturulmasına ait genel mekanizma Şekil 4.11' de, amin türevlerinin oluşturulmasına ait reaksiyon mekanizması Şekil 4.12'de gösterilmiştir. LPS'nin amin türevlerinin oluşturulmasına ait hazırlanış şeması Şekil 4.13'de verilmiştir.



Şekil 4. 11 Aldehit içeren moleküllerin amin türevlerinin oluşturulmasına ait genel mekanizması



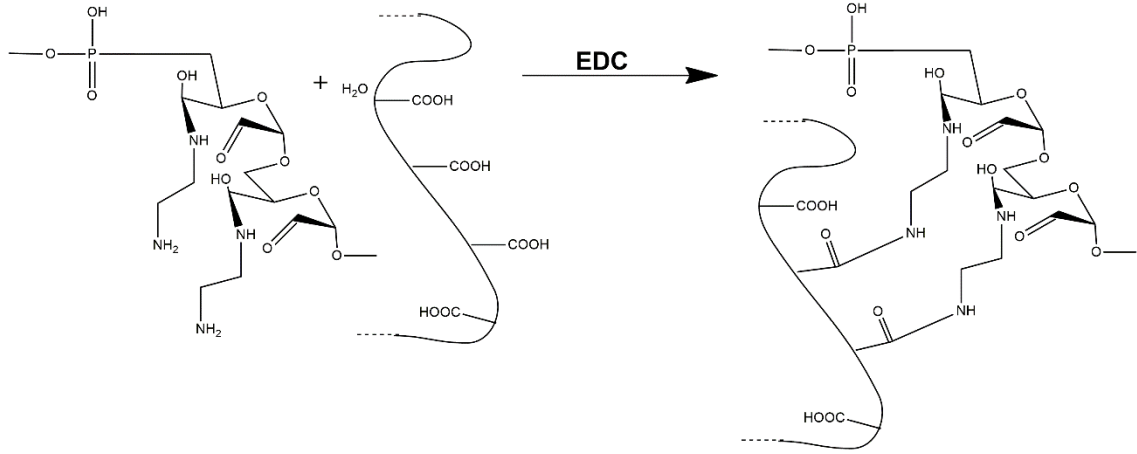
Şekil 4. 12 Amin türevlerinin oluşturulmasına ait reaksiyon mekanizması



Şekil 4. 13 LPS'nin amin türevlerinin oluşturulmasına ait hazırlanış şeması

- **H₂N-LPS'nin Biyopolimerle Konjugasyonu**

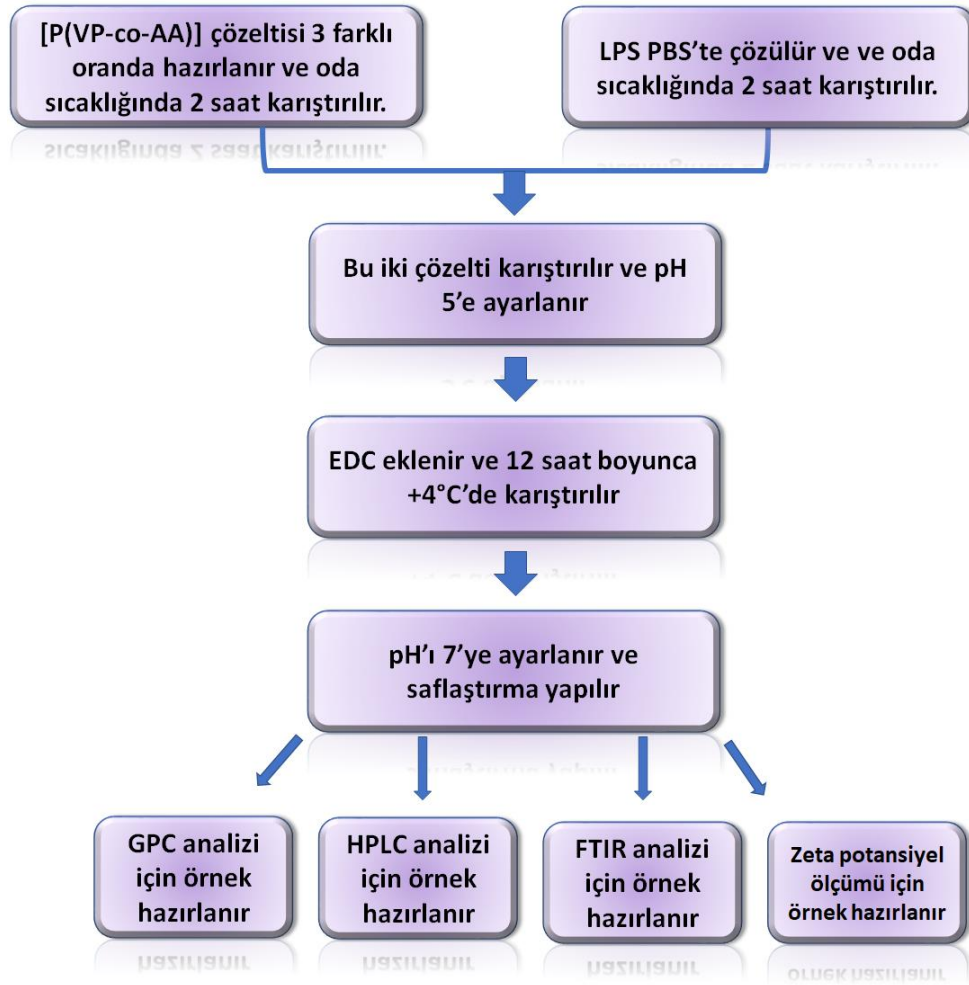
Hidroksil grupları -NH₂'ye modifiye edilmiş LPS'nin POX ve P(VP-*ko*-AA) polimerleri ile EDC çapraz bağlayıcısı varlığında biyokonjugatları sentezlenmiştir. H₂N-LPS'nin biyopolimerle konjugasyonuna ait reaksiyon mekanizması Şekil 4.14' de gösterilmiştir.



Şekil 4. 14 H₂N-LPS'nin biyopolimerle konjugasyonuna ait reaksiyon mekanizması

- **-H₂N-LPS' nin P(VP-*ko*-AA) ile Konjugasyonu**

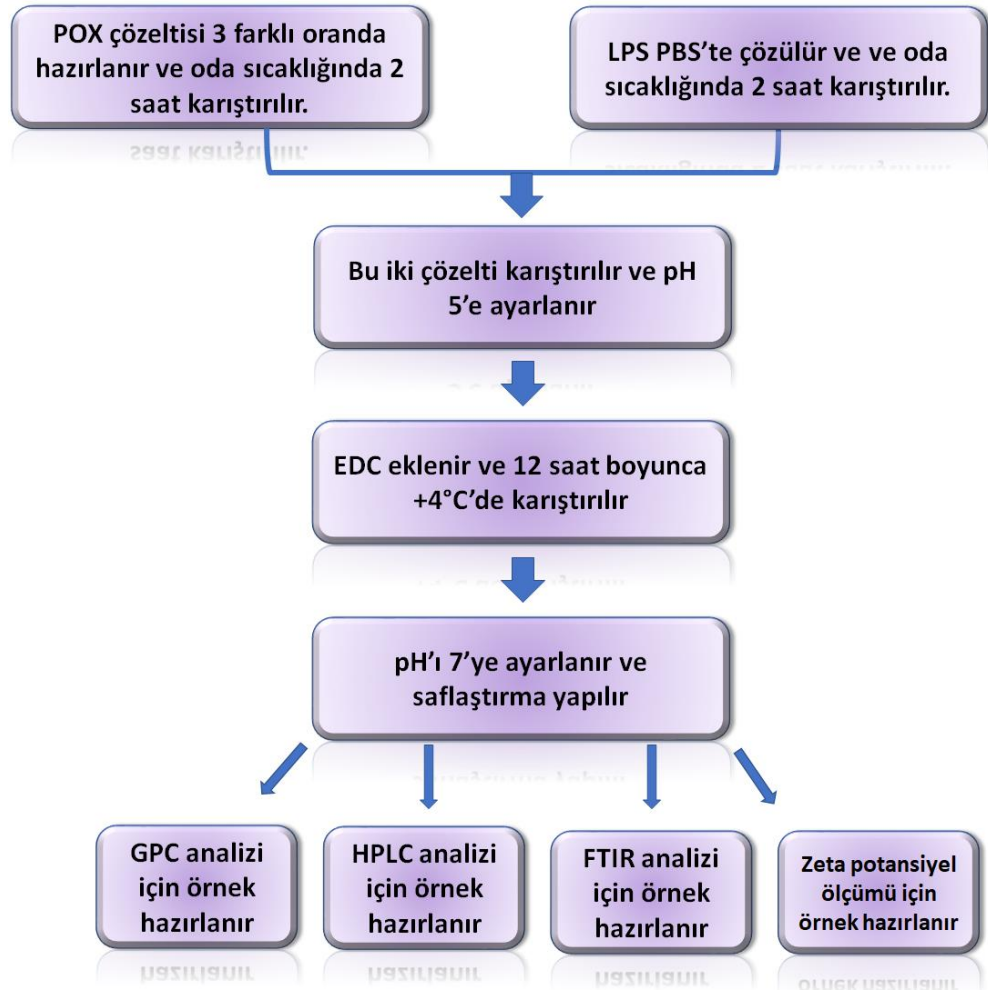
OH grupları NH₂'ye modifiye edilmiş LPS (H₂N-LPS) ve P(VP-*ko*-AA) polimerinin EDC çapraz bağlama reaktifi kullanılarak Polimer/LPS kütesel oranları 0,5; 1 ve 2 olacak şekilde polimerin artan oranlarında 3 konjugatı sentezlenmiştir. Bunun için, polimer stok çözeltileri hazırlanmış ve örnekler 2 saat karıştırılmıştır. Polimer çözeltisi ve H₂N-LPS çözeltisi karıştırılarak 2 saat daha karıştırılmıştır. Karışımın pH'ı 5'e düşürülmüş ve aktivasyon amacıyla EDC eklenmiştir. 4 °C'de gece boyunca karıştırılmış ve pH 7.2 'ye ayarlanmıştır. Membranlı santrifüj tüpleri ile saflaştırma yapılmış ve örnek analize verilmiştir. H₂N-LPS'nin P(VP-*ko*-AA) ile konjugasyonunun hazırlanış şeması Şekil 4.15'de gösterilmiştir [152, 153].



Şekil 4. 15 NH₂-LPS'nin P(VP-ko-AA) ile Konjugasyonunun hazırlanış şeması

-H₂N-LPS'nin Polioksidonyum ile Konjugasyonu

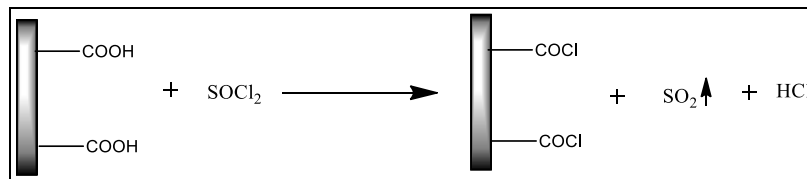
-OH grupları -NH₂'ye modifiye edilmiş LPS (H₂N-LPS) ve polioksidonyum (POX) polimerinin EDC çapraz bağlama reaktifi kullanılarak Polimer/ LPS kütle oranları 0,5; 1 ve 2 olacak şekilde polimerin artan oranlarında 3 konjugatı sentezlenmiştir. Polimer stok çözeltileri hazırlanmış ve örnekler 2 saat karıştırılmıştır. Polimer çözeltisi ve H₂N-LPS çözeltisi karıştırılarak 2 saat daha karıştırılmaya devam edilmiştir. Karışımın pH'ı 5'e düşürülerek aktivasyon amacıyla EDC eklenmiştir. 4 °C'de gece boyunca karıştırılmış ve pH 7,2' ye ayarlanmıştır. Membranlı santrifüj tüpleri ile saflaştırma yapılmış ve örnek analize verilmiştir. H₂N-LPS'nin POX ile konjugasyonunun hazırlanış şeması Şekil 4.16' da gösterilmiştir.



Şekil 4. 16 H₂N-LPS'nin POX ile konjugasyonunun hazırlanış şeması

4.3.2.2 Tiyonil Klorür Yöntemi ile Konjugasyon

Tiyonil klorür yöntemi: Polimerin karboksilik asit gruplarının tiyonil klorür ile muamele edilmesi sonucunda kloranhidridin eldesi gerçekleştirilir.



Şekil 4. 17 Kloranhidridin eldesi

Daha sonrasında polimerin kloranhidridin fonksiyonel gruplarının LPS'nin OH grupları ile reaksiyonu sonucunda biyokonjugat sentezi gerçekleştirilir.



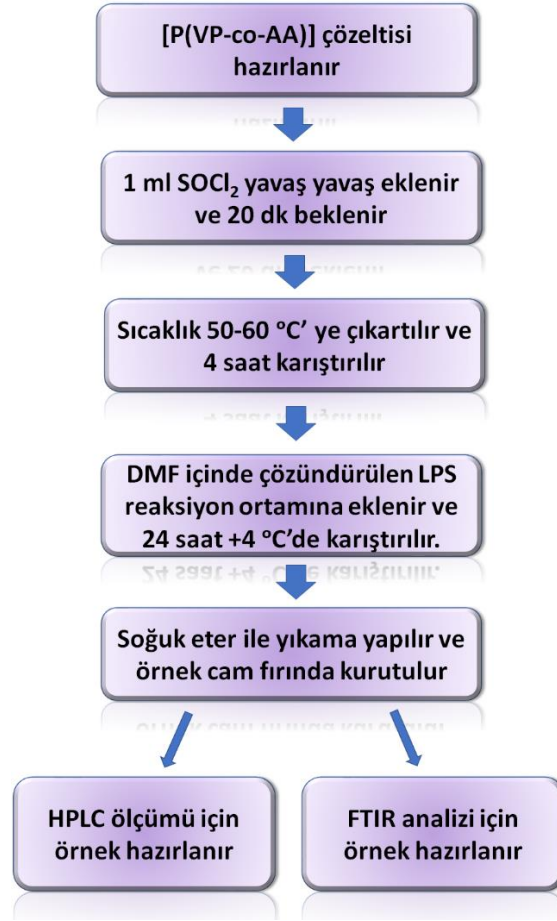
Şekil 4. 18 Polimer-LPS konjugatı

* Reaksiyonda SO_2 'nin ayrılması ve ilgili grupların bağlanması ile tek adımda konjugat eldesi sağlanır.

Polimerlerin çözünbilmesi için uygun organik çözücünün belirlenmesi amacıyla denemeler gerçekleştirilmiştir. Polimerler için DMF (Dimetilformamid), THF (Tetrahidrofuran), DMSO (Dimetil sülfoksit) ve Kloroform çözücüleri denendi. P(VP-ko-AA) polimeri DMF'te çözünmüştür. Polioksidonyum polimeri organik çözücülerde çözünmediği için- çalışmalarımızda SOCl_2 yöntemi kullanılarak sadece LPS-P(VP-ko-AA) konjugatı sentezlenmiştir.

-LPS-P(VP-ko-AA) konjugatlarının SOCl_2 yöntemi ile Sentezi

3 mg P(VP-ko-AA) 3 ml DMF içerisinde çözündürülerek 2 saat karıştırılıp, üç boyunlu dibi yuvarlak şifli reaksiyon kabına kondu. Reaksiyon kabının geniş boynuna geri soğutucu, dar boyunlarından birine şifli termometre ve diğer boynu da sıkıca tıpa ile kapatılıp, 1 ml (0,015 mol) SOCl_2 +4 °C' de (dakikada bir damla olacak şekilde) eklendi. Bir süre karıştırıldıktan sonra 50-60 °C' de 4 saat karıştırıldı ve karbonil gruplarının klorlanması sağlandı. 3 mg LPS 3 ml DMF içinde çözündürülerek reaksiyon ortamına eklendi. 24 saat +4°C' de karıştırılarak reaksiyon tamamlanarak, soğuk eter ile 3 kez yıkama yapıldı. Cam fırında oda sıcaklığında vakum ile kurutma yapıp örnek analizi gerçekleştirildi [114, 154]. LPS-P(VP-ko-AA) konjugatının SOCl_2 yöntemi ile konjugasyon hazırlanış şeması Şekil 4.19' da verilmiştir.



Şekil 4. 19 LPS-P(VP-ko-AA) konjugatının SOCl₂ yöntemi ile konjugasyon hazırlanış şeması

4.4 *In Vivo* Deneyler

İmmünojenik ve aşı özelliği taşıyabilen suda çözünebilen farklı polimer-LPS ikili, üçlü komplekslerinin ve konjugatlarının Balb/c farelere enjekte edilmesi çalışmamızda TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü Transgen ve Deney Hayvanları laboratuvarında temin edilen 56 adet 8 haftalık 28-32 gr ağırlığında erkek Balb/c türü fare kullanıldı.



Şekil 4. 20 Balb/c türü farelerimiz

Enjeksiyon işlemi, eter anestezisi altında intraperitoneal olarak 0,5 ml örnek kullanılarak gerçekleştirildi.



Şekil 4. 21 Balb/c fareye karınaltından enjeksiyon yapılışı

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

Aşağıdaki tabloda (Tablo 4.1) kafes numaraları, her kafeste bulunan fare sayısı ve enjekte edilen maddenin içeriği belirtilmiştir. Kafeslerle ilgili varsa özel durumlar, ELISA yanıtları verilirken bahsedilecektir.

Tablo 4. 1 Kafes numaraları, fare sayıları ve enjekte edilen maddenin içeriği

Kafes No	Balb/c Fare Sayısı	Enjekte edilen madde içeriği
Kafes 1	3	100 µg LPS
Kafes 2	3	100 µg P(VP-ko-AA)
Kafes 3	3	100 µg POX
Kafes 4	3	100 µg LPS+ 200 µl Freund's Adj
Kafes 5	4	100 µg LPS-100 µg P(VP-ko-AA) içeren Fiz.Kompleks
Kafes 6	4	100 µg LPS-100 µg POX içeren Fiz. Kompleks
Kafes 7	3	100 µg LPS-100 µg P(VP-ko-AA), 13 µl CuSO ₄ .5H ₂ O çözeltisi (150mg/10ml saf su) içeren LPS-Cu ²⁺ - P(VP-ko-AA) Kompleksi
Kafes 11	4	100 µg LPS-100 µg POX ve 13 µl CuSO ₄ .5H ₂ O çözeltisi (150mg/10ml saf su) içeren LPS- Cu ²⁺ -POX Kompleksi
Kafes 12	3	LPS-Cu ²⁺ -POX Kompleksi 100 µg LPS-100 µg POX ve 6 µl CuSO ₄ .5H ₂ O çözeltisi (150mg/10ml saf su) içeren LPS- Cu ²⁺ -POX Kompleksi

Tablo 4.1 Kafes numaraları, fare sayıları ve enjekte edilen maddenin içeriği (Devamı)

Kafes 13	5	LPS- P(VP- <i>ko</i> -AA) Konjugatı+ Freund's Adj (200 µg LPS-100 µg P(VP- <i>ko</i> -AA) + 200µl incomplete Freund's Adj.)
Kafes 14	4	LPS- P(VP- <i>ko</i> -AA) Konjugatı (100 µg LPS-100 µg P(VP- <i>ko</i> -AA) içeren)
Kafes 15	4	LPS- P(VP- <i>ko</i> -AA) Konjugatı (200 µg LPS-100 µg P(VP- <i>ko</i> -AA) içeren)
Kafes 17	4	LPS-BSA Konjugatı (100 µg LPS-100 µg BSA içeren)
Kafes 18	4	LPS-POX konjugatı n=1 oranı (100 µg LPS-100 µg POX içeren)
Kafes 19	4	LPS-Cu ²⁺ - P(VP- <i>ko</i> -AA) Kompleksi 100 µg LPS-100 µg P(VP- <i>ko</i> -AA), 6 µl CuSO ₄ .5H ₂ O çözeltisi (150mg/10ml saf su) içeren LPS-Cu ²⁺ - P(VP- <i>ko</i> -AA) Kompleksi

4.4.1 Fare Serumlarının alınması

Eter anestezisi altında kuyruk ucu kesilerek 10, 20, 30, 37, 44 ve 51. günler olmak üzere 7 defa kan alındı. 10 µl sodyum sitrat içeren eppendorflara alınan kan örnekleri 45 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üst fazdan 10 µl serum dikkatlice alınarak örnekler kanda antikor miktar tayin işlemi yapılana kadar -20 °C'de saklandı.



Şekil 4. 22 Fare serumlarının alınması ve serumlarının ayrıldığı santrifüj aşamaları işlemleri

4.4.2 ELISA Kaplamada kullanılması için sentezlenen konjugatlar

ELISA platelerin kaplanması amacıyla literatür de incelenerek kaplama amacıyla LPS tek başına ve LPS-BSA konjugatları oluşturularak denemeler yapılmıştır [114, 123, 155-157]. LPS-BSA konjugatlarının verimli şekilde oluşturulması için 3 adet farklı yöntem kullanılarak konjugatlar sentezlenmiştir ve elde edilen konjugatların GPC ile karakterizasyonu yapılmıştır.

Konjugatların hazırlanmasında kullanılan 3 yöntem aşağıda belirtilmektedir.

1. Yöntemde:

Literatürde belirtildiği gibi [154] karbodiimid metodu ile gerçekleştirmiştir. BSA proteinin karboksil grupları (4 mg) EDC ile pH 5'de aktive edilmiştir. Karışım +4°C' de 2 saat karıştırılmıştır. Amino-LPS (4mg) PBS de çözündürülerek BSA-EDC karışımına eklenmiştir ve 2 saat +4 °C' de karıştırılmıştır. pH 'ı 7.2' ye ayarlanan konjugat saflaştırma işleminden sonra liyofilizatörde kurutulmuştur. GPC ile analizi gerçekleştirilmiştir.

2. Yöntemde

Literatüre göre [130, 158, 159] 4 mg LPS / 2 ml destile su çözeltisi hazırlanmıştır. 5 mM sodyum periyodat NaIO_4 çözeltisi LPS 'nin üzerine yavaş yavaş ve ışıktan korunarak eklenmiştir. Elde edilen çözelti oda sıcaklığında ve karanlıkta 24 saat karıştırılmıştır. Reasyon çözeltisi membranlı santrifüj tüpü ile saflaştırılarak, 4 kez saf su ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Liyofilizatörle kurutma sağlanarak katı LPS-aldehit türevi elde edilmiştir. 2 mg LPS / 1 ml NaHCO_3 çözeltisi ve 2 mg BSA / 1 ml NaHCO_3 çözeltisi hazırlanmıştır. Oda sıcaklığında 16 saat boyunca karıştırılmıştır. $+4^\circ\text{C}$ 'de 5 mM NaBH_4 çözeltisi eklenerek 15 dak. karıştırılıp tekrar 5 mM NaBH_4 eklenmiş ve 15 dak. daha karıştırılarak membranlı santrifüj tüpünde saf su ile 6000 rpm'de 5 dak. olacak şekilde 2 kez ve sonrasında PBS pH 7.2 tamponu ile 2 kez daha yıkama yapılmıştır. Elde edilen konjugat liyofilizatörde kurutulmuştur.

3. Yöntemde:

Literatürden faydalanılarak [160]; 5 mM sodyum periyodat (NaIO_4) çözeltisi ve LPS 2 mg / ml olacak şekilde 2 saat karıştırılmıştır. Aldehit türevi LPS 2 mg / ml BSA çözeltisine eklenmiş ve 0.05 M karbonat tamponunda pH 9.6'da oda sıcaklığında 1 gece karıştırılmıştır. 200 μl NaBH_4 eklenmiş ve 2 saat $+4^\circ\text{C}$ ' de karıştırılmaya devam edilerek, pH'ı 7.2' ye getirilmiştir. Konjugat PBS tamponu ve membranlı santrifüj tüpleri ile 6000 rpm' de 10 dak. olacak şekilde 4 kez yıkanmış ve elde edilen konjugat liyofilizatörde kurutulmuştur.

4.4.3 ELISA platelerinin LPS Kaplanması Standardizasyon çalışması

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

4.4.4 ELISA Deneyinin Yapılışı

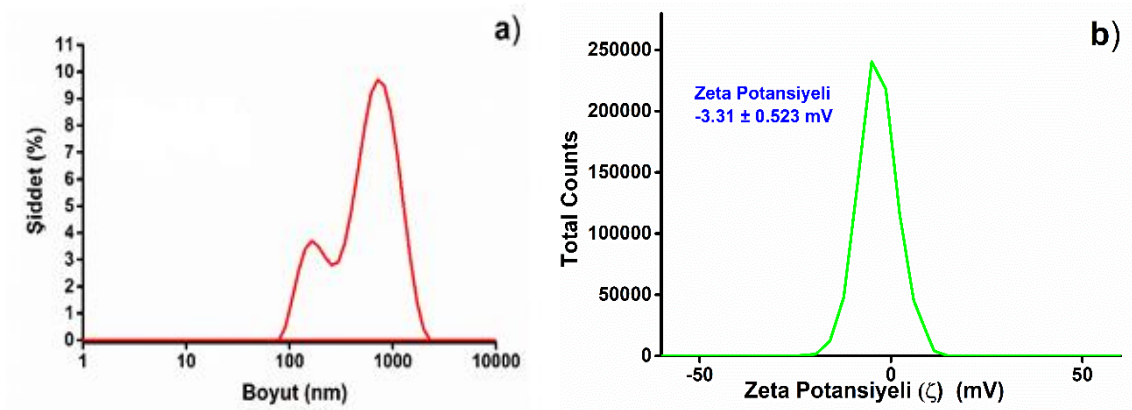
96 kuyu içeren ELISA plate (Nunc, Maxisorp) her kuyuya 0,2 μg LPS içerecek şekilde 100 μl olarak kuyulara eklendi. Antijen ile kaplanan ELISA plateleri gece boyu $+4^\circ\text{C}$ ' de bekletildi. Kuyular %0,05 tween 20 ihtiva eden 0.5 M PBS pH 7 yıkama tamponu ile 3 defa yıkandı. ELISA platelerindeki herbir kuyuya 12 yollu otomatik pipet

yardımıyla %1'lik 380 µl süt tozu çözeltisi eklendi. ELISA plakası 37 °C sıcaklığında etüvde 1 saat bekledi ve 0,05 tween20 ihtiva eden PBS yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı. Farelerden alınan serumların 1:50 ve 1:100 oranında dilüsyonları yapıldı. Her bir kuyuya 1:50 ve 1:100 oranında dilüsyonları yapılan serum örnekleri 100 µl olarak eklendi. ELISA plate +4 °C'de 2 saat bekledi. ELISA plate 0,05 tween20 ihtiva eden PBS yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı. Antimouse polivalent immünoglobulin alkalın fosfataz 1:2000 oranında dilüe edilerek 100 µl her bir kuyuya eklendi. ELISA plate 1 saat 37 °C'de etüvde bekletildi. ELISA kuyucukları 0,05 tween20 ihtiva eden PBS yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı. %0,1 Paranitrofenil fostat (PNFP) substrat çözeltisi eklendi. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 45. dak. ve 1 saat ölçümleri ELISA plate okuyucu aletinde 405nm dalga boyunda okundu. Tez kapsamında ELISA sonuçları 1 saatlik sonuçlar üzerinden tartışılmıştır. Sırasıyla 10, 20, 30, 37, 44, 51 ve 58. günlerde olmak üzere 7 kez ELISA okuma gerçekleştirilmiştir.

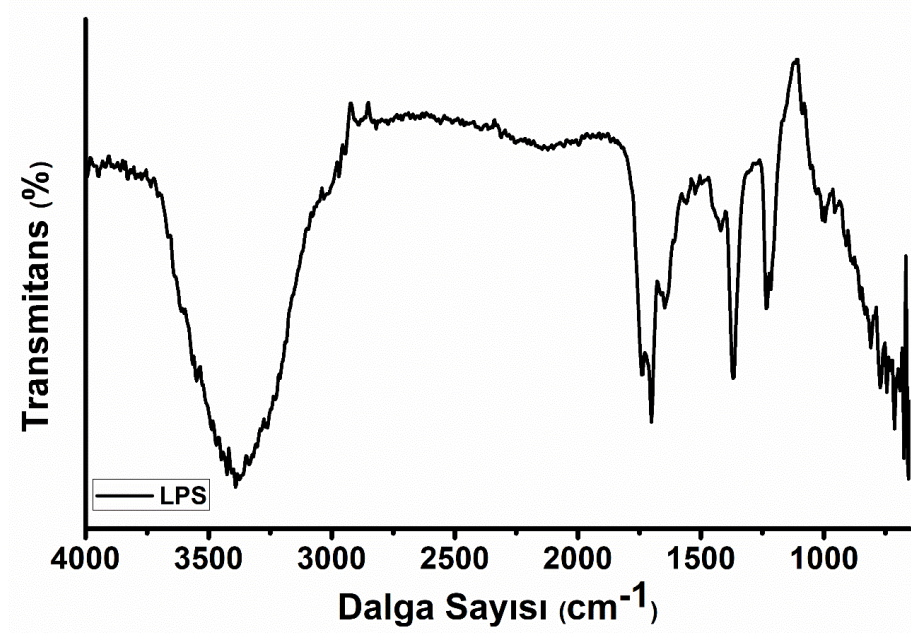
5.1 LPS İzolasyonuna ait Sonuçlar

Slovakya Bilimler Akademisi'nde gerçekleştirilen kolorometrik deneyler LPS 'nin 95,1 nmol/mg Kdo, 137,2 nmol/mg fosfat, 291,4 nmol/mg hekzoamin içerdiğini göstermiştir. Nötral şekerin GC/MS analizi sonucunda virenose (22,8%), ksiloz (2,7%), mannoz (28,3%), galaktoz (0,4%), glikoz (0,8%), dihidroksistreptose (19,9%) ve L-gliser-D-manno-heptoz (25,1%) içerdiği ortaya çıkarılmıştır. Elde edilen sonuçlar ham LPS'nin yapısında bulunan şekerlere ek olarak O-polisakkarit zincirindeki iki nadir şeker ünitesi daha içerdiğini göstermektedir. Virenose (6-deoksi-3-C-metilgüloz) ve dihidrohidroksistreptose [3-C-(hidroksimetil)likoz] diğer LPS lerde bulunmamıştır, ayrıca şekerlerin her ikisinin de yalnızca LPS'in terminal pozisyonlarında lokalize olduğunu bulunmuştur.

Ayrıca tarafımızca yapılan analizler ile LPS molekülünün boyutu ve yükü Zetasizer cihazı ile tespit edilmiştir. Şekil 5.1a ve 5.1b 'de sırasıyla boyutu $397,1 \pm 8.796$ nm ve Zeta potansiyel değeri (negatif) $-3,31 \pm 0.523$ mV olarak gösterilmiştir. FTIR spektrumu Şekil 5.2' de gösterilmiştir.



Şekil 5. 1 LPS molekülünün Zetasizer a) boyut dağılımı ve b) zeta potansiyel grafiği



Şekil 5. 2 LPS molekülünün FTIR spektrumu

Şekil 5.2’de LPS molekülünün FTIR spektrumunda belirgin olarak 3387 cm^{-1} ‘deki pik O-H’ nin germe titreşimini, 1232 cm^{-1} ‘deki pik P=O asimetric gerilmesini temsil eder.

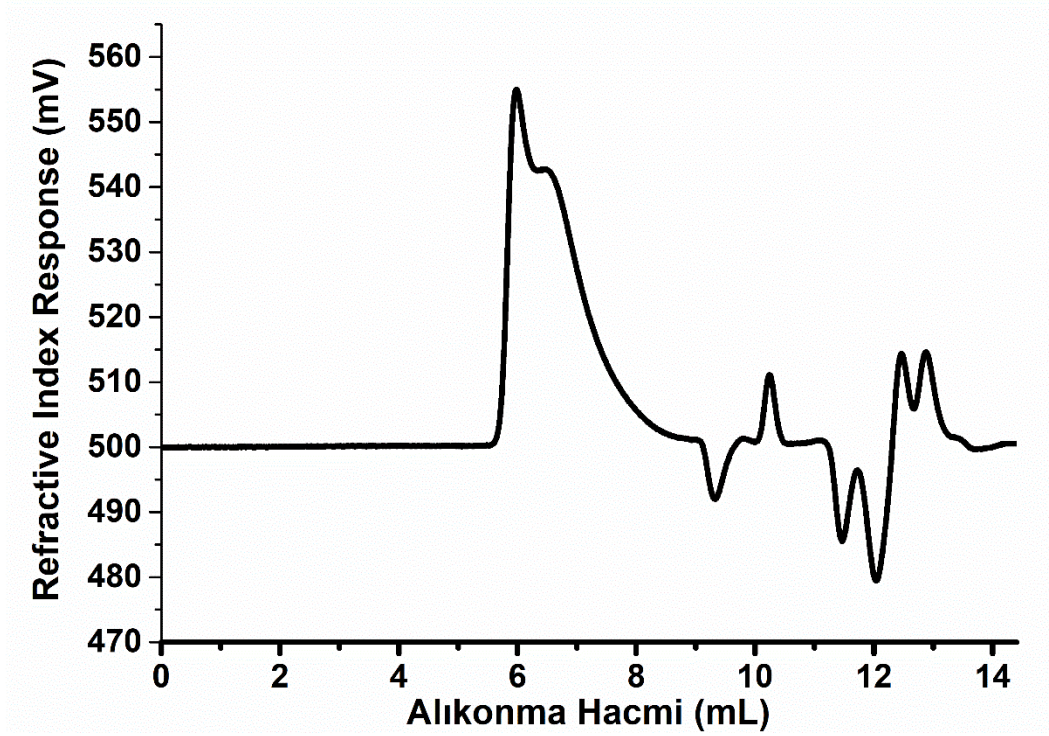
5.2 Polimerlere ait Bulgular

Sentezlenen Poli(N-Vinil-2-Pirolidon-ko-Akrilikasid) polimerine ve ticari olarak alınan polioksidonyum polimerine ait analiz sonuçları bu bölümde verilmiştir.

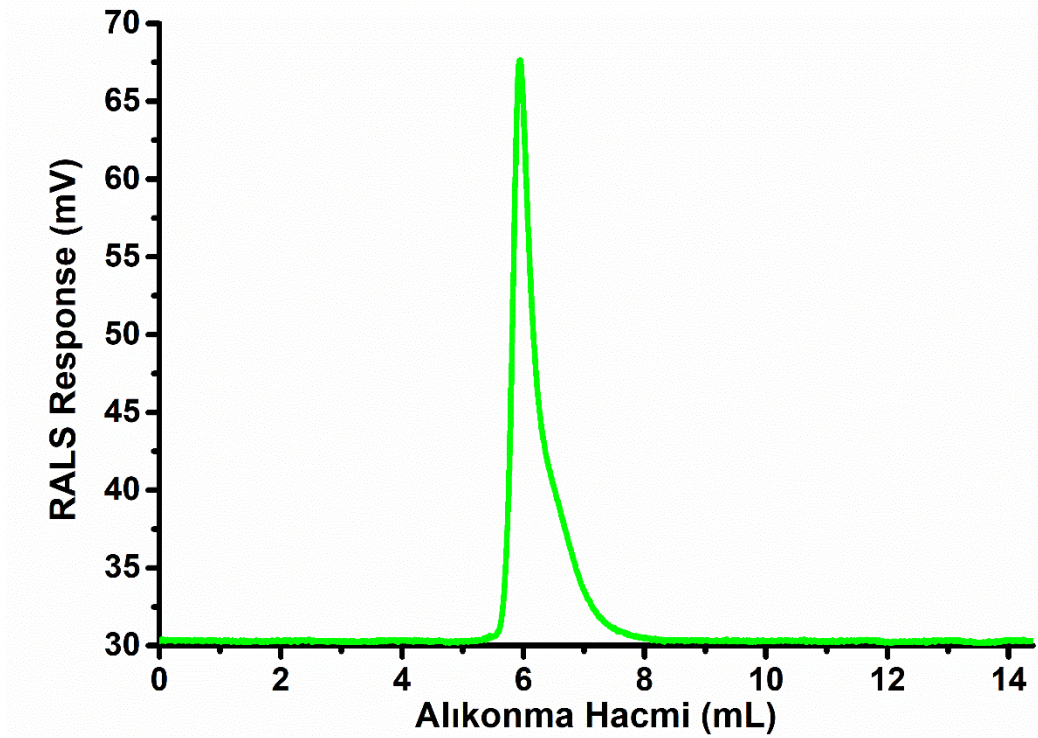
5.2.1 P(VP-ko-AA) polimerine ait veriler

5.2.1.1 GPC Analizi

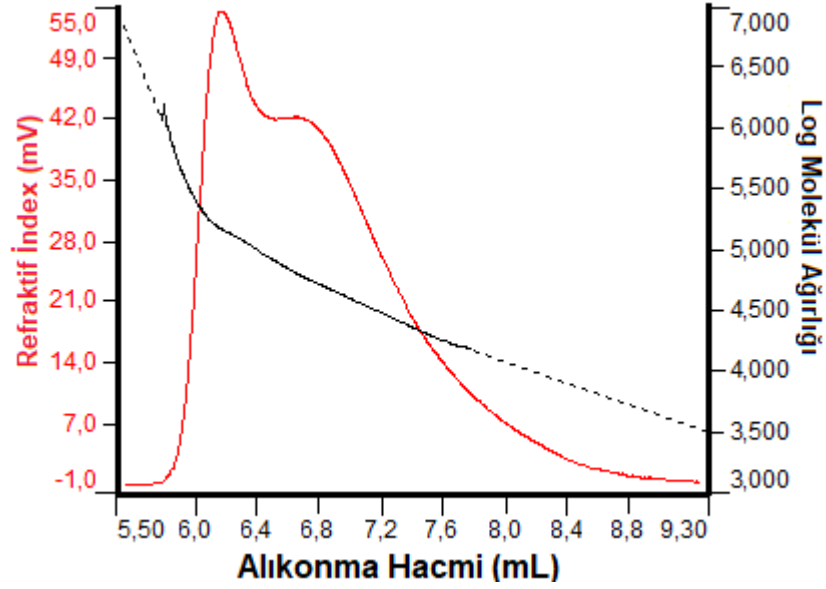
P(VP-ko-AA) polimerinin GPC analiz sonuçları Şekil 5.3-5.5’ de verilmiştir. Molekül ağırlığı ve PDI bilgileri Tablo 5.1’de verilmiştir. Şekil 5.3’te verilen kırılma indisi kromatogramı polimerin ortalama molekül ağırlığının saptanmasında kullanılmıştır. Şekil 5.4’ te verilen GPC ışık saçılması kromatogramında molekülün boyutu hakkında bilgi edinilmiştir. Kromatogram incelendiğinde polimere ait tek pik görüldüğü ve ortamda reaksiyona girmeyen monomerin olmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 5. 3 P(VP-ko-AA)'ye ait GPC kırılma indisi kromatogramı



Şekil 5. 4 P(VP-ko-AA)'ye ait GPC ışık saçılması kromatogramı



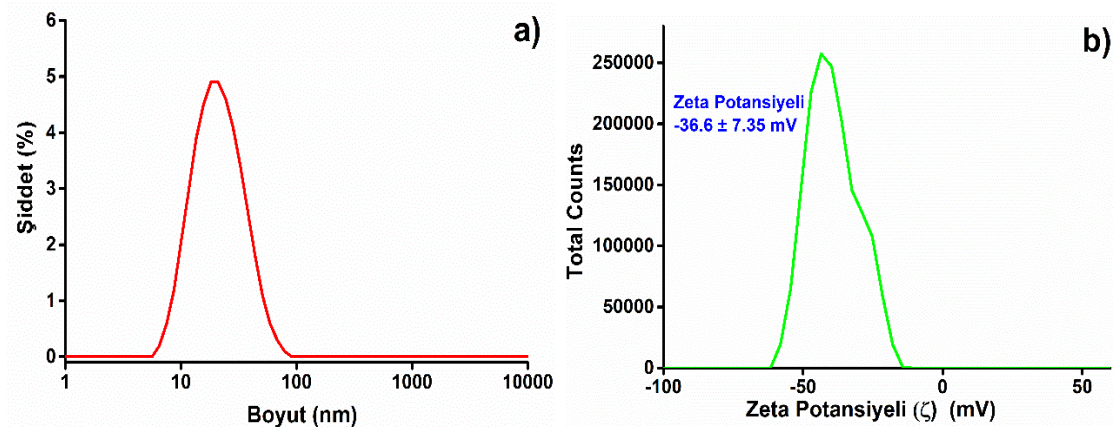
Şekil 5. 5 Sentezlenen Poli (N-Vinil-2-pirolidon-ko-Akrilik asit) polimerinin GPC kırılma indisi kromatogramına göre molekül ağırlığı tayini

Tablo 5.1 Sentezlenen P(VP-ko-AA) polimerinin GPC kırılma indisi kromatogramına göre molekül ağırlığı tayininde elde edilen veriler

Sentezlenen P(VP-ko-AA) polimerine ait veriler	
Mn - (Daltons)	62.617
Mw - (Daltons)	81.965
Mz - (Daltons)	155.662
Mp - (Daltons)	147.107
Mw / Mn	1,309
RI Alanı - (mvmI)	65,55
UV Alanı - (mvmI)	0,00
RALS Alanı- (mvmI)	20,71

5.2.1.2 ZetaSizer Analizi

Sentezlenen P(VP-*ko*-AA) polimerinin yapılan boyut ve zeta potansiyel ölçüm sonuçları sırasıyla Şekil 5.6a ve Şekil 5.6b’ de verilmektedir.

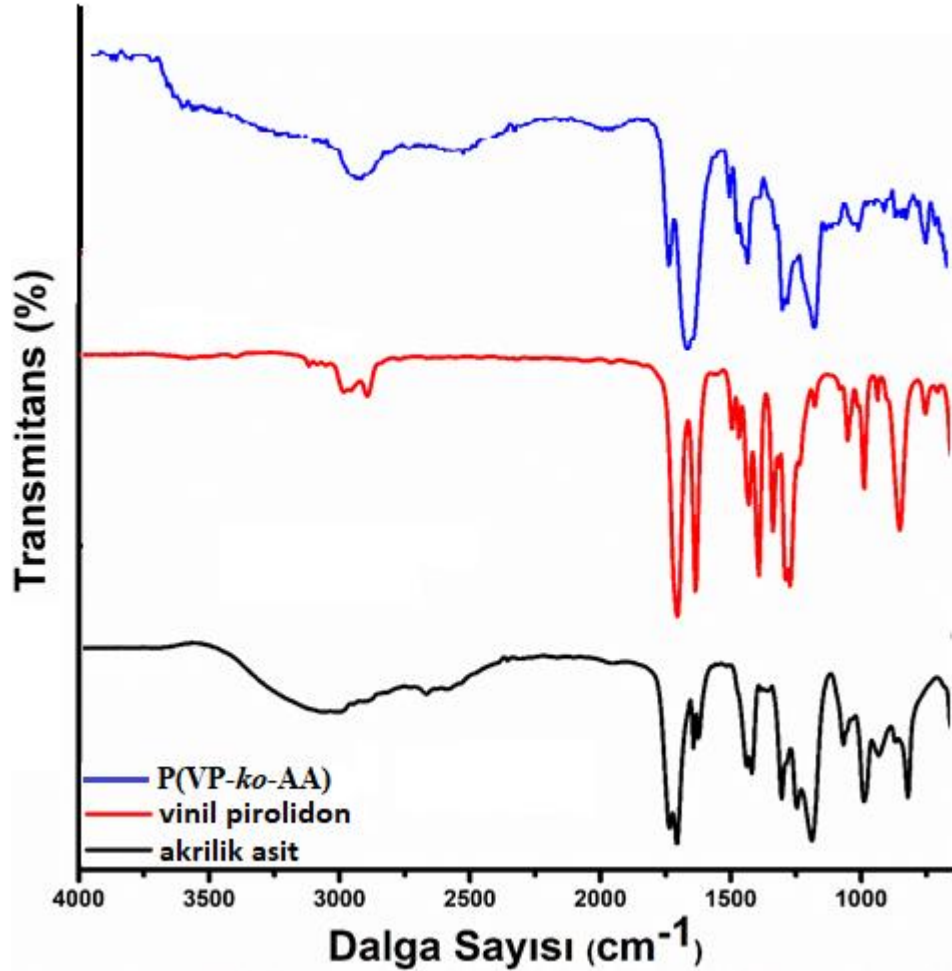


Şekil 5. 6 P(VP-*ko*-AA) polimerinin a) boyut dağılımı ve b) zeta potansiyel grafiği

Sentezlenen P(VP-*ko*-AA) polimerinin şiddet grafiği şekil 5.6’da gösterilmiştir. Z-ave boyutu $53,44 \pm 14.65$ nm, şekil 5.6b’de de gösterildiği gibi yükü- $36,6 \pm 7.35$ mV’ dir.

5.2.1.3 FTIR Analizi

Akrilik asit, vinil pirolidon monomerlerine ve sentezlenen P(VP-ko-AA) polimerine ait FTIR spektrumları Şekil 5.7’ de verilmiştir.



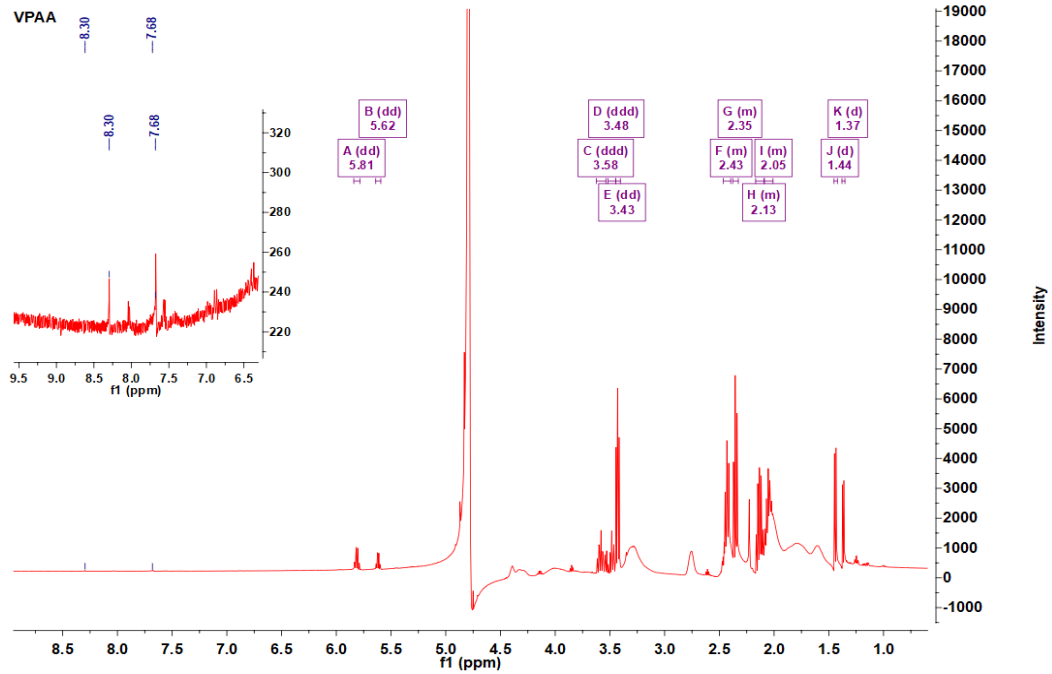
Şekil 5. 7 Akrilik asit, vinil pirolidon monomerlerine ve sentezlenen P(VP-ko-AA) polimerine ait FTIR spektrumu

her iki monomerde mevcut olan bantlar görülmüştür. 1600-1750 cm⁻¹, 1170-1350 cm⁻¹ ve 1400 cm⁻¹’de oluşan pikler kopolimerizasyonun gerçekleştiğini kanıtlayan en önemli piklerdir.

5.2.1.4 NMR Analizi

¹H NMR, proton tipleri, proton tiplerinin herbirinin sayısı ve ortamları hakkında bilgi vererek polimerlerin yapısını aydınlatmada kullanılır. Tez kapsamında ¹H-NMR spektrumları için tüm numuneler su içerisinde çözülmüştür ve Bruker Avance

III 500 NMR spektrometresi kullanılarak elde edilmiştir. ve tüm numuneler su içinde çözüldü. P(VP-ko-AA) polimerine ait NMR spektrumu Şekil 5. 8’de verilmiştir.



Şekil 5. 8 P(VP-ko-AA) polimerine ait NMR spektrumu

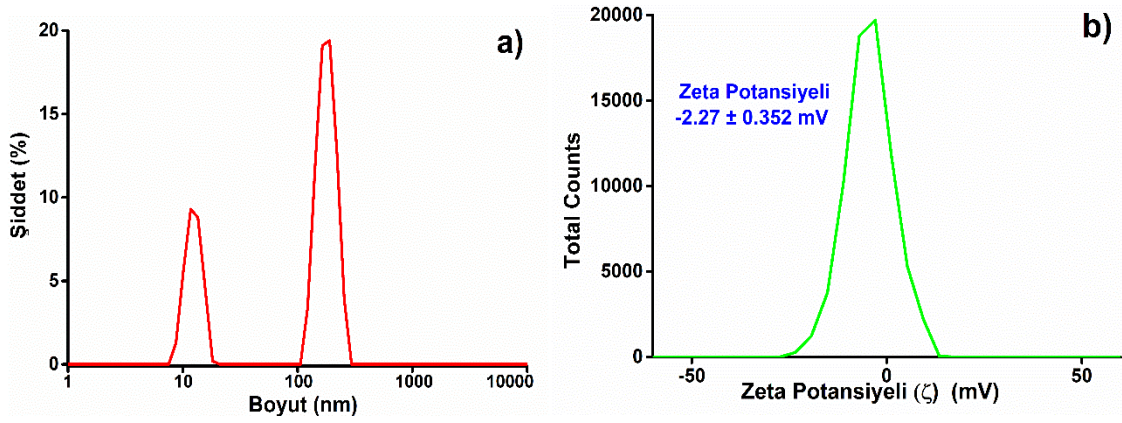
Monomerler için (AA ve VP): $\delta = 7.68$ ppm (AA monomerinin -COOH hidrojeni); $\delta = 5.81$ (dd, $J = 14.0, 7.0$ Hz, 1H); $\delta = 5.62$ (dd, $J = 12.3, 6.2$ Hz, 1H); $\delta = 2.46 - 2.09$ (m, 10H).

Polimer için: $\delta = 3.58$ ppm (ddd, $J = 18.2, 10.2, 6.8$ Hz, 2H); $\delta = 3.48$ ppm (ddd, $J = 16.6, 9.4, 4.8$ Hz, 1H); $\delta = 3.43$ ppm (dd, $J = 8.7, 5.5$ Hz, 3H); $\delta = 2.09 - 2.01$ ppm (m, 7H); $\delta = 1.44$ ppm (d, $J = 7.0$ Hz, 2H); $\delta = 1.37$ ppm (d, $J = 6.2$ Hz, 2H); $\delta = 8.30$ ppm (Polimerin -COOH hidrojeni).

5.2.2 POX polimerine ait veriler

5.2.2.1 Boyut ve Zeta Potansiyel Analizi

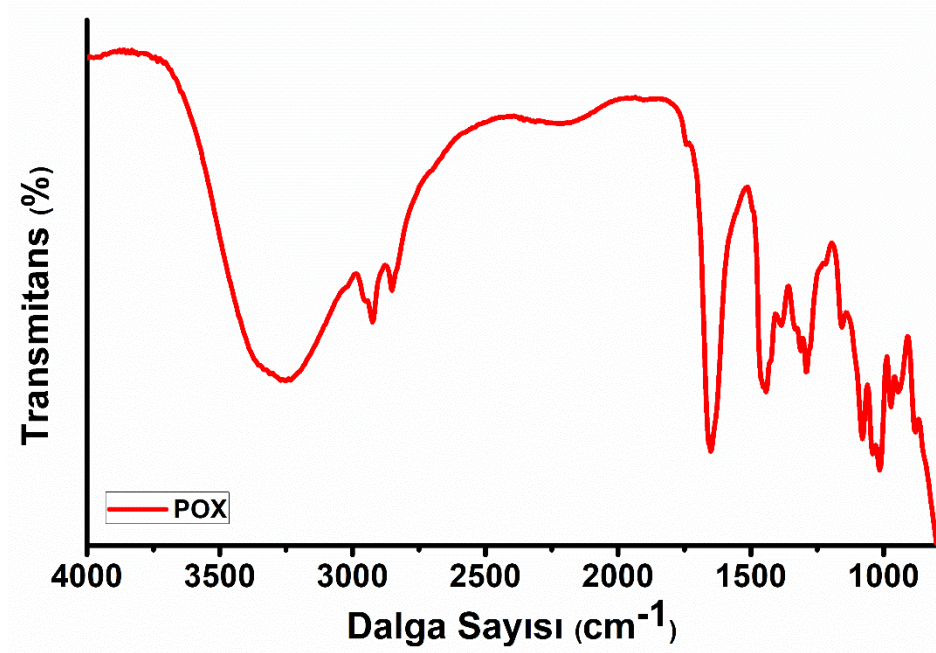
Polioksidonyum polimerine ait Zetasizer boyut analizi sonucu Şekil 5.9a’ da ve zeta potansiyel analizi sonucu Şekil 5.9b’de verilmiştir.



Şekil 5. 9 POX polimerinin Zetasizer a) boyut dağılımı ve b) zeta potansiyel grafiği
Kullanılan POX polimerinin Z-ave boyutu 189.4 ± 33.25 nm, zeta potansiyel değeri ise -2.27 ± 0.352 mV' dir.

5.2.2.2 FTIR Analizi

Polioksidonyum polimerine ait FTIR spektrumu Şekil 5.10'da gösterilmiştir.



Şekil 5. 10 POX polimerine ait FTIR spektrumu

POX polimerine ait FTIR spektrumunda 1652 cm^{-1} 'de C=O piki, 3265 cm^{-1} 'deki geniş bantta ise OH grubuna ait pik görülmektedir.

5.3 Komplekslerin ve Konjugatların Analizlerine Ait Bulgular

LPS biyomolekülünün P(VP-*ko*-AA) ve POX polimeri kullanılarak üretilen kompleks ve konjugatlarına ait analiz sonuçları bu bölümde verilmiştir.

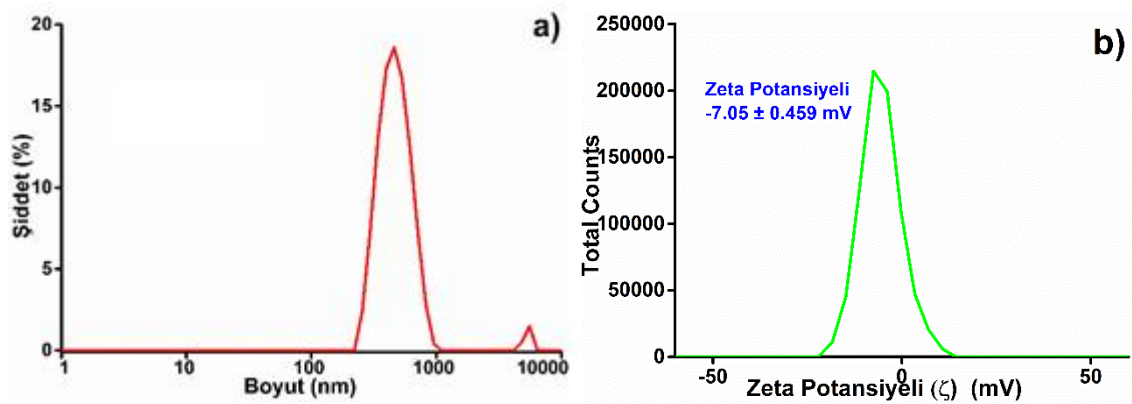
5.3.1 LPS ile Komplekslerin Analizine ait Bulgular

LPS biyomolekülünün P(VP-*ko*-AA) ve POX polimeri ile gerçekleştirilen fiziksel kompleksleri ve metal iyonu varlığında gerçekleşen 3'lü LPS-Cu²⁺-Polimer komplekslerinin analizlerine ait bulgular aşağıda verilmiştir.

5.3.1.1 LPS-P(VP-*ko*-AA) Fiziksel Komplekslerinin Analizlerine ait Bulgular

- ZetaSizer Analizi

LPS-P(VP-*ko*-AA) fiziksel komplekslerinin ZetaSizer boyut grafiği Şekil 5.11a' da ve zeta potansiyel grafiği Şekil 5.11b' de gösterilmiştir.

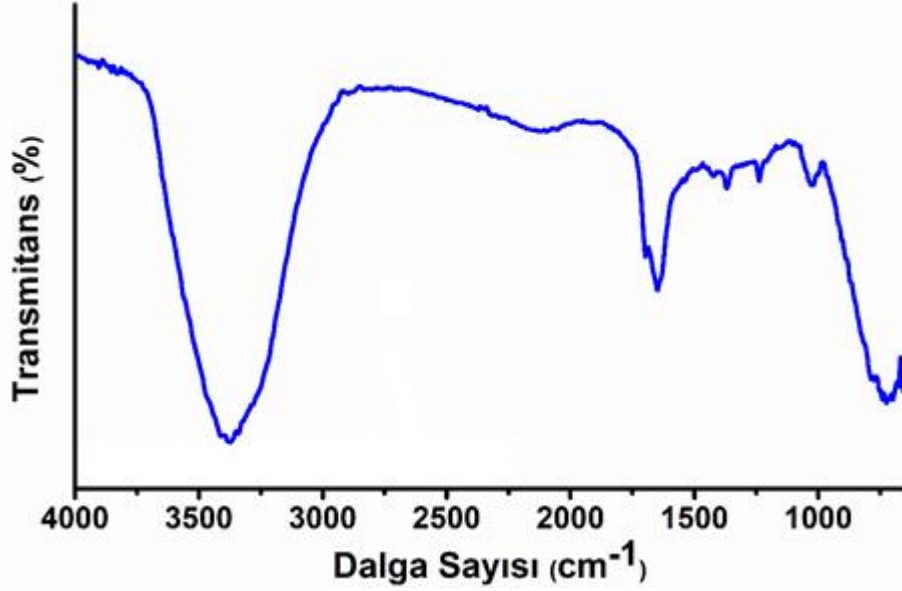


Şekil 5. 11 LPS-P(VP-*ko*-AA) fiziksel komplekslerinin Zetasizer a) boyut dağılımı ve b) zeta potansiyel grafiği

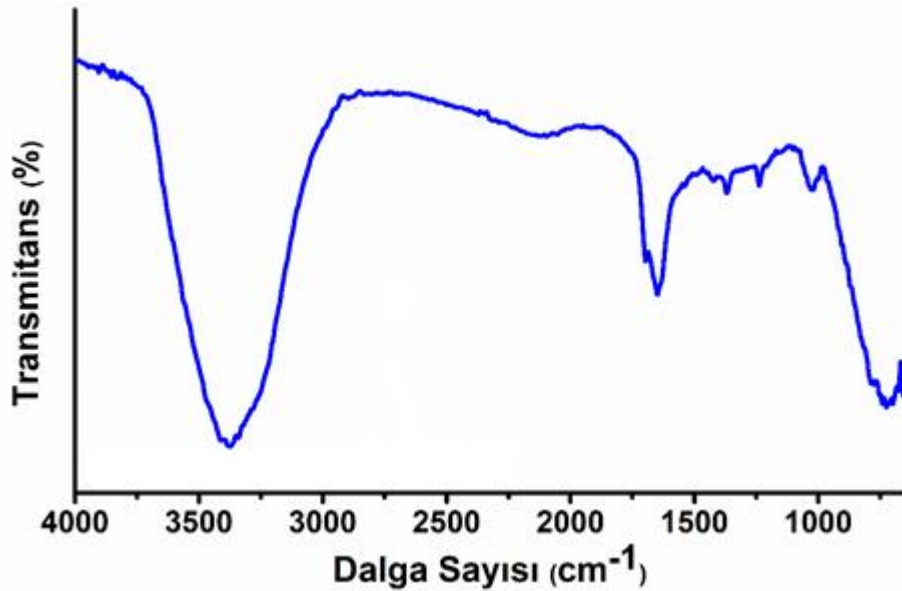
Fiziksel kompleksin Z-ave değeri 437.9 ± 1.882 nm ve zeta potansiyeli -7.05 ± 0.459 mV olarak ölçülmüştür.

- **FTIR Analizi**

LPS-P(VP-ko-AA) fiziksel kompleksine ait FTIR spektrumu Şekil 5.12' de; LPS, polimer ve komplekse ait kıyaslamalı FTIR spektrumu Şekil 5.13' de gösterilmiştir.



Şekil 5. 12 LPS-P(VP-ko-AA) fiziksel kompleksine ait FTIR spektrumu

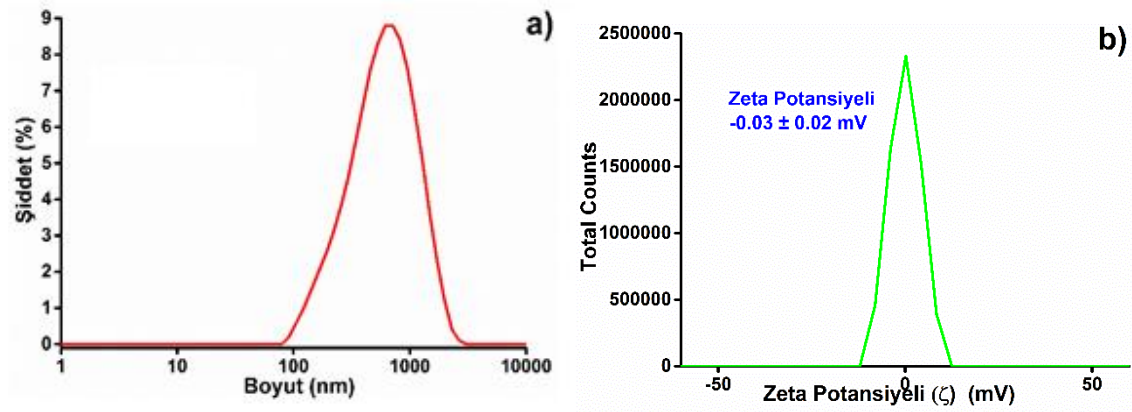


Şekil 5. 13 LPS, P(VP-ko-AA) ve LPS-P(VP-ko-AA) fiziksel kompleksine ait karşılaştırmalı FTIR spektrumu

5.3.1.2 LPS-Polioksidonyum Fiziksel Komplekslerinin Analizlerine ait Bulgular

- ZetaSizer Analizi

LPS-POX fiziksel komplekslerinin ZetaSizer boyut grafiği Şekil 5.14a’ da ve zeta potansiyel grafiği Şekil 5.14b’ de gösterilmiştir.

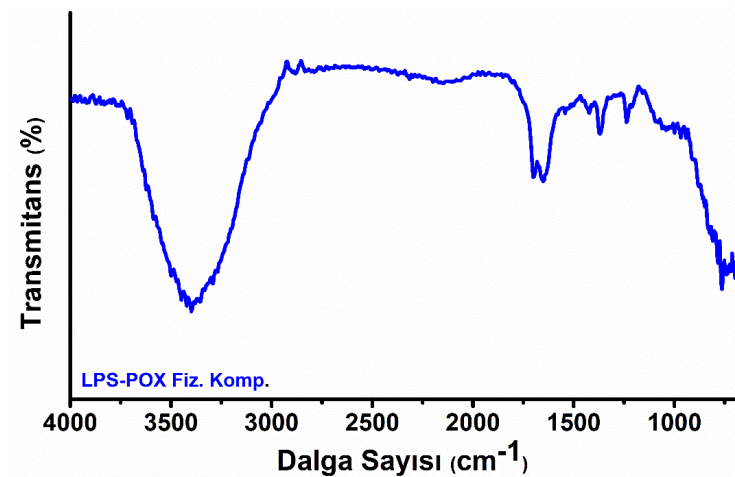


Şekil 5. 14 LPS-POX fiziksel komplekslerinin Zetasizer a) boyut dağılımı ve b) zeta potansiyel grafiği

LPS-POX fiziksel kompleksinin Z-ave boyutu 416.7 ± 4.708 nm, yükü Şekil 5.14b’ de gösterildiği gibi yükü -0.03 ± 0.02 mV olarak ölçülmüştür.

- FTIR Analizi

LPS-POX fiziksel kompleksine ait FTIR spektrumu Şekil 5.15’ de gösterilmiştir.

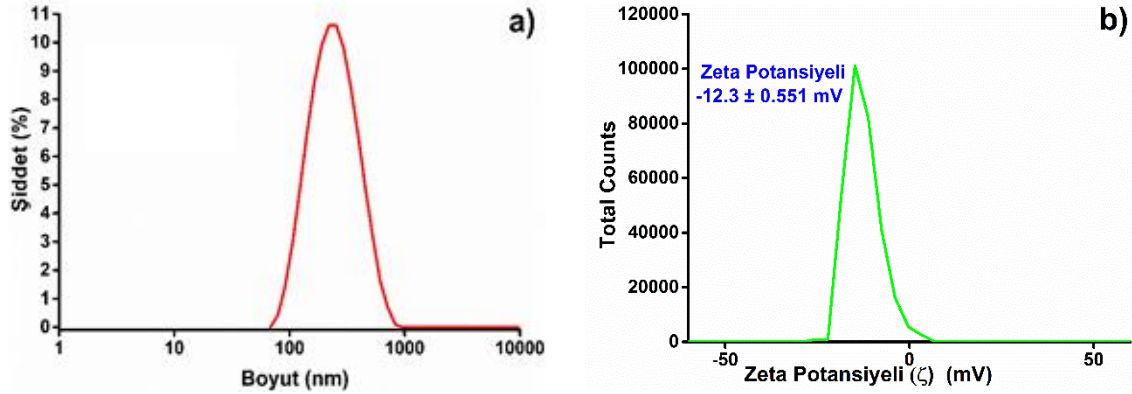


Şekil 5. 15 LPS-POX fiziksel kompleksine ait FTIR spektrumu

5.3.1.3 P(VP-ko-AA)-Cu²⁺-LPS Komplekslerine Analizine Ait Bulgular

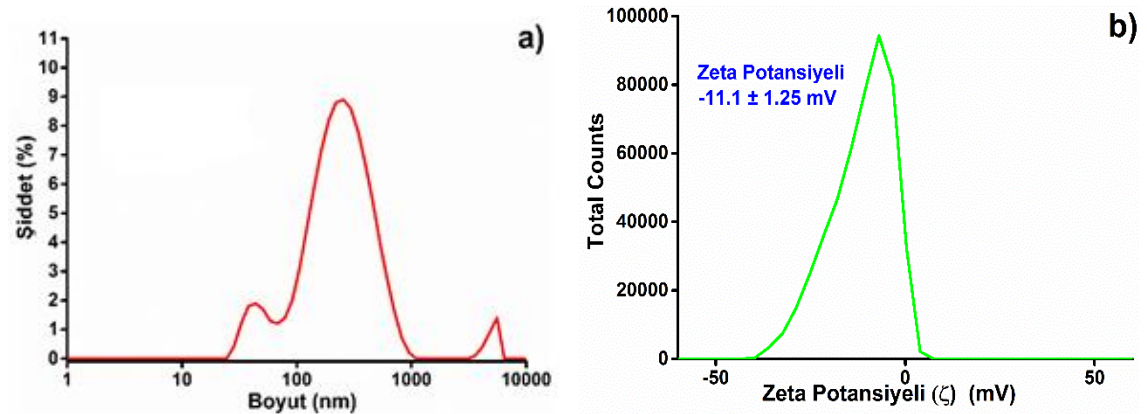
• ZetaSizer Analizi

LPS-Cu²⁺-P(VP-ko-AA)-1 ve LPS-Cu²⁺-P(VP-ko-AA)-2 komplekslerine ait Zetasizer boyut ve zeta potansiyel sonuçları sırasıyla Şekil 5.16' da ve Şekil 5.17' de gösterilmiştir.



Şekil 5. 16 P(VP-ko-AA)-Cu²⁺-LPS-1 kompleksinin Zetasizer a) boyut dağılımı ve b) zeta potansiyel grafiği

LPS-Cu²⁺-P(VP-ko-AA)-1 kompleksinin Z-ave boyutu 189.9 ± 5.508 nm ve zeta potansiyeli -12.3 ± 0.551 olarak ölçülmüştür.

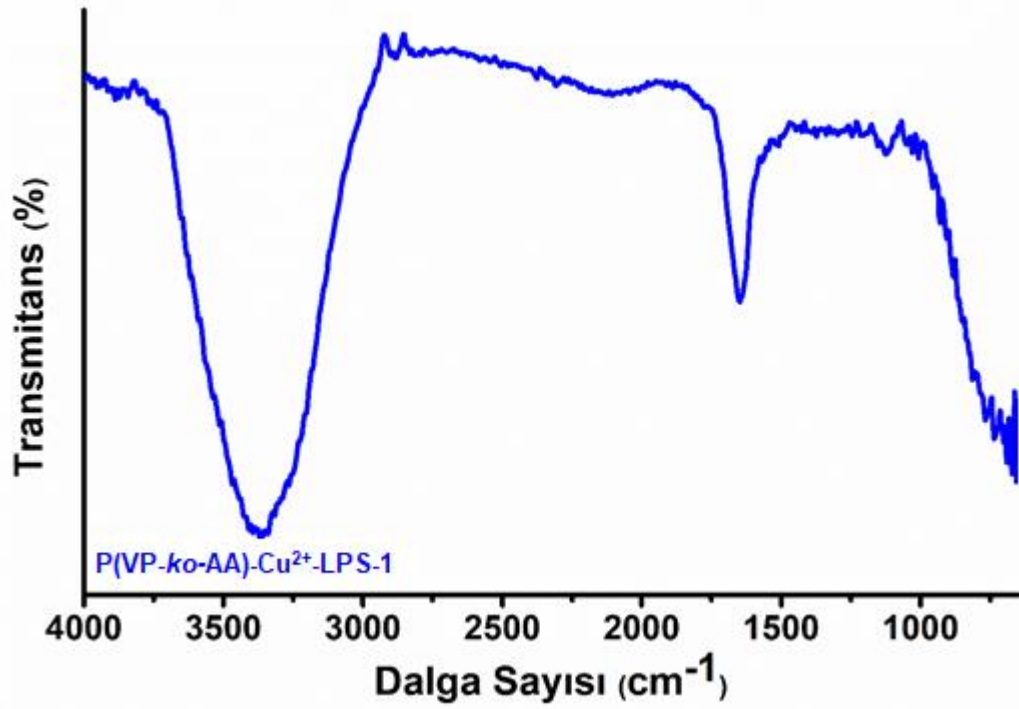


Şekil 5. 17 P(VP-ko-AA)-Cu²⁺-LPS-2 kompleksinin Zetasizer a) boyut dağılımı ve b) zeta potansiyel grafiği

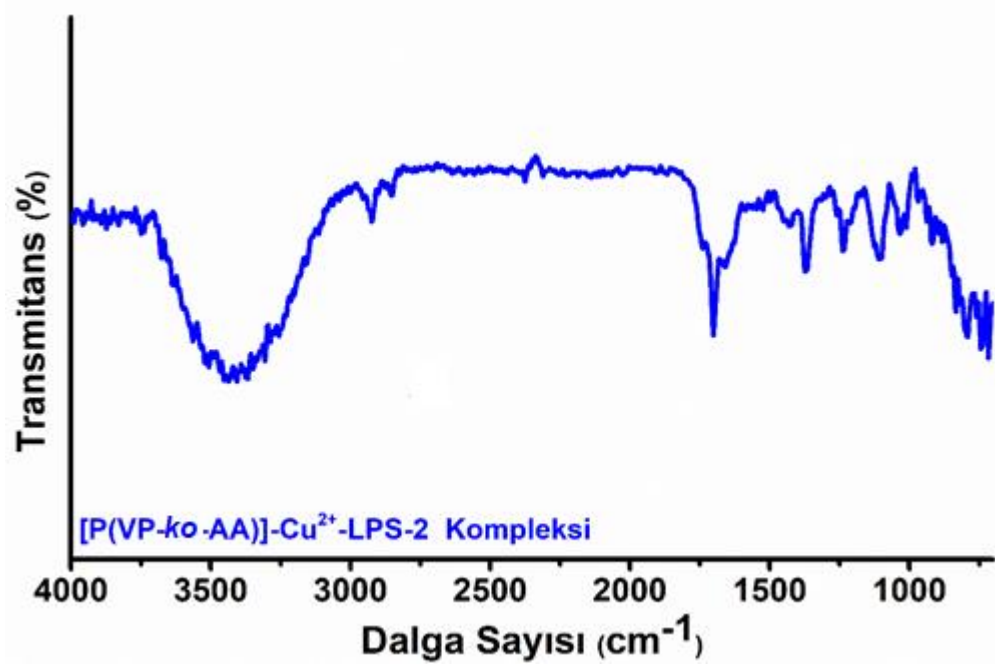
P(VP-ko-AA)-Cu²⁺-LPS-2 kompleksine ait Z-ave boyutu 186.3 ± 1.823 nm ve zeta potansiyeli -11.1 ± 1.25 mV olarak ölçülmüştür.

- **FTIR Analizi**

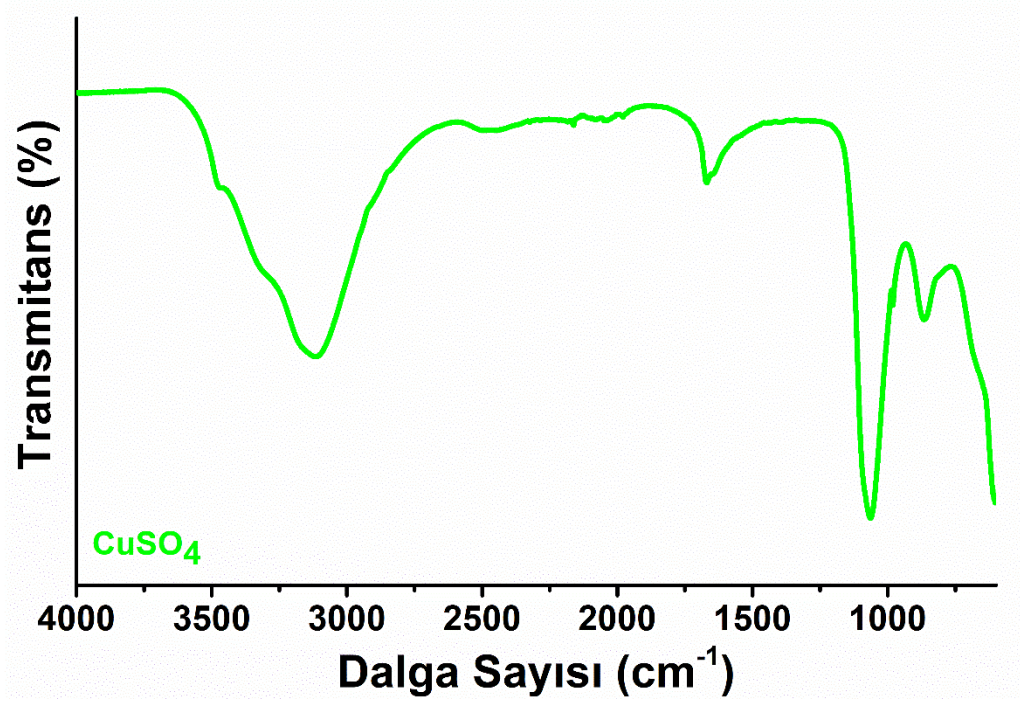
P(VP-*ko*-AA)-Cu²⁺-LPS-1 kompleksine (Kompleks 1- Komp.1) ait FTIR spektrumu Şekil 5.18' de, LPS ve P(VP-*ko*-AA) ile kıyaslamalı olarak Şekil 5.20' de, P(VP-*ko*-AA)-Cu²⁺-LPS-2 kompleksine (Kompleks 2- Komp.2) ait FTIR spektrumu ise Şekil 5.19' da ve CuSO₄.5H₂O'a ait FT-IR spektrumu Şekil 5.21' de gösterilmiştir.



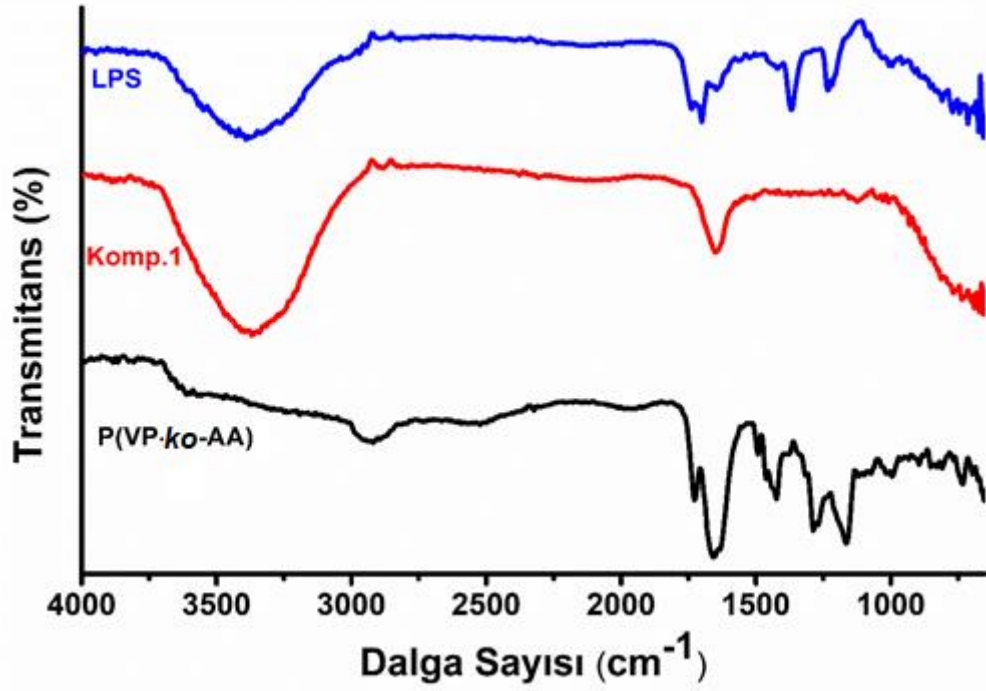
Şekil 5. 18 P(VP-*ko*-AA)-Cu²⁺-LPS-1 FTIR spektrumu



Şekil 5. 19 P(VP-ko-AA)-Cu²⁺-LPS-2 Kompleksine ait FTIR spektrumu



Şekil 5. 20 CuSO₄.5H₂O'a ait FTIR spektrumu

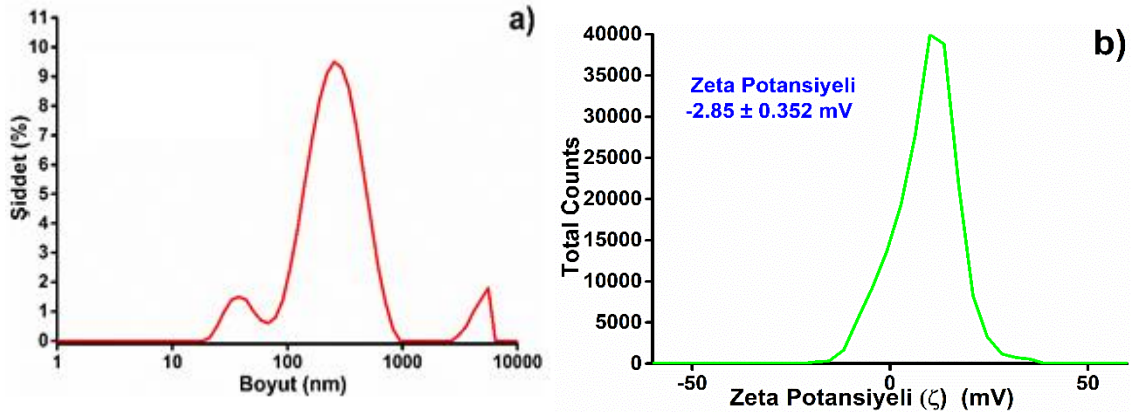


Şekil 5. 21 LPS, P(VP-ko-AA)-Cu²⁺-LPS-1 Kompleksi (Komp.1) ve P(VP-ko-AA) ve LPS'ye ait karşılaştırmalı FTIR spektrumu

5.3.1.4 POX-Cu²⁺-LPS Komplekslerinin Analizlerine Ait Bulgular

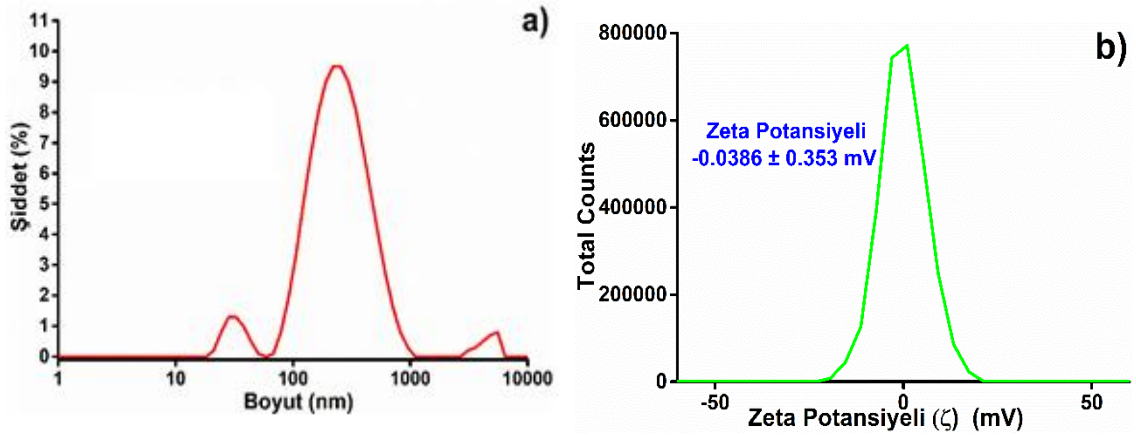
- Zetasizer Analizi

POX- Cu²⁺-LPS-1 kompleksine ait boyut sonuçları Şekil 5.22a'da ve zeta potansiyel sonucu Şekil 5.22b'de gösterilmiştir. POX- Cu²⁺-LPS-2 komplekslerine ait ZetaSizer boyut sonuçları sırasıyla Şekil 5.23a' da zeta potansiyel sonucu Şekil 5.23b' de gösterilmiştir.



Şekil 5. 22 POX-Cu²⁺-LPS-1 kompleksine ait Zetasizer a) boyut dağılımı ve b) zeta potansiyel grafiği

POX-Cu²⁺-LPS-1 kompleksinin Z-ave boyutu 207.3 ± 5.831 nm ve zeta potansiyeli -2.85 ± 0.352 mV olarak ölçülmüştür.

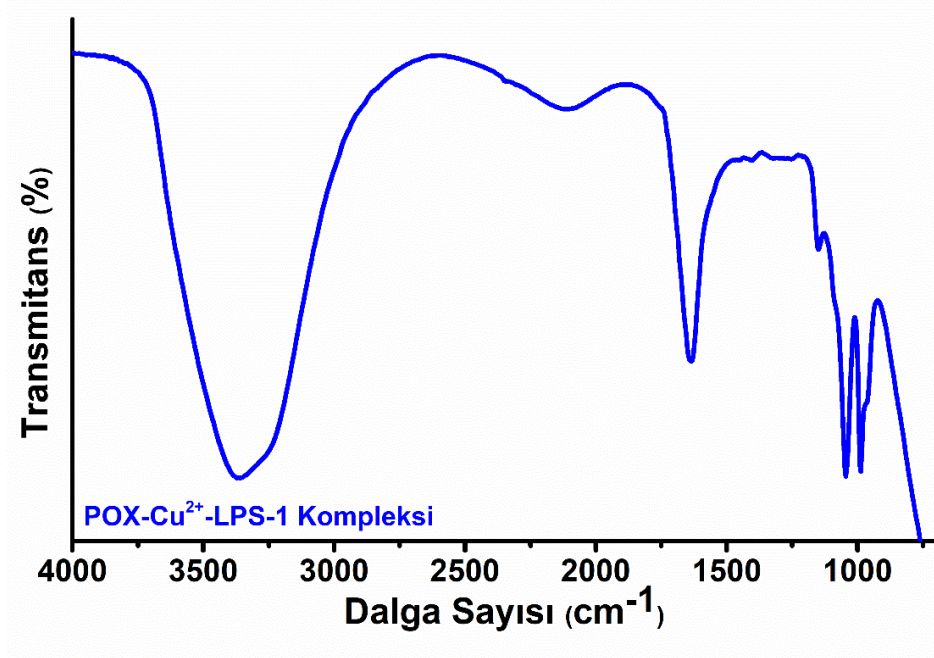


Şekil 5. 23 POX-Cu²⁺-LPS-2 kompleksine ait Zetasizer a) boyut dağılımı ve b) zeta potansiyel grafiği

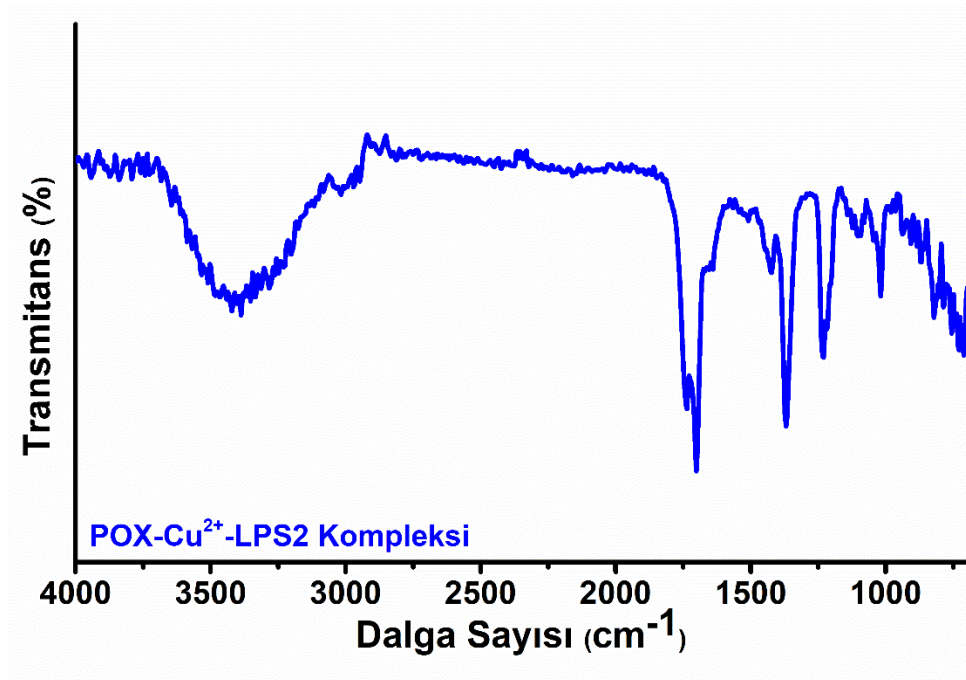
POX-Cu²⁺-LPS-2 kompleksinin Z-ave boyutu 199.1 ± 4.632 nm ve zeta potansiyeli -0.0386 ± 0.353 mV olarak ölçülmüştür.

- **FTIR Analizi**

POX-Cu²⁺-LPS-1 kompleksine ait FTIR spektrumu Şekil 5.24' de, POX-Cu²⁺-LPS-2 kompleksine ait FTIR spektrumu Şekil 5.25' de verilmiştir.



Şekil 5. 24 POX-Cu²⁺-LPS-1 Kompleksine ait FTIR spektrumu

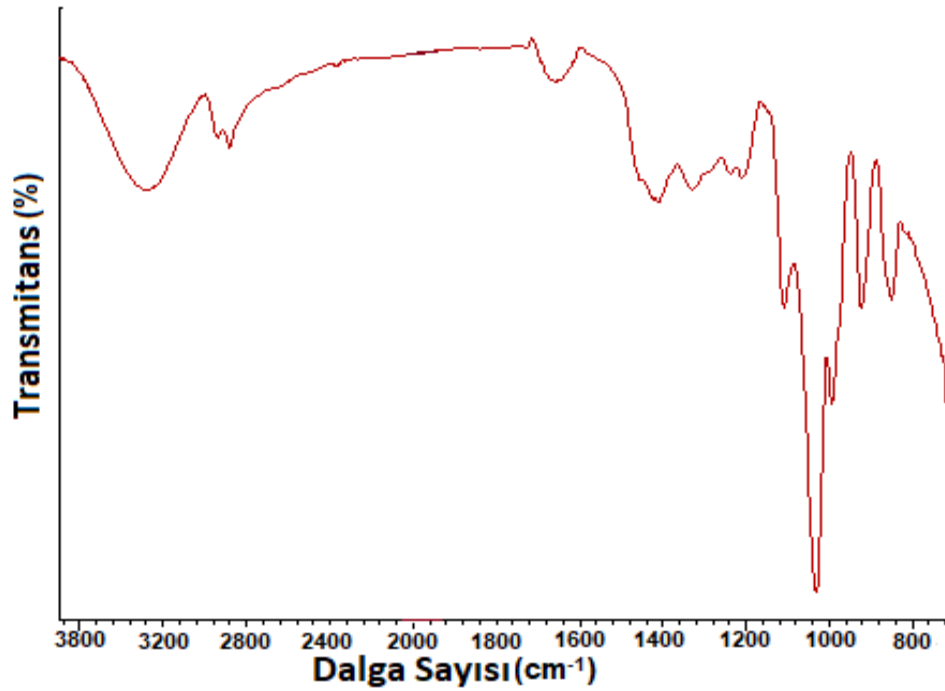


Şekil 5. 25 POX-Cu²⁺-LPS-2 Kompleksine ait FTIR spektrumu

5.3.2 LPS-POX ve LPS- P(VP-ko-AA) Konjugatlarının Analizlerine Ait Bulgular

- **LPS'nin Aldehit Türevinin Oluşturulması**

LPS'nin periyodatla oksidasyonu sonucunda elde edilen LPS'nin aldehit türevine ait FTIR spektrumu şekil 5.26' da verilmiştir.



Şekil 5. 26 LPS'nin aldehit türevinin FTIR spektrumu

Sodyum periyodatla aldehit türevi oluşturulan LPS'nin $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$ ve NaBH_4 ile amin türevleri oluşturularak biyopolimerlerle konjugasyonu yapılmıştır.

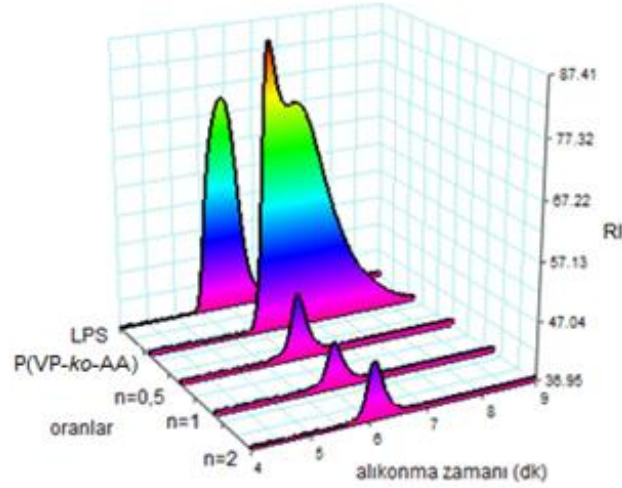
5.3.2.1 NH_2 -LPS'nin Biyopolimerle Konjugasyonu

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

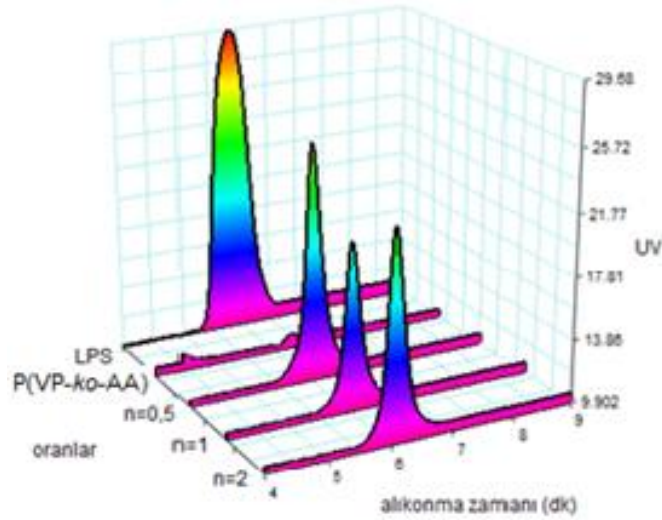
$n_{\text{P(VP-ko-AA)}}/n_{\text{LPS}}$ oranları 0,5; 1 ve 2 olmak üzere EDC varlığında sentezlenen konjugatlar GPC, HPLC, FTIR ve ZetaSizer cihazları ile karakterize edilmiştir.

- **GPC Analizi**

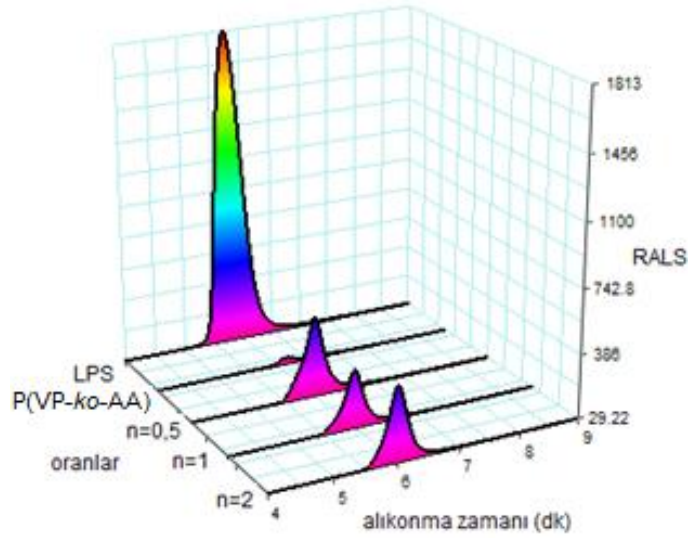
$n_{P(VP-ko-AA)}/n_{LPS}$ oranları 0,5; 1 ve 2 olmak üzere EDC varlığında sentezlenen konjugatlar GPC cihazı ile analiz edildi ve elde edilen GPC kromatogramları LPS ve polimerin kromatogramları ile kıyaslamalı olarak Şekil 5.27-5.28-5.29' da verildi.



Şekil 5. 27 $n_{P(VP-ko-AA)}/n_{LPS}$ oranları 0,5; 1 ve 2 olan konjugatlara ait LPS ve polimer ile kıyaslamalı GPC Kırılma İndisi kromatogramı



Şekil 5. 28 $n_{P(VP-ko-AA)}/n_{LPS}$ oranları 0,5; 1 ve 2 olan konjugatlara ait LPS ve polimer ile kıyaslamalı GPC UV kromatogramı

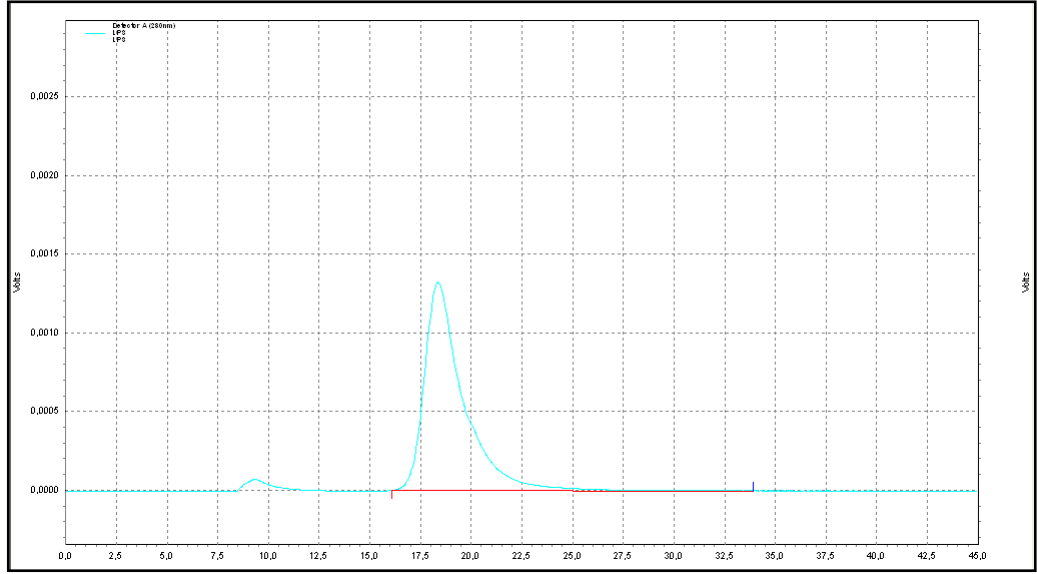


Şekil 5. 29 $n_{P(VP-ko-AA)}/n_{LPS}$ oranları 0,5; 1 ve 2 olan konjugatlara ait LPS ve polimer ile kıyaslamalı GPC Işık Saçılması kromatogramı

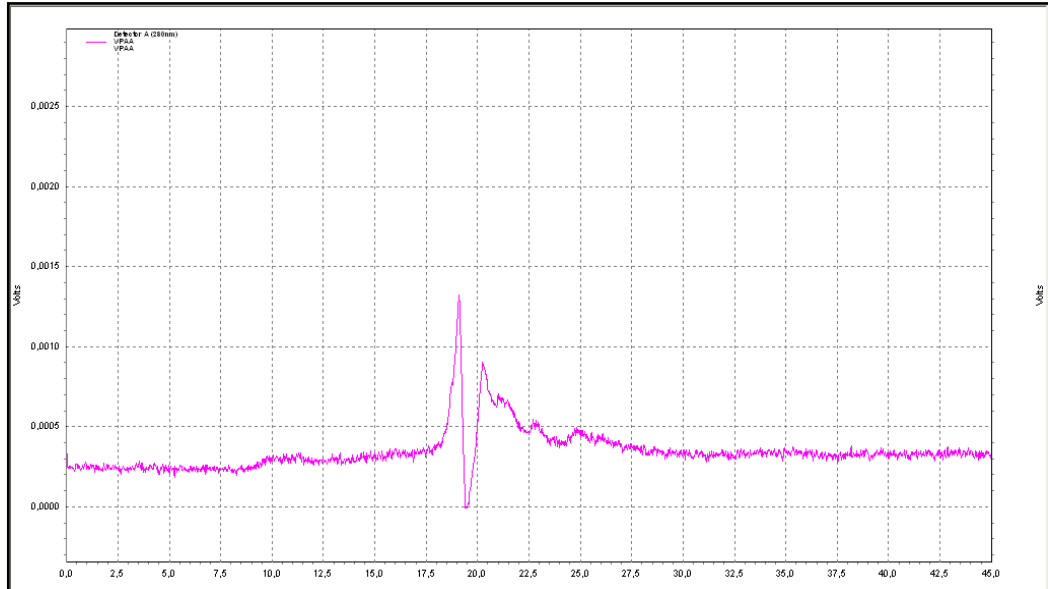
Elde edilen kromatogramlar biyokonjugason reaksiyonunun başarı ile gerçekleştiğini göstermektedir.

- **HPLC Analizi**

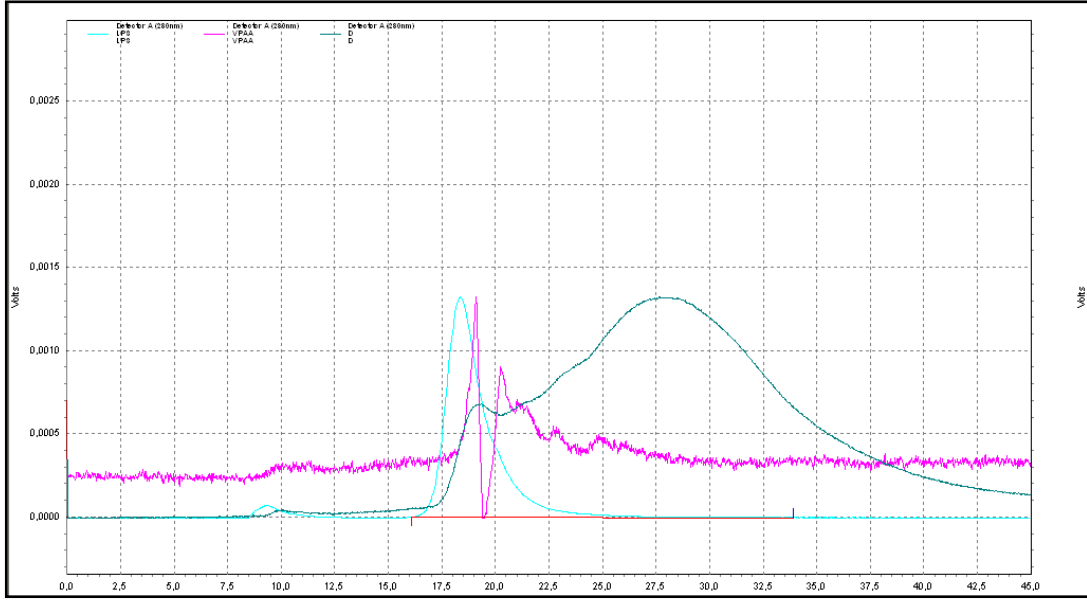
LPS'ye ait HPLC kromatogramı Şekil 5.30'da P(VP-ko-AA) polimerine ait HPLC kromatogramı Şekil 5. 31'de; pH 7'de hazırlanmış $n_{P(VP-ko-AA)}/n_{LPS} = 0,5; 1; 2$ oranlarındaki her bir konjugata ait HPLC kromatogramları, LPS ve polimer ile kıyaslamalı olarak Şekil 5.32-5.33-5.34'de gösterilmiştir. Şekil 5.35' de tüm oranlara ait HPLC kromatogramları LPS ve polimer ile kıyaslamalı olacak şekilde toplu olarak gösterilmiştir.



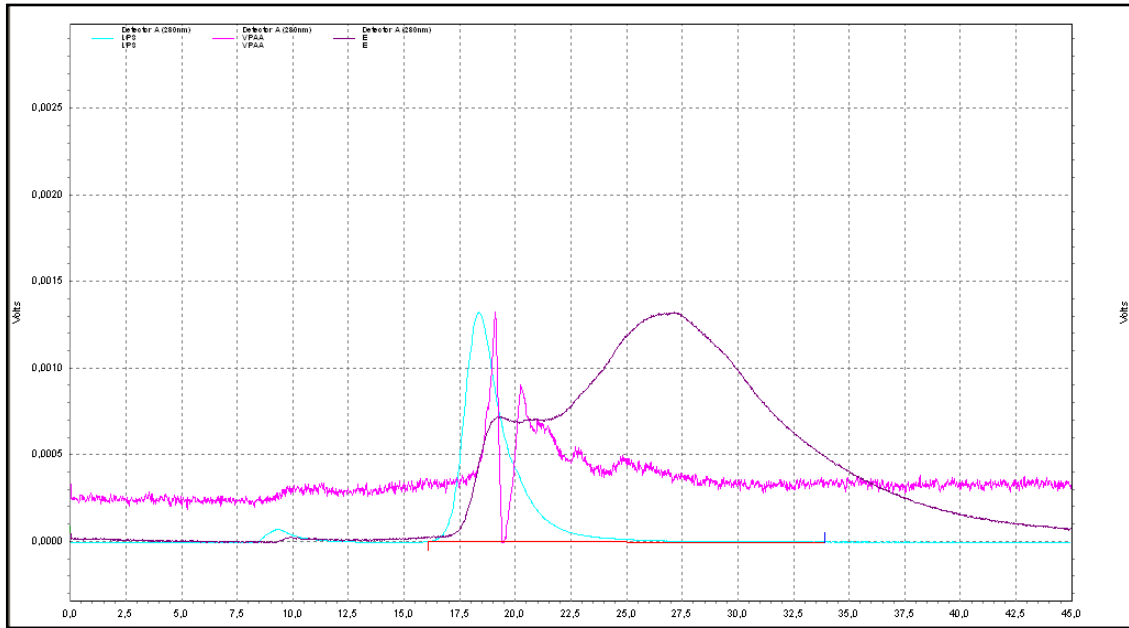
Şekil 5. 30 LPS'ye (♣) ait HPLC kromatogramı



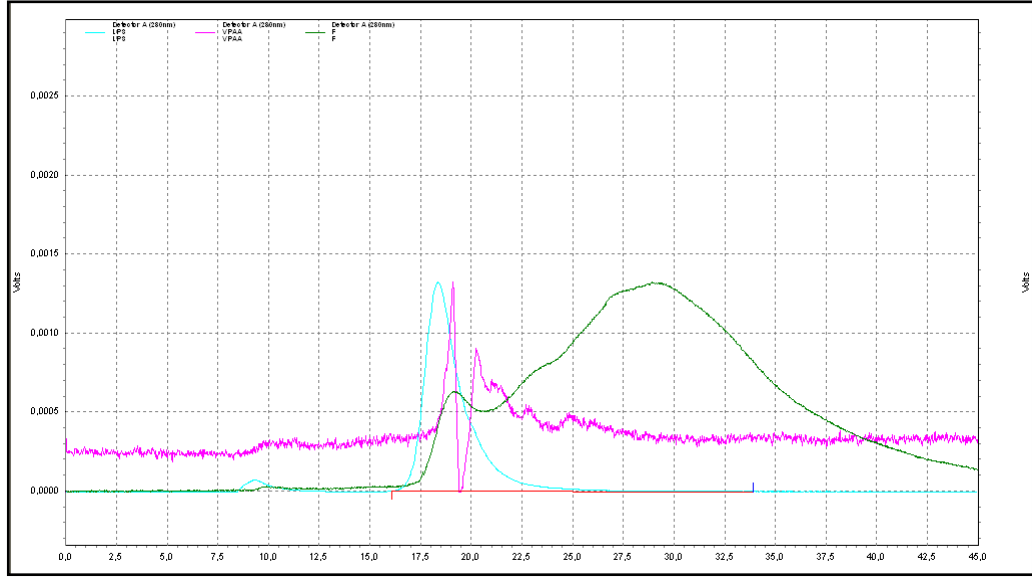
Şekil 5. 31 P(VP-ko-AA)' ya (♣) ait HPLC kromatogramı



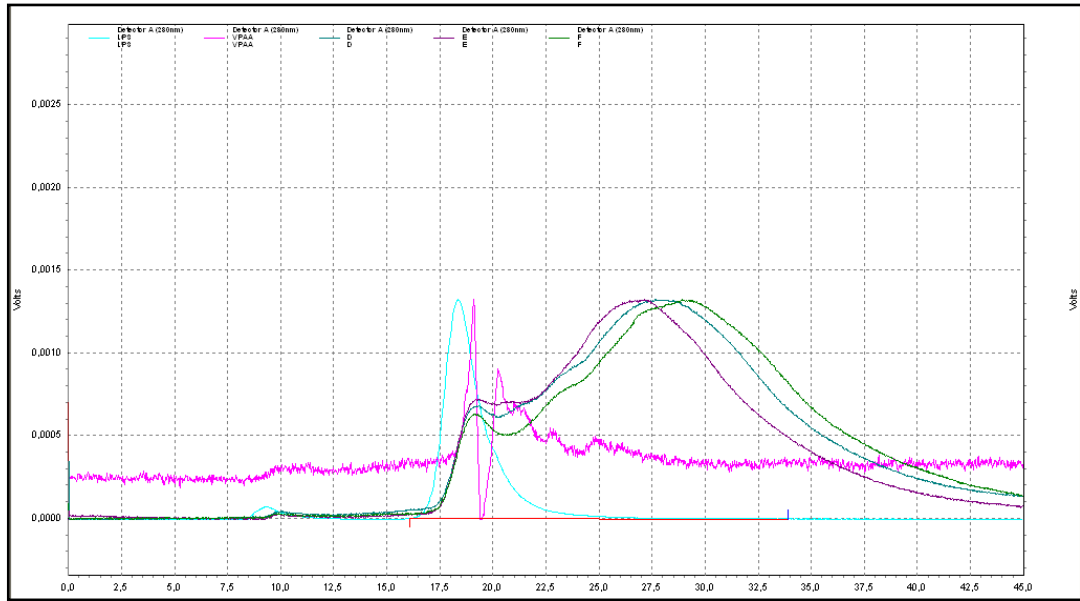
Şekil 5. 32 LPS (♣); P(VP-ko-AA) (♣) ve n=0,5 oranındaki LPS- P(VP-ko-AA) (♣) konjugatına ait kıyaslamalı HPLC Kromatogramı



Şekil 5. 33 LPS (♣); P(VP-ko-AA) (♣) ve n=1 oranındaki LPS- P(VP-ko-AA) (♣) konjugatına ait kıyaslamalı HPLC Kromatogramı



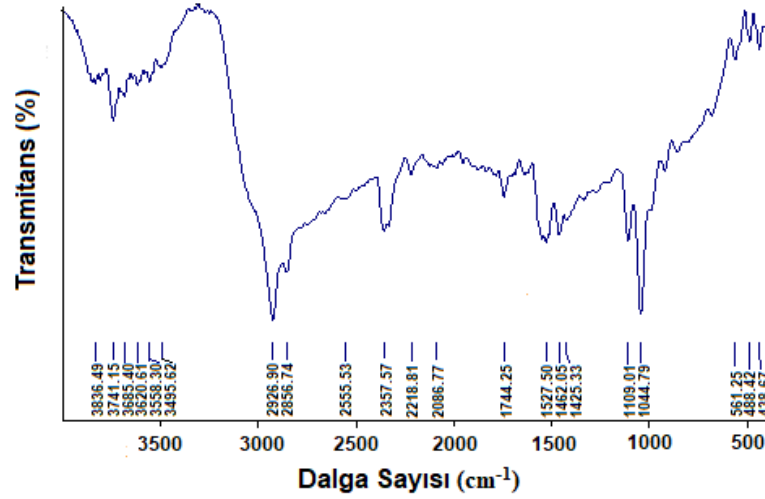
Şekil 5. 34 LPS (♣); P(VP-ko-AA) (♣) ve n=2 oranındaki LPS- P(VP-ko-AA) (♣) konjugatına ait kıyaslamalı HPLC Kromatogramı



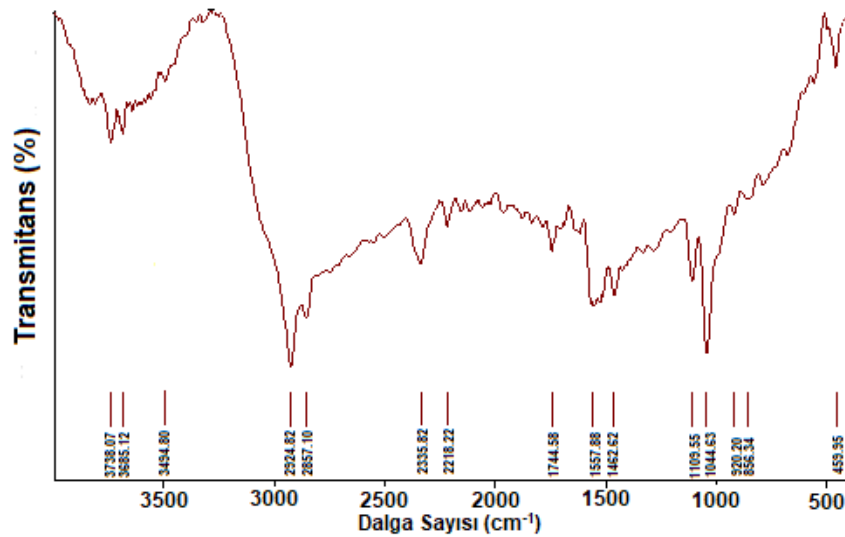
Şekil 5. 35 LPS (♣); P(VP-ko-AA) (♣); LPS- P(VP-ko-AA) oranlarına ait n=0,5 (♣); n=1 (♣); n=2 (♣) ait kıyaslamalı HPLC Kromatogramı

- FTIR Analizi

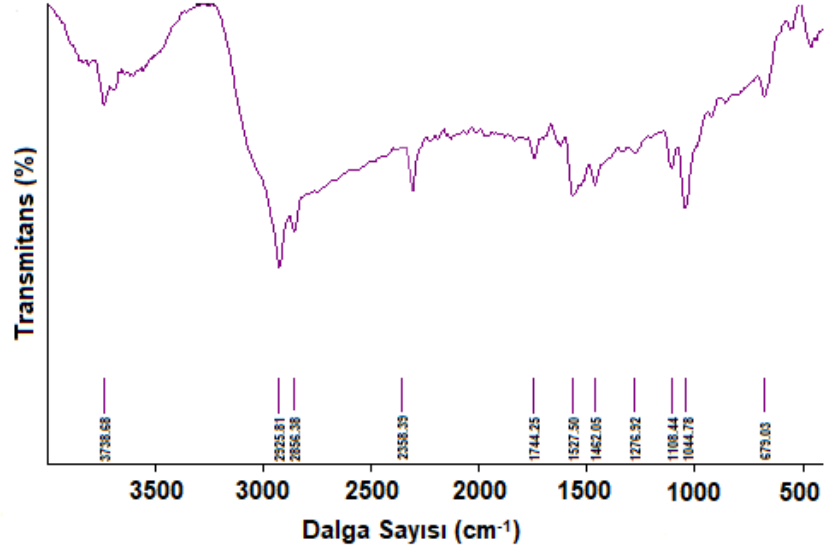
Şekil 5.36-5.37-5.38’ de $n_{P(VP-ko-AA)} / n_{LPS}$ oranları 0,5; 1; 2 olan konjugatlarına ait FTIR spektrumları verilmiştir. Şekil 5.39 ’da üç oranın FTIR spektrumları birbirleriyle karşılaştırmalı olarak verilmiştir.



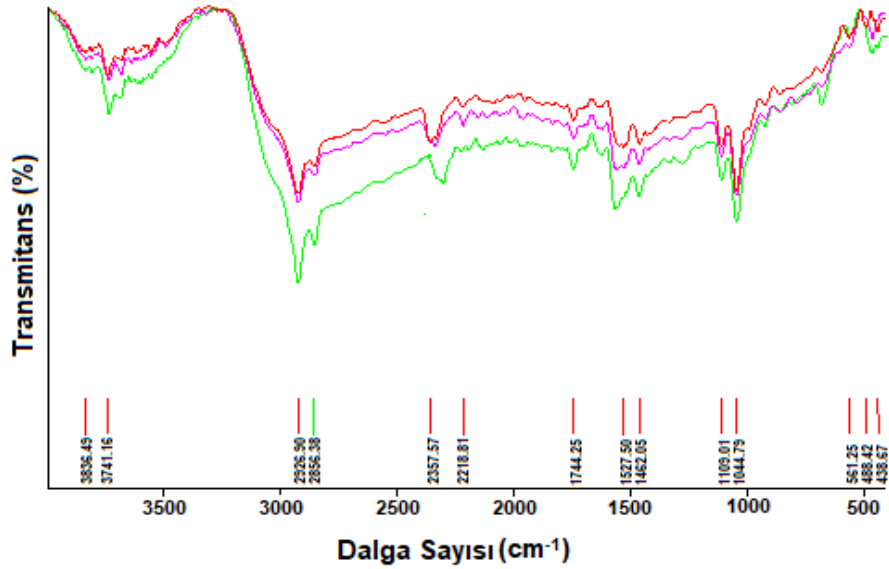
Şekil 5. 36 Karbodiimid yöntemiyle sentezlenmiş olan $n_{P(VP-ko-AA)} / n_{LPS} = 0,5$ oranındaki konjugatın FTIR analiz sonucu



Şekil 5. 37 Karbodiimid yöntemiyle sentezlenmiş olan $n_{P(VP-ko-AA)} / n_{LPS} = 1$ oranındaki konjugatın FTIR analiz sonucu



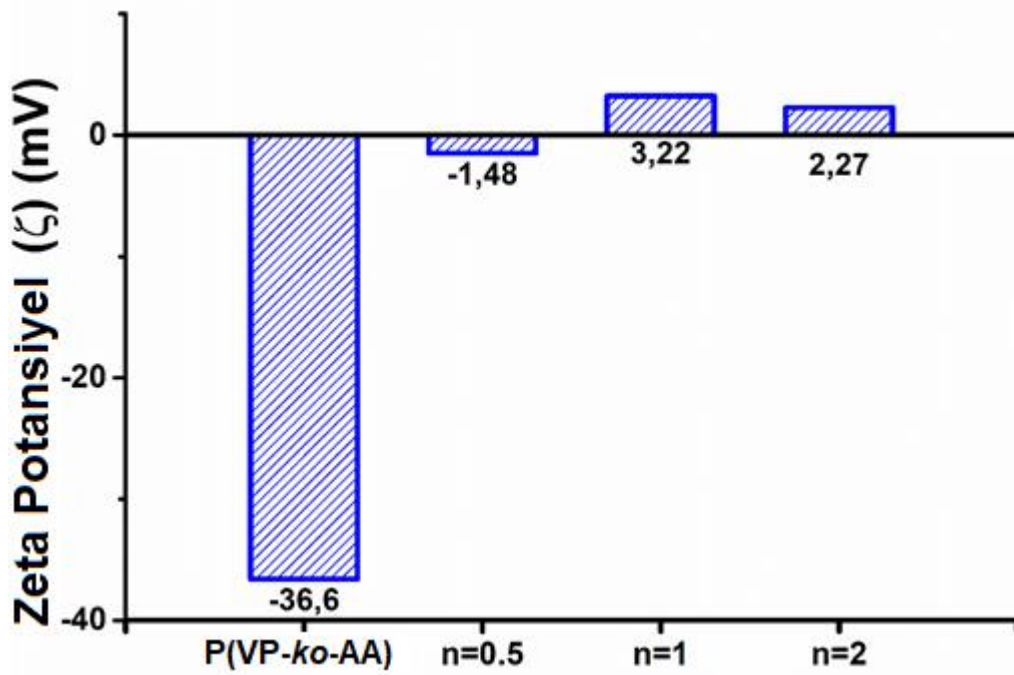
Şekil 5. 38 Karbodiimid yöntemiyle sentezlenmiş olan $n_{P(VP-ko-AA)} / n_{LPS} = 2$ oranındaki konjugatın FTIR analiz sonucu



Şekil 5. 39 Karbodiimid yöntemiyle sentezlenmiş olan $n_{P(VP-ko-AA)} / n_{LPS} = 0,5$ (♣); 1 (♠); 2 (♣) oranlarındaki konjugatların karşılaştırmalı FTIR analiz sonucu

• ZetaSizer Analizi

Karbodiimid yöntemi ile hazırlanan $n_{P(VP-ko-AA)} / n_{LPS} = 0,5; 1; 2$ oranlarındaki konjugatların Zetasizer cihazı ile zeta potansiyel değerleri analiz edilmiştir ve elde edilen zeta potansiyel değerleri polimer ile kıyaslamalı olarak Şekil 5.40' da verilmiştir.



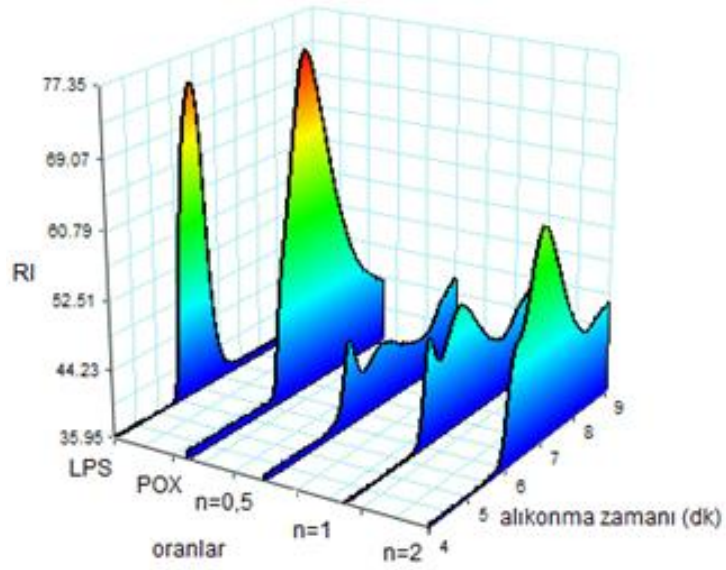
Şekil 5. 40 $n_{P(VP-ko-AA)} / n_{LPS} = 0,5; 1; 2$ oranlarındaki konjugatlara ait polimer ile karşılaştırmalı zeta potansiyel değerleri (mV cinsinden)

-NH₂-LPS'nin Polioksidonyum Polimeri ile Biyokonjugatlarının Sentezi ve Karakterizasyonuna ait Bulgular

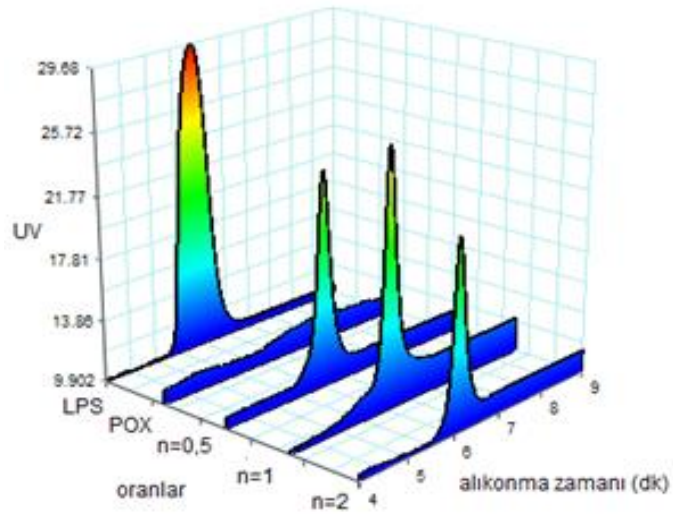
-OH grupları NH₂'ye modifiye edilmiş LPS (NH₂-LPS) ve Polioksidonyum polimerinin EDC çapraz bağlama reaktifi kullanılarak $n_{Polimer} / n_{LPS}$ oranları 0,5; 1 ve 2 olacak şekilde polimerin artan oranlarında sentezlenen konjugatları GPC, HPLC, FTIR ve ZetaSizer cihazları ile karakterize edilmiştir.

• GPC Analizi

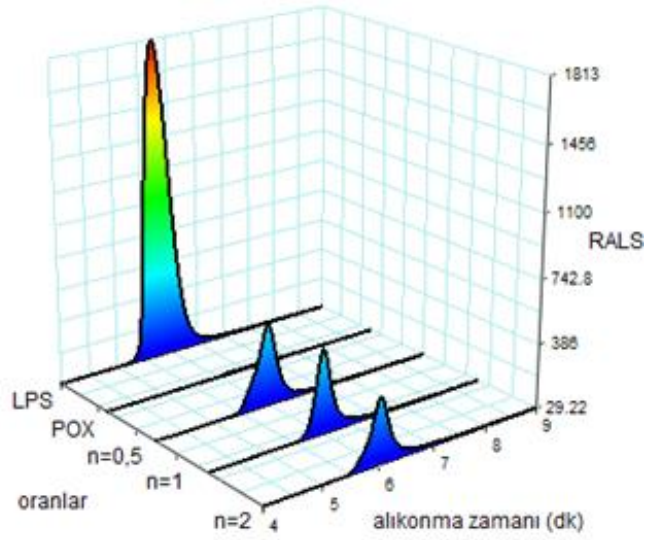
n_{POX} / n_{LPS} oranları 0,5; 1 ve 2 olmak üzere EDC varlığında sentezlenen konjugatlar GPC cihazı ile analiz edildi ve elde edilen GPC kromatogramları LPS ve polimerin kromatogramları ile kıyaslamalı olarak Şekil 5.41-5.42-5.43' de verildi.



Şekil 5. 41 n_{POX}/n_{LPS} oranları 0,5; 1 ve 2 olan konjugatlara ait LPS ve polimer ile kıyaslamalı GPC Kırılma İndisi kromatogramı



Şekil 5. 42 n_{POX}/n_{LPS} oranları 0,5; 1 ve 2 olan konjugatlara ait LPS ve polimer ile kıyaslamalı GPC UV kromatogramı

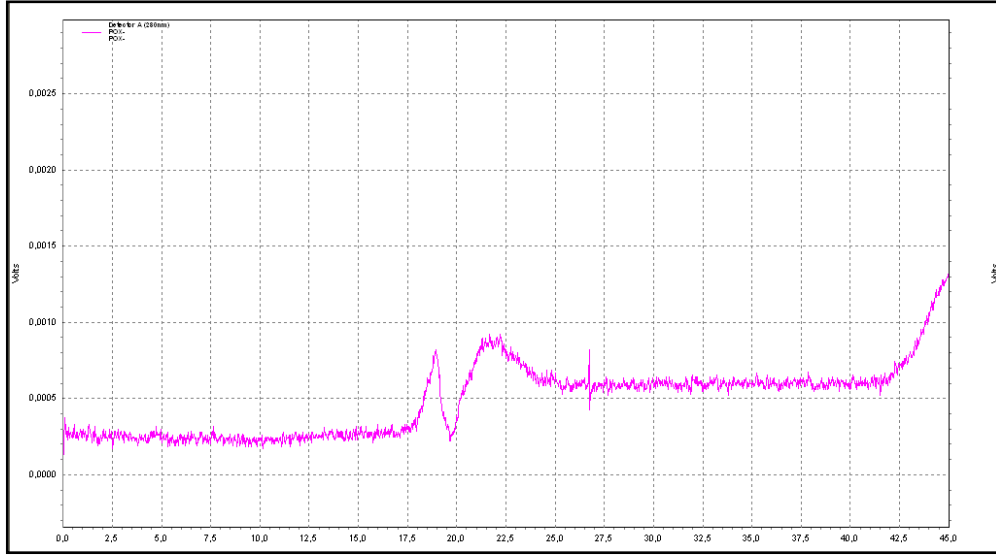


Şekil 5. 43 n_{POX}/n_{LPS} oranları 0,5; 1 ve 2 olan konjugatlara ait LPS ve polimer ile kıyaslamalı GPC Işık Saçılması Kromatogramı

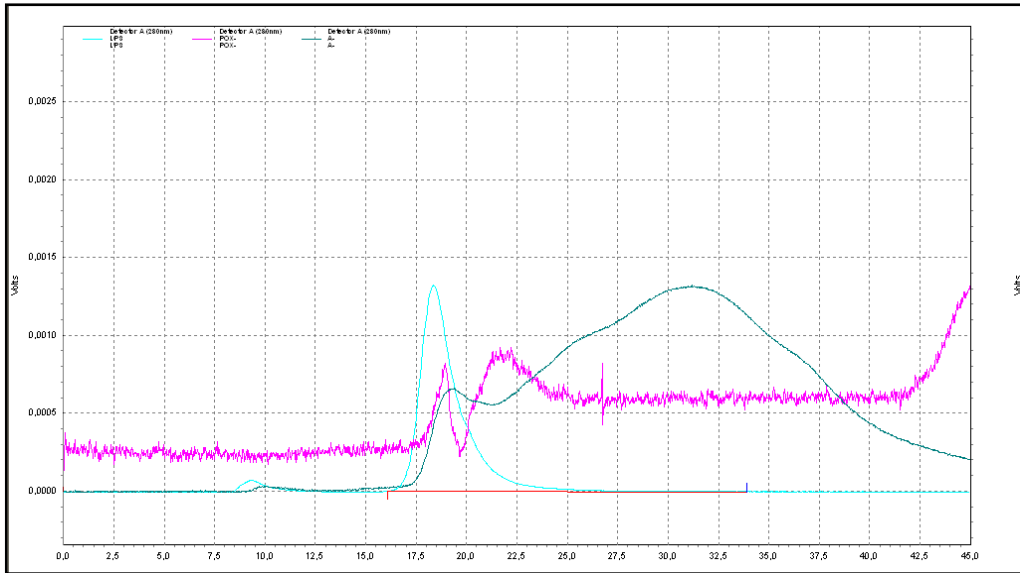
Elde edilen kromatogramlar konjugasyonun başarı ile gerçekleştirildiğini göstermektedir.

- **HPLC Analizi**

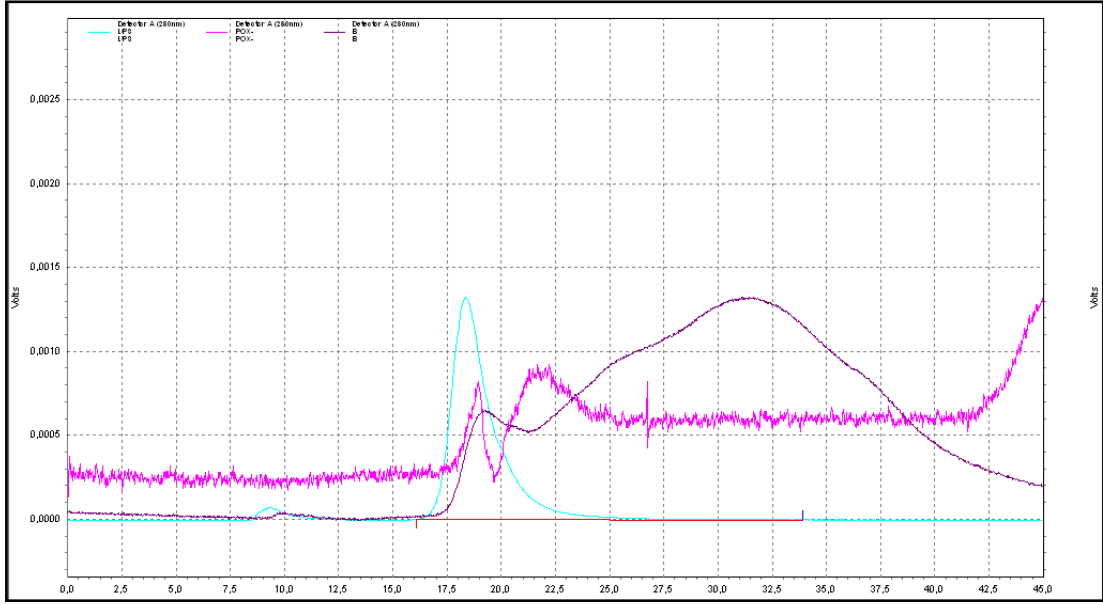
POX polimerine ait HPLC kromatogramı Şekil 5.53 'de, pH 7'de hazırlanmış $n_{P(VP-ko-AA)}/n_{LPS}=0,5; 1; 2$ oranlarındaki her bir konjugata ait HPLC kromatogramları, LPS ve polimer kıyaslamalı olarak Şekil 5.44-5.45-5.46'da gösterilmiştir. Şekil 5.47' de tüm oranlara ait HPLC kromatogramları LPS ve polimer kıyaslamalı olmak üzere toplu olarak gösterilmiştir.



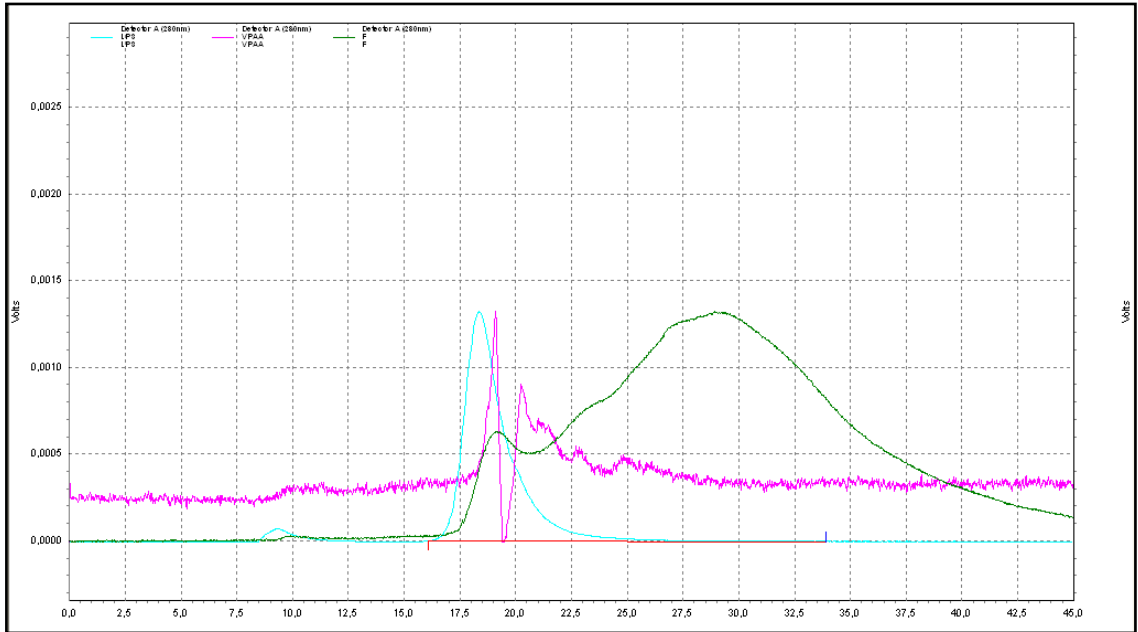
Şekil 5. 44 Polioksidonyuma (POX) (♣) ait HPLC kromatogramı



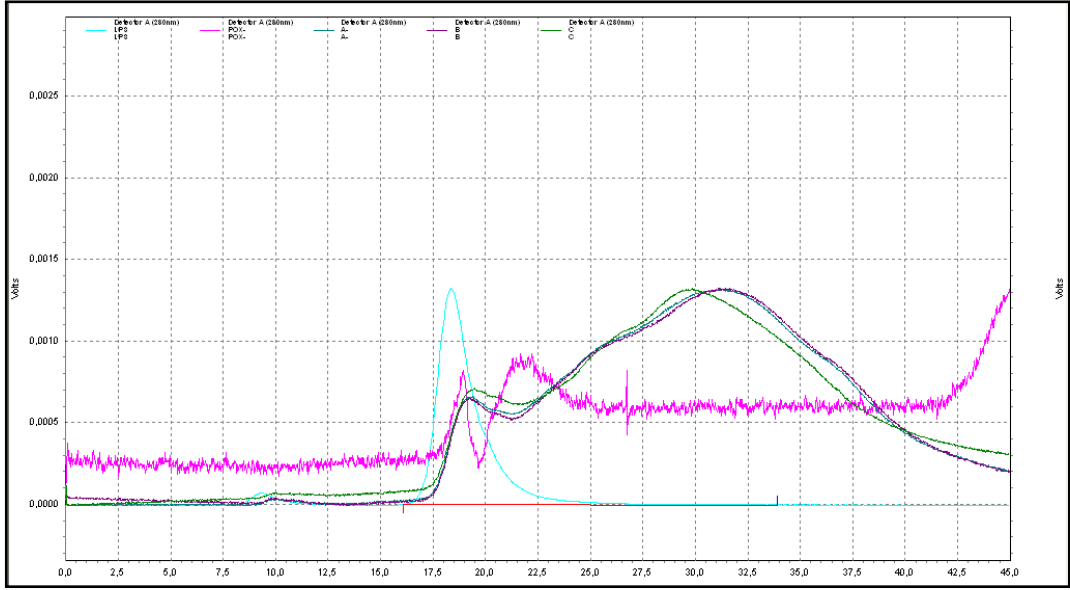
Şekil 5. 45 LPS (♣); POX (♣) ve n=0,5 oranındaki LPS-POX (♣) konjugatına ait kıyaslamalı HPLC Kromatogramı



Şekil 5. 46 LPS (♣); POX (♣) ve n=1 oranındaki LPS-POX (♣) konjugatına ait kıyaslamalı HPLC Kromatogramı



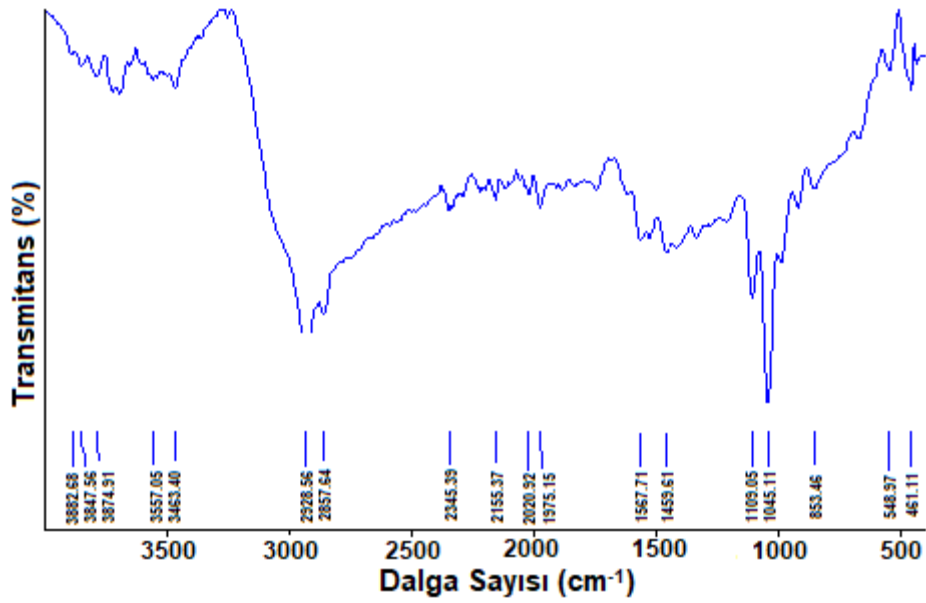
Şekil 5. 47 LPS (♣); POX (♣) ve n=2 oranındaki LPS-POX (♣); konjugatına ait kıyaslamalı HPLC Kromatogramı



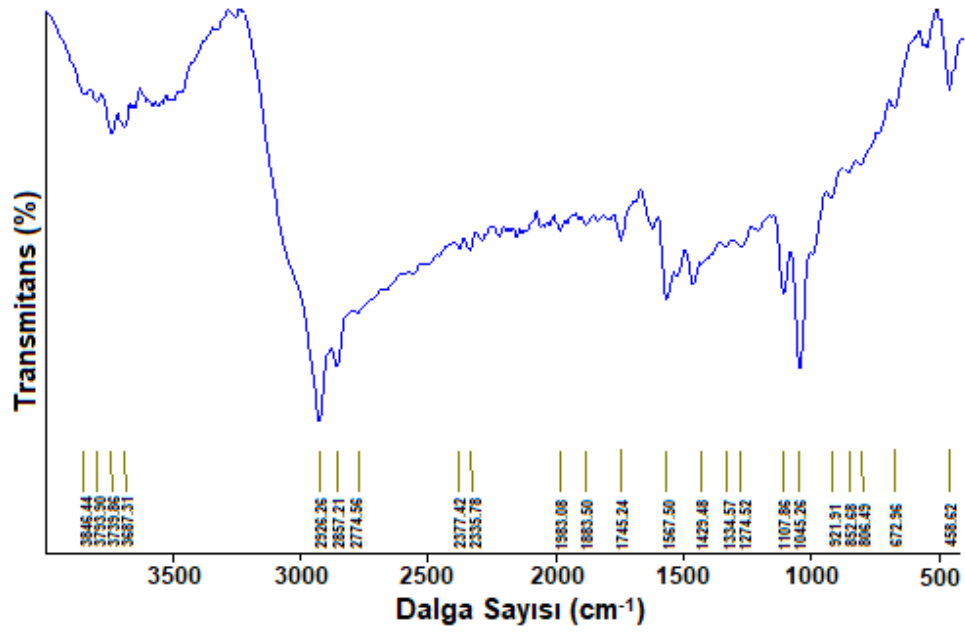
Şekil 5. 48 LPS (♣); POX (♣); LPS-POX konjugatının n=0,5 (♣); n=1 (♣); n=2 (♣) oranlarına ait kıyaslamalı HPLC Kromatogramı

• FTIR Analizi

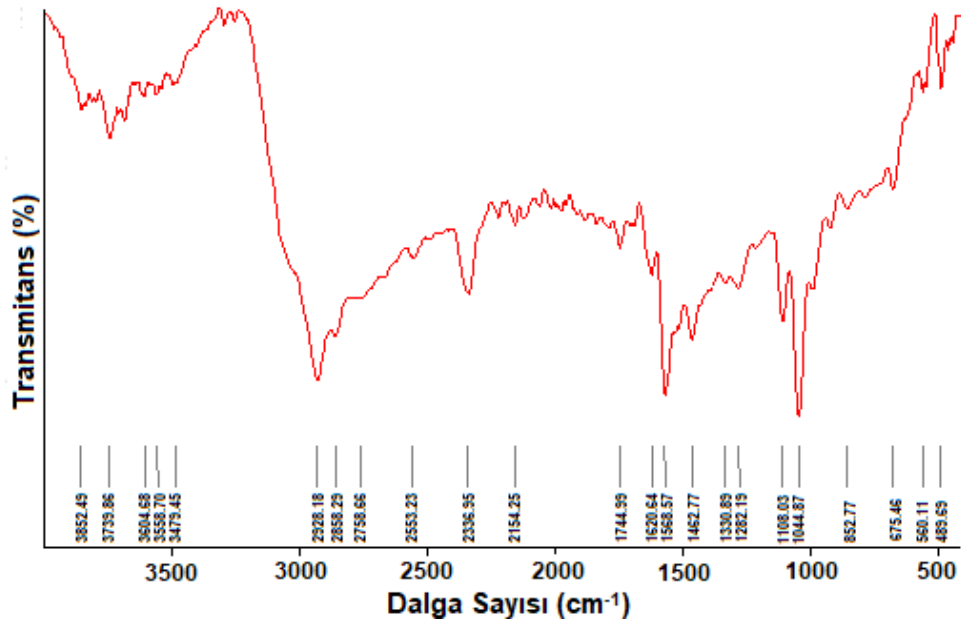
Şekil 5.49-5.50-5.51’de sırasıyla n_{POX}/n_{LPS} oranları 0,5; 1; 2 olan konjugatlara ait FT-IR spektrumları, Şekil 5.52’de n_{POX}/n_{LPS} oranları 0,5; 1; 2 olan konjugatlara ait tplu FT-IR spektrumları verilmiştir.



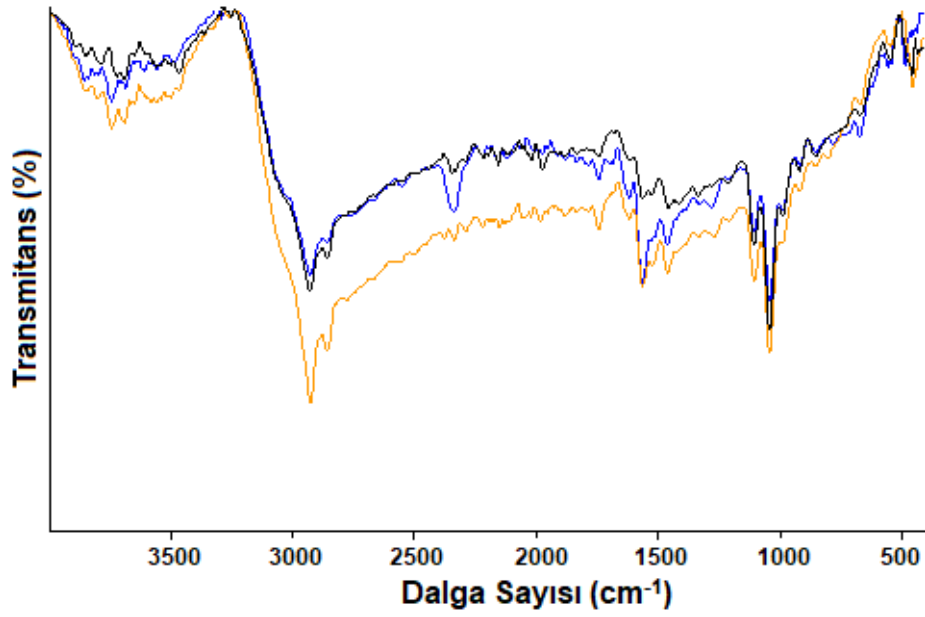
Şekil 5. 49 Karbodiimid yöntemiyle sentezlenmiş olan $n_{POX}/n=0,5$ oranındaki konjugatın FTIR Spektrumu



Şekil 5. 50 Karbodiimid yöntemiyle sentezlenmiş olan $n_{POX}/n_{LPS} = 1$ oranındaki konjugatın FTIR Spektrumu



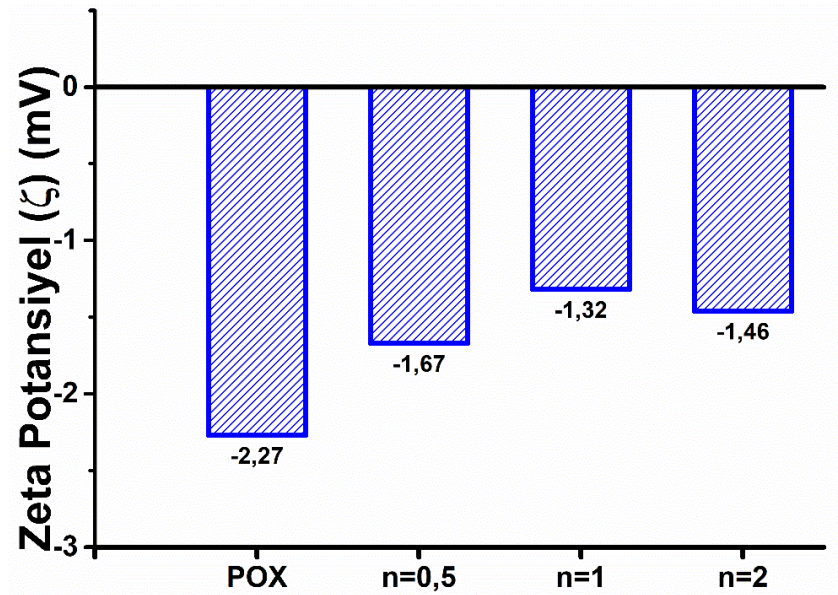
Şekil 5. 51 Karbodiimid yöntemiyle sentezlenmiş olan $n_{POX}/n_{LPS} = 2$ oranındaki konjugatın FTIR Spektrumu



Şekil 5. 52 Karbodiimid yöntemiyle sentezlenmiş olan $n_{POX}/n_{LPS}=0,5$ (♣); 1 (♣); 2 (♣) oranlarındaki konjugatların karşılaştırmalı FTIR Analiz Sonucu

- **ZetaSizer Analizi**

Karbodiimid yöntemi ile hazırlanan $n_{POX}/n_{LPS}= 0,5; 1; 2$ oranlarındaki konjugatların zeta potansiyel değerleri Zetasizer cihazı ile analiz edilmiştir ve polimer ve konjugatların zeta potansiyel değerleri Şekil 5.53' de verilmiştir.



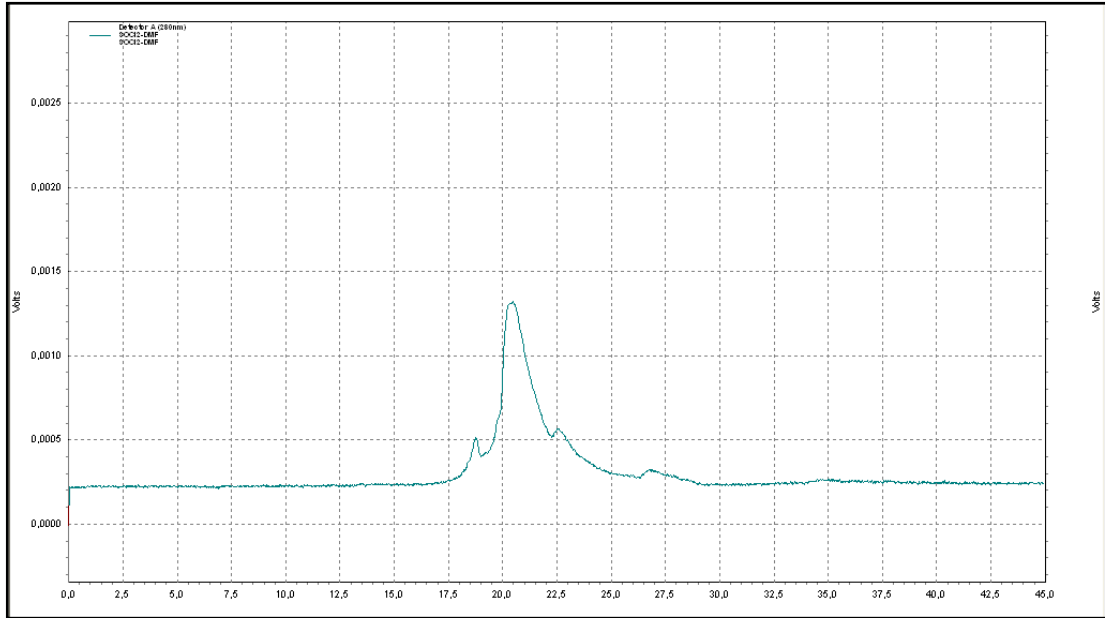
Şekil 5. 53 Polioksidonyum-LPS Konjugatlarına ait polimer ve LPS kıyaslamalı zeta potansiyel değerleri

-LPS-P(VP-*ko*-AA) konjugatlarının SOCl₂ yöntemi ile Konjugasyonuna ait Bulgular

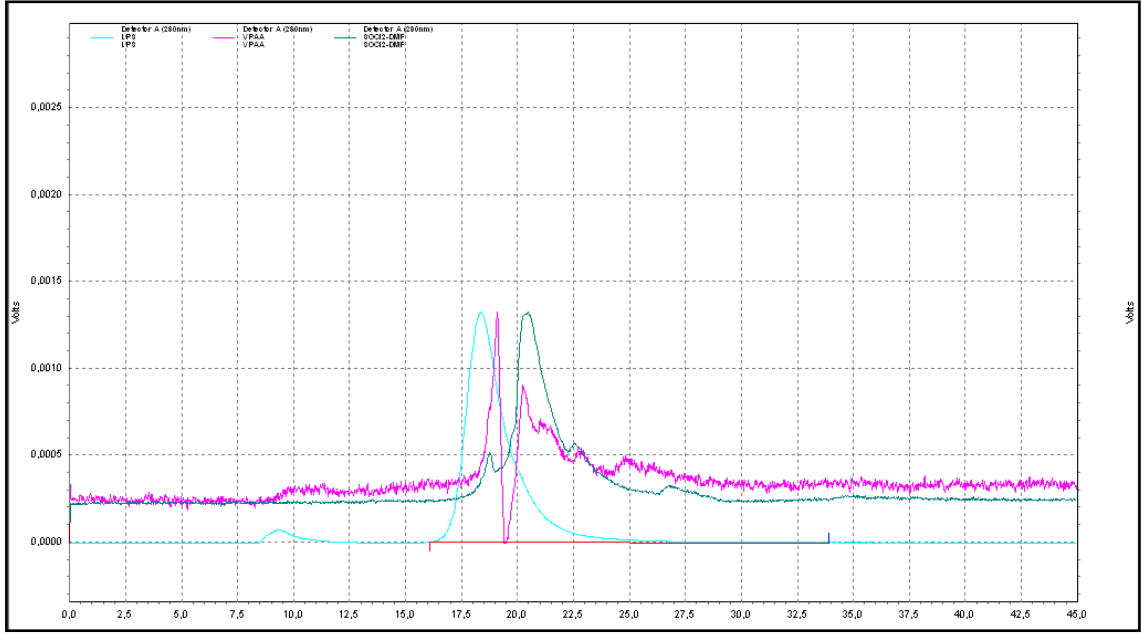
SOCl₂ varlığında sentezlenen LPS-P(VP-*ko*-AA) konjugatının n=0,5 oranının HPLC ve FTIR analizleri gerçekleştirilmiştir.

• HPLC analizi

SOCl₂ varlığında sentezlenen LPS-P(VP-*ko*-AA) konjugatına ait HPLC kromatogramı Şekil 5.54' de; LPS, P(VP-*ko*-AA) ve SOCl₂ yöntemi ile sentezlenmiş LPS-P(VP-*ko*-AA) konjugatına ait kıyaslamalı HPLC kromatogramları Şekil 5.55' de verilmiştir.

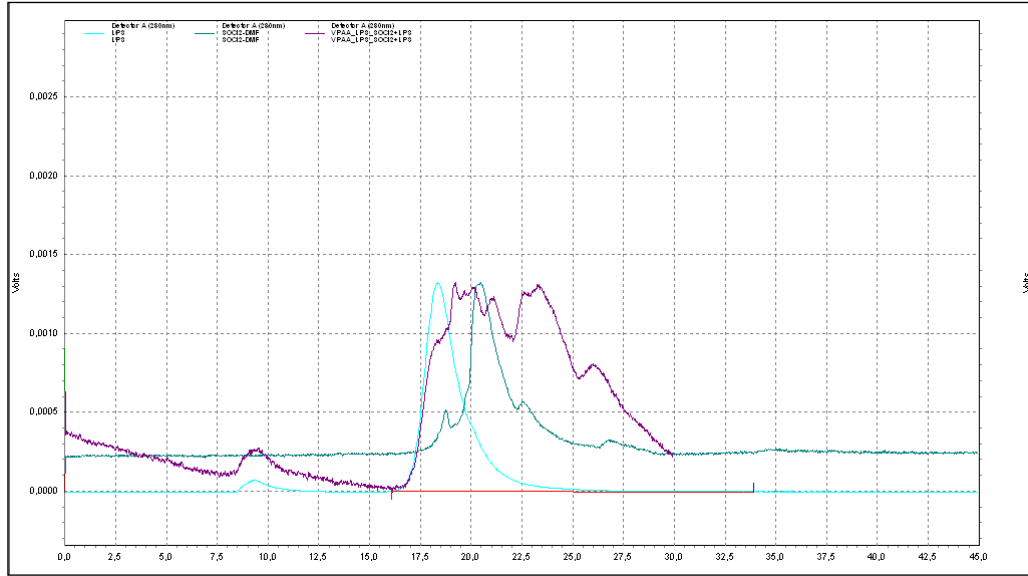


Şekil 5. 54 SOCl₂ varlığında sentezlenen LPS- P(VP-*ko*-AA) konjugatına (♣) ait HPLC kromatogramı



Şekil 5. 55 LPS (♣); P(VP-ko-AA) (♣) ve SOCl₂ yöntemi ile sentezlenmiş n=0,5 oranındaki LPS-P(VP-ko-AA) (♣) konjugatına ait kıyaslamalı HPLC Kromatogramı

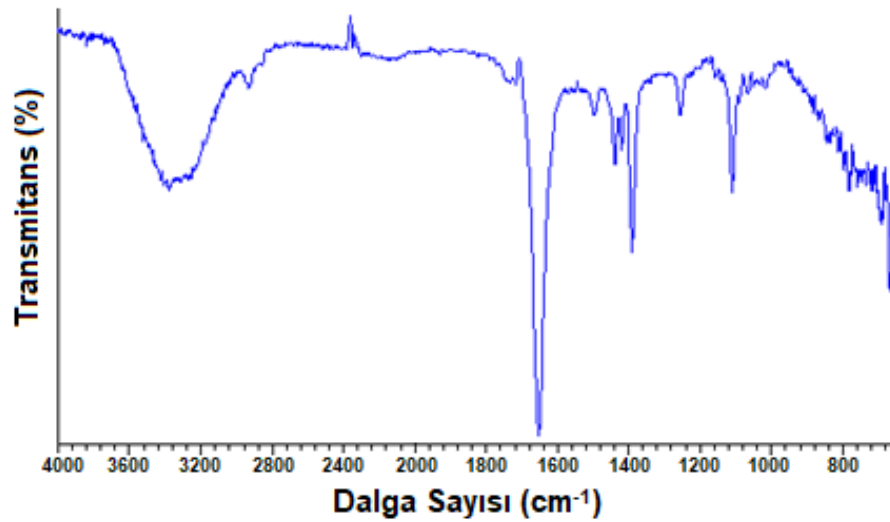
Bu iki HPLC kromatogramına göre 18-20. dakikalar arasındaki konjugat pikinin yanındaki ufak pikin reaksiyona girmemiş LPS olduğu düşünülerek emin olmak amacıyla konjugattan alınan bir miktar örnek üzerine LPS çözeltisi eklenerek konjugat örneğindeki LPS miktarı artırılmıştır ve tekrar HPLC analizi yapılmıştır.



Şekil 5. 56 LPS (♣); SOCl₂ yöntemi ile sentezlenmiş n=0,5 oranındaki LPS- P(VP-ko-AA) (♣) konjugatı ve LPS çözeltisi ilave edilen n=0,5 oranındaki LPS- P(VP-ko-AA) (♣) konjugatına ait kıyaslamalı HPLC Kromatogramı

• FTIR Analizi

Tiyonil Klorür yöntemi ile sentezlenmiş P(VP-ko-AA)-LPS n=0,5 oranındaki konjugata ait FTIR spektrumu Şekil 5.57' de gösterilmiştir.

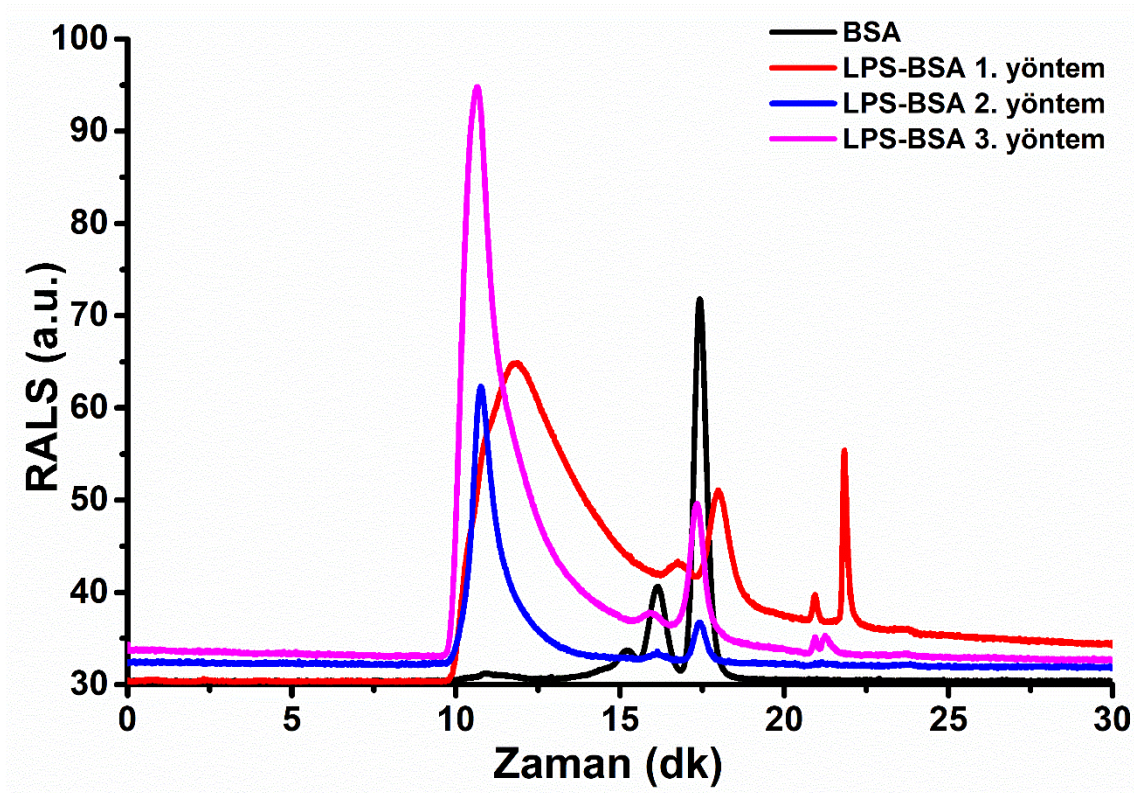


Şekil 5. 57 Tiyonil klorür yöntemi ile sentezlenmiş P(VP-ko-AA)-LPS konjugatına ait FTIR spektrumu

5.3.3 ELISA Deneylerine Ait Bulgular

5.3.3.1 ELISA Kaplamada kullanılması için gerçekleştirilen Konjugatlara ait Bulgular

ELISA platelerinde yüksek immun yanıt alınabilmesi için antijenin plağa kaplanmasını sağlamak amacıyla LPS'nin tek başına olduğu plakların yanında LPS-BSA konjugatları ile kaplanan plaklarda denenmiştir. ELISA kaplamada kullanılması amacıyla en hızlı ve verimli yöntemin kullanılmasının sağlanması için 3 farklı yöntemle sentezlenmiş LPS-BSA konjugatlarına ait GPC ışık saçılması kromatogramı Şekil 5.58' de verilmiştir.

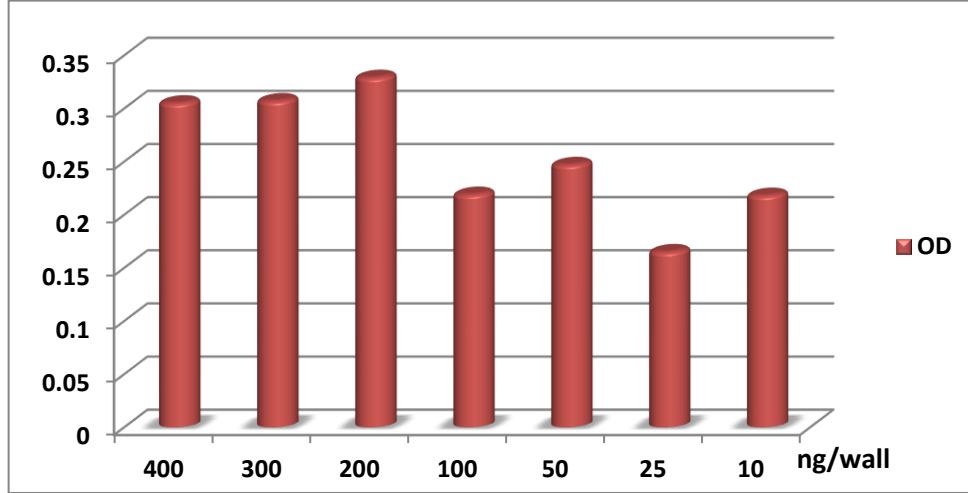


Şekil 5. 58 1.Yöntemle sentezlenmiş LPS-BSA Konjugatı (♣), 2. Yöntemle sentezlenmiş LPS-BSA konjugatı (♠), 3. Yöntemle sentezlenmiş LPS-BSA konjugatı (♣), BSA proteinine (♣) ait GPC Işık Saçılması Kromatogramı

LPS, 1. Yöntem ve 3. Yöntem ilk hafta karşılaştırmalı olarak kaplama için denenmiş ve LPS ile aynı sonuçlar alınmıştır ve ELISA kaplamada LPS kullanılmıştır.

5.3.3.2 ELISA Platelerine LPS Kaplamada Standardizasyon çalışması

Kaplanacak LPS miktarının standardizasyonu açısından; 400 ng, 300 ng, 200 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 10 ng olmak üzere 7 miktar denenmiştir. Şekil 5.59'da X eksenini ELISA plaklarına kaplanan LPS miktarını gösterirken y ekseninde ELISA okuyucuda 405 nm'de okunan değerler verilmektedir.



Şekil 5. 59 ELISA platelerinin LPS ile kaplanma standardizasyonu

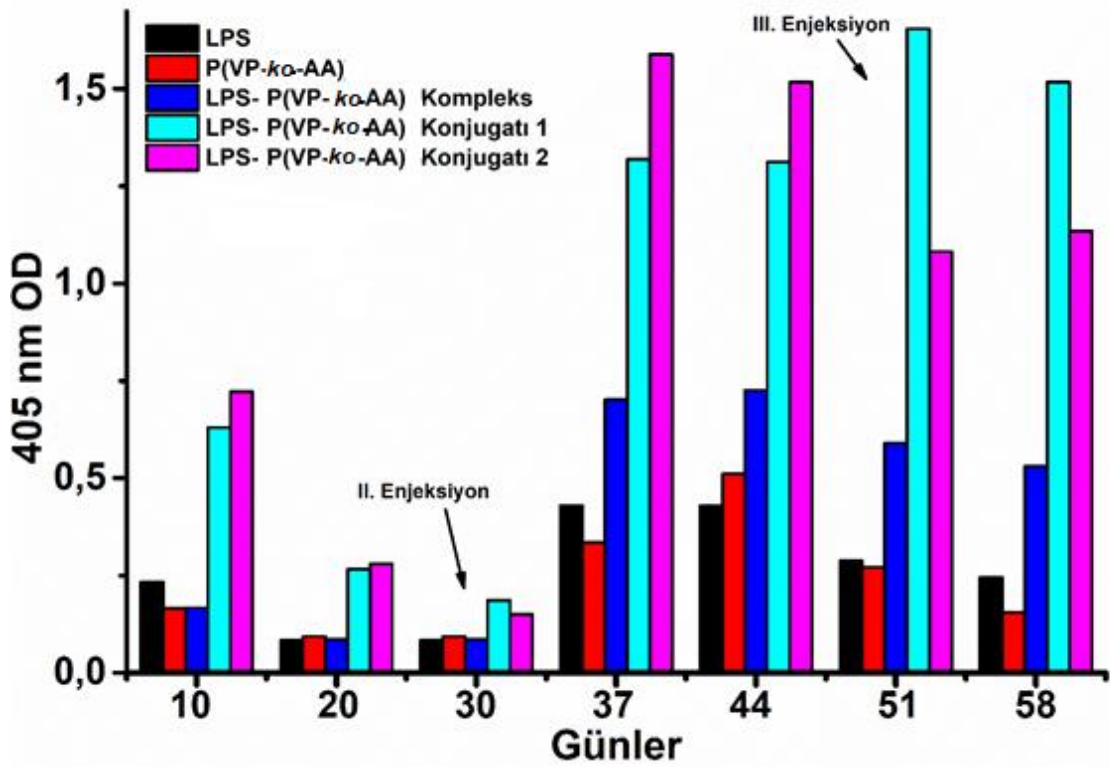
En yüksek OD değeri alınan 200 ng her br kuyunun kaplanmasında kullanılan LPS miktarıdır.

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

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

LPS-P(VP-ko-AA) fiziksel kompleks (100 µg LPS ve 100 µg P(VP-ko-AA)) ve LPS ile P(VP-ko-AA)'nın EDC çapraz bağlayıcısı varlığında konjugatları (n=1 için 100 µg LPS ve 100 µg P(VP-ko-AA); n=2 için 100 µg LPS ve 200 µg P(VP-ko-AA)) her bir formülasyondan 500 µl olacak şekilde hazırlandı. Sentezlendikten sonra saflaştırılmış olan fiziksel kompleks ve biyokonjugatlar Balb/c farelere intraperitoneal olarak enjekte edildi. Analizlerde kompleksin ve konjugatın etkisinin

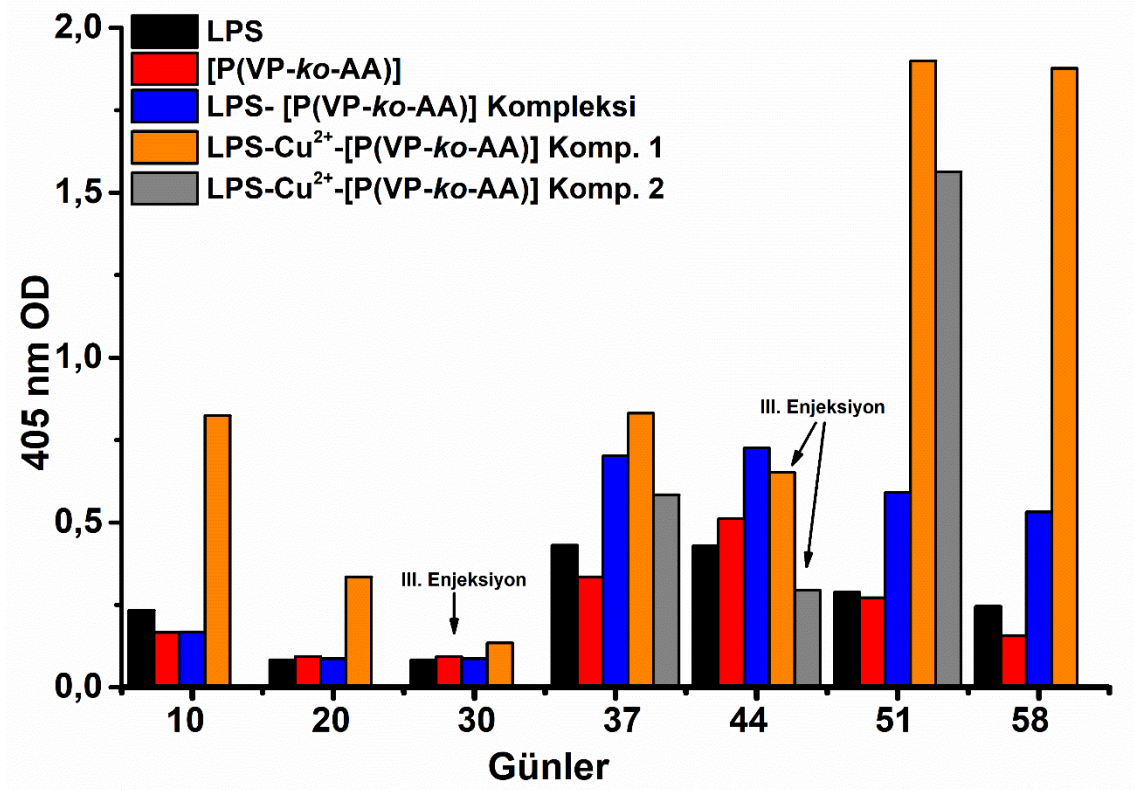
kontrollerden bağımsız değerlendirilebilmesi için tek başına LPS bir grup fareye enjekte edildi. Yine tek başına polimerlerin doğrudan spesifik immün yanıtı sebep olmadığını teyit edebilmek için bir grup fareye intraperitoneal olarak P(VP-ko-AA) kopolimeri enjekte edildi. 30. günde 2. immunizasyon, 51. günde 3. immunizasyon gerçekleştirildi. 58 gün boyunca belirli aralıklarla alınan tüm fare serumlarındaki antikor miktarı kontrol grubunun serumu ile karşılaştırıldı. LPS, P(VP-ko-AA), LPS-P(VP-ko-AA) Fiziksel Kompleksi, LPS-P(VP-ko-AA) konjugatı n=1 oranı ve LPS-P(VP-ko-AA) konjugatı n=2 oranı enjekte edilen farelerden 58 gün boyunca aralıklarla alınan serumlardaki antikor miktarlarının karşılaştırılması Şekil 5.60' da verildi.



Şekil 5. 60 LPS (◆), P(VP-ko-AA) (◆), LPS- P(VP-ko-AA) Fiziksel Kompleksi (◆), LPS- P(VP-ko-AA) Konjugatı n=1 oranı (◆) ve LPS- P(VP-ko-AA) Konjugatı n=2 oranı (◆) enjekte edilen farelerden 58 gün boyunca aralıklarla alınan serumlardaki antikor miktarlarının karşılaştırılması

- **LPS-P(VP-*ko*-AA) Fiziksel Kompleks ve LPS-Cu²⁺-P(VP-*ko*-AA) 3'lü kompleksine Karşı Oluşan Antikor Miktar Tayini Sonuçları**

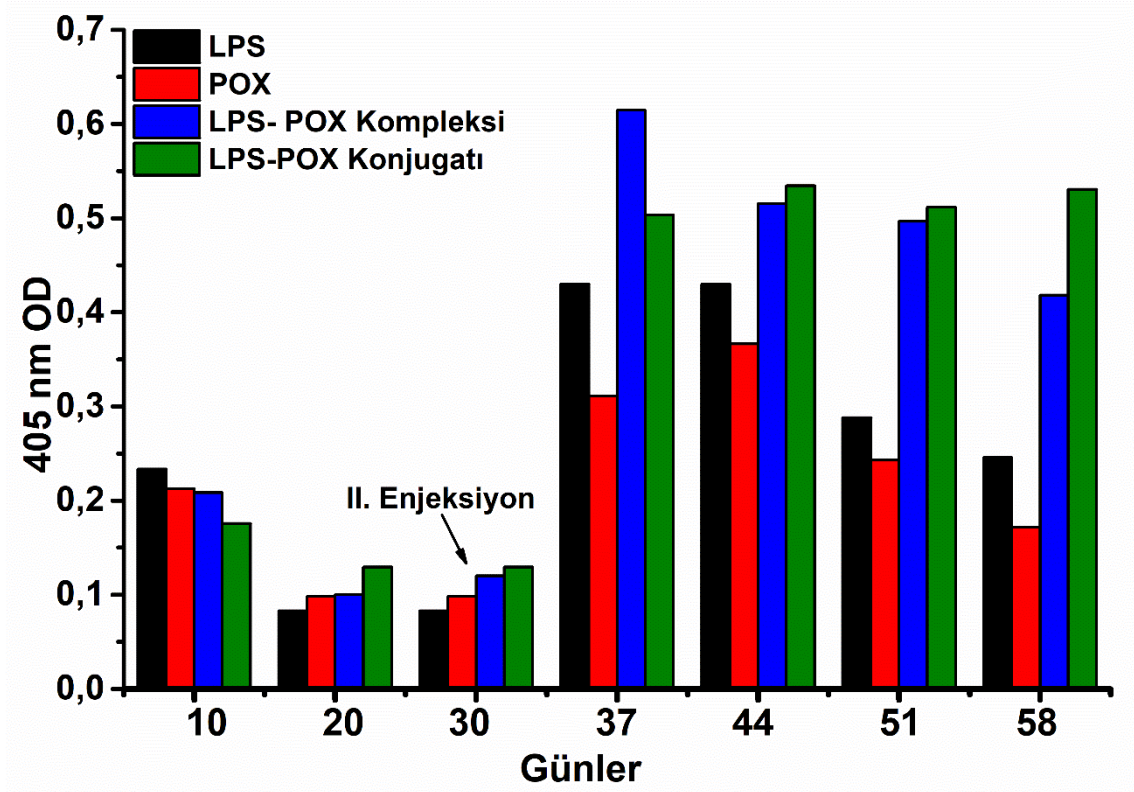
LPS-P(VP-*ko*-AA) fiziksel kompleks (fare başına 100 µg LPS, 100 µg P(VP-*ko*-AA) ve LPS-Cu²⁺- P(VP-*ko*-AA) kompleksi 1. oran (fare başına 100 µg LPS-100 µg P(VP-*ko*-AA) ve 12 µl CuSO₄.5H₂O çözeltisi (150mg/10ml saf su)) LPS-Cu²⁺-P(VP-*ko*-AA) kompleksi 2. oran (fare başına 100 µg LPS-100 µg P(VP-*ko*-AA) ve 6 µl CuSO₄.5H₂O çözeltisi (150mg/10ml saf su)) fare başına 500 µl olacak şekilde hazırlandı. Sentezlendikten sonra saflaştırılmış olan fiziksel kompleksler Balb/c farelere intraperitoneal olarak enjekte edildi. Analizlerde komplekslerin etkisini gözlemleyebilmek için tek başına LPS bir grup fareye enjekte edildi. Yine tek başına polimerlerin doğrudan spesifik immün yanıtı sebep olmadığını teyit edebilmek için bir grup fareye intraperitoneal olarak P(VP-*ko*-AA) polimeri enjekte edildi. 30 ve 44. günlerde 2 ve 3. İmmünizasyon gerçekleştirildi. 58 gün boyunca belirli aralıklarla alınan tüm fare serumlarındaki antikor miktarı kontrol grubunun serumu ile karşılaştırıldı. LPS-Cu²⁺-P(VP-*ko*-AA) 2. oran fare grubu 30. günde 8 haftalık 28-32 g ağırlığında erkek Balb/c türü farelerden oluşturularak diğer gruplara 2. enjeksiyon yapılan 30. günde ilk enjeksiyonu ve 44. Günde 2. hatırlatma enjeksiyonu yapılmıştır. LPS, P(VP-*ko*-AA), LPS-P(VP-*ko*-AA) fiziksel kompleksi, LPS-Cu²⁺- P(VP-*ko*-AA) kompleksi 1. oranı ve LPS-Cu²⁺-P(VP-*ko*-AA) kompleksi 2. oranı enjekte edilen farelerden 58 gün boyunca aralıklarla alınan serumlardaki antikor miktarlarının karşılaştırmalı sonuçları Şekil 5.61' de verildi.



Şekil 5. 61 LPS (◆), P(VP-ko-AA) (◆), LPS- P(VP-ko-AA) Fiziksel Kompleksi (◆), LPS-Cu²⁺-P(VP-ko-AA) kompleksi 1. oranı (◆) ve LPS-Cu²⁺-P(VP-ko-AA) kompleksi 2. oranı (◆) enjekte edilen farelerden 58 gün boyunca aralıklarla alınan serumlardaki antikor miktarlarının karşılaştırılması

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

LPS-POX fiziksel kompleks (100 µg LPS ve 100 µg POX) ve LPS ile POX' un EDC çapraz bağlayıcısı varlığında sentezlenen konjugatları (100 µg LPS ve 100 µg POX) 500 µl olacak şekilde hazırlandı. Sentezlendikten sonra saflaştırılmış olan fiziksel kompleks ve biyokonjugatlar Balb/c farelere intraperitoneal olarak enjekte edildi. Analizlerde kompleksin ve konjugatın etkisini gözlemleyebilmek için tek başına LPS ve tek başına POX birer grup fareye intraperitoneal enjekte edildi. 30. günde 2. immunizasyon gerçekleştirildi. 58 gün boyunca belirli aralıklarla alınan tüm fare serumlarındaki antikor miktarı kontrol grubunun serumu ile karşılaştırıldı. Karşılaştırmalı sonuçlar Şekil 5.62' de verilmiştir.

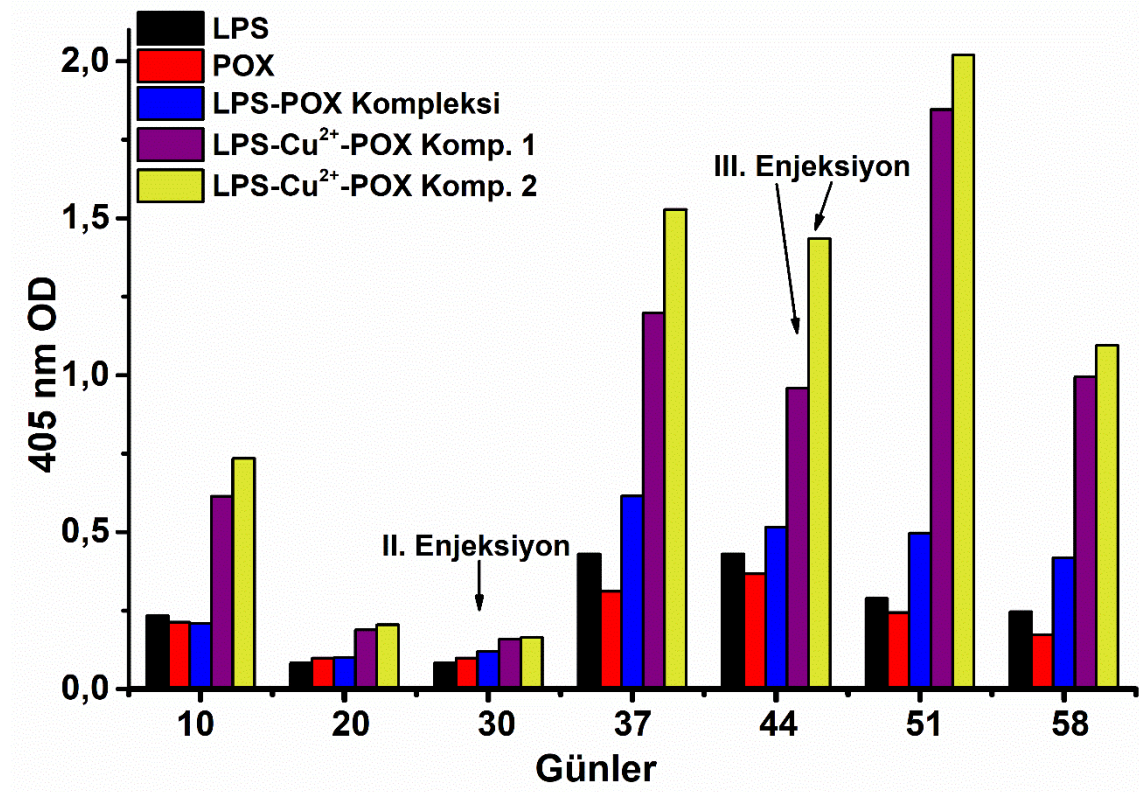


Şekil 5. 62 LPS (◆), POX (◆), LPS-POX Fiziksel Kompleksi (◆), LPS-POX Konjugatı (◆) için enjekte edilen farelerden 58 gün boyunca aralıklarla alınan serumlardaki antikor miktarlarının karşılaştırılması

- **LPS-POX Fiziksel Kompleks ve LPS-Cu²⁺-POX Kompleksine Karşı Oluşan Antikor Miktar Tayini Sonuçları**

LPS-POX fiziksel kompleks (fare başına 100 µg LPS ve 100 µg POX), LPS-Cu-POX 1. oranı (100 µg LPS-100 µg POX ve 6 µl CuSO₄.5H₂O çözeltisi (150mg/10ml saf su)) LPS-Cu²⁺-POX Kompleksi 2. oranı (100 µg LPS-100 µg POX ve 12 µl CuSO₄.5H₂O çözeltisi (150mg/10ml saf su)) fare başına 500 µl olacak şekilde hazırlandı. Sentezlendikten sonra saflaştırılmış olan fiziksel kompleks ve kompleksler Balb/c farelere intraperitoneal olarak enjekte edildi. Analizlerde komplekslerin etkisini gözlemleyebilmek için tek başına LPS ve tek başına POX birer grup fareye intraperitoneal enjekte edildi. 30 ve 44. günlerde 2. ve 3. immunizasyonlar gerçekleştirildi. 58 gün boyunca belirli aralıklarla alınan tüm fare serumlarındaki antikor miktarı kontrol grubunun serumu ile karşılaştırıldı. LPS, POX, LPS-POX fiziksel kompleks, LPS-Cu²⁺-POX konjugatı için LPS-Cu²⁺-POX kompleksi 2. oranı

enjekte edilen farelerden 58 gün boyunca aralıklarla alınan serumlardaki antikor miktarlarının karşılaştırılması sonuçları Şekil 5.63' de verilmiştir.

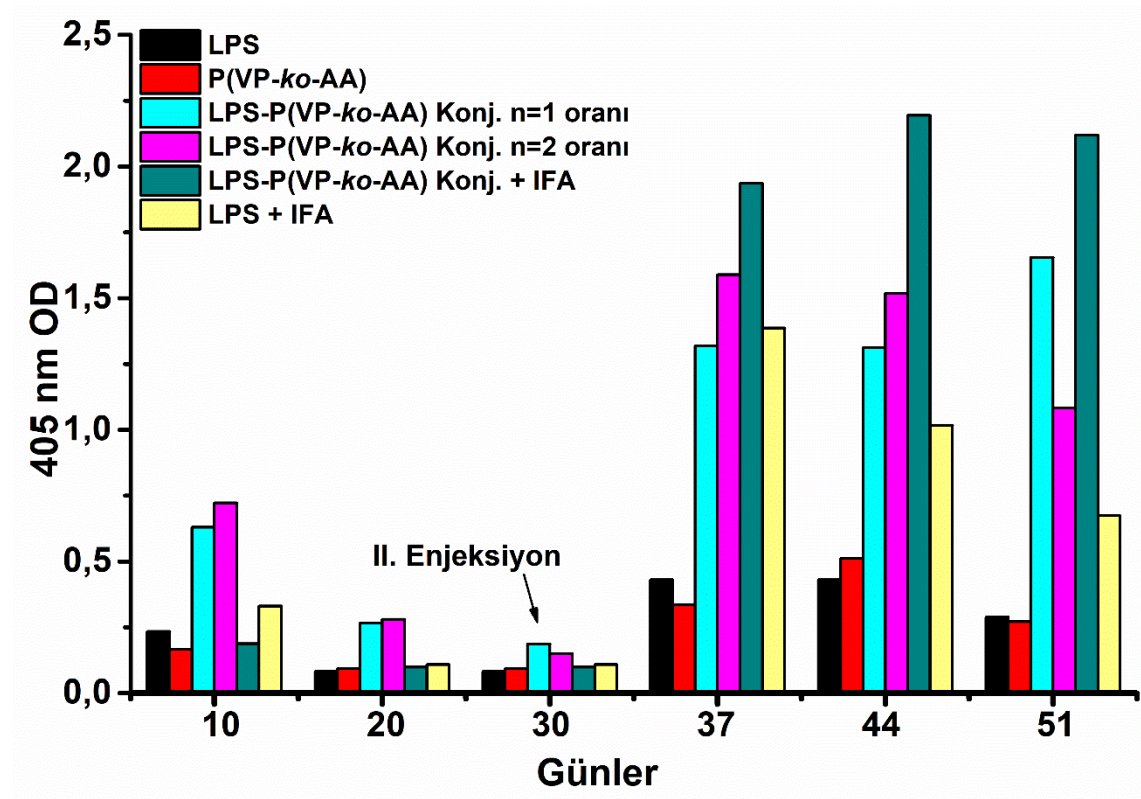


Şekil 5. 63 LPS (■), POX (■), LPS-POX Fiziksel Kompleksi (■), LPS-Cu²⁺-POX Konjugatı (■) için LPS-Cu²⁺-POX Kompleksi 2. oranı (■) enjekte edilen farelerden 58 gün boyunca aralıklarla alınan serumlardaki antikor miktarlarının karşılaştırılması

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

Klasik adjuvantlara alternatif olarak etkin immün ve koruma yanıtlarının alındığı polimerik adjuvantların kullanılması son yıllarda aşı sistemlerinin etkinliğinin geliştirilmesi açısından dikkat çekmekte ve kullanımı genişlemektedir. Bu amaçla kıyaslama yapabilmek amacıyla LPS ile P(VP-ko-AA)'nın EDC çapraz bağlayıcısı varlığında konjugatları (n=1 için 100 µg LPS ve 100 µg P(VP-ko-AA); n=2 için 100 µg LPS ve 200 µg P(VP-ko-AA)) 500 µl ve LPS- P(VP-ko-AA)-Freund's adjuvantı (100 µg LPS ve 200 µg P(VP-ko-AA) ve fare başına 200 µl incomplete Freund's adjuvantı (IFA) olacak şekilde hazırlandı. Sentezlendikten sonra saflaştırılmış olan biyokonjugatlar Balb/c farelere intraperitoneal olarak enjekte edildi. Analizlerde

kompleksin ve konjugatın etkisini gözlemleyebilmek için tek başına LPS, LPS+Freund's adjuvantı ve tek başına P(VP-ko-AA) polimeri için 3 fareden oluşan birer grup fareye intraperitoneal olarak enjekte edildi. 30. günde 2. immunizasyon gerçekleştirildi. 51 gün boyunca belirli aralıklarla alınan tüm fare serumlarındaki antikor miktarı kontrol grubunun serumu ile karşılaştırıldı. LPS, P(VP-ko-AA), LPS-P(VP-ko-AA) konjugatı n=1 oranı, LPS- P(VP-ko-AA) konjugatı n= 2 oranı ve LPS-P(VP-ko-AA)-Freund's Adjuvantı, LPS+ Freund's Adjuvantı enjekte edilen farelerden 51 gün boyunca aralıklarla alınan serumlardaki antikor miktarlarının karşılaştırılmalı sonuçlar Şekil 5.64' de verilmiştir.

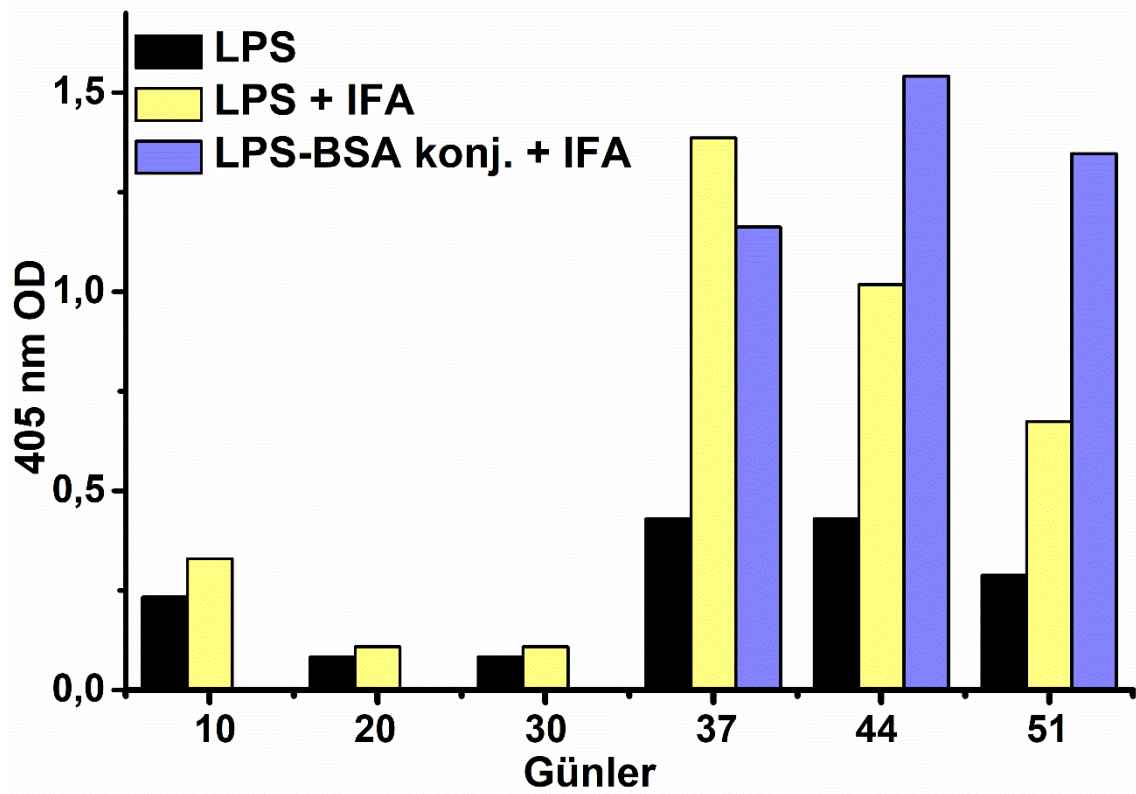


Şekil 5. 64 LPS (◆), P(VP-ko-AA) (◆), LPS- P(VP-ko-AA) Konjugatı n=1 oranı (◆), LPS- P(VP-ko-AA) Konjugatı n= 2 oranı (◆) ve LPS-P(VP-ko-AA)-Freund's Adjuvantı (◆), LPS+Freund's Adjuvantı (◆) enjekte edilen farelerden 51 gün boyunca aralıklarla alınan serumlardaki antikor miktarlarının karşılaştırılması

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

Tek başına LPS (100 µg), LPS-Freund's adjuvantı (100 µg LPS+200 µl incomplete Freund's adjuvantı) ve 1:1 oranında 200 µg LPS-BSA konjugatı+200 µl incomplete Freund's adjuvantı hazırlandı. LPS, P(VP-ko-AA) ve konjugatlar Balb/c farelere

intraperitoneal olarak enjekte edildi. İlk 3 hafta ELISA plate kaplamalarında LPS-BSA konjugatlarının deneme açısından kullanılması sebebiyle herhangi bir fareye enjeksiyonu gerçekleştirilmedi. 30. günde 4 fareden oluşan gruba ilk adjuvanlı LPS-BSA konjugatı intraperitoneal olarak enjekte edildi. Kontrol gruplarına 30. günde ikinci hatırlatma enjeksiyonu gerçekleştirilmiştir. LPS, LPS-Freund's enjekte edilen farelerden 51 gün boyunca aralıklarla, LPS- BSA-Freund's Adjuvanı enjekte edilen farelerden 21 gün boyunca aralıklarla alınan serumlardaki antikor miktarlarının karşılaştırmalı sonuçları Şekil 5.65' de verilmiştir.



Şekil 5. 65 LPS (◆), LPS-IFA (◆), LPS- BSA-Freund's Adjuvanı (◆) enjekte edilen farelerden 51 gün boyunca aralıklarla alınan serumlardaki antikor miktarlarının karşılaştırılması

6.1 LPS nin izolasyonuna ve Karakterizasyonuna ait Tartışma

LPS'nin boyutu ve zeta potansiyel değeri Zetasizer cihazı ile tespit edildi. Şekil 5.1a ve 5.1b' de sırasıyla LPS'nin Z-Ave boyutu ($397,1 \pm 8.796$ nm) ve Zeta potansiyel değeri ($-3,31 \pm 0.523$ mV) grafikleri verilmiştir. Şekil 5.2' de gösterilen FTIR spektrumunda LPS'nin 3300 cm^{-1} civarındaki geniş -OH bandı belirgin olarak görülmektedir.

6.2 Polimerlerin Sentezine ve Karakterizasyonuna Ait Tartışma

Çalışma kapsamında sentezlenen P(VP-ko-AA) polimerinin GPC kırılma indisi kromatogramlarına göre molekül ağırlıkları ve PDI değerleri hesaplanmıştır. Bu sonuçlar ışığında, molekül ağırlığı Mw: 81.965 Da ve ayrıca molekül ağırlık dağılımı (PDI) Mw/Mn: 1,309 olarak elde edilmiştir. RALS kromatogramında monomere ait herhangi bir pik gözlenmeden yalnızca polimere özgü pikin olduğu görülmektedir.

Çalışmalarımızda kullanılmak üzere sentezlenen P(VP-ko-AA)'ya ait Şekil 5.6a ve Şekil 5.6b' de verilen Zetasizer analizi sonuçlarına göre Z-Ave değeri $53,44 \pm 14.65$ nm (d.nm) ve zeta potansiyel değeri $-36,6 \pm 7.35$ olarak ölçülmüştür.

P(VP-ko-AA) polimerine ait polimerizasyonunun gerçekleştiğini tespit etmek için yapılan FT-IR analizinde elde edilen spektrumda (Şekil 5.7) her iki monomerde mevcut olan bantlar görülmüştür. $1600\text{-}1750\text{ cm}^{-1}$, $1170\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$ ve 1400 cm^{-1} 'de oluşan pikler kopolimerizasyonun gerçekleştiğini kanıtlayan en önemli piklerdir. Karboksilik gruplarında yer alan C=O' a ait pik 1717 cm^{-1} ' de görülürken, pirolidon halkasında yer alan C-C' a ait pikler 1423 cm^{-1} 'de görülmektedir. Analiz sonuçları akrilik asit monomeri ile vinil pirolidon monomerinin polimerleşmesinin gerçekleştiğini göstermektedir.

P(VP-*ko*-AA) 'ye ait ^1H -NMR analizi Şekil 5.8'de gösterilmektedir. NMR analizi için çözücü olarak döteryum oksit (D_2O) kullanılmıştır. NMR analizinin sonuçları P(VP-*ko*-AA) polimerinin elde edildiğini göstermektedir. Elde edilen sonuçlara göre, monomer kalıntılarının varlığına rağmen polimerizasyonun meydana geldiği belirlenmiştir.

6.3 Komplekslerin ve Konjugatların Analizine Ait Tartışma

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

6.3.1 LPS ile Komplekslerin Analizine ait Tartışma

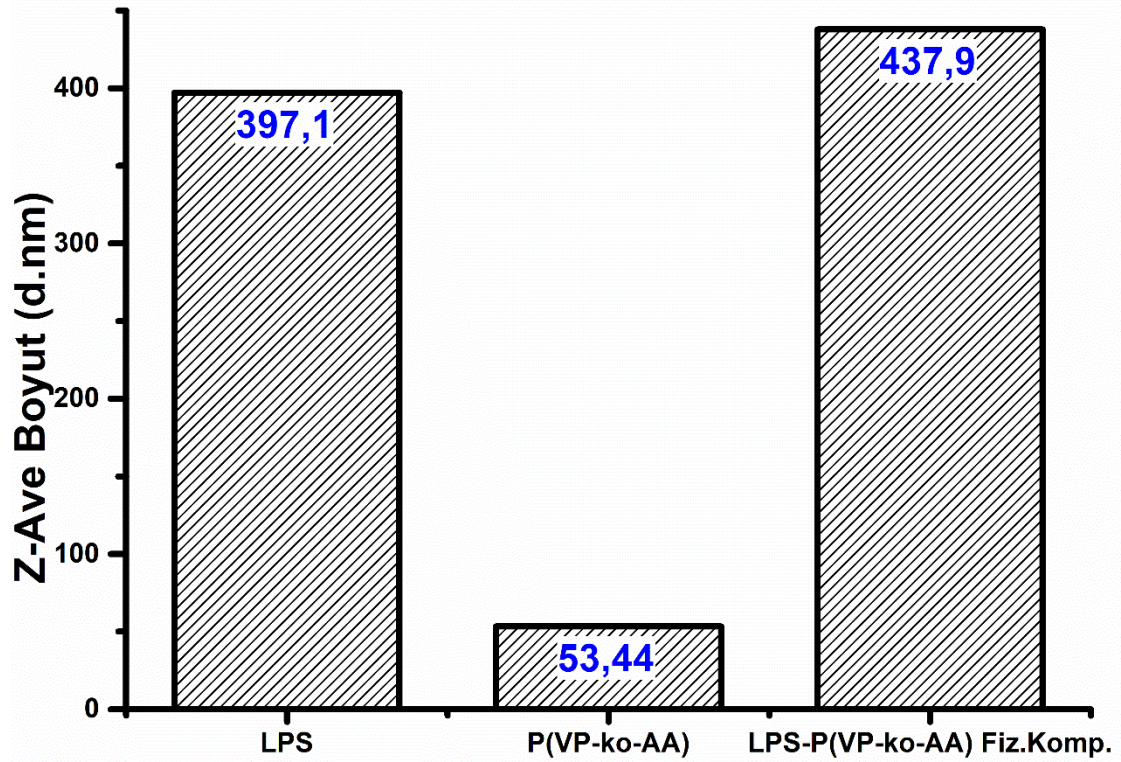
LPS biyomolekülünün P(VP-*ko*-AA) ve polioksidonyum polimeri ile gerçekleştirdiği fiziksel kompleks ve metal iyonu varlığında gerçekleştirilen 3'lü LPS- Cu^{2+} -Polimer komplekslerinin analizine ait tartışma aşağıda verilmiştir.

6.3.1.1 LPS-P(VP-*ko*-AA) Fiziksel Komplekslerinin Sentezi ve Analizine ait Tartışma

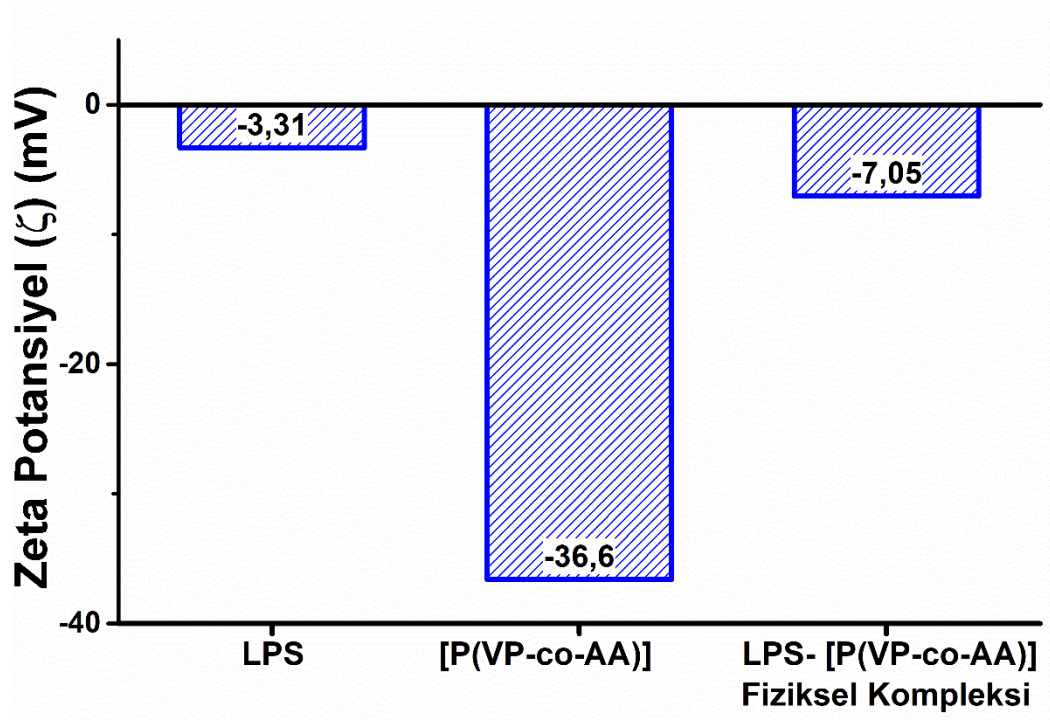
LPS'nin Z-ave değeri $397,1 \pm 8.796$ d.nm, P(VP-*ko*-AA) polimerinin Z-ave değeri $53,44 \pm 14.65$ d.nm ve LPS-P(VP-*ko*-AA) fiziksel kompleksinin Z-ave boyutu $437,9 \pm 1.882$ d.nm olarak elde edilmiştir. Boyut dağılım sonuçları Şekil 6.1'de verilmiştir. LPS-P(VP-*ko*-AA) nin boyutu; LPS ve P(VP-*ko*-AA)'nın boyutları ile kıyaslandığında oluşturulan kompleksin boyutunun biyomolekülden ve polimerden daha büyük olduğu görülmektedir. Bu da kompakt bir hal almadan polimer ile lipopolisakkaritin fiziksel bir kompleks oluşturduğunu göstermektedir. Hazırlanan LPS-P(VP-*ko*-AA) kompleksinin zeta potansiyel değeri $-7,05 \pm 0.459$ mV, LPS'nin zeta potansiyel değeri $-3,31 \pm 0.523$ mV ve P(VP-*ko*-AA) polimerinin zeta potansiyel değeri $-36,6 \pm 7.35$ olduğu Şekil 6.2'de gösterilmiştir. Ayrıca P(VP-*ko*-AA)'nın negatif yüklü grupları ile lipopolisakkarit arasındaki elektrostatik etkileşim sebebiyle polimerin $-36,6 \pm 7.35$ mV olan yükü, fiziksel kompleksin oluşması ile $-7,05 \pm 0.459$ mV olarak

nötre kaymıştır ve bu durum kompleksin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.

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



Şekil 6. 1 LPS, P(VP-*ko*-AA) ve LPS-P(VP-*ko*-AA) fiziksel kompleksinin Z-ave değerlerinin kıyaslamalı grafiği



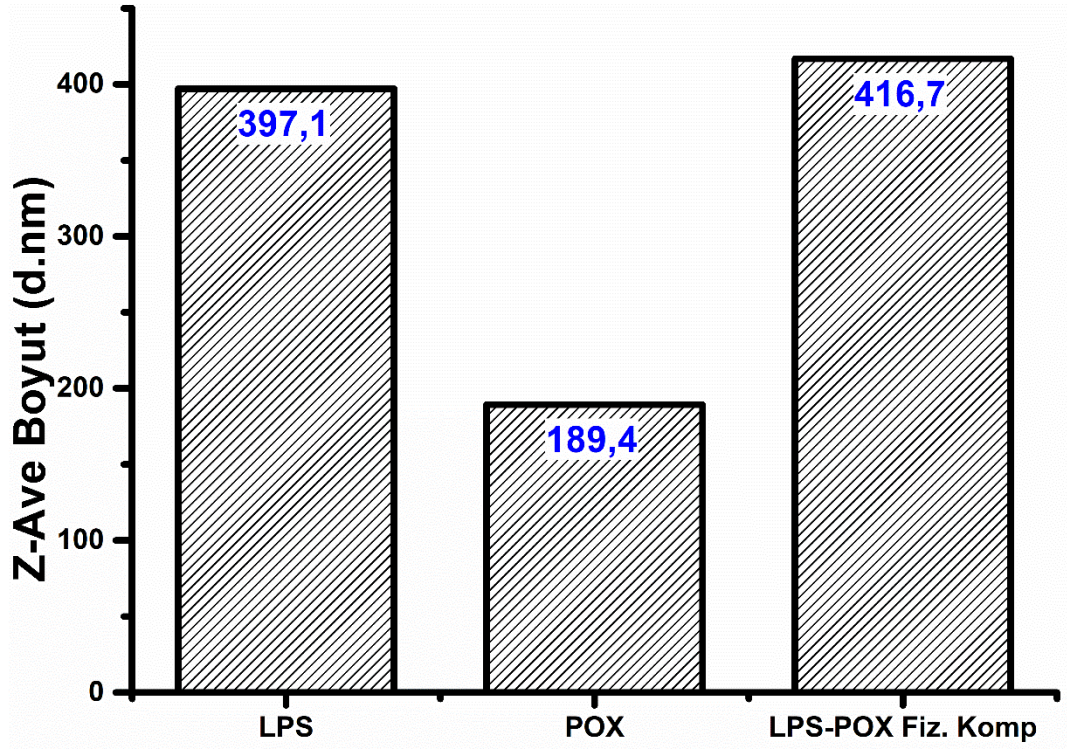
Şekil 6. 2 LPS, P(VP-ko-AA) ve LPS-P(VP-ko-AA) fiziksel kompleksinin zeta potansiyel değerlerinin kıyaslamalı grafiği

6.3.1.2 LPS-Polioksidonyum Fiziksel Komplekslerinin Sentezi ve Analizine ait Tartışma

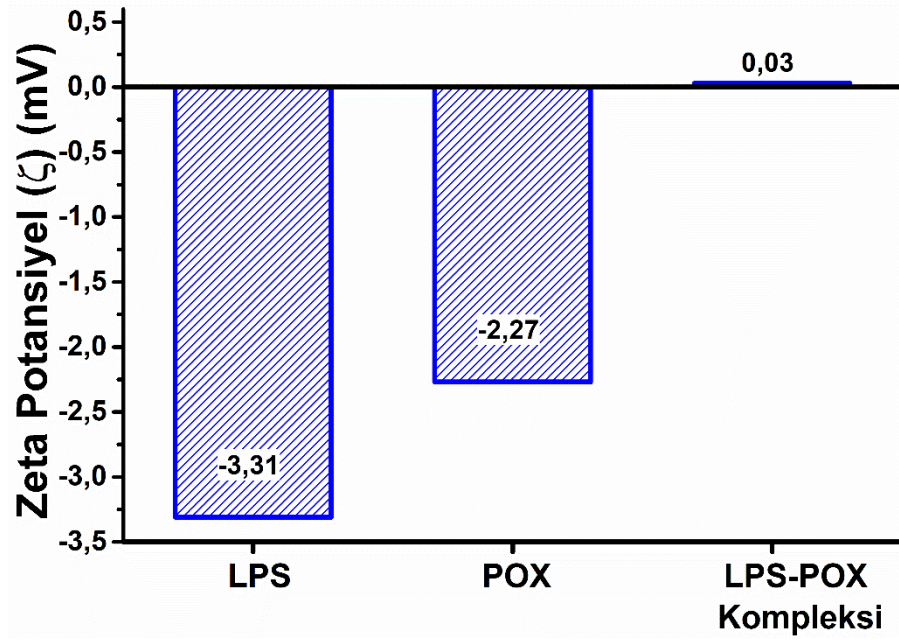
LPS'nin Z-ave değeri $397,1 \pm 8.796$ d.nm, POX polimerinin Z-ave değeri 189.4 ± 33.25 d.nm ve LPS-POX fiziksel kompleksinin Z-ave: $416,7 \pm 4.708$ d.nm olarak ölçülmüştür. Bulgular kıyaslamalı olarak Şekil 6.3' de verilmiştir. LPS-POX Fiziksel kompleksin boyutu; LPS ve POX'un boyutları ile kıyaslandığında oluşturulan kompleksin boyutunun biyomolekülden ve polimerden daha büyük olduğu görülmektedir. Bu da kompakt bir hal almadan polimer ile lipopolisakkaritin fiziksel bir kompleks oluşturduğunu göstermektedir.

LPS'nin zeta potansiyel değeri $-3,31 \pm 0.523$ mV, POX polimerinin zeta potansiyel değeri -2.27 ± 0.352 mV ve LPS-POX fiziksel kompleksinin zeta potansiyel değeri 0.03 ± 0.02 mV olarak ölçülmüştür. Elde edilen bulgular kıyaslamalı olarak Şekil 6.4' de verilmiştir. Şekilde, polimer ve lipopolisakkarit arasında fiziksel bir kompleks oluşması ile negatif yük değerinin nötre doğru kaydığı görülmektedir.

Polimerin yapısındaki C=O grubuna ait 1600-1700 cm^{-1} civarındaki bandın şiddetindeki azalmaya bakılarak polioksidonyum-LPS fiziksel kompleksinin oluştuğu Şekil 5.10'da POX FTIR spektrumu ve Şekil 5.15'de POX-LPS fiziksel kompleksine ait FTIR spektrumu karşılaştırıldığında anlaşılmaktadır. 3300 cm^{-1} de suya ait -OH piki görünmektedir.



Şekil 6. 3 LPS, POX ve LPS-POX fiziksel kompleksinin Z-ave değerlerinin kıyaslamalı grafiği



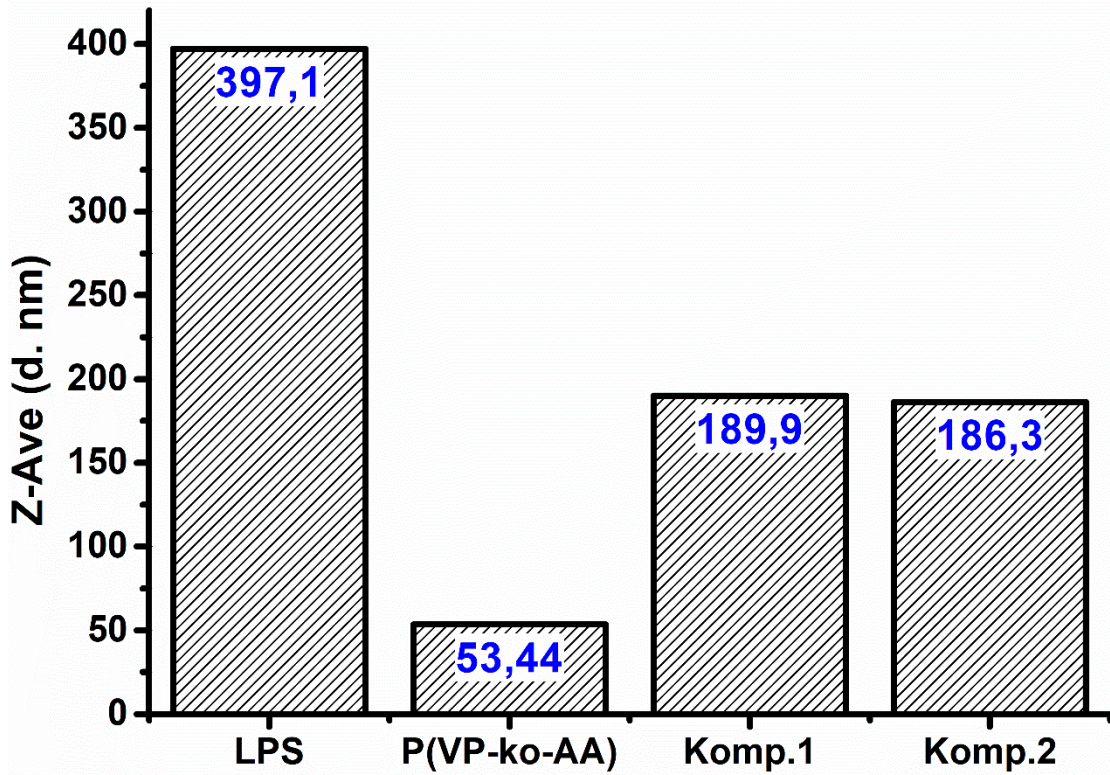
Şekil 6. 4 LPS, POX ve LPS-POX Fiziksel kompleksinin zeta potansiyel değerlerinin kıyaslamalı grafiği

6.3.1.3 P(VP-ko-AA)-Cu²⁺-LPS Komplekslerinin Sentezine ve Analizine Ait Tartışma

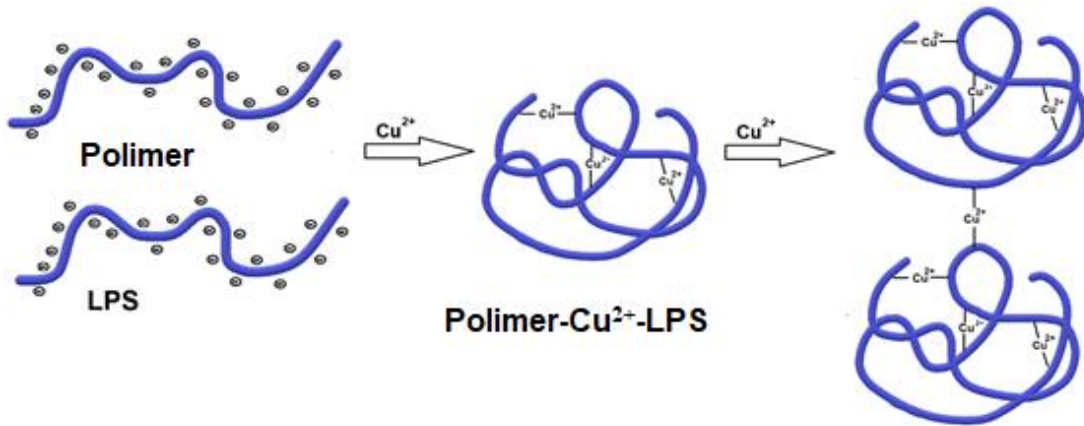
LPS nin hidrodinamik çapı $397,1 \pm 8.796$ d.nm, P(VP-ko-AA) polimerinin Z-ave değeri 53.44 ± 14.65 d.nm, P(VP-ko-AA)-Cu²⁺-LPS-1 kompleksinin Z-ave değeri 189.9 ± 5.508 d.nm; P(VP-ko-AA)-Cu²⁺-LPS-2 kompleksinin Z-ave değeri 186.3 ± 1.823 d.nm değerleri Şekil 6.5'te kıyaslamalı olarak gösterilmektedir. Bakır metali varlığındaki fiziksel karışımda bağlanma gerçekleştiği için 3'lü polimer-Cu²⁺-LPS fiziksel karışımlarında kompleksler kompakt hal alarak oluşmuştur ve oluşturulan komplekslerin hidrodinamik çapı LPS' ye göre daha küçük, polimerin çapına göre ise daha büyüktür. Bunun sebebi bakır metalleri hem P(VP-ko-AA) ile LPS arasında bağlanmayı sağlarken hem de bu bağlanan P(VP-ko-AA)-Cu²⁺-LPS leri de birbirine bağlamasıdır (Şekil 6.6).

Ayrıca P(VP-ko-AA)' nın negatif yük oluşturan grupları bakır metali aracılığı ile polimere bağlandığı için $-36,6 \pm 7.35$ mV olan yük, 3'lü kompleksin oluşturulması sonucunda 1. kompleks için $-12,3 \pm 0.551$ mV; 2. kompleks için $-11,1 \pm 1.25$ mV olmak üzere nötre doğru kayma göstermiştir. 2. komplekste, 1. komplekse göre 2 kat fazla bakır kullanılması ve zeta potansiyel değerlerinin birbirine yakın olmasına

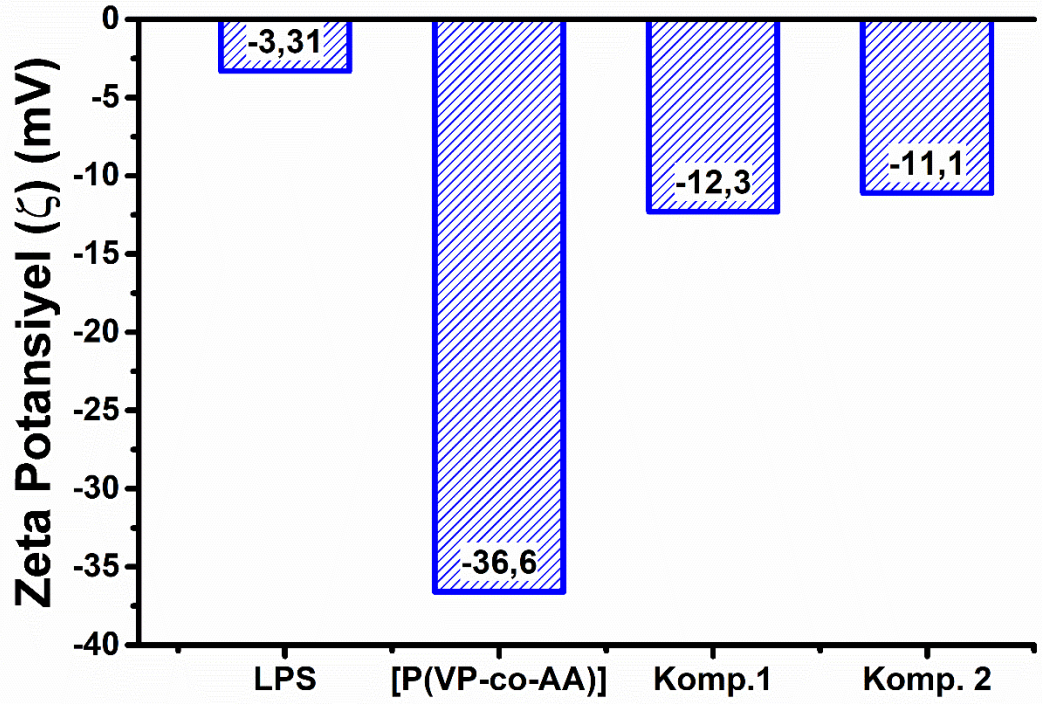
rağmen daha fazla bakır kullanılan 2. komplekste boyutun 1. komplekse göre biraz daha küçük olduğu gözlenmiştir.



Şekil 6. 5 LPS, P(VP-ko-AA) ve P(VP-ko-AA)-Cu²⁺-LPS-1 ve P(VP-ko-AA)-Cu²⁺-LPS-2 kompleksinin Z-ave değerlerinin kıyaslamalı grafiği



Şekil 6. 6 LPS ile polimerin bakır metali varlığında oluşturduğu kompleks yapısının şematik gösterimi



Şekil 6. 7 LPS, P(VP-*ko*-AA) ve P(VP-*ko*-AA)-Cu²⁺-LPS-1 (Komp.1) ve P(VP-*ko*-AA)-Cu²⁺-LPS-2 (Komp. 2) kompleksinin zeta potansiyel değerlerinin kıyaslamalı grafiği

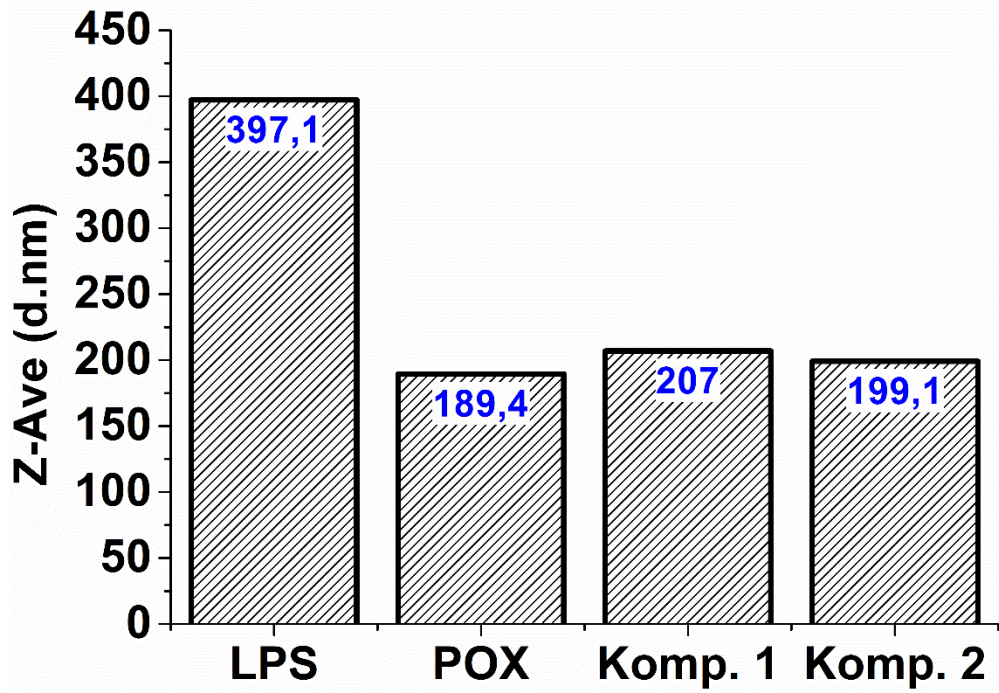
FTIR spektrumlarına bakıldığında (Şekil 5.21) CuSO₄.5H₂O'ün 1100 cm⁻¹ civarındaki pikinin P(VP-*ko*-AA)-Cu²⁺-LPS kompleksinin FTIR spektrumunda (Şekil 5.18) tamamen kaybolması, CuSO₄.5H₂O'nin kompleks oluşumunda kullanıldığını ve komplekslerin istenilen şekilde elde edildiğini göstermektedir. Sulu sistemde çalışıldığı için 3300 cm⁻¹ lerde -OH grubuna ait pikler görünmektedir.

P(VP-*ko*-AA)-LPS fiziksel kompleks ve P(VP-*ko*-AA)-Cu²⁺-LPS komplekslerini karşılaştırıldığında; bakır metali ile oluşturulan 3'lü komplekslerin yapısının boyutları göz önünde bulundurularak (Z-ave: 189,9 ve 186,3 d. nm) fiziksel kompleksin yapısına oranla (437,9 nm) daha kompakt formda olduğu tespit edilmiştir.

LPS-P(VP-*ko*-AA) fiziksel kompleksinin zeta potansiyel değeri -7,05 mV; P(VP-*ko*-AA)-Cu²⁺-LPS 1. kompleksinin -12,3 mV; 2. kompleksin -11,1 mV olarak ölçülmüştür. Bu durum bakır metallerinin P(VP-*ko*-AA) ile LPS arasında bağlanmayı sağlarken aynı zamanda bu bağlanan P(VP-*ko*-AA)-Cu²⁺-LPS' leri de birbirine bağlamasından kaynaklanmaktadır. Bu sebepten dolayı negatif yük artmaktadır.

6.3.1.4 POX-Cu²⁺-LPS Komplekslerinin Analizine Ait Tartışma

LPS nin Z-Ave değeri $397,1 \pm 8.796$ d.nm , polioksidonyum polimerinin Z-ave değeri $189,4 \pm 33.25$ d.nm, POX-Cu²⁺-LPS-1 kompleksinin Z-ave değeri $207,0 \pm 5.831$ d.nm; POX-Cu²⁺-LPS-2 kompleksinin Z-ave değeri $199,1 \pm 4.632$ d.nm olarak ölçülmüştür. Elde edilen boyut değerleri Şekil 6.8’de kıyaslamalı olarak gösterilmektedir. Komplekslerin boyutunun LPS nin boyutundan küçük, polimerin boyutundan daha büyük olduğu tespit edilmiştir. Bu durum bakır metali varlığında oluşturulan üçlü komplekslerin kompakt hal alarak sentezlenmesi ile açıklanabilir.

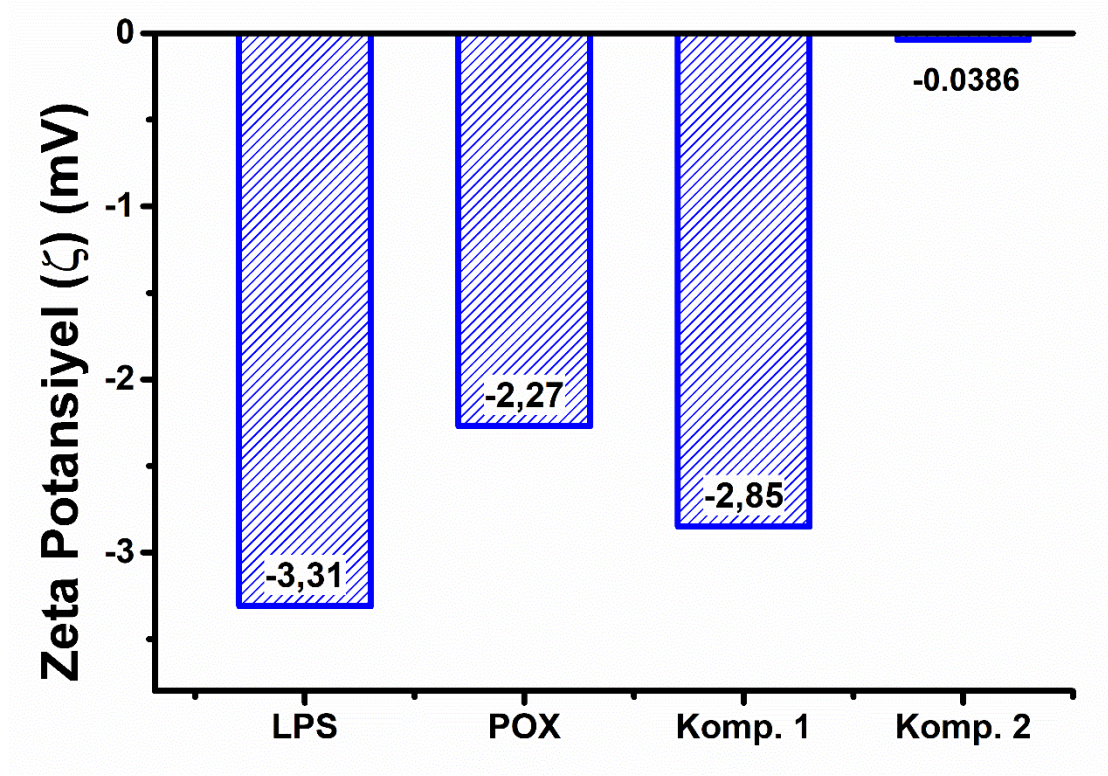


Şekil 6. 8 LPS, POX, POX-Cu²⁺-LPS1 (Komp. 1) ve POX-Cu²⁺-LPS2 (Komp. 2) kıyaslamalı Z-Ave (d.nm) değerleri

LPS nin zeta potansiyeli -3,31 mV, POX polimerinin zeta potansiyeli -2,27 mV, POX-Cu²⁺-LPS-1 kompleksinin zeta potansiyeli $-2,85 \pm 0.352$ mV ve POX-Cu²⁺-LPS-2 kompleksinin zeta potansiyeli $-0,0386 \pm 0.353$ mV olarak tespit edilmiştir. Sonuçlar şekil 6.9’da kıyaslamalı olarak gösterilmektedir. LPS-Cu²⁺-POX kompleksinin zeta potansiyelinin en yüksek negatif yüke sahip olan LPS’ ye göre pozitif kayma görülmektedir.

FTIR spektrumlarına bakıldığında (Şekil 5.24 ve Şekil 5.25); CuSO₄.5H₂O’ ya ait 1100 cm⁻¹ civarındaki pikinin polioksidonyum-Cu²⁺-LPS kompleksinde kaybolması,

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ' nun kompleks oluşumunda kullanıldığını ve komplekslerin istenilen şekilde elde edildiğini göstermektedir. Sulu sistemde çalışıldığı için 3300 cm^{-1} 'lerde -OH grubuna ait pikler görünmektedir.



Şekil 6. 9 LPS, POX, POX- Cu^{2+} -LPS1 (Komp. 1) ve POX- Cu^{2+} -LPS2 (Komp. 2) kıyaslamalı zeta potansiyel değerleri (mV)

Polioksidonyum-LPS fiziksel karışım ve polioksidonyum- Cu^{2+} -LPS kompleksleri karşılaştırıldığında; bakır metali ile oluşturulan komplekslerin fiziksel karışıma (416,7 d.nm) göre daha kompakt yapıda olduğu görülmektedir. Ancak zeta potansiyel değeri daha negatif olarak tespit edilmiştir. Bu durum bakır metallerinin hem polioksidonyum ile LPS arasında bağlanmayı sağlarken hem de bu bağlanan Polioksidonyum- Cu^{2+} -LPS 3'lü komplekslerini de birbirine bağlamasıyla açıklanabilir. Dolayısıyla P(VP-ko-AA)- Cu^{2+} -LPS kompleksinde olduğu gibi yüzey yükü daha negatif olacak şekilde sonuçlar elde edilmiştir.

6.3.2 Konjugatların Oluşumuna ait Tartışma

6.3.2.1 LPS'nin Aldehit Türevinin Eldesine ait Tartışma

Yapılan literatür araştırmasında farklı mM'larda NaIO₄ kullanılarak gerçekleştirilen dekstranın aldehit türevlerine ait FTIR spektrumlarının dekstranla karşılaştırılmasında gözle görülen bir değişiklik olmamıştır [161]. Literatürde FTIR spektrumlarında aldehit oluşumunu gösteren pikleri en az 500 mM ve 1M NaIO₄ ile oksidasyon işlemi yapılarak gösterilebilmiştir. Aldehit türevlerinin FT-IR spektrumları incelendiğinde, dekstran-aldehite ait FT-IR spektrumunda 1650 cm⁻¹'de -C=O gerilmesine ait bir pikin olduğu görülmektedir. 2841 ve 2875 cm⁻¹'de aldehit gerilmeleri ikili pik olarak görülmektedir. Bu piklerin literatürde dekstran aldehitin oluşturulduğunu ispat eden pikler olduğu ifade edilmiştir [161].

LPS'nin aldehit türevine ait FTIR spektrumu Şekil 5.26' da gösterilmiştir. 1640-1650 cm⁻¹ arasında karbonil grubu piki görülmektedir. Ayrıca 2800-2900 cm⁻¹ arasındaki ikili pik aldehit oluştuğunu kanıtlar niteliktedir. Elde edilen bulgular yöntemin başarılı olduğunu göstermektedir. Ancak yüksek mM NaIO₄ kullanmanın LPS'nin moleküler yapısını değiştirerek antijenik karakterine zarar verme olasılığı literatürde belirtilmiştir [162]. Bu sebeple LPS'nin antijenik karakterinde herhangi bir değişikliğe sebep olmaması açısından yapı değişikliğini en aza indirmek için oksidasyon aşamasında 5 mM NaIO₄ kullanılmıştır.

6.3.2.2 H₂N-LPS'nin Biyopolimerle Konjugasyonu

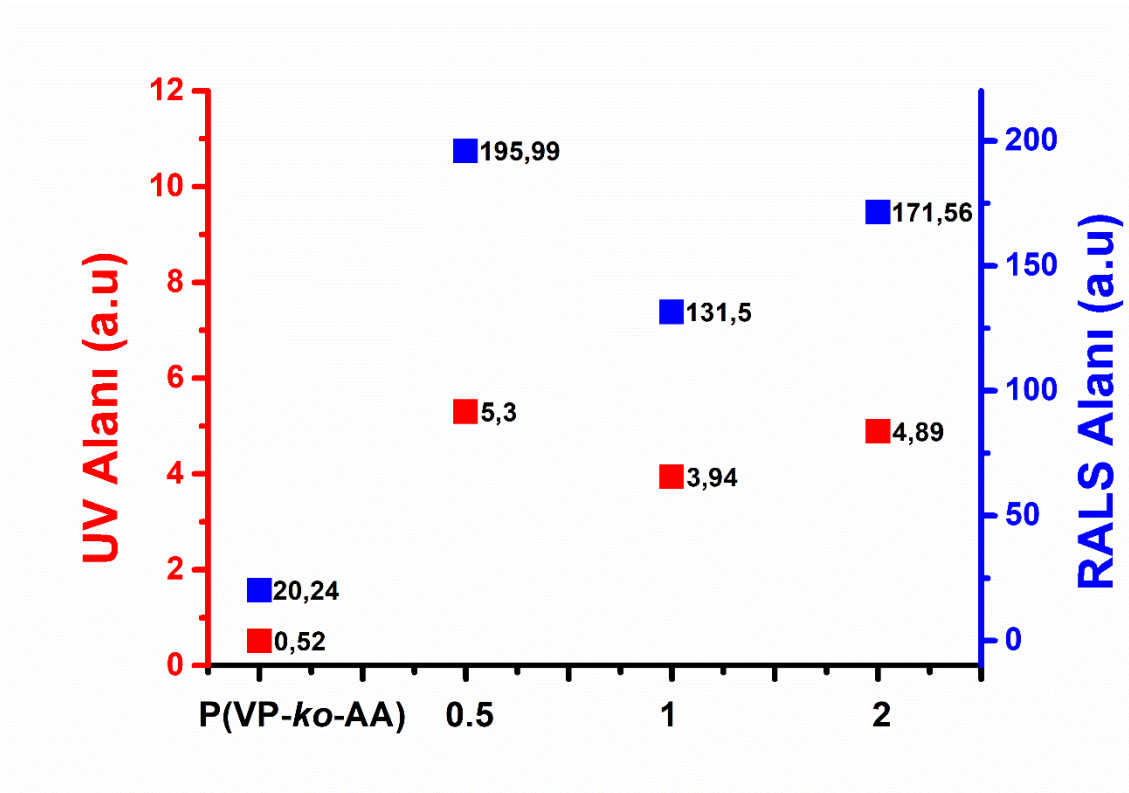
-H₂N-LPS'nin P(VP-ko-AA) ile Biyokonjugatlarının Sentezi ve Karakterizasyonuna ait Bulgular

n_{P(VP-ko-AA)}/n_{LPS} oranları 0,5; 1 ve 2 olmak üzere EDC varlığında sentezlenen konjugatlar GPC, HPLC, FTIR ve Zetasizer cihazları ile karakterize edilmiştir. LPS, P(VP-ko-AA) ve LPS-P(VP-ko-AA) konjugatlarının n=0,5; 1 ve 2 oranlarının GPC kromatogramları RALS ve UV alanları Şekil 6.10'da gösterilmiştir.

Şekil 5.28' de GPC UV kromatogramında P(VP-ko-AA) polimerinin baseline'a yakın bir elüsyon profili sergilediği ve 5 ve 7. dakikalar arasında LPS'nin ve konjugatların

pik verdiği görülmektedir. Polimer oranının artması ile konjugatların pik alanları arasında lineer bir artış görülmemiştir.

Şekil 5.29' da ışık saçılması kromatogramına göre polimer pik büyüklüğünün LPS pikinin yanında daha ufak kaldığı ve LPS- P(VP-*ko*-AA) konjugatlarının oluşturulması ile oluşan konjugatların piklerinin LPS pikine göre daha küçük olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, tüm konjugatların pik alanlarının, polimerin pik alanlarından daha yüksek bir değere sahip olduğu gözlenmiştir.



Şekil 6. 10 P(VP-*ko*-AA) ve LPS-P(VP-*ko*-AA) konjugatlarının n=0,5; 1 ve 2 oranlarının RALS ve UV alanları

HPLC kromatogramları incelendiğinde Şekil 5.30'da 17,5-22,5 dakikalar arasında görülen pik LPS' ye; Şekil 5. 31'de 18-20. dakikalar arasında görülen pik ise polimere ait piktir. Şekil 5.32-5.33-5.34'de LPS'nin polimerle konjugasyonu sonucu oluşan yapıya ait 22,5-37,5. dakikalar arasındaki geniş pikin ise konjugata ait olduğu değerlendirilmiştir. Polimer oranının değiştirilmesiyle konjugat alanlarında büyük oranda değişiklik olmadığı gözlenmiştir.

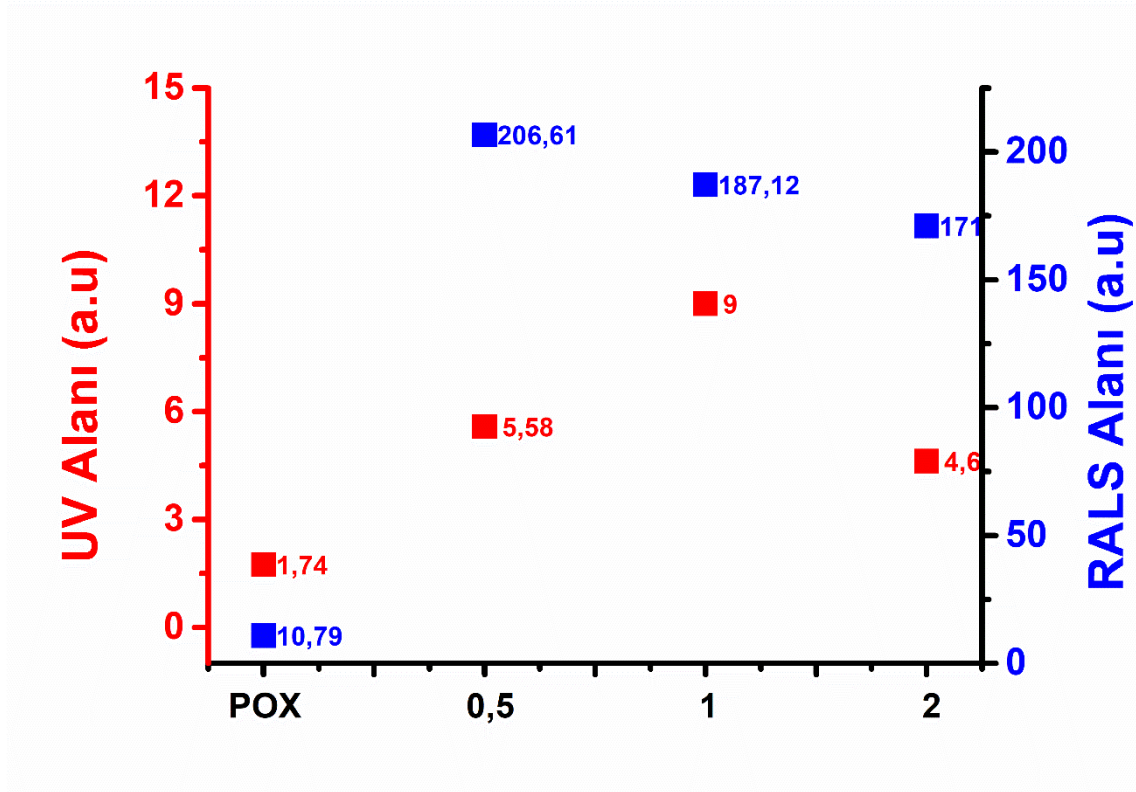
Konjugatların FTIR spektrumları göz önüne alındığında, polimerden gelen 3300 cm⁻¹ civarındaki OH bandının ve polimerin karboksilik asit grubuna ait kuvvetli 1760-1650 cm⁻¹ deki bandın kaybolarak 1550-1650 cm⁻¹ civarı (C=O) ve 1450-1550 cm⁻¹ civarında (N-H bandı) amidlere ait piklerin oluşması konjugasyon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

P(VP-ko-AA) ve EDC çapraz bağlayıcısı kullanılarak oluşturulan $n_{P(VP-ko-AA)} / n_{LPS} = 0,5$ 1, 2 oranlarındaki biyokonjugatların zeta potansiyel değerleri zetasizer cihazında ölçülmüş ve Şekil 5.40 'da verilmiştir. Bu değerler sırasıyla P(VP-ko-AA) (-36,6 mV), $n_{P(VP-ko-AA)} / n_{LPS} = 0,5$ (-1,48 mV); 1 (3,22 mV); 2 (2,27 mV) olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlar ışığında; polimer üzerindeki negatif yüklü karboksilik asit gruplarının (-COOH); NH₂-LPS üzerindeki amino grupları (-NH₂) ile konjugasyonu sonucunda negatif yüklerin kaybolduğu görülmektedir ve bu durum polimer ve lipopolisakkaritin bağlanarak amid bağı oluşturması ile açıklanmıştır.

-H₂N-LPS'nin Polioksidonyum ile Biyokonjugatlarının Sentezi ve Karakterizasyonuna ait Bulgular

GPC UV kromatogramında polioksidonyum polimerinin baseline'a yakın bir elüsyon profili sergilediği gözlenmiştir. 5 ve 7. dakikalar arasında konjugatlara ait uv pikleri görülmektedir. Polimer oranının artması ile konjugatların pik alanlarında lineer bir artış görülmemiştir. POX ve LPS-POX konjugatlarının 0,5; 1 ve 2 oranlarının pik alanları Şekil 6.11'de gösterilmiştir.

Işık saçılması kromatogramına göre polimerin pikinin büyüklüğünün LPS pikinin yanında daha ufak kaldığı ve LPS-POX konjugatlarının oluşması sonucunda piklerinin boyutlarının polimerin pikine göre daha büyük bir değer aldığı görülmektedir.



Şekil 6. 11 POX ve LPS-POX konjugatlarının 0,5; 1 ve 2 oranlarına ait pik alanları

LPS-POX konjugatlarının HPLC analizi sonuçları EDC çapraz bağlama reaktifi kullanılarak iki molekül arasında konjugat oluşumu sağlandığını göstermektedir. HPLC kromatogramları göz önünde bulundurulduğunda 17,5-22,5 dakikalar arasındaki pik LPS'ye; 18-22. dakikalar arasındaki pikin ise polimere ait olduğu değerlendirilmiştir. LPS'nin polimerle konjugasyonu sonucu oluşan yapıya ait geniş pik 22,5-37,5 dakikaları arasında gözlenmiştir. Polimer oranının değiştirilmesiyle konjugat piklerinde büyük oranda değişiklik olmadığı ifade edilebilir.

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

Zeta potansiyel değerleri kıyaslandığında bu değerler sırasıyla POX (-2,27 mV), $n_{\text{POX}}/n_{\text{LPS}}=0,5$ (-1,67 mV); 1 (-1,32 mV); 2 (-1,46 mV) olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlar

ışığında; polimer üzerindeki negatif yüklü karboksilik asit gruplarının (-COOH); NH₂-LPS üzerindeki amino grupları (-NH₂) ile konjugasyonu sonucunda negatif yüklerin kaybolduğu görülmektedir. Bu durum polimerin karboksilik asit gruplarının lipopolisakkaritin amino gruplarına bağlanarak amid bağı oluşturmaları ile açıklanmıştır. Bu sonuçlar ışığında; n_{POX} /n_{LPS} 'nin tüm oranlarında GPC ve HPLC sonuçlarına dayanarak konjugat oluşumunun sağlandığı değerlendirilmiştir.

-LPS-P(VP-ko-AA) konjugatlarının SOCl₂ yöntemi ile konjugasyonuna ait tartışma

SOCl₂ varlığında sentezlenen konjugatlar koyu jel kıvamındadır ve suda çözünürlüğü düşüktür. Şekil 5.55' de görülen 20-25 dakikalar arasındaki pik konjugat piki; 17,5-22,5 dakikalar arasındaki pik LPS'ye ait piktir. 18-20. dakikalar arasındaki konjugat pikinin yanındaki ufak pik reaksiyona girmemiş olan LPS' ye ait olduğu düşünülmektedir. Bu pikin LPS'den kaynaklandığını belirlemek amacıyla, konjugattan alınan bir miktar örnek üzerine LPS çözeltisi eklenerek konjugat örneğindeki LPS miktarı arttırılmıştır ve sonucunda 18-20.dakikalar arasındaki bu pikte artma olduğu görülmüştür. Şekil 5.56'da bu çalışmamızla ilgili kromatogram yer almaktadır.

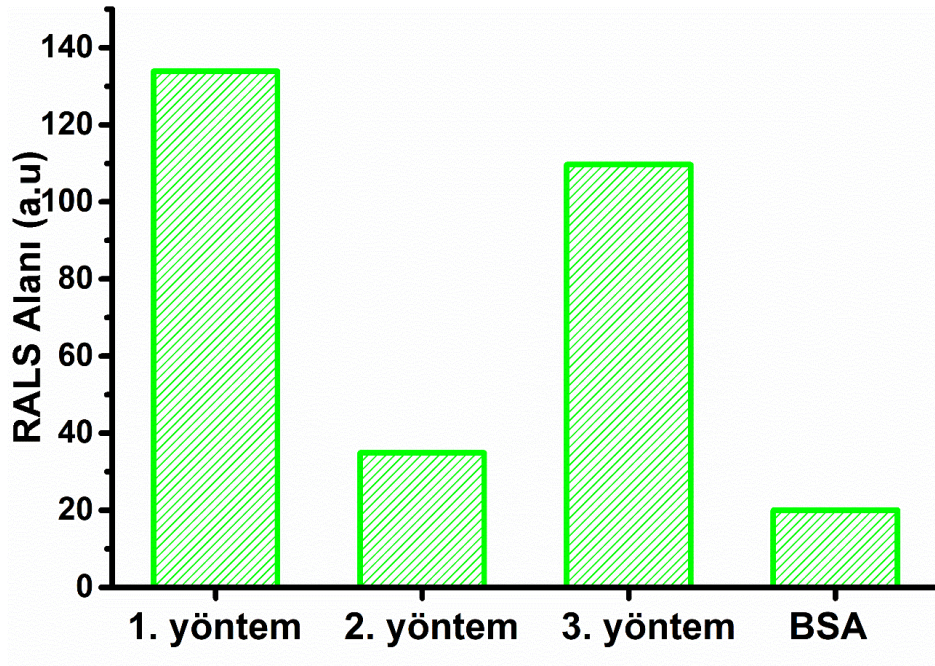
Tiyonil klorür yöntemi ile sentezlenmiş P(VP-ko-AA)-LPS konjugatına ait FTIR spektrumu Şekil 5.57' de gösterilmiştir. 1650 cm⁻¹ civarında çok kuvvetli C=O gerilme titreşimleri; 3230- 3550 arası zayıf-orta geniş, intermoleküler H bağlarına ait pik; 1420 cm⁻¹ civarında esterden gelen zayıf veya orta CH₂ simetrik deformasyon titreşimleri; 1100 cm⁻¹ civarında da ester gruplarına ait C-O-C asimetrik gerilme titreşimleri görülmektedir. Bu pikler göz önüne alınarak ester oluşumu üzerinden P(VP-ko-AA)-LPS konjugatının sentezlendiği doğrulanmıştır.

6.4 ELISA Deneylerine ait Tartışmalar

6.4.1 ELISA Kaplamada Kullanılması İçin Gerçekleştirilen LPS-BSA Konjugatlarına Ait Tartışma

Şekil 5. 58' de GPC ışık saçılması kromatogramı incelendiğinde, daha önceki yapmış olduğumuz çalışmalar ışığında 17-18. dakikalar arasında görülen BSA pikinden ve

6-8. dk LPS pikinden farklı olarak, 10 ve 14. dakikalarda konjugat piklerinin oluştuğu görülmüştür. Piklerin alanları göz önünde bulundurularak 1 ve 3. yöntemle sentezlenmiş olan BSA-LPS konjugatlarının 2. yöntemle sentezlenen LPS-BSA konjugatına göre daha başarılı olduğu söylenebilmektedir. Her 3 yöntemle sentezlenen LPS-BSA konjugatlarının pik alanları BSA ile kıyaslamalı olarak Şekil 6.12’de gösterilmiştir.



Şekil 6. 12 1. yöntemle, 2. yöntemle ve 3. yöntemle sentezlenen LPS-BSA konjugatlarının BSA kıyaslamalı pik alanlarına ait grafik

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

6.4.2 ELISA Platelerine LPS Kaplamada Standardizasyon Çalışmasına Ait Tartışma

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

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

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

Şekil 5.60'da görüldüğü üzere bu gruptaki en yüksek titre LPS-P(VP-ko-AA) konjugatı n=2 oranından alınmıştır. İlk enjeksiyondan 30 gün sonra titre seviyesinin düşmesiyle 1. enjeksiyonla aynı dozda 2. enjeksiyon (hatırlatma) yapılmıştır ve serumlardaki antikor titrelerinin 37 ve 44. Günlerde maksimum seviyelere ulaştığı gözlenmiştir. Daha sonraki hafta LPS-P(VP-ko-AA) konjugatı n=1 oranının OD değeri daha da yükselmişken, LPS-P(VP-ko-AA) konjugatı n=2 oranının OD değerlerinde çok küçük bir düşme görülmesine karşın iki oranın da kontrollere göre yüksek antikor yanıt verdiği görülmektedir.

6.4.3.2 LPS-P(VP-ko-AA) Fiziksel Kompleks ve LPS-Cu²⁺-P(VP-ko-AA) 3'lü Kompleksine Karşı Oluşan Antikor Miktar Tayini Sonuçları

Şekil 5.61'de görüldüğü üzere en yüksek titrede antikor yanıtları LPS-Cu²⁺-P(VP-ko-AA) 3'lü kompleksinin 1.oranının enjekte edildiği fare grubundan elde edilmiştir. 30. gün birinci enjeksiyonla aynı dozda 2. enjeksiyon tüm farelere hatırlatma dozu olarak uygulanmıştır. LPS-Cu²⁺-P(VP-ko-AA) kompleksi için 37. günde antikor yanıtının arttığı ancak 44. günde ufak bir düşüş olduğu görülmektedir. Bu sebeple 3. enjeksiyon 44. günde yapılmıştır. 52. ve 58. günlerde en yüksek antikor yanıtının bu

gruptan alındığı, titre seviyesinin yaklaşık 2,00 OD civarına ulaştığı gözlenmiştir. Çalışma sonucunda en iyi antikor seviyelerinin bu grup ile elde edilmiş olması sebebiyle gelecekteki çalışmalar için bu farelerle devam edilmesi planlanmıştır.

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

Şekil 5.62’de görüldüğü üzere LPS-POX fiziksel kompleksi ve LPS-POX konjugatlarının ilk enjeksiyondan sonra antikor seviyelerinin kontrollerle yakın olduğu gözlenmiştir. 30. günde gerçekleştirilen 1. enjeksiyonla aynı dozda 2. enjeksiyondan sonra bu gruptaki en yüksek titre LPS-POX fiziksel kompleksinden 37. günde alınmış diğer haftalarda ise hafif bir düşme gözlenmiştir. LPS-POX konjugatının enjekte edildiği grupta 2. enjeksiyonun gerçekleştiği 30. günden itibaren 37. günde antikor yanıtı artmış ve 44, 51 ve 58. günlerde benzer antikor titreleri elde edilmiştir.

6.4.3.5 LPS-POX Fiziksel Kompleks ve LPS-Cu²⁺-POX Kompleksine Karşı Oluşan Antikor Miktar Tayini Sonuçlarına ait Tartışma

Şekil 5. 63’ de görüldüğü üzere ilk enjeksiyondan sonra belirtilen 5 grup içinde en yüksek antikor bakır komplekslerinde elde edilmiştir. 30. günde 405 nm’deki OD değerlerinin düşmesi ile 1. enjeksiyon ile aynı dozda 2. enjeksiyon (hatırlatma) gerçekleştirilmiştir. 37. günde LPS-Cu²⁺-POX 1. oran ve 2. oranda yüksek antikor yanıtı artışı gözlenmiştir. 44. günde antikor yanıtlarında hafif bir düşme görülmesi ile 3. enjeksiyon (hatırlatma) yapılarak 51. günde yaklaşık 2.00 OD değerlerde yanıt aldığı görülmektedir. Ancak 58. günde okunan antikor yanıtlarındaki düşüşe rağmen OD değeri 1,00 üzerinde olmakla beraber yüksek yanıt olarak kabul edilebilmektedir. Ancak gelecekteki monoklonal antikor çalışmaları gibi çalışmalara devam edebilmek için yanıtlardaki yükselme ve düşmeler tutarsız görülmektedir ve bu gruptaki farelerle devam edilmemesine karar verilmiştir.

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

Şekil 5.64'e bakıldığında ilk enjeksiyondan sonra Freund's adjuvantı içermeyen LPS-P(VP-ko-AA) konjugatlarının her iki oranının da kontrol gruplarına göre yüksek antikor yanıt verdiği görülmektedir. 30. günde 2. enjeksiyonun yapılması ile 37. ve 44. günlerde alınan antikor yanıtlarının oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Gelecek çalışmalarda kullanılması amacıyla uygun yüksek yanıtları koruyabilmek açısından 3. enjeksiyon 51. günde gerçekleştirilmiştir. Alternatif adjuvan etkisini gözlemleyebilmek için yapılan bu çalışma sonucunda, Freund's adjuvantı içeren ve içermeyen konjugatlar arasında çok büyük bir fark görülmemektedir. Tek başına LPS ye göre LPS+Freund's adjuvantının yüksek titre verdiği görülmekte, Freund's adjuvantı içeren ve içermeyen konjugatlardan alınan antikor yanıtları arasında çok büyük bir fark olmadığı söylenebilmektedir. Sonuç olarak, konjugatlarda seçilen P(VP-ko-AA) kopolimerinin uygun bir adjuvant olduğu görülmektedir.

6.4.3.7 LPS-BSA-Freund's Konjugatlarına Karşı Oluşan Antikor Yanıtlarına Ait Tartışma

Şekil 5.65' de görüldüğü üzere Adjuvanlı LPS-BSA konjugatlarının antikor yanıtlarının kontrole oranla hatırlatma enjeksiyonu olmaksızın yüksek olduğu görülmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında Q humması hastalığının dominant antijeni LPS'nin P(VP-ko-AA) ve POX ile fiziksel kompleks, 3'lü bakır kompleksleri ve çapraz bağlayıcı aracılığıyla oluşturulan konjugatları sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir. Optimum oranlar belirlenerek Balb/c' lere immunizasyon yapılmış ve antikor yanıtları değerlendirilmiş ve en yüksek titre veren kompleks ve konjugatlar belirlenmiştir. Tez çalışmasından elde edilen verilerin Q hummasına karşı sentetik aşı geliştirilmesi ve bu hastalığa özgü antikorların elde edilmesi ile tanı kitlerinin üretilmesi için yapılacak çalışmalara yol göstermesi ümit edilmektedir.

- [1] Pardis Moradnejad, Saber Esmaeili, Majid Maleki, Anita Sadeghpour, Monireh Kamali, Mahdi Rohani, *et al.*, "Q Fever Endocarditis in Iran," *Scientific Reports*, vol. 9, p. 7, 2019.
- [2] H. Roest, J. Tilburg, W. Van der Hoek, P. Vellema, F. Van Zijderveld, C. Klaassen, *et al.*, "The Q fever epidemic in The Netherlands: history, onset, response and reflection," *Epidemiology & Infection*, vol. 139, pp. 1-12, 2011.
- [3] E. Ceylan, M. Berktaş, I. Keles, and Z. Agaoglu, "Seroprevalence of Q Fever in Cattle and Sheep in the East of Turkey," *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, vol. 4, pp. 114-121, 2009.
- [4] J. Y. Heo, Y. W. Choi, E. J. Kim, S. H. Lee, S. K. Lim, S. Do Hwang, *et al.*, "Clinical characteristics of acute Q fever patients in South Korea and time from symptom onset to serologic diagnosis," *BMC infectious diseases*, vol. 19, pp. 1-7, 2019.
- [5] H. Honarmand, "Q Fever: An Old but Still a Poorly Understood Disease," *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, vol. 2012, p. 8, 2012.
- [6] F. E. Elzein, N. Alsherbeen, K. Alnajashi, E. Alsufyani, M. Akhtar, R. Albalawi, *et al.*, "Ten-year experience of Q fever endocarditis in a tertiary cardiac center in Saudi Arabia," *International Journal of Infectious Diseases*, vol. 88, pp. 21-26, 2019.
- [7] P. Abnave, X. Muracciole, and E. Ghigo, "Coxiella burnetii lipopolysaccharide: what do we know?," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 18, p. 2509, 2017.
- [8] N. R. Parker, J. H. Barralet, and A. M. Bell, "Q fever," *The lancet*, vol. 367, pp. 679-688, 2006.
- [9] C. T. Narasaki, K. Mertens, and J. E. Samuel, "Characterization of the GDP-D-mannose biosynthesis pathway in Coxiella burnetii: the initial steps for GDP-β-D-virenose biosynthesis," *PLoS One*, vol. 6, p. e25514, 2011.
- [10] R. Toman, L. Skultety, and R. Ihnatko, "Coxiella burnetii glycomics and proteomics—tools for linking structure to function," *Ann NY Acad Sci*, vol. 1166, pp. 67-78, 2009.
- [11] B. Krt, "The influence of Coxiella burnetii phase I and phase II antigens on the serological diagnosis of Q fever in cattle," *Slovenian Veterinary Research*, vol. 40, pp. 203-207, 2003.
- [12] OIE, "Q fever," in *Terrestrial manual chapter 3.1.16*, ed, 2018, pp. 560-577.
- [13] D. Şakar Daşdan, M. Karahan, F. Noyan Tekeli, and G. Gölbaşı Şimşek, "Modeling particle size of polyacrylic acid-copper (II)-bovine serum albumin ternary complex in salt solution," 2019.

- [14] T. Acar, P. P. Arayıcı, B. Ucar, M. Karahan, and Z. Mustafaeva, "Synthesis, characterization and lipophilicity study of *Brucella abortus*' immunogenic peptide sequence that can be used in the future vaccination studies," *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, vol. 25, pp. 911-918, 2019.
- [15] S. Ruiz and D. N. Wolfe, "Vaccination against Q fever for biodefense and public health indications," *Frontiers in microbiology*, vol. 5, p. 726, 2014.
- [16] M. H. Hermans, C. R. J. Huijsmans, J. J. Schellekens, P. H. Savelkoul, and P. C. Wever, "Coxiella burnetii DNA in goat milk after vaccination with Coxevac®," *Vaccine*, vol. 29, pp. 2653-2656, 2011.
- [17] O. Freylikhman, N. Tokarevich, A. Suvorov, E. Vorobiova, and A. Totolian, "Coxiella burnetii Persistence in Three Generations of Mice after Application of Live Attenuated Human M-44 Vaccine against Q Fever," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 990, pp. 496-499, 2003.
- [18] Z. Mustafaeva, "Water-Soluble Synthetic Polymers In Medical Applications," *group*, vol. 29, p. 31, 2016.
- [19] S. I. Deliloglu Gürhan, M. Mustafaev Akdeste, Z. Mustafaeva Akdeste, G. Aynagöz, G. Unver, N. Unal, *et al.*, "Peparation of synthetic peptide FMD vaccine with newly developed antigen- polymere conjugates be used as immonogen and vaccine in veterinary medicine " FAO, Report of the Session of the Research Group of the Standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot and Mouth Disease 2002.
- [20] Z. Mustafaeva, "Polymers In Vaccine Formulation," *Sigma: Journal of Engineering & Natural Sciences/Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, vol. 34, 2016.
- [21] V. A. Kabanov, "From synthetic polyelectrolytes to polymer-subunit vaccines," *Pure and applied chemistry*, vol. 76, pp. 1659-1677, 2004.
- [22] M. P. Kostinov, A. P. Cherdantsev, A. I. Kuselman, N. K. Akhmatova, A. M. Kostinova, E. V. Deryabina, *et al.*, "Prospective randomized open-label comparative study of immunogenicity after subunit and polymeric subunit influenza vaccines administration among mothers and infants," *Human vaccines & immunotherapeutics*, vol. 14, pp. 2971-2978, 2018.
- [23] P. P. Arayici, T. Acar, B. Ucar, M. Karahan, Z. Mustafaeva, and B. Atasever Arslan, "Rabies Virus 31D Peptide-[P (VP-co-AA)] Conjugates: Synthesis, Characterization and Cytotoxicity Evaluation," 2019.
- [24] F. Yücel, B. Çirakoglu, Z. Mustafaeva, and M. Mustafaev, "Immune response to progesterone immobilized on Cu²⁺-induced amphifilic polyelectrolyte-protein complex: Antigen specificity and affinity of hybridoma clones," *Hybridoma*, vol. 20, pp. 11-15, 2001.
- [25] P. Arayici-Pelit, "Koruyucu Yeni Nesil Peptid Aşı Modelleri: Viral Kuduz Hastalığı Peptidlerinin Çeşitli Adjuvantlarla Biyokonjugatlarının Geliştirilmesi," Yüksek Lisans, Biyomühendislik, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul, 2015.

- [26] Z. Ö. Özdemir and Z. Mustafaeva, "Development of polyelectrolyte based bioconjugates using with synthetic viral peptides," *Sigma*, vol. 29, pp. 65-89, 2011.
- [27] B. Mansuroğlu, K. Kizilbey, S. Derman, and Z. Mustafaeva, "Investigation of protein-polyelectrolyte complex and conjugates by high performance liquid chromatography methods," *Turkish Journal Of Biochemistry*, vol. 36, pp. 21-28, 2011.
- [28] B. I. Eroglu, Y. B. Kilinc, and Z. Mustafaeva, "Bioconjugation of Hepatitis B antigenic peptide with polymeric carriers through various carbodiimide chemistry," *Turkish Journal of Biochemistry*, vol. 36, pp. 222-229, 2011.
- [29] H. Edalati-Shokat, E. Abbasi-Doulatshahi, H. Hajian-Bidar, J. Gharekhani, and A.-A. Rezaei, "Q fever in domestic ruminants: A Seroepidemiological survey in Hamedan, Iran," *Int J Curr Microbiol App Sci*, vol. 4, pp. 589-596, 2015.
- [30] Z. Wiley, S. Reddy, K. M. Jacobs Slifka, D. C. Brandon, J. Jernigan, G. J. Kersh, *et al.*, "Chronic Q Fever with Vascular Involvement: Progressive Abdominal Pain in a Patient with Aortic Aneurysm Repair in the United States," *Case reports in infectious diseases*, vol. 2019, 2019.
- [31] G. Ozbey, H. Kalender, and M. A., "Q Humması'nın Epidemiyolojisi Ve Teşhisi," *Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences)*, vol. 18, pp. 100-110, 2009.
- [32] S. Gazyağcı, M. S. Aktaş, S. Kılıç, C. Babur, B. Çelebi, and S. Y. Duru, "Seroprevalence of Q fever in dairy cattle in the Konya province, Turkey," *Revue Méd. Vét.*, vol. 162, pp. 387-390, 2011.
- [33] P. Kalita, A. Padhi, K. Y. Zhang, and T. Tripathi, "Design of a peptide-based subunit vaccine against novel coronavirus SARS-CoV-2," *Microbial Pathogenesis*, p. 104236, 2020.
- [34] A. Gülmez, "Sığır ve Koyun Sürülerinden Alınan Örneklerde *Coxiella Burnetii* (Q Fever) Varlığının Araştırılması," Doktora Tezi Doktora, Mikrobiyoloji ABD, Kafkas Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kars, 2013.
- [35] Z. S. Mavili, "Dişi Sığırlarda Q Hummasının Moleküler (Real-Time Pcr) Ve Serolojik (Elisa) Yöntemlerle Araştırılması," Doktora Tezi Doktora Tezi, Mikrobiyoloji ABD, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2015.
- [36] J. Hirschmann, "The discovery of Q fever and its cause," ed: Elsevier, 2019.
- [37] S. Kılıç and B. Çelebi, "1. Bölüm: Genel Bilgiler," *Turk Hij Den Biyol Derg*, vol. 65, pp. 1-20, 2008.
- [38] B. Kumsa, C. Socolovschi, L. Almeras, D. Raoult, and P. Parola, "Occurrence and genotyping of *Coxiella burnetii* in ixodid ticks in Oromia, Ethiopia," *The American journal of tropical medicine and hygiene*, vol. 93, pp. 1074-1081, 2015.

- [39] H. R. Dalton, J. Dreier, G. Rink, A. Hecker, K. Janetzko, D. Juhl, *et al.*, "Coxiella burnetii-pathogenic agent of Q (query) fever," *Transfusion medicine and hemotherapy*, vol. 41, pp. 60-72, 2014.
- [40] M. Karahan, "Antigenic peptide synthesis and characterization of Q fever disease," *Afyon Kocatepe University Journal of Sciences and Engineering*, vol. 17, pp. 312-317, 2017.
- [41] A. Cikman, M. Aydin, B. Gulhan, F. Karakecili, A. Ozcicek, O. A. Kesik, *et al.*, "The seroprevalence of Coxiella burnetii in Erzincan, Turkey: Identification of the risk factors and their relationship with geographical features," *Journal of Vector Borne Diseases*, vol. 54, p. 157, 2017.
- [42] B. Coşkun, "Ayvacık'ta (Çanakkale) Koyunlarda Coxiella Burnetii İnfeksiyonunun Seroprevalansının Belirlenmesi," Doktora Tezi Doktora Tezi, Zootekni Anabilim Dalı, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale, 2016.
- [43] T. Tagesu, "Q Fever in Small Ruminants and its Public Health Importance."
- [44] C. T. Narasaki and R. Toman, "Lipopolysaccharide of Coxiella burnetii," in *Coxiella burnetii: Recent Advances and New Perspectives in Research of the Q Fever Bacterium*, ed: Springer, 2012, pp. 65-90.
- [45] X. Wang and P. J. Quinn, "Endotoxins: lipopolysaccharides of gram-negative bacteria," in *Endotoxins: structure, function and recognition*, ed: Springer, 2010, pp. 3-25.
- [46] C. Whitfield, D. M. Williams, and S. D. Kelly, "Lipopolysaccharide O-antigens-bacterial glycans made to measure," *Journal of Biological Chemistry*, p. jbc.REV120.009402, 2020.
- [47] A. Honstetter, E. Ghigo, A. Moynault, C. Capo, R. Toman, S. Akira, *et al.*, "Lipopolysaccharide from Coxiella burnetii is involved in bacterial phagocytosis, filamentous actin reorganization, and inflammatory responses through Toll-like receptor 4," *The Journal of Immunology*, vol. 172, pp. 3695-3703, 2004.
- [48] B. Çelebi, B. BAŞ, E. A. BALI, and S. Ş. YAVUZ, "Endokarditli Bir Olgudan Coxiella burnetii'nin Türkiye'de İlk İzolasyonu; Antijen Üretimi ve Faz Değişimi Çalışması," *Mikrobiyol Bul*, vol. 53, pp. 274-284, 2019.
- [49] L. Gürtler, U. Bauerfeind, J. Blümel, R. Burger, C. Drosten, A. Gröner, *et al.*, "Coxiella burnetii-Pathogenic Agent of Q (Query) Fever," *Transfusion Medicine and Hemotherapy: Offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhamatologie*, vol. 41, pp. 60-72, 2013.
- [50] P. Ftáček, L. u. Skultéty, and R. Toman, "Phase variation of Coxiella burnetii strain Priscilla: influence of this phenomenon on biochemical features of its lipopolysaccharide," *Journal of Endotoxin Research*, vol. 6, pp. 369-376, 2000.
- [51] T. Hackstadt, "Antigenic variation in the phase I lipopolysaccharide of Coxiella burnetii isolates," *Infection and immunity*, vol. 52, pp. 337-340, 1986.

- [52] C. M. Stead, D. C. Cockrell, P. A. Beare, H. E. Miller, and R. A. Heinzen, "A *Coxiella burnetii* phospholipase A homolog *pldA* is required for optimal growth in macrophages and developmental form lipid remodeling," *BMC microbiology*, vol. 18, pp. 1-9, 2018.
- [53] E. I. Shaw and D. E. Voth, "*Coxiella burnetii*: a pathogenic intracellular acidophile," *Microbiology*, vol. 165, p. 1, 2019.
- [54] E. S. Gürbilek, O. Keskin, A. Yiğın, O. Y. Tel, " Ruminant Abortus Vakalarında *Coxiella burnetii*'nin Real Time PCR ile Araştırılması" *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, vol.7(1), pp.79-83, 2018.
- [55] T. F. McCaul and J. Williams, "Developmental cycle of *Coxiella burnetii*: structure and morphogenesis of vegetative and sporogenic differentiations," *Journal of bacteriology*, vol. 147, pp. 1063-1076, 1981.
- [56] B. La Scola, "Current laboratory diagnosis of Q fever," in *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 2002, pp. 257-262.
- [57] P. P. España, A. Uranga, C. Cillóniz, and A. Torres, "Q Fever (*Coxiella Burnetii*)," in *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 2020, pp. 509-521.
- [58] J. D. Hartzell, R. N. Wood-Morris, L. J. Martinez, and R. F. Trotta, "Q fever: epidemiology, diagnosis, and treatment," in *Mayo Clinic Proceedings*, 2008, pp. 574-579.
- [59] M. Million and D. Raoult, "Q Fever," in *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease*, ed: Elsevier, 2013, pp. 558-560.
- [60] N. Arricau-Bouvery and A. Rodolakis, "Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis?," *Veterinary research*, vol. 36, pp. 327-349, 2005.
- [61] M. Hanczaruk, S. J. Cutler, R. Toman, and D. Frangoulidis, "*Coxiella burnetii*: Q Fever," *BSL3 and BSL4 Agents*, pp. 57-69, 2012.
- [62] E. Angelakis and D. Raoult, "Q fever," *Veterinary microbiology*, vol. 140, pp. 297-309, 2010.
- [63] C. Eldin, C. Melenotte, O. Mediannikov, E. Ghigo, M. Million, S. Edouard, *et al.*, "From Q fever to *Coxiella burnetii* infection: a paradigm change," *Clinical microbiology reviews*, vol. 30, pp. 115-190, 2017.
- [64] L. Norlander, "Q fever epidemiology and pathogenesis," *Microbes and infection*, vol. 2, pp. 417-424, 2000.
- [65] S. Payzin, "Epidemiological investigations on Q fever in Turkey," *Bulletin of the World Health Organization*, vol. 9, p. 553, 1953.
- [66] T. Yildirmak, F. Simsek, B. Çelebi, E. Çavus, A. Kantürk, and N. Efe-Iris, "Ağır Sarılıkla Basvuran, Nadir Görülen Bir Akut Q Atesi Olgusu ve Literatüre Bakış/A Rare Case of Acute Q Fever Presenting with Deep Jaundice and a Review of the Literature," *KLİMİK Dergisi*, vol. 23, p. 124, 2010.
- [67] Z. Woldehiwet, "Q fever (coxiellosis): epidemiology and pathogenesis," *Research in veterinary science*, vol. 77, pp. 93-100, 2004.

- [68] Heydel C. and W. H., "Pathogens in Milk | *Coxiella burnetii*," in *Encyclopedia of dairy sciences*, J. W. Fuquay, P. L. McSweeney, and P. F. Fox, Eds., 2th ed USA: Academic Press, 2011, pp. 54-59.
- [69] J. L. Robinson, "Coxiella burnetii Infection in Children," *Current Infectious Disease Reports*, vol. 22, 2020.
- [70] S. Kilic, S. Pasa, C. Babur, and M. Ozlem, "Investigation of Coxiella burnetii antibodies in sheep in Aydin region, Turkey," *Rev Med Vet*, vol. 156, pp. 336-340, 2005.
- [71] S. P. Salifu, A.-R. A. Bukari, D. Frangoulidis, and N. Wheelhouse, "Current perspectives on the transmission of Q fever: Highlighting the need for a systematic molecular approach for a neglected disease in Africa," *Acta tropica*, vol. 193, pp. 99-105, 2019.
- [72] C. Melenotte, M. Million, and D. Raoult, "New insights in Coxiella burnetii infection: diagnosis and therapeutic update," *Expert Review of Anti-infective Therapy*, vol. 18, pp. 75-86, 2020.
- [73] P.-E. Fournier, T. J. Marrie, and D. Raoult, "Diagnosis of Q fever," *Journal of clinical microbiology*, vol. 36, pp. 1823-1834, 1998.
- [74] M. Maurin and D. f. Raoult, "Q fever," *Clinical microbiology reviews*, vol. 12, pp. 518-553, 1999.
- [75] H. K. Miller, A. M. Binder, A. Peterson, E. S. Theel, J. M. Volpe, M. R. Couturier, et al., "Trends in Q fever serologic testing by immunofluorescence from four large reference laboratories in the United States, 2012–2016," *Scientific reports*, vol. 8, pp. 1-8, 2018.
- [76] E. Günaydin, S. Pekkaya, H. K. Müştak, and B. Dalkilic, "Investigation of Q Fever in Kilis and Shamil goats by ELISA and Touchdown-PCR," *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, vol. 61, pp. 161-165, 2014.
- [77] H. Lepidi, F. Gouriet, and D. Raoult, "Immunohistochemical detection of Coxiella burnetii in chronic Q fever hepatitis," *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 15, pp. 169-170, 2009.
- [78] A. Setiyono, M. Ogawa, Y. Cai, S. Shiga, T. Kishimoto, and I. Kurane, "New criteria for immunofluorescence assay for Q fever diagnosis in Japan," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 43, pp. 5555-5559, 2005.
- [79] M. W. Horigan, M. M. Bell, T. R. Pollard, A. R. Sayers, and G. C. Pritchard, "Q fever diagnosis in domestic ruminants: comparison between complement fixation and commercial enzyme-linked immunosorbent assays," *Journal of veterinary diagnostic investigation*, vol. 23, pp. 924-931, 2011.
- [80] J. Meekelenkamp, P. Schneeberger, P. Wever, and A. Leenders, "Comparison of ELISA and indirect immunofluorescent antibody assay detecting Coxiella burnetii IgM phase II for the diagnosis of acute Q fever," *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, vol. 31, pp. 1267-1270, 2012.
- [81] H.-W. Chen, Z. Zhang, E. Glennon, and W.-M. Ching, "Detection of Q fever specific antibodies using recombinant antigen in ELISA with peroxidase

- based signal amplification," *International journal of bacteriology*, vol. 2014, 2014.
- [82] M. Stellfeld, C. Gerlach, I.-G. Richter, P. Miethe, D. Fahlbusch, B. Polley, *et al.*, "Evaluation of the Diagnostic Potential of Recombinant *Coxiella burnetii* Com1 in an ELISA for the Diagnosis of Q Fever in Sheep, Goats and Cattle," *Microorganisms*, vol. 8, p. 1235, 2020.
 - [83] S. V. Nguyen, H. Otsuka, G. Zhang, H. To, T. Yamaguchi, H. Fukushi, *et al.*, "Rapid method for detection of *Coxiella burnetii* antibodies using high-density particle agglutination," *Journal of clinical microbiology*, vol. 34, pp. 2947-2951, 1996.
 - [84] J. Kazar, R. Brezina, S. Schramek, A. Palanova, and B. Tvrda, "Suitability of the microagglutination test for detection of post-infection and post-vaccination Q fever antibodies in human sera," *Acta virologica*, vol. 25, p. 235, 1981.
 - [85] G. Döller, P. Döller, and H.-J. Gerth, "Early diagnosis of Q fever: detection of immunoglobulin M by radioimmunoassay and enzyme immunoassay," *European journal of clinical microbiology*, vol. 3, pp. 550-553, 1984.
 - [86] G. J. Kersh, "Antimicrobial therapies for Q fever," *Expert review of anti-infective therapy*, vol. 11, pp. 1207-1214, 2013.
 - [87] L. M. Kampschreur, S. Dekker, J. C. Hagenaars, P. J. Lestrade, N. H. Renders, M. G. de Jager-Leclercq, *et al.*, "Identification of risk factors for chronic Q fever, the Netherlands," *Emerging infectious diseases*, vol. 18, p. 563, 2012.
 - [88] F. Dijkstra, J. Riphagen-Dalhuisen, N. Wijers, E. Hak, M. Van der Sande, G. Morroy, *et al.*, "Antibiotic therapy for acute Q fever in The Netherlands in 2007 and 2008 and its relation to hospitalization," *Epidemiology & Infection*, vol. 139, pp. 1332-1341, 2011.
 - [89] X. Carcopino, D. Raoult, F. Bretelle, L. Boubli, and A. Stein, "Managing Q fever during pregnancy: the benefits of long-term cotrimoxazole therapy," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 45, pp. 548-555, 2007.
 - [90] I. Y. Bart, Y. Schabos, R. W. van Hout, A. C. Leenders, and E. de Vries, "Pediatric acute Q fever mimics other common childhood illnesses," *PLoS One*, vol. 9, p. e88677, 2014.
 - [91] M. R. Rahaman, A. Milazzo, H. Marshall, and P. Bi, "Is a one health approach utilized for Q fever control? A comprehensive literature review," *International journal of environmental research and public health*, vol. 16, p. 730, 2019.
 - [92] J. G. Shannon and R. A. Heinzen, "Adaptive immunity to the obligate intracellular pathogen *Coxiella burnetii*," *Immunologic research*, vol. 43, pp. 138-148, 2009.
 - [93] H. F. Gidding, C. Wallace, G. L. Lawrence, and P. B. McIntyre, "Australia's national Q fever vaccination program," *Vaccine*, vol. 27, pp. 2037-2041, 2009.

- [94] M. G. Madariaga, K. Rezai, G. M. Trenholme, and R. A. Weinstein, "Q fever: a biological weapon in your backyard," *The Lancet infectious diseases*, vol. 3, pp. 709-721, 2003.
- [95] K. R. Bewley, "Animal models of Q fever (*Coxiella burnetii*)," *Comparative medicine*, vol. 63, pp. 469-476, 2013.
- [96] D. M. Waag, "*Coxiella burnetii*: host and bacterial responses to infection," *Vaccine*, vol. 25, pp. 7288-7295, 2007.
- [97] D. Achard and A. Rodolakis, "fever vaccination in ruminants: A critical review," *The Principles and Practice of Q Fever; Caetano Simoes, JC, Ferreira, AS, Jorge de Silva, G., Eds*, pp. 367-389, 2017.
- [98] Y. Peng, Y. Zhang, W. J. Mitchell, and G. Zhang, "Development of a lipopolysaccharide-targeted peptide mimic vaccine against Q fever," *The Journal of Immunology*, vol. 189, pp. 4909-4920, 2012.
- [99] Y. Peng, L. Schoenlaub, A. Elliott, W. J. Mitchell, and G. Zhang, "Characterization of a lipopolysaccharide-targeted monoclonal antibody and its variable fragments as candidates for prophylaxis against the obligate intracellular bacterial pathogen *Coxiella burnetii*," *Infection and immunity*, vol. 82, pp. 4530-4541, 2014.
- [100] M. Kermode, K. Yong, S. Hurley, and B. Marmion, "An economic evaluation of increased uptake in Q fever vaccination among meat and agricultural industry workers following implementation of the National Q Fever Management Program," *Australian and New Zealand journal of public health*, vol. 27, pp. 390-398, 2003.
- [101] M. Van Asseldonk, D. Bontje, J. Backer, H. van Roermund, and R. Bergevoet, "Economic aspects of Q fever control in dairy goats," *Preventive Veterinary Medicine*, vol. 121, pp. 115-122, 2015.
- [102] C. Alexia, M. Cren, P. Louis-Plence, D.-N. Vo, Y. El Ahmadi, E. Dufourcq-Lopez, et al., "Polyoxidonium® activates cytotoxic lymphocyte responses through dendritic cell maturation: Clinical effects in breast cancer," *Frontiers in immunology*, vol. 10, p. 2693, 2019.
- [103] S. V. Dambaeva, D. V. Mazurov, N. M. Golubeva, V. A. D'yakonova, B. V. Pinegin, and R. M. Khaitov, "Effect of polyoxidonium on the phagocytic activity of human peripheral blood leukocytes," *Russ J Immunol*, vol. 8, pp. 53-60, 2003.
- [104] V. A. Dyakonova, S. V. Dambaeva, B. V. Pinegin, and R. M. Khaitov, "Study of interaction between the polyoxidonium immunomodulator and the human immune system cells," *International immunopharmacology*, vol. 4, pp. 1615-1623, 2004.
- [105] V. Talayev, I. Zaichenko, M. Svetlova, A. Matveichev, O. Babaykina, E. Voronina, et al., "Low-dose influenza vaccine Grippol Quadrivalent with adjuvant Polyoxidonium induces a T helper-2 mediated humoral immune response and increases NK cell activity," *Vaccine*, vol. 38, pp. 6645-6655, 2020.

- [106] G. El'shina, M. Gorbunov, T. Bektimirov, N. Lonskaia, L. Pavlova, A. Nikul'shin, *et al.*, "The evaluation of the reactogenicity, harmlessness and prophylactic efficacy of Grippol trivalent polymer-subunit influenza vaccine administered to schoolchildren," *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii*, pp. 50-54, 2000.
- [107] B. S. Powell, A. K. Andrianov, and P. C. Fusco, "Polyionic vaccine adjuvants: another look at aluminum salts and polyelectrolytes," *Clinical and experimental vaccine research*, vol. 4, p. 23, 2015.
- [108] A. Karaulov, A. Bykov, and N. Volkova, "Review of grippol family vaccine studies and modern adjuvant development," *Epidemiology and Vaccinal Prevention*, vol. 18, pp. 101-119, 2019.
- [109] S. Elçiçek, "İmmunostimulan Polimerler ile Attenüe Edilmiş Leishmania Parazitlerinin Aşı Olarak Etkinliğinin *In Vitro* Ve *In Vivo* İncelenmesi," Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Programı Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul, 2013.
- [110] A. P. Zorba, "Leishmania Tropica Parazitlerinden Elde Edilen İmmünojen Moleküllere Karşı Tanıda Kullanılmak Üzere Hibridoma Teknolojisine Dayalı Antikor Üretilmesi," Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Programı Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul, 2015.
- [111] K. Kızılbaş, B. Mansuroğlu, S. Derman, and Z. Mustafaeva Akdeste, "An In vivo study: Adjuvant activity of poly-n-vinyl-2-pyrrolidone-co-acrylic acid on immune responses against Melanoma synthetic peptide," *Bioengineered*, vol. 9, pp. 134-143, 2018.
- [112] K. Kızılbaş, S. Derman, and Z. Mustafaeva, "Poly (N-vinyl-2-pyrrolidone-co-acrylic acid): Comparing of "Traditional Heating" and "Microwave-Assisted" Free Radical Polymerization," *J. Chem. Soc. Pak*, vol. 35, p. 1191, 2013.
- [113] A. Allahverdiyev, M. Bağirova, R. Ç. Koç, O. N. Öztel, S. Elçiçek, A. Sezen Canım, *et al.*, "Leishmaniasis Karşı Aşı Geliştirilmesinde Yaklaşımlar ve Problemler."
- [114] S. Tuğlu, "Biomolecule-polyelectrolyte conjugates," Yüksek Lisans, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2012.
- [115] B. R. Börklü, D. Daşdan Sakar, and M. Karahan, "Investigation of Different pHs and Salt Concentration Effects on the Stability of Poly (methyl vinyl ether-co-maleic anhydride)- Bovine Serum Albumin) Bioconjugate and Poly (methyl vinyl ether-co-maleic anhydride)- Cu²⁺-Bovine Serum Albumin) Biocomplex in Aquous Solutions," *J. Indian Chem. Soc*, vol. 97, pp. 1-6, 2020.
- [116] E. V. Atalay, İ. B. Ölüç, and M. Karahan, "A Docking Study: Modeling of BSA-Metal Ion-polycomplexes of Poly (Methyl Vinyl Ether-CO-Maleic Anhydride)," *Journal of Chemistry and Chemical Sciences*, vol. 8, pp. 955-963, 2018.
- [117] M. Karahan, Z. Mustafaeva, and H. Ozer, "Polysaccharide-protein covalent conjugates and ternary metal complexes," *Asian J. Chem*, vol. 19, pp. 1837-1845, 2007.

- [118] M. Karahan, Z. Mustafaeva, R. C. Koç, M. Bağirova, and A. M. Allahverdiyev, "Investigation of metal–polyelectrolyte complex toxicity," *Toxicology and industrial health*, vol. 30, pp. 384-389, 2014.
- [119] A. Filenko, M. Demchenko, Z. Mustafaeva, Y. Osada, and M. Mustafaev, "Fluorescence study of Cu²⁺-induced interaction between albumin and anionic polyelectrolytes," *Biomacromolecules*, vol. 2, pp. 270-277, 2001.
- [120] T. Acar, "Ebola Virüsüne Ait Sentetik Peptidin Polimer Konjugatlarının Ve Nanoformülasyonlarının Sentezi Ve Karakterizasyonu," Doktora Tezi, Biyomühendislik, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul, 2020.
- [121] S. Acar, "Peptid Protein Kovalent Konjugasyonu," Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2006.
- [122] S. Derman, "Canine Parvovirus'e Ait Antijenik Özellikli Sentetik Peptidlerin Sentezi ve Biyokonjugatlarının Geliştirilmesi," Doktora Tezi, Biyomühendislik, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2012.
- [123] Nalbantsoy A., Karaboz İ., and Deliloglu Gurhan İ., "Production of Monoclonal Antibodies in a Mouse Model via Lipopolysaccharide Conjugates with Synthetic Polymers Specific to Salmonella Enteritidis O Antigen Foodborne Pathogens And Disease," vol. 7, 2010.
- [124] Y. B. Kilinc, Z. M. Akdeste, R. C. Koc, M. Bagirova, and A. Allahverdiyev, "Synthesis and characterization of antigenic influenza A M2e protein peptide-poly (acrylic) acid bioconjugate and determination of toxicity in vitro," *Bioengineered*, vol. 5, pp. 357-362, 2014.
- [125] B. Mansuroğlu and Z. Mustafaeva, "Characterization of water-soluble conjugates of polyacrylic acid and antigenic peptide of FMDV by size exclusion chromatography with quadruple detection," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 32, pp. 112-118, 2012.
- [126] M. Topuzoğulları, N. S. Çimen, Z. Mustafaeva, and M. Mustafaev, "Molecular-weight distribution and structural transformation in water-soluble complexes of poly (acrylic acid) and bovine serum albumin," *European polymer journal*, vol. 43, pp. 2935-2946, 2007.
- [127] S. Derman, A. Katmıs, S. Fide, and S. Karaismailoglu, "Synthesis and characterization methods of polymeric nanoparticles," *Characterization and Application of Nanomaterials*, vol. 1, 2018.
- [128] S. Derman and Z. M. Akdeste, "Particle size and zeta potential investigation of synthetic peptide-protein conjugates/Sentetik peptid-protein konjugatlarının parçacık boyutu ve zeta potansiyel analizi," *Turkish Journal of Biochemistry*, vol. 40, pp. 282-289, 2015.
- [129] G. Karakus, A. Ece, A. S. Yaglioglu, H. B. Zengin, and M. Karahan, "Synthesis, structural characterization, and antiproliferative/cytotoxic effects of a novel modified poly (maleic anhydride-co-vinyl acetate)/doxorubicin conjugate," *Polymer Bulletin*, vol. 74, pp. 2159-2184, 2017.

- [130] Kılınç Budama Y., "Influenza A Virüsüne Ait Sentetik Peptidlerin Polielektrolitlerle Konjugasyon Reaksiyonunun Floresans Rezonans Enerji Transferi Ve Diğer Yöntemlerle İncelenmesi," Doktora, FBE, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul, 2013.
- [131] Y. Coşkun, K. Özlem, Y. Koçyiğit, and A. T. Erdoğan, "Ticari Bir Florfenikol Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) Test Kiti ile Florfenikolün Tespit Edilememesi Durumu," *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, vol. 27, pp. 75-81, 2016.
- [132] S. Aydın, "A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA," *Peptides*, vol. 72, pp. 4-15, 2015.
- [133] E. Engvall, "The ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay," *Clinical chemistry*, vol. 56, pp. 319-320, 2010.
- [134] R. M. Lequin, "Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)," *Clinical chemistry*, vol. 51, pp. 2415-2418, 2005.
- [135] S. D. Gan and K. R. Patel, "Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay," *J Invest Dermatol*, vol. 133, p. e12, 2013.
- [136] S. Sakamoto, W. Putalun, S. Vimolmangkang, W. Phoolcharoen, Y. Shoyama, H. Tanaka, *et al.*, "Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites," *Journal of natural medicines*, vol. 72, pp. 32-42, 2018.
- [137] M. Alhajj and A. Farhana, "Enzyme Linked Immunosorbent Assay," *StatPearls*, 2020.
- [138] G. Chaudhari, S. Kavil, D. Ullal, S. Kadam, D. Bakre, S. Gubbewad, *et al.*, "An Overview On Elisas Techniques For Analyte Detection To New Levels: A Review," *Editorial Board*, vol. 3, p. 172, 2014.
- [139] E. İ. Başak, "Alzheimer Amiloid Beta Peptidine Ait Farklı Amino Asid Dizilerinin Polielektrolitler ile Konjugasyon Reaksiyonlarının İncelenmesi," Doktora Tezi, Biyomühendislik, Yıldız Teknik Üniversitesi FBE, İstanbul, 2014.
- [140] R. Toman and L. u. Škultéty, "Structural study on a lipopolysaccharide from Coxiella burnetii strain Nine Mile in avirulent phase II," *Carbohydrate research*, vol. 283, pp. 175-185, 1996.
- [141] R. Toman and V. Pätöprstý, "A comparative study of lipopolysaccharides from two Coxiella burnetii strains considered to be associated with acute and chronic Q fever," *Carbohydrate polymers*, vol. 35, pp. 189-194, 1998.
- [142] J. Williams, M. G. Peacock, and T. F. McCauley, "Immunological and biological characterization of Coxiella burnetii, phases I and II, separated from host components," *Infection and Immunity*, vol. 32, pp. 840-851, 1981.
- [143] A. Hussein and R. Toman, "Structural analyses of the lipopolysaccharides from Chlamydophila psittaci strain 6BC and Chlamydophila pneumoniae strain Kajaani 6," *Carbohydrate research*, vol. 336, pp. 213-223, 2001.

- [144] H. Uelzmann, "Copolymers of acrylic acid and N-vinylpyrrolidone-2," *Journal of Polymer Science*, vol. 33, pp. 377-379, 1958.
- [145] M. Karahan, "Metal İçeren Fonksiyonel Biyopolimer Sistemlerin Geliştirilmesi," Doktora Tezi, Kimya Anabilim Dalı, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2009.
- [146] M. Karahan, A. Z. Mustafaeva, and C. Özeroğlu, "Fluorescence and dynamic light scattering studies for the formation of ternary complexes of polyacrylic acid with bovine serum albumin in the presence of metal ions," *The Protein Journal*, vol. 29, pp. 336-342, 2010.
- [147] M. Karahan, A. Z. Mustafaeva, and C. Özeroğlu, "The formation of polycomplexes of poly(methyl vinyl ether maleic anhydride) and bovine serum albumin in the presence of copper ions," *Polish Journal of Chemical Technology*, vol. 16, pp. 97-105, 2014.
- [148] M. Karahan, A. S. Öztürkcan, and A. Z. Mustafaeva, "Antitumor Activity of Polyelectrolytes metal Complexes," *Romanian Biotechnological Letters*, vol. 18, pp. 8447-8455, 2013.
- [149] M. Karahan, A. Z. Mustafaeva, R. Koç-Çakır, M. Bağirova, and M. A. Allahverdiyev, "Investigation of Metal-Polyelectrolyte complexes Toxicity," *Toxicology and Industrial Health*, vol. 30, pp. 384-389, 2014.
- [150] Arayıcı-Pelit. P., T. Acar, M. A. Maharramov, M. Karahan, and Z. Mustafaeva, "Synthesis And Characterization Of Bioconjugates Of Antigenic Rabies Virus Peptide Epitope With Polyacrylic Acid (PAA). ," *Fresenius Environmental Bulletin*, vol. 26, pp. 2753-2759, 2017.
- [151] G. T. Hermanson, *Bioconjugate techniques*: Academic press, 2013.
- [152] Z. Mustafaeva, "Synthesis and physicochemical characterization of covalent conjugates: Sheep-pox disease's synthetic peptide-polyacrylic acid," *Fresenius Environmental Bulletin*, vol. 26, pp. 1622-1628, 2017.
- [153] T. Acar, B. Ucar, P. Arayici, S. Derman, and Z. Mustafaeva, "Covalent Conjugation and Characterization of the Ebola Nucleoprotein 421-430 Peptide with Polyacrylic Acid," 2020.
- [154] M. Mustafaev, Z. Mustafaeva, E. Ergen, Y. Uraki, and Y. Sano, "Novel Betulin-Containing Polyelectrolyte Conjugates," *Journal of Bioactive And Compatible Polymers*, vol. 17, pp. 251-269, 2002.
- [155] K. Kızılbey, "Melanoma hastalığını oluşturan sentetik peptidlerin poliakrilikasit ve kopolimerleri ile konjugasyonu," doktora Tezi, FBE, YTÜ, İstanbul, 2012.
- [156] K. Slabá, L. Škultéty, and R. Toman, "Efficiency Of Various Serological Techniques For Diagnosing Coxiella Burnetii Infection," *Acta virologica*, vol. 49, pp. 123-127, 2005.
- [157] E. Kováčová, D. Cmarko, V. Mucha, R. Toman, F. Čiampor, P. Kosma, *et al.*, "Analysis Of Specificity Of Interaction Between Synthetic Key Saccharide

Components Of Lipopolysaccharides And Monoclonal Antibodies To *Coxiella Burnetii*," *Acta virologica* vol. 49, pp. 261-270, 2005.

- [158] M. Altikatoglu, Y. Basaran, C. Arioz, A. Ogan, H. Kuzu, "Glucose Oxidase-dextran Conjugates with Enhanced Stabilities Against Temperature and pH," *Appl Biochem Biotechnol*, vol. 160, pp. 2187-2197, 2010.
- [159] M. Altikatoglu, C. Arioz, Y. Basaran, and H. Kuzu, "Stabilization of horseradish peroxidase by covalent conjugation with dextran aldehyde against temperature and pH changes," *Cent. Eur. J. Chem.*, pp. 423-428, 2009.
- [160] Wu X., W. Wang, L. Liu, Kuang H., and C. Xu, "Monoclonal antibody-based cross-reactive sandwich ELISA for the detection of *Salmonella* spp. in milk samples," *Anal. Methods*, vol. 7, pp. 9047-53., 2015.
- [161] J. Maia, L. Ferreirab, R. Carvalhoc, A. M. Ramosd, and H. Gila, M., "Synthesis and characterization of new injectable and degradable dextran-based hydrogels," *Polymer*, vol. 46, pp. 9604-9614, 2005.
- [162] M. Topuzogullari, R. C. Koc, S. D. Isoglu, M. Bagirova, A. Z. Mustafaeva, S. Elcicek, *et al.*, "Conjugation, characterization and toxicity of lipophosphoglycan-polyacrylic acid conjugate for vaccination against leishmaniasis," *Journal of biomedical science*, vol. 20, p. 35, 2013.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Makaleler

1. Pelin PELİT ARAYICI, Tayfun ACAR, Mesut KARAHAN, Serap DERMAN, Zeynep MUSTAFAEVA, Rudolf TOMAN, Development of Lipopolysaccharide-Polyoxidonium Complexes and Conjugates against the Q Fever Disease for Application Purpose of Vaccine Prototype

Konferans Bildirileri

1. Water-soluble covalent conjugates of Lipopolysaccharide with Bovine Serum Albumin, Karahan M., PELİT ARAYICI P., Kandur M. Y., Frimmelova M., Toman R., Mustafaeva Z. , 6th EuCheMS Chemistry Congress, Seville, İspanya, 11 Eylül 2016.

2. Lipopolysaccharide-poly (N-vinyl-2-pyrrolidone-*ko*-acrylic acid) complex synthesis for development of diagnostic kit for Q fever, Arayici P., Karahan M., FRIMMELOVA M., TOMAN R., MUSTAFAEVA Z. A., 41st FEBS Congress on Molecular and Systems Biology for a Better Life, Kusadasi, Türkiye, 3-08 Eylül 2016, cilt.283, ss.317-318.

3. Development of Lipopolysaccharide-Polyoxidonium Complex As A Candidate Vaccine Against Q Fever, 4th Biotechnology World Congress, Sharjah, Birleşik Arap Emirlikleri, 15 Şubat 2016, ss.170, Karahan M., PELİT ARAYICI P., Acar T., Mustafaeva Z., Frimmelova M., Toman R.

4. Q Humması Hastalığına Karşı LPS-Polioksidonyum Aşı Prototipinin Geliştirilmesi, PELİT ARAYICI P., Acar T., Karahan M., Toman R., Mustafaeva Z., 19. Ulusal Parazitoloji Kongresi & Uluslararası Katılımlı Ekinokokkozis Sempozyumu, Erzurum, Türkiye, 05 Ekim 2015, ss.204

Projeler

1. 2513-TUBITAK and Slovak Academy of Sciences Bilateral Cooperation Project 113Z938-'Development of Lipopolysaccharide-Biopolymer Complex and Conjugates Against the Q Fever Disease For Application Purpose of Vaccine Prototype and Diagnostic Kit

2. YTU BAPK, DOP, 2016-07-04-DOP05 numaralı BAP projesi

Ödüller

1. Yıldız Teknik Üniversitesi Rektörlüğü, Bilimsel Yayın Teşvik Ödülü, 2020.

2. TÜBİTAK BİDEB 2211-C Öncelikli alanlara yönelik doktora bursu (2017).