

**T.C.**  
**EGE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSİTÜSÜ**

**GLİKOZAMİNOGLİKAN TAYİNİ İÇİN MOLEKÜLER  
BASKILANMIŞ KROMATOĞRAFİK KOLON DOLGU  
MATERYALİ GELİŞTİRİLMESİ**

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZİ HAZIRLAYAN**  
**ZİHNİ ONUR UYGUN**

**DANIŞMANLAR**  
**PROF. DR. FERHAN GİRGİN SAĞIN**  
**DOÇ. DR. BURCU OKUTUCU**

**İZMİR**  
**2016**

**T.C.**  
**EGE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSİTÜSÜ**

**GLİKOZAMİNOGLİKAN TAYİNİ İÇİN MOLEKÜLER  
BASKILANMIŞ KROMATOĞRAFİK KOLON DOLGU  
MATERYALİ GELİŞTİRİLMESİ**

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZİ HAZIRLAYAN**  
**ZİHNİ ONUR UYGUN**

**DANIŞMANLAR**  
**PROF. DR. FERHAN GİRGİN SAĞIN**  
**DOÇ. DR. BURCU OKUTUCU**

**İZMİR**  
**2016**

## TEZ DEĞERLENDİRME KURULU SAYFASI

Zihni Onur UYGUN tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “Glikozaminoglikan tayini için moleküler baskılanmış kromatografik kolon dolgu materyali geliştirilmesi” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 20.01.2016 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği ile başarılı bulunmuştur.

### Jüri Üyeleri:

### İmza

**Jüri Başkanı** : Prof. Dr. Ferhan GİRGİN SAĞIN

.....

**2. Danışman** : Doç. Dr. Burcu OKUTUCU

.....

**Üye** : Prof. Dr. Gül Hüray İŞLEKEL

.....

**Üye** : Prof. Dr. Yasemin AKÇAY

.....

## ÖNSÖZ

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde ve tüm yüksek lisans sürecimde, tavsiyeleri ile yoluma ışık tutan danışman hocam Prof. Dr. Ferhan SAĞIN'a teşekkür ederim.

Lisans eğitimimden itibaren tavsiyelerini ve yönlendirmelerini esirgemeyen, ikinci danışmanım Doç. Dr. Burcu OKUTUCU'ya teşekkür ederim.

Her zorluğu benimle göğüsleyen, aldığım her kararda bana tam destek veren hayat arkadaşım Hilmiye Deniz ERTUĞRUL UYGUN'a çok teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemi sağlayan maddi ve manevi desteği ile yanımdan hiç ayrılmayan annem Ayten UYGUN, babam Metin UYGUN ve kardeşim Melike UYGUN'A teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımda bana yardımcı olan Ege Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Son olarak Ege Üniversitesi'ne 2015-TIP-025 numaralı BAP projemize verdiği maddi destekten ötürü teşekkür ederim.

İzmir-2016

Zihni Onur UYGUN

## ÖZET

Hücrelerarası alanın en yaygın moleküllerinden olan proteoglikanların temel yapısında, 'core protein'e (çekirdek protein) kovalan olarak bağlanmış bir ya da daha fazla glikozaminoglikan (GAG) zinciri bulunmaktadır. İdrarla eksrete edilen GAG düzeyleri, lizozomal depo hastalıklarının, özellikle de mukopolisakkaridozların tayin ve izleminde kullanılırlar. Son yıllarda ise idrar GAG tayininin değişik hastalıklarda (kronik böbrek rahatsızlıkları, renal fibroz, glomerüler filtrasyon sorunları, mesane taşı, meme ve akciğer kanserleri, hipertansiyon ve diyabet, vb.) bir belirteç olarak kullanılabileceğini gösteren çalışmalar yayımlanmıştır. Bu gelişmelere karşılık, GAG yapısının yüksek polaritesi ve mikroheterojenitesi idrar GAG analizlerinin oldukça zor olmasına yol açmaktadır. Bu nedenle GAG analizi için yeni, spesifik ve kolay uygulanabilir yöntemler geliştirilmesine gereksinim bulunmaktadır. Bu çalışmada, biyolojik olarak tayinleri büyük öneme sahip Glikozaminoglikan türlerinden Heparan sülfat, kondroitin sülfat ve dermatan sülfat tayini ve ayırımı için kromatografik kolon materyali geliştirildi. Öncelikle bu üç Glikozaminoglikan kimyasal olarak parçalanmış elde edilen fragmanlar kütle spektrometresinde, Multiple Reaction Monitoring(MRM) ve Surface Induced Reaction(SIR) ile incelendi. Bu analizler ile elde edilen fragmanların bir kütüphanesi oluşturuldu. Bu ölçümlere göre polimerler karakterize edilmiştir. Moleküler baskılanmış polimer materyalleri de sadece bu üç moleküle karşı seçicilik gösteren, glikozaminoglikanların negatif yüklü sülfat gruplarına non-iyonik ilgi gösteren akrilamid monomerinden elde edildi. Bu polimeri elde edebilmek için presipitasyon polimerizasyon tekniğinde termal polimerizasyon ile hazırlanmış moleküler baskılama tekniği kullanıldı. Bu teknikle elde edilen polimerler, çelik HPLC kolonu içerisine doldurulmuş, sonrasında yıkanarak içerisinde baskılanmış, Glikozaminoglikanlar uzaklaştırılmış sonrasında ise bu baskılanmış polimerler örnek uygulamasından sonra, tutma kapasitelerine bağlı olarak karakterize edildiler. Ölçümlerde kolon elüsyon zamanı her onbeş dakikada bir toplanan fraksiyonlara göre yapılmış ve farklı baskılanmış kolonlara göre farklı zamanlar bulunmuştur. Farklı zamanlara göre pompa sisteminde elüsyon uygulanarak örnek uygulaması yapılmış ve karakterizasyonu buna göre gerçekleştirildi. Standart grafiklerin oluşturulmasında 1000ng/mL'nin altındaki düzeylerde seri dilüsyon ile standart grafikleri oluşturulmuştur. İdrar örneklerinde ise ölçümdeki doğruluk gücünü artırmak için idrara 500ng/mL miktarda her bir glikozaminoglikandan eklenmiştir. Baskılanmamış kör polimer ile yapılan çalışmalarda ise glikozaminoglikanlara seçicilik gösterilmemiştir. Gerçekleştirilen bu çalışma, idrar ile atılan GAG'ların seçimli bir şekilde ayrılması ve böylelikle daha doğru, daha hızlı ve daha ekonomik tayini için moleküler damgalama yöntemiyle kromatografik kolon dolgu materyali geliştirilmesi hipotezine dayanmış ve başarılı bir şekilde bu hipotez kanıtlanmıştır. Bu yeni metodolojik yaklaşımla hazırlanan GAG seçimli polimerle, analiz edilen idrar örneklerinde GAG molekülleri kromatografik olarak daha doğru ve daha hızlı ve ekonomik bir şekilde ayrıştırılacaktır. Böylelikle idrar GAG analizinde yeni ve kolay bir yöntem geliştirildi ve bu polimer GAG ile ilişkili hastalıkların izlenmesindeki eksikliği/kısıtlılıkları gidererek GAG tayini çalışmalarında kromatografik kolon dolgu materyali olarak rutinde kullanılabilecektir.

**Anahtar Kelimeler:** Glikozaminoglikan; moleküler damgalama; kromatografi, tandem kütle spektroskopisi, Heparan sülfat, kondroitin sülfat, dermatan sülfat, kondroitin sülfat A, presipitasyon polimerizasyonu.

## ABSTRACT

Proteoglycans which are among the most abundant molecules of the inter-cellular structure contain one or more glycosaminoglycan (GAG) chains that are covalently attached to the core protein. The levels of GAG excreted via urine is used as a marker to monitor and detect lysosomal storage diseases, especially mucopolysaccharidoses. Recently, studies that report GAG as a useful biomarker in different diseases (chronic renal disease, renal fibrosis, glomerular filtration abnormalities, bladder stones, breast and lung cancers, hypertension and diabetes etc.) have been published. However, GAG analysis is not simple due to the high polarity and microheterogeneity of GAG structure. Therefore there is a need to develop new, specific and easily applicable methods for GAG analysis. In this study, determination of biologically important species of glycosaminoglycans, heparan sulfate, chondroitin sulfate and dermatan sulfate determination was carried out by an improved material for chromatographic column separation. First of all, these three glycosaminoglycans were chemically broken into fragments, afterwards these fragments were characterized by mass spectrometry, which were Multiple Reaction Monitoring (MRM) and Surface Induced Reaction (SIR) were evaluated, specifically, then a library was created from obtained fragments. Polymers based on these measurements have been characterized. Molecularly imprinted polymer material can only exhibiting selectivity against these three molecules to glycosaminoglycans negatively charged sulfate groups of those showing non-ionic interest was derived from acrylamide monomer. The polymers prepared by the precipitation polymerization technique as a molecular imprinting technique obtained by thermal polymerization. By using this technique, the resulting polymers were filled to steel HPLC column, after quenched washing, and after the removal of glycosaminoglycans from these imprinted polymers, the sample application were characterized based on the retention capacity. According to different retention times, the characterization was carried out by considering these results. Standard graphics creation was carried out in the serial dilution at 1000ng / ml the highest level. Glycosaminoglycan detection in urine was also carried out and to increase the accuracy 500 ng/mL GAGs were added to each urine samples. In studies with non-imprinted polymers, glycosaminoglycan selectivity was not shown. By performing this assay development to design a chromatographic column solid state material on the selection of discharged GAGs in urine was performed more accurate, faster and more economical. This new methodological approach prepared by selective polymers for GAGs, GAG molecules in urine samples analyzed more accurately and faster and they will be used in chromatographic separation in an economical manner. Thus, we developed a new and easy method of urine GAG analysis and monitoring of of these diseases associated with GAG determination by polymers overcoming limitations/shortcomings and they could be used in routine chromatographic column packing material.

**Keywords:** glycosaminoglycan, Molecular imprinting, chromatography, tandem mass spectrometry, Heparan sulfate, chondroitin sulfate, dermatan sulfate, chondroitin sulfate A, precipitation polymerization.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                                                     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| TEZ DEĞERLENDİRME KURUL SAYFASI.....                                                                                                | i   |
| ÖNSÖZ.....                                                                                                                          | ii  |
| ÖZET.....                                                                                                                           | iii |
| ABSTRACT.....                                                                                                                       | iv  |
| TABLOLAR.....                                                                                                                       | vi  |
| ŞEKİLLER.....                                                                                                                       | vii |
| GİRİŞ.....                                                                                                                          | 1   |
| 1. GLİKOZAMİNOGLİKANLAR.....                                                                                                        | 2   |
| 1.1. Glikozaminoglikanların Biyolojik Önemleri ve Hastalıklarla İlişkisi..                                                          | 2   |
| 1.2. Kromatografik GAG Ölçüm Yöntemleri.....                                                                                        | 5   |
| 1.3. Moleküler Baskılama.....                                                                                                       | 6   |
| 1.3.1. Moleküler Baskılanmış Polimerleri Hazırlama Yöntemleri..                                                                     | 8   |
| 1.3.2. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Kromatografide<br>Kullanımı.....                                                          | 8   |
| 1.4. Tandem Kütle Spektroskopisi (MS/MS).....                                                                                       | 10  |
| 2. GEREÇ VE YÖNTEM.....                                                                                                             | 13  |
| 2.1. Gereç.....                                                                                                                     | 13  |
| 2.2. Yöntem.....                                                                                                                    | 14  |
| 2.2.1. Kütle Spektroskopisinde GAG Standart Grafiklerinin<br>İnfüzyonu(Bileşenlerin Optimizasyonu) ve GAG Tayini .....              | 14  |
| 2.2.2. GAG Saflaştırılması.....                                                                                                     | 14  |
| 2.2.3. Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Hazırlanması, HPLC<br>kolonuna doldurulması ve GAG'ların HPLC Kolonundan<br>Elüsyonu..... | 15  |
| 2.2.4. Kütle Spektroskopisinde GAG Standart Grafiklerinin<br>Oluşturulması ve GAG Tayini.....                                       | 16  |
| 2.2.5. Kromatografik Kolon Dolgu Materyallerinin<br>Karakterizasyonu.....                                                           | 16  |
| 2.2.6. Gerçek Örneklerin Kolona Uygulanması.....                                                                                    | 17  |
| 2.2.7. Kütle Spektroskopisinden Elde Edilen Veriler ile GAG<br>Miktarının Hesaplanması.....                                         | 17  |
| 3. BULGULAR.....                                                                                                                    | 18  |
| 3.1 Kütle Spektroskopisinin (MS) Optimizasyonu ve Standart<br>Grafiklerinin Hazırlanması.....                                       | 18  |
| 3.2 Polimerlerin Hazırlanması ve HPLC Kolonuna Doldurulması.....                                                                    | 31  |
| 3.3 Kromatografik Kolon Dolgu Materyallerinin<br>Karakterizasyonu.....                                                              | 33  |
| 3.4 Gerçek Örnek Denemeleri.....                                                                                                    | 35  |
| 3.5 Baskılanmamış Kromatografik Kolon Dolgu Materyalleri ile GAG<br>Analizi.....                                                    | 36  |
| 4. TARTIŞMA.....                                                                                                                    | 37  |
| 5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....                                                                                                           | 40  |
| KAYNAKLAR.....                                                                                                                      | 41  |
| ÖZGEÇMİŞ.....                                                                                                                       | 46  |

## TABLÖLAR

|                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 1. Değişik MPS'lerde görülen klinik hastalık tablosu, lizozomal enzim eksiklikleri ve GAG tipleri..... | 4  |
| Tablo 2. Ölçülen GAG fragmanlarının ana iyonları ve yavru iyonları.....                                      | 18 |
| Tablo 3. Standart grafik aralıkları ve ölçüm tipleri.....                                                    | 18 |
| Tablo 4. Glikozaminoglikanların konsantrasyon hesapları(C: Konsantrasyon).....                               | 31 |
| Tablo 5. GAG seçimli polimerlerin elüsyon zamanı optimizasyonu.....                                          | 33 |
| Tablo 6. İdrar örnekleri ve bulunan sonuçlar (n=6).....                                                      | 36 |
| Tablo 7. NIP Polimer Karakterizasyonu.....                                                                   | 36 |



## ŞEKİLLER

|                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1. Proteoglikan genel yapısı ve GAG'ların ekstraselüler matrikste yerleşimi.....                  | 2  |
| Şekil 2. GAG'ların tekrarlanan disakkarit yapıları.....                                                 | 3  |
| Şekil 3. HSA, CS ve DS disakkarit birimleri kimyasal gösterimi.....                                     | 3  |
| Şekil 4. Şematize edilmiş MIT.....                                                                      | 7  |
| Şekil 5. MISPE Kolonu kromatografik prosesi.....                                                        | 9  |
| Şekil 6. Şematik ESI.....                                                                               | 10 |
| Şekil 7. Şematik Water-TQD MS/MS kısımları.....                                                         | 11 |
| Şekil 8. Şematik Target Lynx Kromatogram alan hesabında kullanılan grafik(x; dakika, y; sinyal %). .... | 17 |
| Şekil 9 A ve B. A: 0,48-8 ng/mL B: 0,48-1000 ng/mL DS 448,2>258,2 MRM standart grafikleri.....          | 19 |
| Şekil 10. DS MRM standart grafiği kromatogramları, ve DS hesaplaması.....                               | 20 |
| Şekil 11 A ve B. A: 0,12-15 ng/mL B: 0,12-1000 ng/mL DS 338,2 SIR standart grafikleri... ..             | 21 |
| Şekil 12. DS SIR standart grafiği kromatogramları ve DS hesaplaması.....                                | 22 |
| Şekil 13 A ve B. A: 0,0075-0,5 ng/mL B: 0,0075-1000 ng/mL CS 394,2>138,1 MRM standart grafikleri.....   | 23 |
| Şekil 14. CS MRM standart grafiği kromatogramları ve CS hesaplaması.....                                | 24 |
| Şekil 15 A ve B. A: 0,06-8 ng/mL B: 0,06-1000 ng/mL CS 448,2 SIR standart grafikleri....                | 25 |
| Şekil 16. CS SIR standart grafiği kromatogramları.....                                                  | 26 |
| Şekil 17 A ve B. A: 0,06-8 ng/mL B: 0,06-1000 ng/mL HSA 637,3>581,3 MRM standart grafikleri.....        | 27 |
| Şekil 18. HSA MRM standart grafiği kromatogramları.....                                                 | 28 |
| Şekil 19 A ve B. A: 0,48-8 ng/mL B: 0,48-1000 ng/mL HSA 663,5>551,3 MRM standart grafikleri.....        | 29 |
| Şekil 20. HSA MRM standart grafiği kromatogramları.....                                                 | 30 |
| Şekil 21. Akrilamid ve akrilamid polimerlerinin kimyasal gösterimi.....                                 | 31 |
| Şekil 22. TRIM kimyasal yapısı.....                                                                     | 32 |
| Şekil 23. Waters X-Bridge HPLC kolonu.....                                                              | 33 |
| Şekil 24. Aynı polimere 7 kez DS 500 ng/mL örnek uygulaması.....                                        | 34 |
| Şekil 25. Aynı polimere 8 kez CS 500 ng/mL örnek uygulaması.....                                        | 34 |
| Şekil 26. Aynı polimere 11 kez HSA 500 ng/mL örnek uygulaması.....                                      | 35 |

## GİRİŞ

Vücut sekresyon sıvıları, çoğu hastalığın tanısında, progresyonu belirlemede ya da sürecin izlenmesinde son derece yaygın olarak kullanılan biyolojik sıvılardır. Bu sıvıların içerisindeki maddelerin konsantrasyonuna bağlı olarak hastalıklar hakkında bilgi edinilebilir, erken teşhis koyulabilir, tedaviye yanıt izlenebilir.

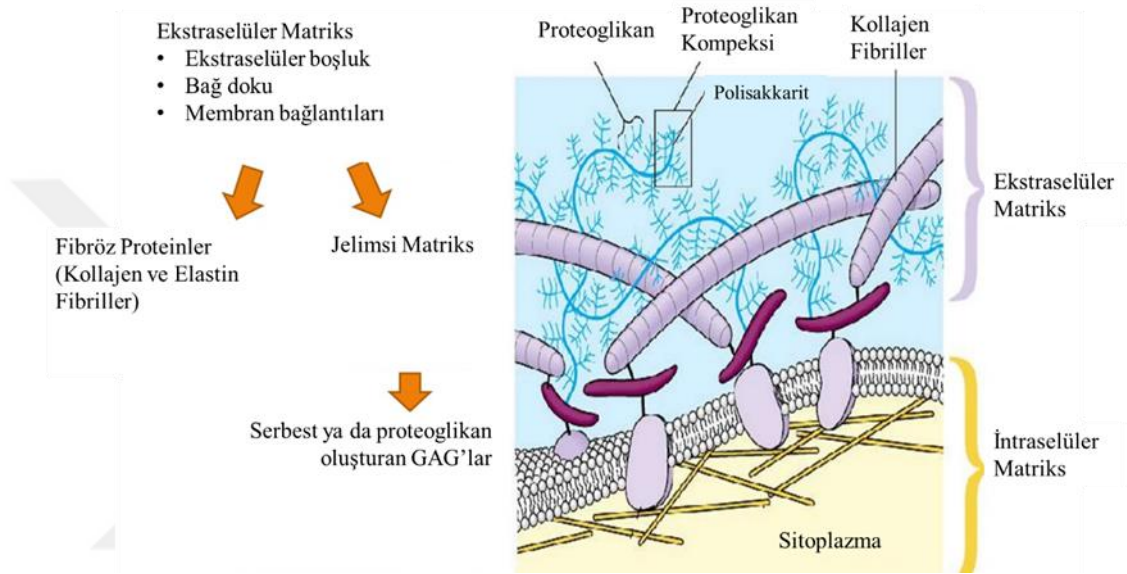
Hücrelerarası alanın en yaygın moleküllerinden olan proteoglikanların temel yapısında, 'core protein'e (çekirdek protein) kovalent olarak bağlanmış bir ya da daha fazla glikozaminoglikan (GAG) zinciri bulunmaktadır. İdrarla ekscrete edilen GAG düzeyleri, lizozomal depo hastalıklarının, özellikle de mukopolisakkaridozların tayin ve izleminde kullanılırlar. Son yıllarda ise idrar GAG tayininin değişik hastalıklarda (kronik böbrek rahatsızlıkları, renal fibroz, glomerüler filtrasyon sorunları, mesane taşı, meme ve akciğer kanserleri, hipertansiyon ve diabet, vb.) bir belirteç olarak kullanılabileceğini gösteren çalışmalar yayımlanmıştır. Bu gelişmelere karşılık, GAG yapısının yüksek polaritesi ve mikroheterojenitesi idrar GAG analizlerinin oldukça zor olmasına yol açmaktadır. Bu nedenle GAG analizi için yeni, spesifik ve kolay uygulanabilir yöntemler geliştirilmesine gereksinim bulunmaktadır.

Bu çalışma da, moleküler baskılama yöntemiyle GAG'a spesifik seçici polimerlerin hazırlanmasını ve bu polimerlerin boş bir kromatografi kolonuna dolgu materyali olarak yerleştirilmesini, böylelikle tasarlanmış olan özel GAG tutucu polimer ile idrarda GAG tayininde ayırım işleminin hızlandırılmasını ve daha seçici bir yöntem geliştirilmesini hedeflemektedir. Bu hedefe yönelik olarak idrar GAG atılımının en yüksek düzeyde olduğu 0-3 yaş arası sağlıklı çocuk idrarlarından GAG seçici olarak moleküler baskılama yöntemiyle GAG baskılanmış polimerler olarak hazırlanmış kromatografik kolon dolgu materyali geliştirilmiştir. İkinci aşamada ise, hazırlanan baskılanmış polimerler kromatografik kolonlara yerleştirilmiş, bu kolonlar taşıma kapasiteleri ve kullanılabilirlikleri açısından incelenmiş ve karakterize edilmiştir.

Böylelikle idrar GAG tayiniyle ilgili yeni, ekonomik, seçici ve kolay uygulanabilir bir materyal elde edilmiştir. Moleküler baskılama yöntemiyle geliştirilecek bu GAG seçici kromatografik kolon dolgu materyali sayesinde GAG ayırımında tayin işleminin basitleştirilmesinin yanı sıra çok sayıda ve düşük örnek hacmiyle çalışılabilmesi, yüksek seçicilik ve farklı bileşiklerin olduğu karmaşık vücut sıvılarından ayırım gibi yaygın kullanımı artıracak avantajlar yakalanmıştır. Sonuçta, bu yöntemle idrarda GAG tayinlerinin önemli olduğu hastalıklarda hastanın tanı ve izleminde önemli bir ölçüm kolaylığı sağlanarak sağlık alanında katma bir değer elde edilmesi beklenmektedir.

## 1. GLİKOZAMİNOGLİKANLAR

Glikozaminoglikanlar proteoglikan olarak adlandırılan hücreler arası alanda bol olarak bulunan moleküllerin polisakkarit bileşenleridir ve karbohidrat içerikleri total proteoglikan molekül ağırlığının %60-90'ını oluşturmaktadır. Vücutta en fazla bulunan heteropolisakkaritler olan proteoglikanların yapısında, temel proteoglikan birimi olan 'core protein'e (çekirdek protein) kovalan olarak bağlanmış bir ya da daha fazla glikozaminoglikan (GAG) zinciri bulunmaktadır (Şekil 1).

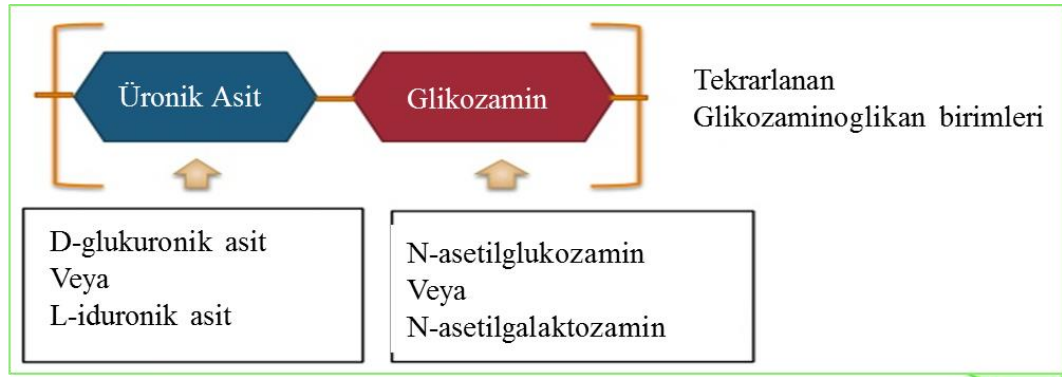


Şekil 1. Proteoglikan genel yapısı ve GAG'ların ekstraselüler matrikste yerleşimi

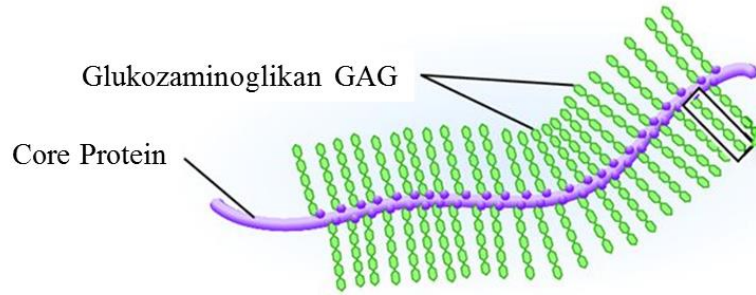
GAG'lar amino ve üronik şekerler içeren tekrarlayan disakkarid birimleri olup dallanmamış bir polisakkarit yapıdadırlar. İçerdikleri şeker grubu, gruplar arasındaki bağlantı tipi, sülfat gruplarının yerleşimi ve sayılarına göre; hyalüronik asit (HA), kondroitin sülfat (CS), dermatan sülfat (DS), heparan sülfat (HSA) ve keratan sülfat (KS) gibi farklı şekillerde adlandırılırlar (1,2).

### 1.1. GAG'ların Biyolojik Önemleri Ve Hastalıklarla İlişkileri

Kimyasal olarak büyük lineer polisakkaritler olan ve tekrarlanan şeker birimlerinden oluşan GAG'ların birincil konfigürasyonunda amino şekerlerden, N-asetilglukozamin (GlcNAc), N-asetil galaktozamin (GalNAc) ve üronik asit bulunmaktadır. (Şekil 2). Bu GAG birimlerinden CS ve DS (kondroitin sülfat B), GalNAc ve üronik asitlerin  $\beta(1\rightarrow4)$  ya da  $\beta(1\rightarrow3)$  bağları ile bağlanması sonucunda meydana gelir.



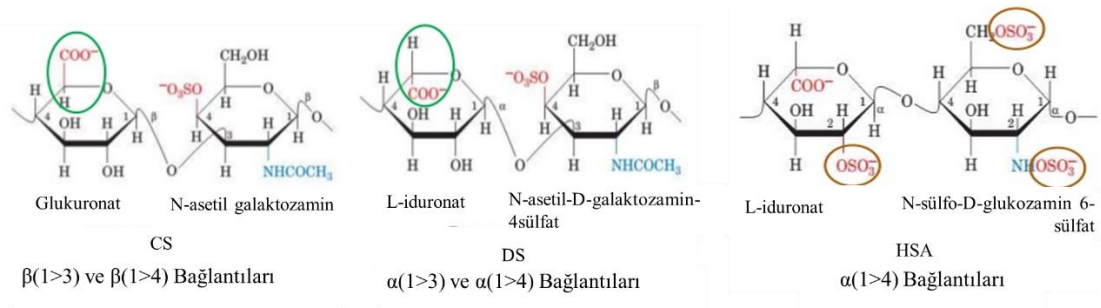
Glukozaminoglikan diasakkarit yapısı



Şekil 2. GAG'ların tekrarlanan diasakkarit yapıları

CS ayrıca glukuronik asit ve 4-O-sülfatlanmış ya da 6-O-sülfatlanmış birimler içerir. DS'nın yapısında ise GalNAc yanı sıra L-üronik asit şeklinde üronik asit birimi bulunur (Şekil 3) (3,4).

HSA ve heparin GAG ürünleri ise kompleks heterojen tekrar eden şeker ürünlerini ( L-üronik asit ve sülfatlanmış GlcNAc birimleri) içerir (Şekil 3). Sülfatlanma derecesi ise her monosakkaritte 0-3 sülfatlanma şeklindedir. HSA, heparinden daha az sülfatlanır (5).



Şekil 3. CS, DS ve HSA disakkarit birimleri kimyasal gösterimi

KS üronik asit içermemesi nedeniyle diğer GAG'lardan farklıdır. Bu durumda bu moleküller bazen N veya O bağı ile proteinlere bağlanabilmektedirler.

GAG üzerindeki sülfat ve üronik asit grupları GAG molekülüne negatif yüklü bir çevre kazandırmaktadır. Böylelikle katyon ve su bağlanması kolaylaşmış olup yüksek miktarda su tutabilen molekül, koyu kıvamlı jel bir matriks yapısı oluşturur.

GAG molekülleriyle ilişkili bozukluklar, çoğu zaman genetik geçişlidirler ve membrana bağlı GAG'ların yıkımında görev alan lizozomal hidrolaz grubu enzimlerin eksikliği sonucu ortaya çıkmaktadırlar (Tablo 1).

**Tablo 1.** Değişik MPS'lerde görülen klinik hastalık tablosu, ilişkili sendrom, lizozomal enzim eksiklikleri ve biriken GAG tipleri (6)

| Hastalık  | Sendrom                 | Enzim Eksikliği                                       | GAG Tipi   |
|-----------|-------------------------|-------------------------------------------------------|------------|
| MPS I     | Hurler/Scheie           | $\alpha$ -L-iduronidaz                                | DS/HSA     |
| MPS II    | Hunter                  | İdronat-2-sülfataz                                    | DS/HSA     |
| MPS III A | Sanfilippo A            | Heparan N-sülfataz                                    | HSA        |
| MPS III B | Sanfilippo B            | N-asetil- $\alpha$ -D-glukozaminidaz                  | HSA        |
| MPS III C | Sanfilippo C            | Asetil-CoA: $\alpha$ -glukozaminid N-asetiltrasnferaz | HSA        |
| MPS III D | Sanfilippo D            | N-asetilglukozamin-6-sülfataz                         | HSA        |
| MPS IV A  | Morquio A               | Galaktozamin-6-sülfataz                               | KS/C6S     |
| MPS IV B  | Morquio B               | $\beta$ -galaktozidaz                                 | KS         |
| MPS VI    | Maroteaux-Lamy          | Arilsülfataz B                                        | DS         |
| MPS VII   | Sly                     | B-glukuronidaz                                        | DS/HSA/C6S |
| MPS IX    | Hiyalüronidaz eksikliği | Hiyalüronidaz                                         | ---        |

İskelet bozuklukları, makrosefali, konuşma, öğrenmede bozukluk, anormal saç gelişimi, kornea bulanıklığı, hepatosplenomegali, pnömoni, zihinsel gerilik gibi belirtilerle seyreden ve lizozomal depo hastalıkları arasında özel bir grup olan mukopolisakkaridozda (MPS) temel patoloji, yıkılamayan GAG'ların lizozom içerisinde birikmesi ve idrarla yüksek miktarda atılımıdır (7–10). Bu nedenle, bu olguların tanı ve izleminde, idrar GAG ölçümü son derece önemlidir, ancak bu şeker türevlerinin yüksek polariteleri ve mikroheterojeniteleri analizlerinin de oldukça zor olmasına yol açmaktadır. MPS'lerin tanı aşamasında, ilk basamak olan ve önemli bir yer tutan idrar total GAG ekskresyonunun ölçümü için bugüne kadar birçok metot geliştirilmiş olmasına rağmen bunların yüksek maliyet, seçicilikte düşük sonuç vermiş olması gibi kısıtlılıkları yeni yöntemlerin geliştirilmesine olan gereksinimi ortaya çıkarmaktadır (11).

Özellikle son yıllarda, idrar GAG tayininin MPS'lerin tayin ve izleminde kullanılmaları dışında, değişik hastalıklarda bir belirteç olarak kullanılabileceğini gösteren çalışmalar da yayımlanmıştır. Üriner sistemi ilgilendiren bir çok durumun (kronik böbrek rahatsızlıkları, renal fibroz, glomerüler filtrasyon sorunları, mesane taşı, vb.) (8,12), başta meme ve akciğer kanserleri (13) olmak üzere birçok kanser türünün (14,15), hipertansiyon ve diyabetin patofizyolojisinde GAG'ların önemi ortaya konmuş ve idrar GAG ölçümünün erken tanı ve izlemde önemli bir belirteç olarak kullanılabileceği bildirilmiştir.

Tüm bunlar, GAG analizi için yeni, spesifik ve kolay uygulanabilir yöntemler geliştirilmesine olan gereksinimi ortaya koymaktadır. Mevcut olan gereksinimden yola çıkan bu çalışmada, moleküler baskılama yöntemiyle GAG'a spesifik seçici polimerlerin hazırlanmasını hedeflenmiştir. GAG'ların kimyasal yapılarındaki benzerlikler, analiz sırasında ayrılmalarını da güçleştirmektedir, bu nedenle öncelikle bu molekülleri seçimli olarak ayırmak ve sonrasında ölçmek için, kromatografik ayırma tasarlanmıştır. Bu kısımda her bir GAG'ın seçimli olarak ayrılması için kromatografik ayırmanın gücünü artırabilecek bazı modifikasyonlar yapılmıştır. Sonuçta elde edilen GAG'a spesifik seçici polimerlerin boş bir kromatografi kolonuna dolgu materyali olarak yerleştirilmesi aracılığıyla, GAG tayininde ayırım işleminin hızlandırılması ve daha seçici bir yöntem geliştirilmesi hedeflenmiştir.

## **1.2. Kromatografik GAG Ölçüm Yöntemleri**

Kromatografi maddelerin kimyasal özelliklerine göre katı bir faz üzerindeki hareketleri prensibine dayalı bir ayırma yöntemidir. Bu yöntem ile moleküller polarite, çözünürlük ve büyüklüğüne göre ayrılabilirler. Yapılan kromatografik çalışmalara göre, GAG'ların ölçümleri çoğunlukla enzimlerle GAG'ların degradasyonu sonucu elde edilen fragmanların analizine dayanmaktadır (10,16,17). GAG materyalleri genellikle büyük kütlede moleküller olduğundan, enzimatik olarak degradasyon sonucu elde edilen GAG fragmanlarının HPLC (18), MS/MS (16) ile analizi ya da parçalanmadan direkt olarak TOF (19) ile ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Her ne kadar GAG ölçümleri HPLC sisteminde fragman üzerinden yapılsa da kesin sonuç, üronik asit veya glikozamin üzerinden verilen rölatif ölçüme dayanmaktadır (17).

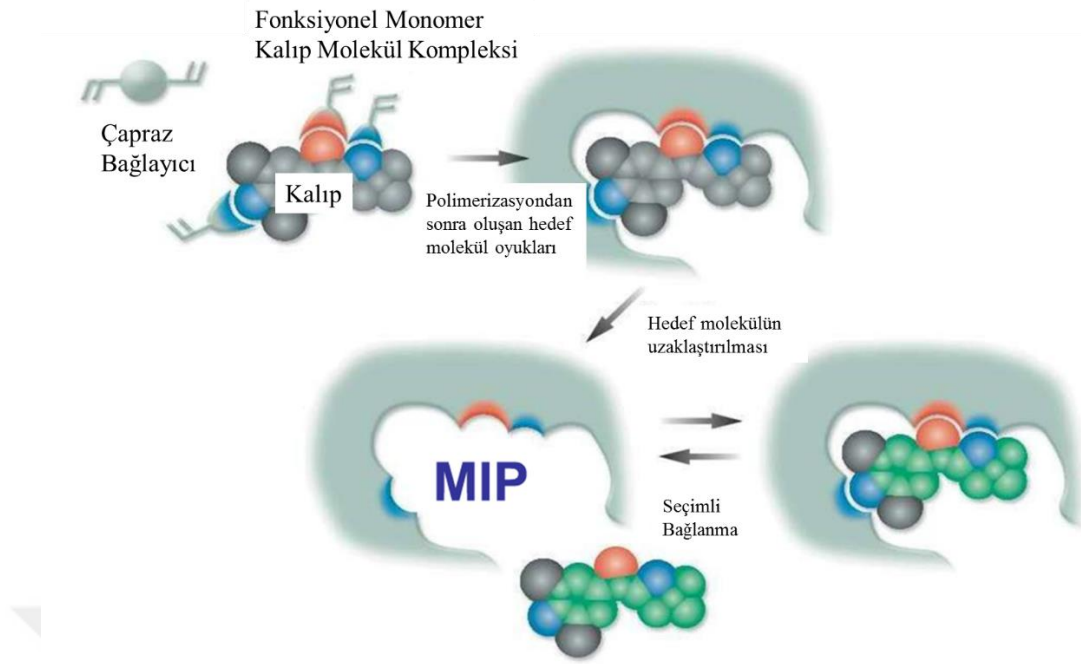
Bu yöntemler çalışır ve hızlı olsalar da özellikle ayırmada sorunlar yaşanmaktadır. Örneğin DS ve CS pikleri birbirine çok yakın zamanlarda gelmektedir, bununla birlikte çözeltideki diğer yüksek polarlıktaki şekerlerin ayrılması da zorluk çıkarmaktadır (11). Görüldüğü gibi ayırma kısmındaki zorluk en büyük dezavantaj olarak görülmektedir. Bu dezavantajdan yola çıkarak, ayırmayı daha seçici hale getirmek için kromatografik kolon dolgu materyalimizde bazı modifikasyonlar yapılmıştır. Buna göre HSA, DS ve CS için ayrı ayrı affiniteye sahip kromatografik kolon dolgu materyalleri, moleküler baskılama teknolojisi ile geliştirilmiştir. Sonuçta, , değişik GAG'lara spesifik geliştirdiğimiz kolon dolgu materyali HPLC sisteminde GAG türlerini çok seçici bir şekilde ayırabilen bir ön aşamanın oluşmasına izin vermiştir.

### 1.3. Moleküler Baskılama

Moleküler baskılama teknolojisi (MIT) karmaşık ve kompleks çözeltilerin içinde bulunan belli bir molekülün üç boyutlu yapısına uyacak oyukları bir polimer üzerinde, üretme teknolojisidir. Diğer bir deyişle, molekülün “parmak izi” istenilen bir polimer molekülü üzerine oluşturulur. Böylelikle sadece bu molekülün girebileceği oyukları içeren polimerler yapay reseptörler olarak da kullanılabilirler. MIT, moleküler tanıma, kataliz, kromatografik ayırma, kimyasal tanıma gibi farklı işleri farklı çözenlerde gerçekleştirebilmektedir (20–22). Oluşturulmak istenen yapay polimerik reseptörün monomerlerinin kimyasal yapısı tamamen bağlanması istenen hedef molekülle etkileşime girecek fonksiyonel grup veya gruplar içermesine göre seçilir. Örneğin bizim sistemimizde kullanılan polimer molekülünün monomerleri pozitif-nötral gruplar içeren monomerler arasından seçilmiştir. Böylelikle negatif yüklü GAG polisakkaritlerini iyonik olarak çekebilecek kapasitede moleküler baskılanmış polimerler (MIP) elde edilebilmektedir. Kullandığımız monomer molekülü GAG molekülünün polar grupları ile etkileşime girerek, onları çevreler ve ardından polimerizasyon reaksiyonu ile polimerlerin içinde GAG oyukları oluşturulur. Daha sonrasında GAG’ların polimerden uzaklaştırılması gerçekleşir. Sonrasında ise üzerinde spesifik oyuklar oluşmuş olan bu polimerler GAG molekülünü seçici bir şekilde tanıyabilir ve bağlayabilirler (23–25).

MIP’lerin oluşumu 3 adımda özetlenebilir (26):

- a) Hedef (kalıp) molekül ile polimerize olabilecek fonksiyonel gruplara sahip monomerler arasında kovalent/kovalent olmayan etkileşimlere dayalı kompleks oluşumu-Bu adımda monomerler, kalıp molekül etrafını sararak pre-kompleks oluşturulur.
- b) Ortamda bulunan polimerizasyon ajanları (porojen, çapraz bağlayıcı, inisiyator) ile kalıp-monomer etkileşimi artırılarak polimer içerisinde kalıp molekülün bağlanma bölgeleri (kalıp moleküle spesifik boşluklar) oluşturulur.
- c) Kalıp molekül uygun yöntemler ile (çözgen ekstraksiyonu, hidroliz) polimerden uzaklaştırılır. Tekrar ortama konulduğunda ise bu bağlanma bölgelerine yeniden bağlanır (Şekil 4.).



**Şekil 4.** Şematize edilmiş MIT

MIP'ler kullanım alanlarına göre farklı polimerizasyon yöntemleri ile farklı boyutlarda hazırlanabilir. MIT, kalıp molekülün polimer moleküle tutunması esnasında hem kovalent hem de non-kovalent etkileşimlerle moleküler baskılanmış polimerler oluşturulabilmektedir. Bu her iki kalıp-polimer etkileşimi ile oyuk oluşturma yönteminin hem avantajları, hem de dezavantajları mevcuttur (21).

Non-kovalent olarak modifiye edilen polimerlerin hazırlanması ve kalıbın yüzeyden uzaklaştırılması sorunsuz bir şekilde gerçekleştirilebilmesine rağmen moleküler grupların birbiri ile etkileşerek oluşturdukları yapı homojen bir özellik göstermez. Bu durum, kullanılan kalıp molekülün baskılanma öncesindeki dağılımından kaynaklanmaktadır. Oluşan yapıda non-kovalent etkileşimler olan iyonik etkileşimler, hidrofobik etkileşimler, van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağları görev alırlar. Bu da, molekülün farklı yönelme biçimleri ile polimere baskılanması ve bunun sonucunda da istenmeyen moleküllerin oyuklara girebilmesi gibi sonuçlara neden olabilir (24,27,28).

Kovalent yaklaşım ile hazırlanmış baskılı polimerlerde ise, sonuçta kovalent bir yapı meydana geldiğinden seçimli bağlar ile homojen ve kararlı bir son ürün elde edilebilmektedir (22,23,26,29). Bu yöntemdeki dezavantaj, kovalent bağın gücü nedeniyle kalıp molekülün uzaklaştırılma adımında karşılaşılan güçlülüktür. Yöntemin en önemli avantajı ise canlılardan elde edilen tanıma moleküllerinden daha kolay ve ucuz olarak polimer üretilebilmesine olanak tanımasıdır. . Son yıllarda oldukça fazla ilgi çeken alanlardan olan MIP üretiminde bu nedenle kovalent yaklaşım tercih edilmektedir.

### **1.3.1. Moleküler Baskılanmış Polimerleri Hazırlama Yöntemleri**

MIP'ler temelde yığın (bulk), süspansiyon, emülsiyon, presipitasyon olmak üzere farklı tekniklerde üretilirler (30).

Yığın polimerizasyonda, monomer çözeltisine başlatıcı (inisiyator) eklenerek termal veya radyasyon etkisi ile polimerizasyon gerçekleştirilir. Elde edilen polimerlerin boyutları birbirinden farklı olduğundan ve polimer fragmanları nemli ve topraklar halinde elde edildiğinden, ardışık bir öğütme işlemi gereklidir. Bu öğütme işleminin polimerin yapısını bozabilmesi, yöntemin dezavantajı olarak görülmektedir. Bununla birlikte bu teknikte polimerlerin büyük boyutlarda sentezlenmesi bir avantajdır.

Süspansiyon polimerizasyonunda heterojen radikal polimerizasyonu gerçekleştirilir, yani monomerler ve kalıp molekül sıvı faz içinde karıştırılarak homojen form elde edilir. Ardından bu homojen monomer çözelti, başlatıcı ile karıştırılarak heterojen kürecikler oluşturulur. Bu polimerizasyonda küreciklerin boyutlarının kontrol edilememesi bir dezavantaj olarak bildirilmiştir.

Emülsiyon polimerizasyonu, adından da anlaşılacağı gibi, hazırlanan monomer ve sürfaktanın emülsiyon şeklinde damlacıklar oluşturarak polimerleşmesiyle gerçekleştirilir. Polimerizasyonda her ne kadar emülsiyon ismi kullanılsa da, bu yöntemle suda çözünür polimerler de üretilebilmekte, ancak ilk hazırlanma aşamasında monomer ve sürfaktan emülsiyon görünümü verdiğinden bu adı almaktadır. Suyun varlığı monomer-kalıp molekül etkileşimlerini değiştirir (31). Bu yaklaşımla, yüksek hızlarda üretim gerçekleştirilebilmekte ve yöntem esnek maddelerin hazırlanmasında da kullanılabilir.

Bu çalışmada kullanılan teknik olan presipitasyon polimerizasyonunda ise, yığın polimerizasyonundan farklı olarak yüksek oranda çözgen materyal kullanılır ve uniform kürecikler elde edilir. Bu da sonuçta, homojen tanıma yüzeyli mikro kürecikler oluşumuna olanak sağlar. Bu şekilde hazırlanan polimerlerin basınca dayanıklı olması ve kromatografik teknikler gibi yüksek basınçlı ortamlarda bozulmadan kullanılabilmesi rahat kullanılabilirliğinin en önemli avantajlarıdır (32).

### **1.3.2. Moleküler Baskılamanın Kromatografide Kullanımı**

Kromatografi bilindiği gibi maddeleri, katı bir faz üzerindeki hareket hızına ve etkileşimine bağlı olarak yapılan bir ayırma-saflaştırma-deriştirme yöntemidir. Bu yöntemde katı bir faz üzerine gönderilen sıvı faz içerisindeki moleküller, katı faz üzerindeki veya içerisindeki hareketlerine bağlı olarak ayrılmaktadır. Kromatografik metotlarda ayırma işlemi madde-katı faz etkileşimi prensibine dayanır. Buna göre madde yüzeyde adsorplanabilir, dağılabilir, katı faz üzerindeki madde ile yer değiştirebilir, elenebilir veya spesifik tutunabilir (affinite).

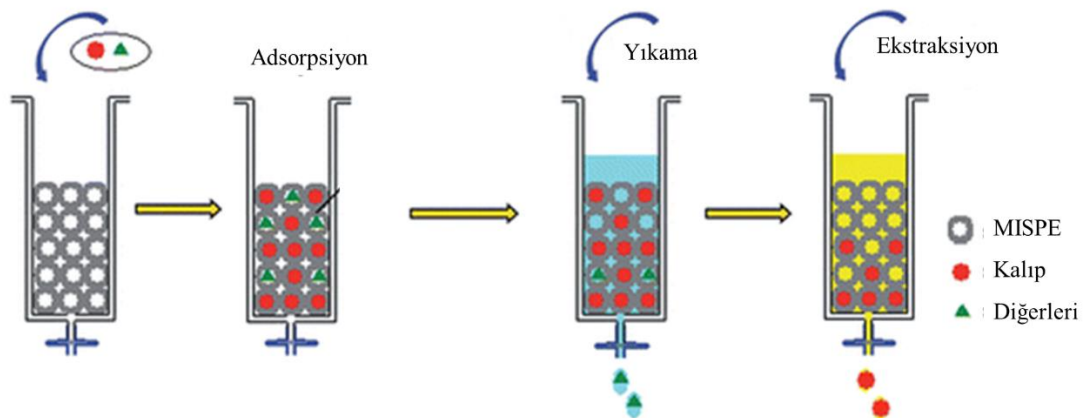
Buna bağlı olarak seçiciliğin en fazla olduğu ayırma yöntemi ise şüphesiz affinite kromatografisidir. Bu yöntemde ayrılması ve analiz edilmesi istenen molekül, katı faz üzerindeki seçici kısımlar ile bağlanarak içerisinde bulunduğu karışımdan ayrılır, sonrasında ise bu bağı bozmak suretiyle ayrılması istenen molekül yüzeyden uzaklaştırılır, analiz edilir veya konsantre edilir. Bu seçici bağlanmaya en önemli örnek antikor-antijen etkileşimidir. Bu etkileşim ne yazık ki affinite ayırmasında son derece yüksek maliyetli, çözgenden etkilenen bir sistemdir. Bu dezavantajlar daha

uygun bir yöntem arayışını getirmiştir. Bu nedenle hem zorlu koşullara adapte olabilen, hem de seçimli örnek analizlerine olanak sağlayabilen MIP'ler üretilerek kromatografide kullanılmaya başlanmıştır.

Günümüzde katı faz ekstraksiyonunda moleküler baskılama(MISPE; molecular imprinting in solid phase extraction),kromatografik sistemlerde hem online (doğrudan bir analitik cihaza bağlı) hem de offline (ekstraksiyon analitik cihaza bağlanmadan) olarak ayırmada kullanılmaktadır (20). Kromatografideki katı faz ekstraksiyon (SPE; solid phase extraction) materyali direkt moleküler baskılanmış materyalin kendisi olabildiğinden, kromatografik kolonlu sistemlerde rahatça kullanılabilme, kolay üretim gibi kolaylıklar nedeniyle sistem daha avantajlı hale gelmektedir.

SPE son yıllarda küçük miktarlardaki maddelerin konsantrasyonlarını saptamak için son derece uygun ve kullanışlı bir teknik olarak laboratuvarlarda yerini almıştır. Kolaylığı ve çok yönlü kullanılabilir olması nedeniyle en çok kullanan prekonsantrasyon tekniği olarak yer almaktadır. Moleküler baskılama ve katı faz ekstraksiyonunun birleştirilmesiyle kalıp molekülün yapısal analogu bir reseptör, katı faz yüzeyinde oluşturularak ekstraksiyon işlemi kolaylaştırılmıştır. Çok farklı matrislerde bile yüksek seçicilik özelliği ile öne çıkmaktadır.

Çoğu MISPE uygulaması, off-line sistem olarak geliştirilmektedir, böyle bir sistem sadece donanım kolaylığından değil, yıkama koşullarının da kolay olması ve enstrümanların analitik olmasına gerek kalmadan çözelti ve deney koşullarına kolay adapte olabilmesi nedeniyle tercih edilmektedir. Online sistemler ise doğrudan sisteme bağlanarak analitik bir kromatografik kolon materyali olarak kullanılmaktadır. Online sistemlerde kontaminasyonun önüne geçebilmeye ve örnek hazırlanmasına gerek duyulmamaktadır. Online sistemlerin bu avantajlarına rağmen yine de offline sistemler en fazla kullanılan sistemlerdir. Her iki sistem de katı faz ekstraksiyonunda aynı teknik sırasına göre işlevlendirilir. Sistemde kolonda akış için vakum kullanılır (Şekil 5.).



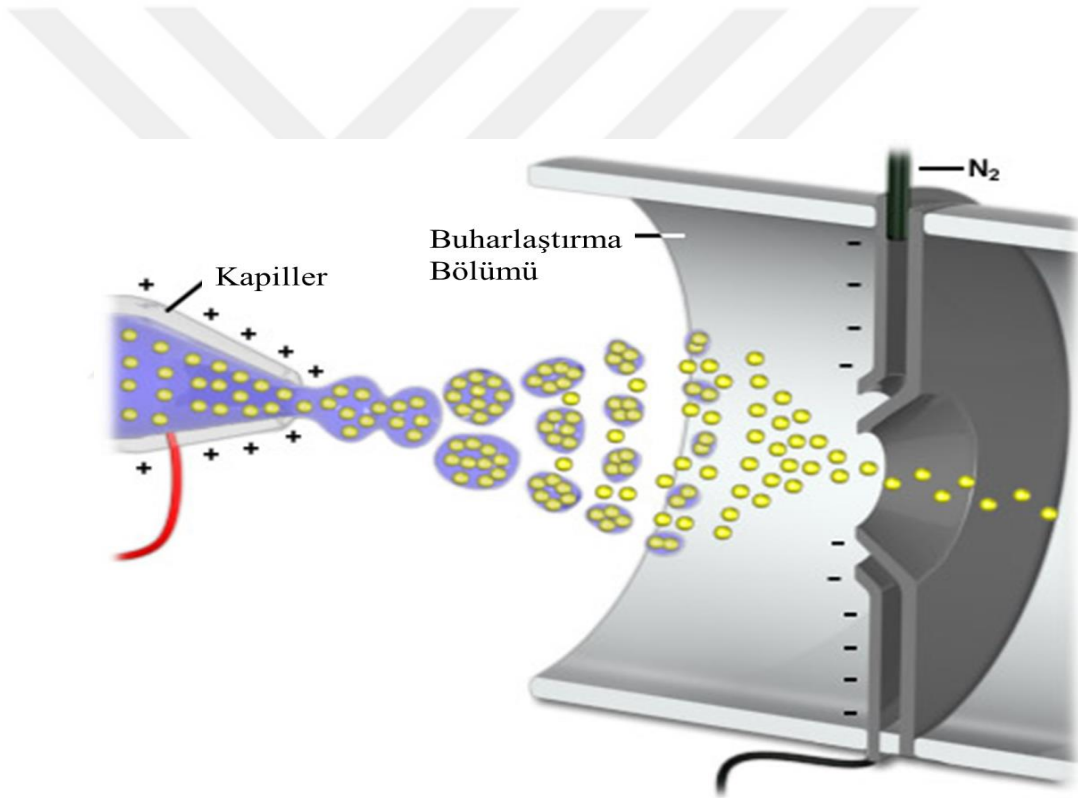
Şekil 5. MISPE kolonu kromatografik prosesi

#### 1.4 Tandem Kütle Spektrometresi (MS/MS)

Kütle spektrometresi, maddelerin gaz fazındaki iyon hallerinin, kütle yük oranının ölçülmesi üzerinden analiz etme yöntemidir (11,33). Kütle spektrometresi maddelerin elemental izleri üzerinden madde analizi gerçekleştirir.

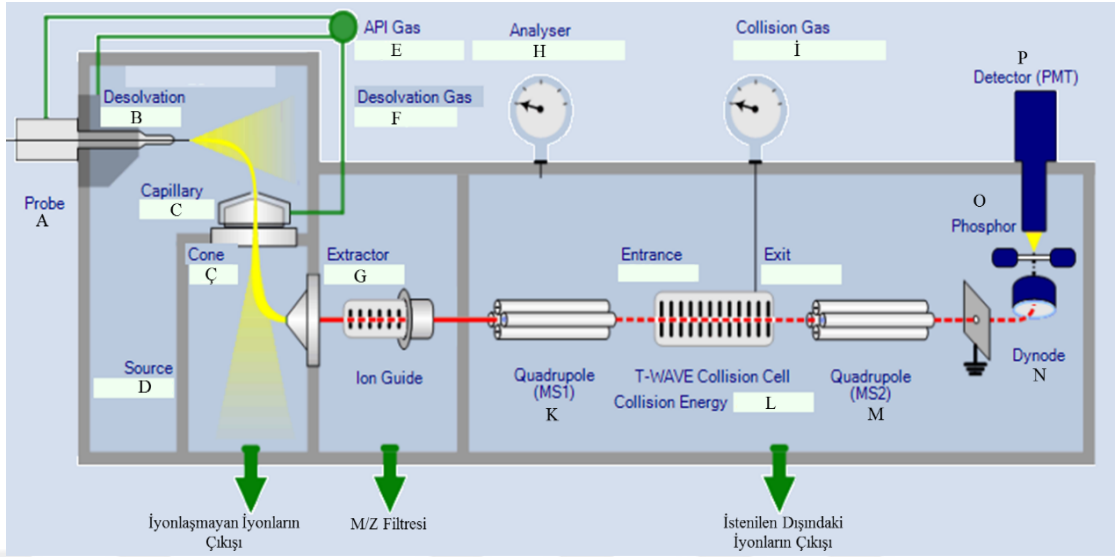
Tandem kütle spektrometresi ise ölçülmesi istenen iyonun hem gerçek kütlesi, hem de bu iyonun parçalanması ile oluşan iyonun ölçülmesine dayanan çift kütle ölçüm yöntemidir. Böylelikle parçalanması istenen iyon seçilebilir ve sadece bu iyonun yavru iyonu üzerinden parçalanma gerçekleştirilebildiğinden seçici ölçümler yapılabilir.

Bu çalışmada, geliştirilen kromatografik kolon dolgu materyalinin GAG seçiciliğini değerlendirmede kullanılan kütle spektrometresi, ESI-MS/MS, yani Electrospray Ionization (ESI) (Şekil 6), Atmospheric Pressure Ionization (API) türüdür. ESI yönteminde iyonlaştırılarak uçucu hale getirilen partiküller, kapillerden geçtikten sonra ayrılırlar. Bu uçuşma iyonların kütle dedektörü ile ölçülebilecek hale getirilmesini sağlar.



Şekil 6. Şematik ESI

Şekil 7’de tandem kütle spektrometresindeki analitik kısımları verilmiştir.



Şekil 7. Şematik Water-TQD MS/MS kısımları

- 1) Prob: Örneği desolvasyon gazı ile buharlaştırarak sisteme aktaran kısım
- 2) Desolvation: Örneği belli bir sıcaklıkta inert gaz ile vakumda aerosol hale getirerek kaynak kısmına spreyleyebilen kısım
- 3) Kapiller: Kütle spektrumuna bağlanan koni şeklinde kısım (buharlaşmış iyon damlacıklarını uygulanan voltaj ile küçük iyonlara ayırıştırır)
- 4) Koni: Belli bir potansiyel oluşturarak iyonları ikincil olarak yükleyen kısım
- 5) Kaynak: Prob ucu ile kapiller kısmını içeren vakumlanmış bölge
- 6) API Gazları: Atmospheric Pressure Ionization (API) kısmı ( desolvasyon gazlarının kaynağa verilmesini kontrol eder)
- 7) Desolvation Gas: Örnek moleküllerinin gaz fazına çözünmesini sağlayan inert gaz
- 8) Extractor: Belli m/z oranına sahip kütlelerin elektriksel alanda ayırma işlemini gerçekleştiren kısım
- 10) 1. Analizör: Bu kısımda iyonlar parçalanmadan kendi kütlelerinde analiz edilerek m/z oranına göre ölçülür.
- 11) Collision Gas: Bu kısım MS/MS ölçümünden önce iyonları Argon gazı ile parçalayarak yavru iyonlarına ayırır.
- 14) Quadrupole (MS1): Pozitif veya negatif elektriksel alan oluşturan dörtlü metal çubuğun oluşturduğu, istenilenin dışındaki iyonların detektöre ulaşmasını engelleyecek elektriksel alan oluşturan kısım
- 15) Collision Cell: İyonları Argon gazı ile yavru iyonlara parçalayan kısım

16) Quadrupole (MS2): MS1 modülünün aynısıdır, hedef yavru iyon dışındaki iyonları saptırır.

17) Dynode: Elektron çoklayıcı bir elektrottur, sinyalin artırılmasında kullanılır.

Bu analizörün çalışma prensibine göre ana iyonlarından yavru iyonları seçebilmek, spesifik ve duyarlı ölçümler yapabilmek mümkün olmaktadır.

İdrarla atılımları çeşitli hastalıkların tanısı ve prognozunda önemli yer tutan GAG'ların yüksek polariteleri, büyük ve benzer kütleleri nedeniyle analizleri oldukça sorunludur. Bu moleküllerin doğru analizi ancak öncelikle idrardan seçici bir şekilde ayrılmalarıyla mümkündür. Bu gereksinime yönelik olarak, bu çalışmada GAG'ları idrarda seçici bir şekilde ayırabilmek için moleküler baskılama teknolojisi ile hazırlanmış kromatografik kolon dolgu materyalleri geliştirilmiş ve bu materyaller HPLC kolonlarına doldurarak, kolonların GAG'lara seçicilikleri kütle spektroskopisi ile test edilmiştir. Moleküler baskılama teknolojisinin biyomedikal alanda kullanımı ile idrarda GAG tayinleri seçimli bir şekilde yapılabilecektir.



## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Gereç

Bu çalışmada kullanılan tüm kimyasal maddeler (MS grade) Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir.

- a) İdrardan GAG saflaştırma materyalleri
  - Etanol
  - Setilpiridinyum Klorür
  - Sodyum Klorür
  - Saf Su
  - 40 numara Whatman Kağıdı
  - Kurutma için Memmert marka inkübatör
  - Santrifüj Nüve NF-1200
- b) Moleküler baskılama prosesi materyalleri;
  - Heparan Sülfat (HSA)
  - Kondroitin Sülfat (CS)
  - Dermatan Sülfat (DS)
  - Akrilamid (Monomer)
  - Trimetilolpropan Trimakrilat: TRIM (Çapraz bağlayıcı)
  - Azobisisobütironitril: AIBN (Polimerizasyon başlatıcı, İnisiyator)
  - Asetonitril (Porojen, Polimerizasyon sıvısı)
  - Santrifüj Nüve NF-1200
- c) GAG kimyasal parçalama materyalleri
  - Metanolde çözölmüş 3 Molar Hidroklorik asit çözeltisi
  - Yan reaksiyonları önlemek için 2,2-dimetoksiopropan
  - Kurutma için azot (N<sub>2</sub>) gazı
  - 10mM susuz Amonyum asetat
  - Thermo Scientific HAAKE Çalkalamalı Su Banyosu
- d) Kromatografi ve Kütle Spektroskopisi Materyalleri
  - HPLC yürütücü faz: Metanol

- HPLC elüsyon fazı: Asetik asit:Metanol(4:1), V/V
- HPLC Pompası: Shimadzu LC-6AD HPLC pompası
- Kromatografik kolon: Waters X-Bridge HPLC kolonu (4,6mm x 1,6mm)
- Tandem Kütle Spektrometresi: Waters Xevo-TQD Tandem Quadrupole MS

Çalışmada kullanılan idrar örnekleri, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Sağlıklı Çocuk Polikliniği'ne rutin kontrol için gelen 0-3 yaş arası 5 sağlıklı çocuktan elde edilmiştir. Çalışmaya alınmada dışlama kriterleri şunlardır: böbrek fonksiyonlarında bozukluk, idiyopatik hipertansiyon, üriner sistem enfeksiyonu, Tip 1 diyabet, Sağlıklı çocuklardan alınan 24 saatlik idrar örnekleri, pool şeklinde birleştirilerek bekletilmeden GAG saflaştırma işlemi uygulanmıştır.

Çalışma için EÜTF Etik Kurulu'ndan 14.05.2015 tarih ve 15-4.1/17 karar numaralı gerekli izinler alınmıştır. Ebeveynler çalışma protokolü tarafından ayrıntılı olarak bilgilendirilmiş ve Gönüllü Olur Formuyla izinleri toplanmıştır.

## 2.2.Yöntem

### 2.2.1 Standart Çözeltilerin Hazırlanması ve GAG'ların Kimyasal Parçalanması

- Üç farklı eppendorf tüpünde HS, DS ve CS glikozaminoglikanları 1 mgr olacak şekilde tartılmıştır
- Her birinin üzerine 1 mL 3M Metanolik HCl çözeltisi ve yan reaksiyonları önlemek için 50µL 2,2-dimetoksiopropan eklenerek GAG'lar, 65°C'de 75 dakika kimyasal parçalamaya tabii tutulmuştur
- Kimyasal parçalamadan sonra, tüplerden kurutuluncaya kadar azot gazı geçirilmiştir
- Kurutulan her bir GAG çözeltisi, 1mL 10mM susuz amonyum asetatla çözülerek 1mg/mL olarak şekilde hazırlanmıştır
- Kütle spektroskopisinde standart grafiklerin hazırlanması için bu çözelti 1000 kat seyreltilmiştir.

### 2.2.2 GAG Saflaştırılması

Sağlıklı çocuklardan alınan 24 saatlik idrar örnekleri bekletilmeden GAG saflaştırma işlemi uygulanmıştır. Bunun için,

- İdrar örneği (10 mL) No 40 Whatman kâğıdından geçirilerek katı ve büyük partiküller süzölmüştür
- Üstüne %10'luk 608 µL Setilpridinyum Klorür (CPC) eklenmiştir
- Oda sıcaklığında 24 saat bekletilerek GAG moleküllerinin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir

- 24 saat sonunda 500 x g'de 30 dakika santrifüjlenerek GAG'lar çöktürülmüştür
- Pelletler 15 mL 0,05% CPC ile yıkanmıştır
- Yıkanan pelletlerin üzerine 2 mL 2M NaCl çözeltisi ve etanol karışımı (100:15) eklenerek çözünme sağlanmıştır
- Çözeltinin üzerine 3 mL absolüt etanol eklenerek 4°C'de 24 saat bekletilmiştir
- 24 saat bekletilen örnek, 5000 x g'de 30 dakika santrifüjlenerek GAG molekülleri çöktürülmüş, ardından önce % 70'lik etanolde 3 kere, sonrasında da absolüt etanolde 1 kere yıkandıktan sonra 50°C'de 24 saat kurumaya bırakılmıştır.
- Metanolde çözülebilen örnekler 2000 kat seyreltilmiştir.

### **2.2.3.Moleküler Baskılanmış Polimerlerin Hazırlanması, HPLC Kolonuna Doldurulması ve GAG'ların HPLC Kolonundan Elüsyonu**

Moleküler baskılanmış polimerler hazırlanmadan önce CS, DS ve HSA 1'er mgr olacak şekilde tartılarak 50 mL'lik tüplere alınmıştır. Aşağıda yer alan GAG baskılama işlemlerinin tümü GAG içermeyen kontrol polimeri için de yapılmıştır.

- Tartılan GAG'ların üzerlerine 40 mL asetonitril eklenmiş ve iyice çözünene kadar çalkalanmıştır
- Bu çözeltilere, 4'er mgr akrilamid eklenerek akrilamidin de çözünmesi sağlanmıştır
- Akrilamid ve her bir GAG'ın bulunduğu 3 tüpe 900'er µL çapraz bağlayıcı TRIM ve 10'ar mgr polimerizasyonu başlatıcı AIBN eklenmiştir
- Her 3 çözelti de azot ile doyurularak oksijen uzaklaştırılması gerçekleştirilmiştir
- Her 3 çözelti de 65°C'deki sıcak su banyosuna koyularak 18 saat termal presipitasyon polimerizasyonu gerçekleştirilmiştir.
- Polimerler 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş, sıvı faz atılmış ve çöken polimerler 40°C'de fırında kurutularak çözgen uçurulmuştur

HPLC kolonuna doldurma işleminden önce polimerler behere alınmıştır, kullanılacak HPLC kolonu akış yönünün tersindeki kısımdan yani kolondan sıvının çıktığı kısımdan açılarak doldurma işlemi akış yönünün tersine doğru yapılmıştır.

- Kolon öncelikle asetonitrilde sonik banyoda inkübe edilip temizlendikten sonra, 60°C'de kurutulmuştur
- Polimerler mikrospatül ile kolonlara doldurulmuş, bir damlalık yardımıyla azar azar ıslatılarak bu doldurma işlemi gerçekleştirilmiştir, bu sırada çelik bir çubuk ile polimerler sıkıştırılmıştır

- Sıkıştırma işleminden sonra kolon 4000 rpm’de 20 dakika santrifüj edilerek polimerlerin sıkıştırılması sağlanmıştır
- Sonrasında ise HPLC kolonu kapatılmış ve HPLC pompasına bağlanarak 300 µL/dk metanol akışı verilmiştir, bu saatte 18 mL’ye tekabül etmektedir, yani kolon bir saat boyunca 18 mL yıkanmıştır. Kolonda geri basınç oluşmayana kadar kolon doldurma işlemi tekrarlanmıştır.

HPLC kolonu doldurulduktan sonra kolondaki GAG baskılanmış dolgu materyalinden GAG uzaklaştırılması için pompa sistemine 300 µL/dk ekstraksiyon çözeltisi verilerek her 15 dakikada bir fraksiyonlar toplanmış ve bu fraksiyonlar azot gazı ile kurutularak kimyasal parçalamaya tabi tutulmuştur. Yüzeylerinden GAG’ların uzaklaştırıldığı kolonlara metanol akışı verilerek idrarda GAG ölçümü için şartlandırılmıştır.

#### **2.2.4. Kütle Spektroskopisinde GAG Standart Grafiklerinin İnfüzyonu(Bileşenlerin Optimizasyonu) ve GAG Tayini**

Kimyasal parçalamadan sonra 10mM susuz amonyum asetatla çözölen DS, HSA ve CS fragmanları ayrı ayrı kütle spektroskopisine verilerek cone voltajı, collision enerjisi, desolvation temperature, desolvation gaz akışı bu fragmanların maksimum sinyal verdiği ayarlar olarak seçilmiş ve tüm GAG ölçümleri bu ayarlarda gerçekleştirilmiştir. Sonrasında ise 1000 ng/mL’nin altında standart grafikler hazırlanmıştır. İdrardan saflaştırılan GAG örnekleri kimyasal parçalamadan sonra MS analizörüne verilerek standart pikleri ile gerçek örnek pikleri karşılaştırılmıştır.

Kütle spektroskopisi ölçümlerinde fragmanların MS/MS modunda parçalanmasına bağlı olarak ölçüm sistemi optimize edilmiştir. Parçalanmayan fraksiyonlar SIR (Selected Ion Recording) yani MS veya MRM (Multiple Reaction Monitoring) yani MS/MS modlarında ölçölmüştür. Her bir glikozaminoglikanın verdiği farklı fragmanların konsantrasyonları toplanarak her bir GAG’ın konsantrasyon hesabı yapılmıştır.

#### **2.2.5.Kromatografik Kolon Dolgu Materyallerinin Karakterizasyonu**

HPLC kolonuna doldurulan dolgu materyallerinin karakterizasyonu için standartlar dolgu materyallerine yani kolonlara metanolde çözölererek yüklenmiştir. Yükleme işleminden sonra elüsyon sıvısı verilerek kolonlardan her 15 dakikada bir elüsyon sıvısı toplanmış ve bu karakterizasyon işlemleri elüsyon sıvısında GAG’ların kütle spektroskopisindeki kantitatif analizine göre yapılmıştır.

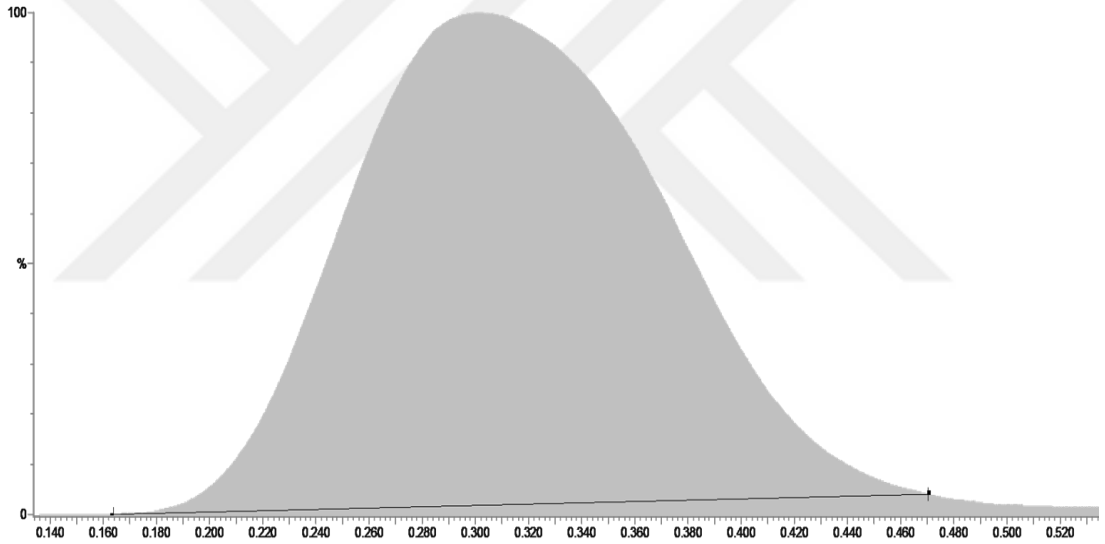
Buradan kolon yıkama süreleri, GAG tutma kapasiteleri, tekrarlanabilirlik, tekrar kullanılabilirlik ve gerçek örnek denemeleri ile standart karşılaştırılması da yapılmıştır. Aynı işlemler GAG baskılanmamış kolon için de gerçekleştirilmiş fakat GAG baskılanmamış kolon ile baskılanmış kolon karşılaştırılması için ilk elüsyon çözeltisi verilmeden her 15 dakikada bir metanol yani yükleme sıvısındaki miktarlarına bakılmıştır.

### 2.2.6.Gerçek Örneklerin Kolona Uygulanması

Saflaştırma işlemlerinden sonra elde edilen GAG'lar 1 mL metanolde çözülerek HPLC pompasına bağlı, yüzeyinden GAG'ların uzaklaştırıldığı kolonlara yüklenmiştir. Yükleme işleminde 1 dakika akış gerçekleştirilmiş, sonrasında da elüsyon çözeltisi tutunan GAG'lar yüzeyden uzaklaştırılmış ve her 15 dakikada bir farklı tüplere toplanan fraksiyonlar kimyasal parçalama işleminden sonra MS/MS cihazında analiz edilmiştir.

### 2.2.7.Kütle Spektroskopisinden Elde Edilen Veriler ile GAG Miktarlarının Hesaplanması

Kütle spektrometresinde yapılan ölçümler MassLynx kütle spektrometresi arayüz programı kullanılarak karakterize edilmiş ve GAG miktarları buna bağlı olarak hesaplanmıştır. Örneğin detektörde oluşturduğu sinyalin (Response) zamana bağlı olarak detektöre gönderilen iyonların detektörde kalma sürelerine göre elde edilen hiperbolik eğrilerin altında kalan alan hesaplanarak konsantrasyon hesabı gerçekleştirilmiştir (Şekil 8).



**Şekil 8.** Şematik Target Lynx Kromatogram alan hesabında kullanılan grafik (x; dakika, y; sinyal %)

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Kütle Spektrometresi (MS) Optimizasyonu ve Standart Grafiklerinin Hazırlanması

Kütle spektroskopisinin optimizasyonu, kimyasal parçalamayla fraksiyonlara ayrılan her bir GAG'ın kütle spektroskopisindeki verdiği maksimum sinyal (responce) değerine göre yapılmıştır. Bu optimizasyonların sonucunda fraksiyonlar pozitif kütle spektroskopisi modunda (ESI+) gözlenmiştir. Pozitif modda gözlenen fraksiyonların verdikleri maksimum pikler 2,7eV kapiller voltajında, 350°C desolvation sıcaklığı ve 650 L/saat desolvation gaz akış hızında elde edilmiştir. Buna göre Cone voltajı (eV), ana iyon ve yavru iyonlarına parçalanan GAG fragmanlarının m/z oranları ile birlikte Collision enerjileri (eV) de Tablo 2'de verilmiştir.

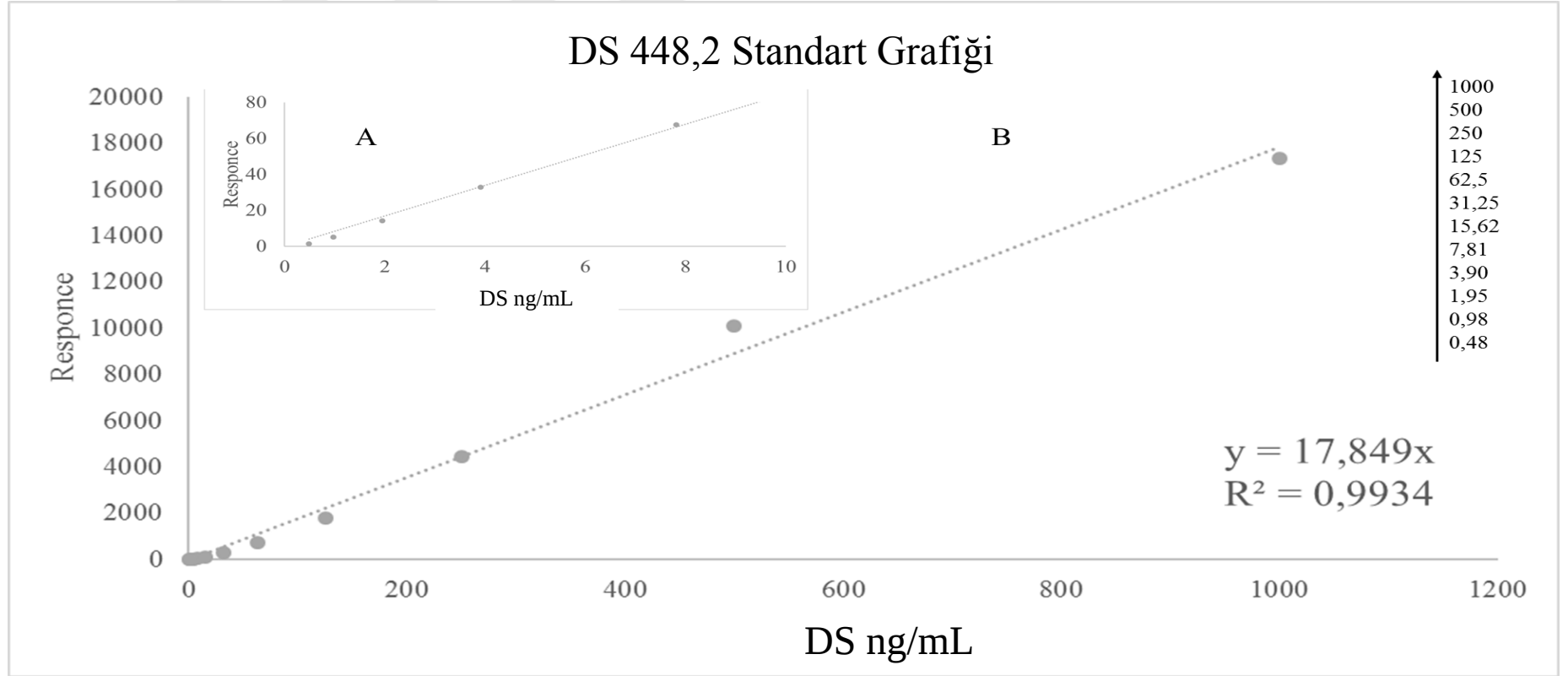
**Tablo 2.** Ölçülen GAG fragmanlarının ana iyonları ve yavru iyonlarının m/z oranları, Cone voltajı (eV) ve Collision enerjileri (eV)

| Glikozaminoglikan      | Ana (Parent) İyon | Yavru (Daughter) İyon |
|------------------------|-------------------|-----------------------|
| Dermatan Sülfat (DS)   | 338,2(Cone: 52)   | -                     |
|                        | 448,2(Cone:53)    | 258,2 (Coll:30)       |
| Kondroitin Sülfat (CS) | 448,2(Cone: 65)   | -                     |
|                        | 394,2(Cone: 40)   | 138,1(Coll:31)        |
| Heparan Sülfat (HSA)   | 637,3(Cone: 65)   | 581,3 (Coll: 35)      |
|                        | 663,5(Cone: 60)   | 551,3 (Coll: 27)      |

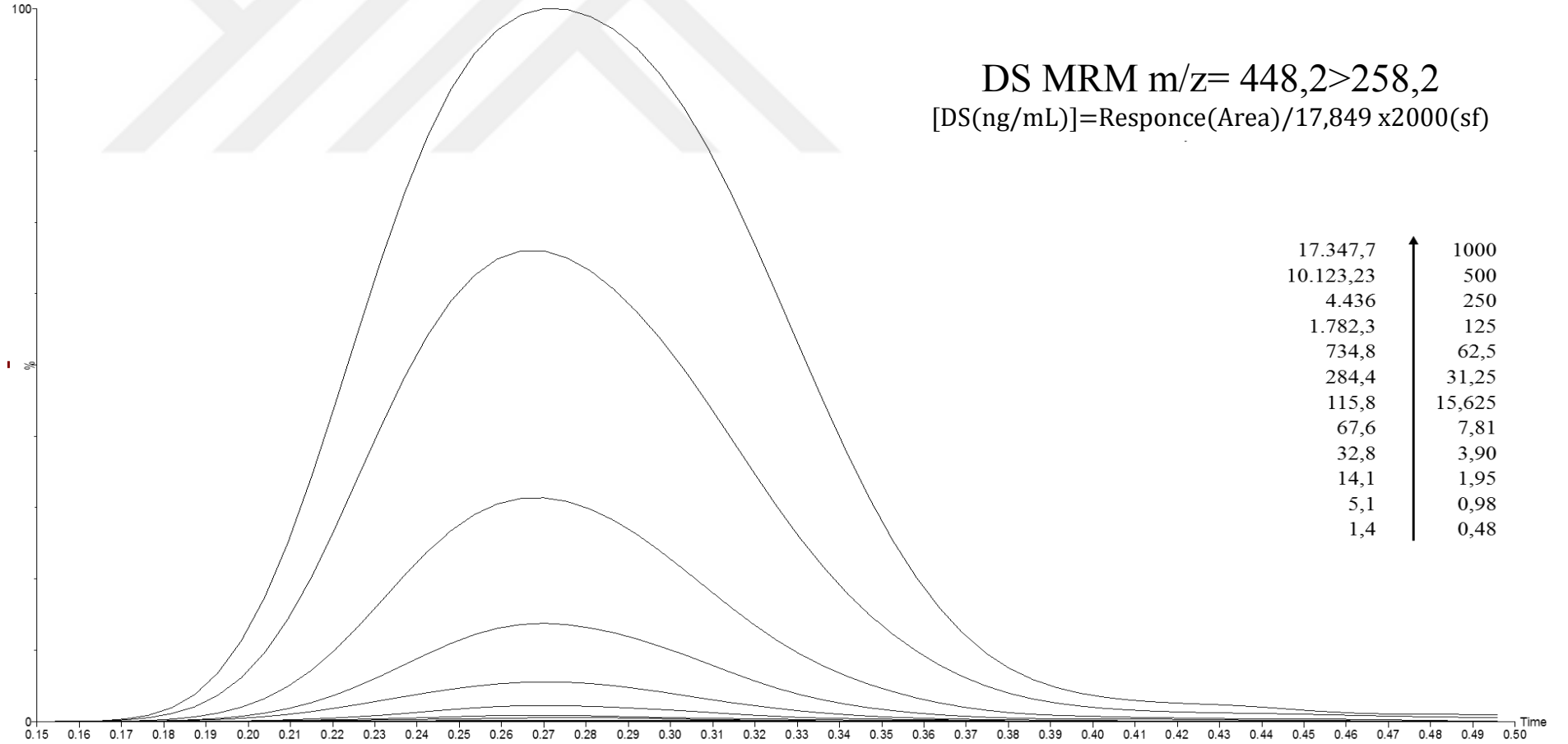
Bu verilerin ışığında her bir GAG fragmanı için farklı standart grafikleri Tablo 3'teki konsantasyon aralıklarına göre hazırlanarak kromatogramlar ile standart grafikleri elde edilmiştir (Şekil 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20).

**Tablo 3.** GAG'ların standart grafik aralıkları ve ölçüm tipleri

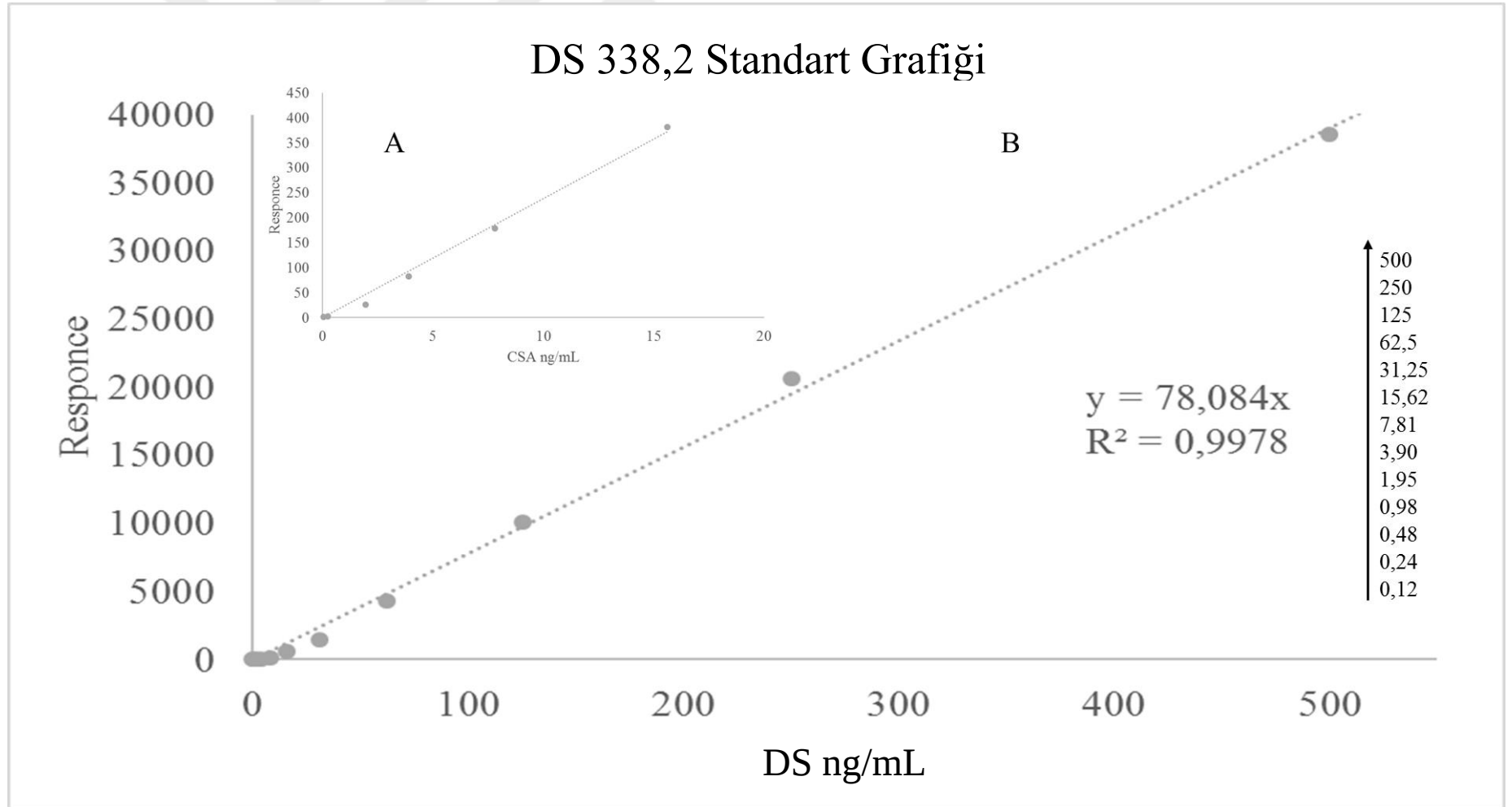
| Glikozaminoglikan      | m/z   | Ölçüm Tipi | Standart Grafik Aralığı |
|------------------------|-------|------------|-------------------------|
| Dermatan Sülfat (DS)   | 338,2 | SIR        | 0,12-500 ng/mL          |
|                        | 448,2 | MRM        | 0,48-1000 ng/mL         |
| Kondroitin Sülfat (CS) | 448,2 | SIR        | 0,06-1000 ng/mL         |
|                        | 394,2 | MRM        | 0,0075-1000 ng/mL       |
| Heparan Sülfat (HSA)   | 637,3 | MRM        | 0,06-1000 ng/mL         |
|                        | 663,5 | MRM        | 0,48-1000 ng/mL         |



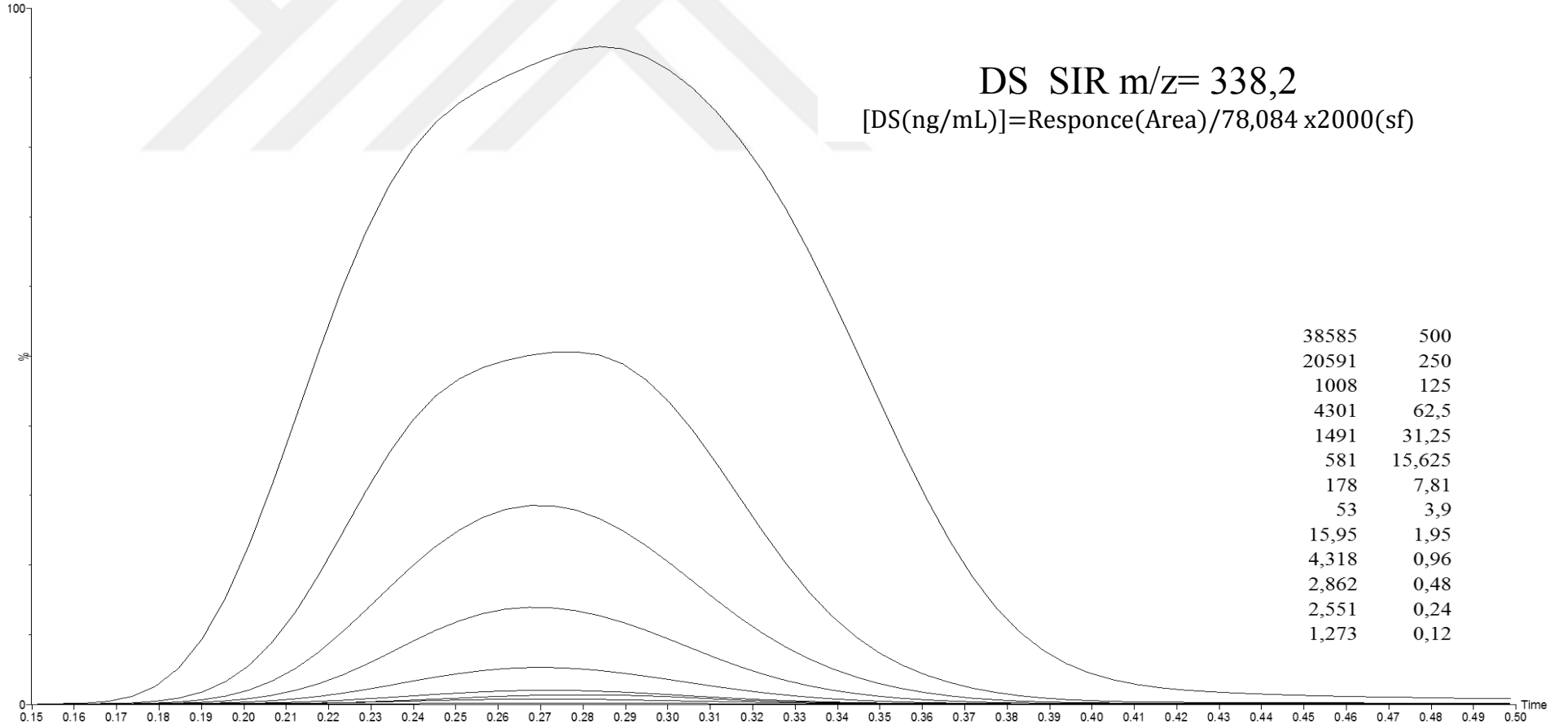
Şekil 9 A ve B. A: 0,48-8 ng/mL B: 0,48-1000 ng/mL DS 448,2>258,2 MRM standart grafikleri



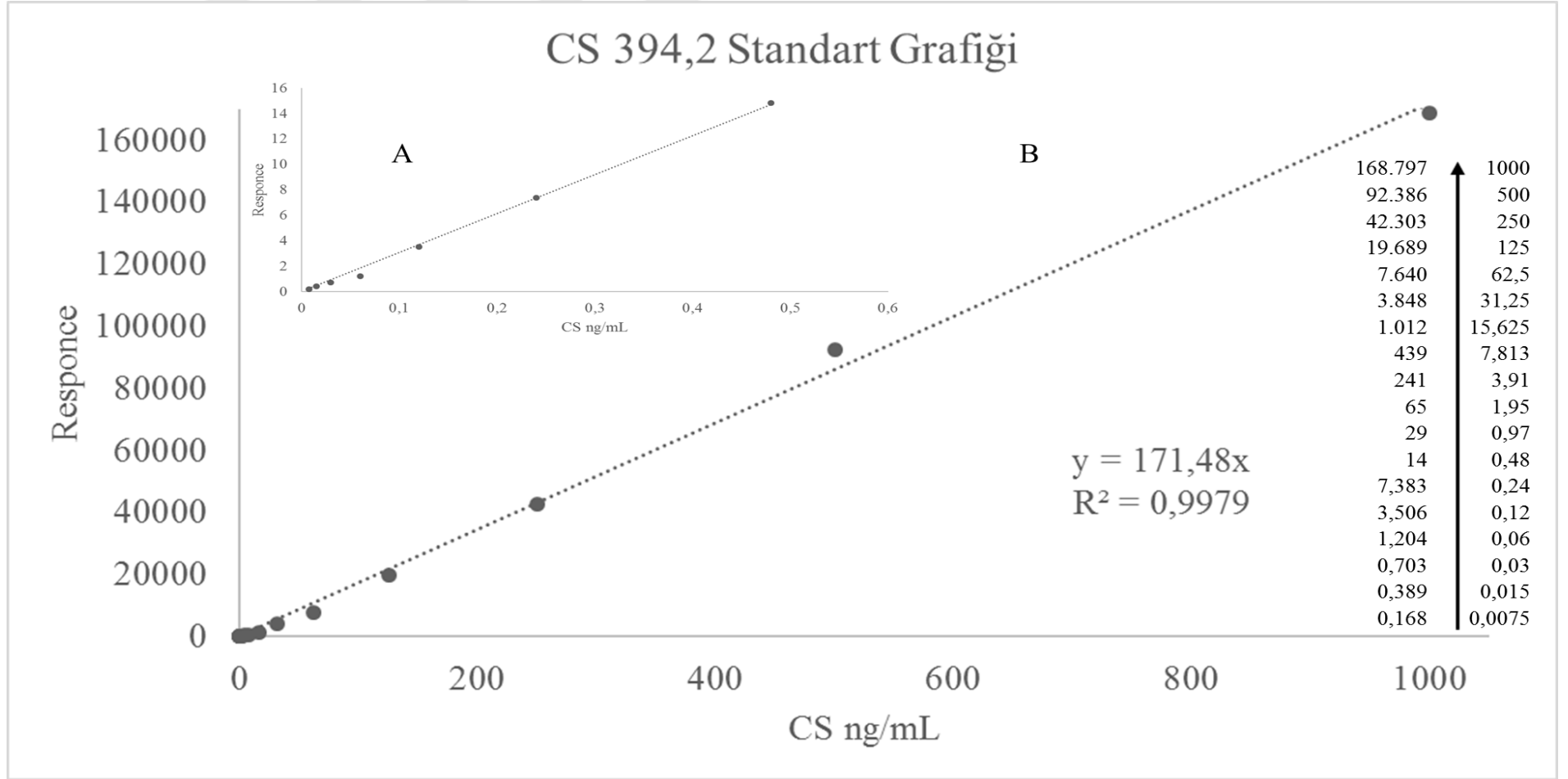
Şekil 10. DS MRM standart grafiği kromatogramları, ve DS hesaplaması



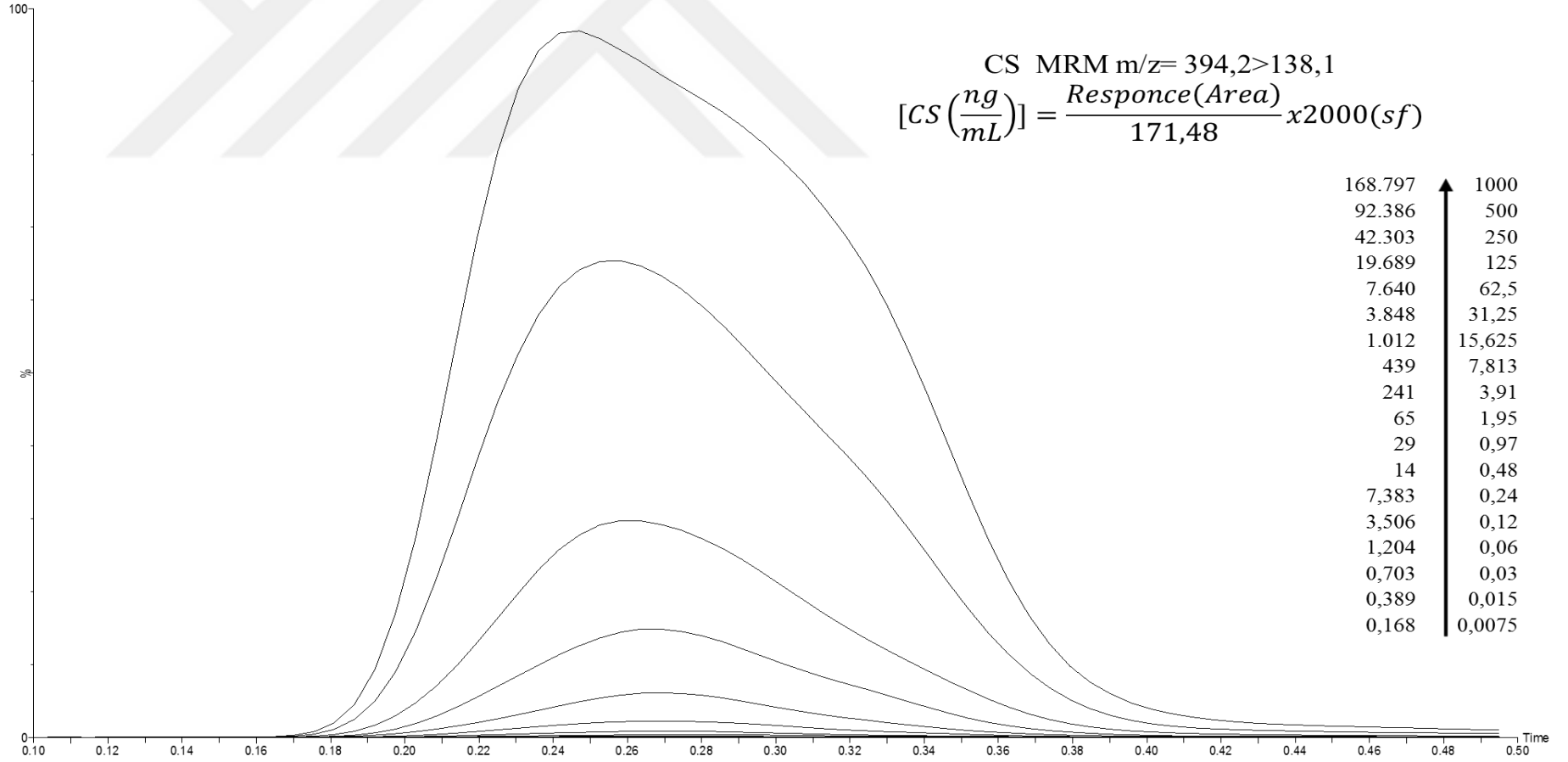
Şekil 11 A ve B. A: 0,12-15 ng/mL B: 0,12-1000 ng/mL DS 338,2 SIR standart grafikleri



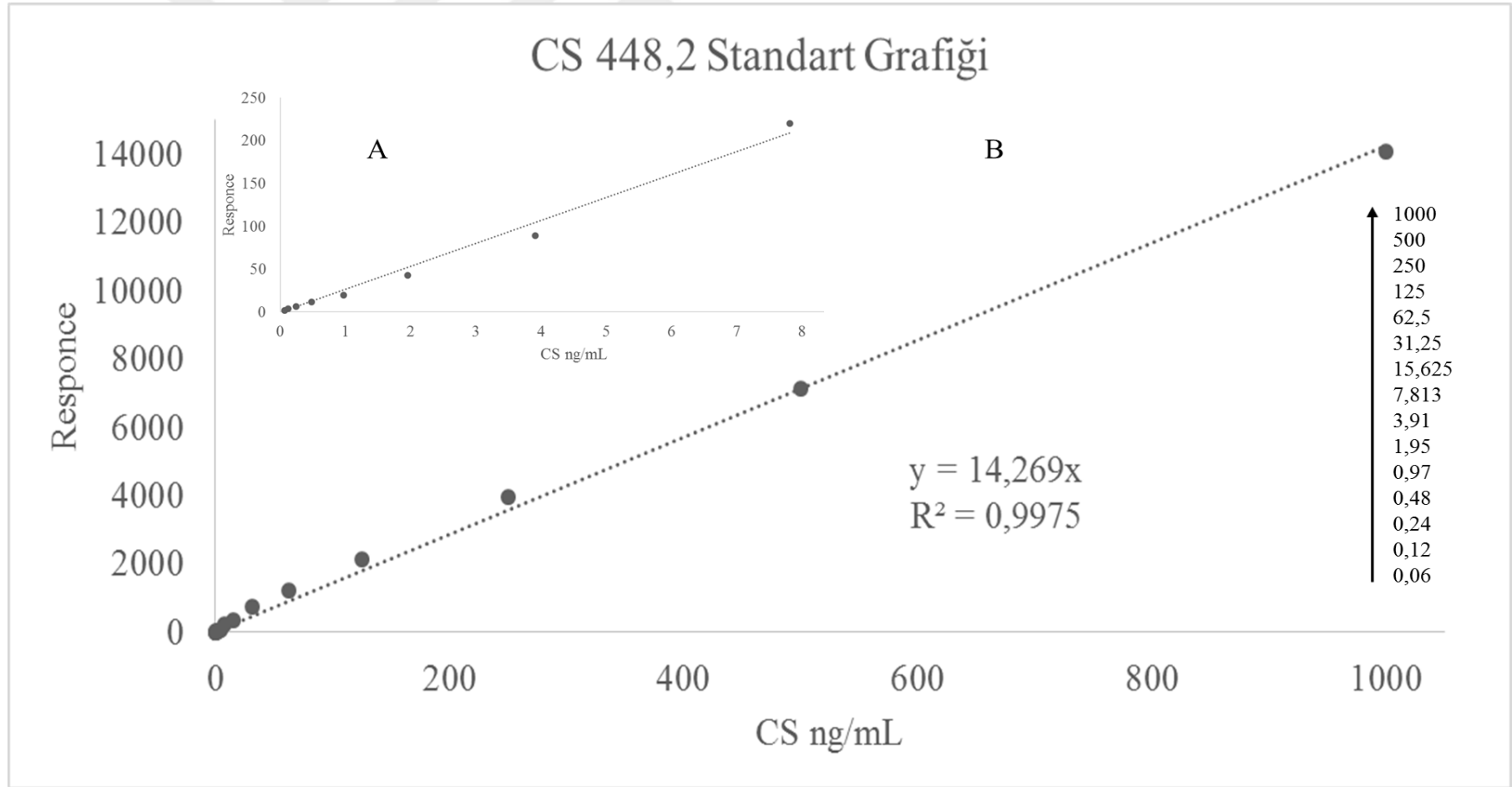
Şekil 12. DS SIR standart grafiği kromatogramları ve DS hesaplaması



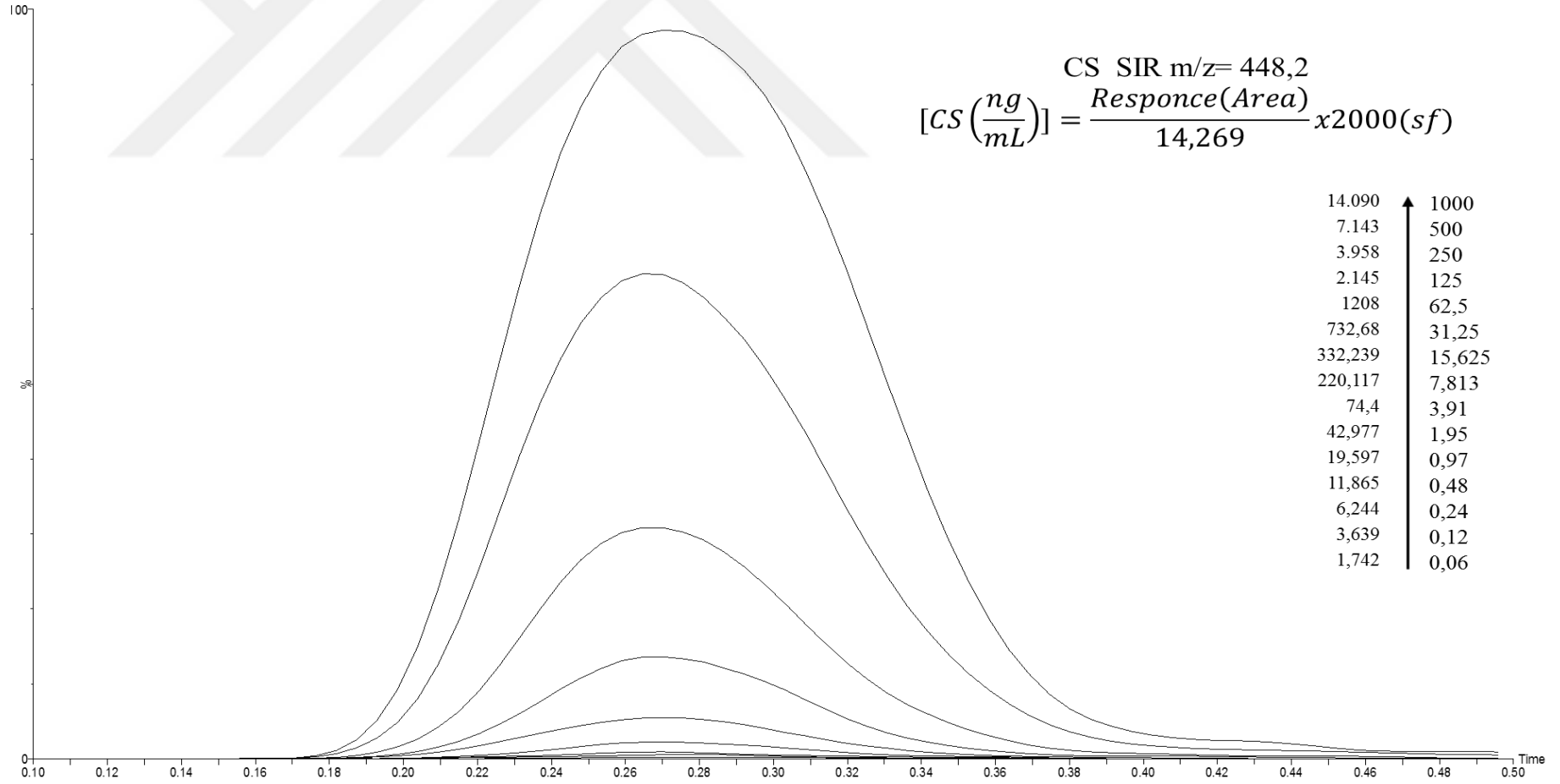
**Şekil 13 A ve B.** A: 0,0075-0,5 ng/mL B: 0,0075-1000 ng/mL CS 394,2>138,1 MRM standart grafikleri



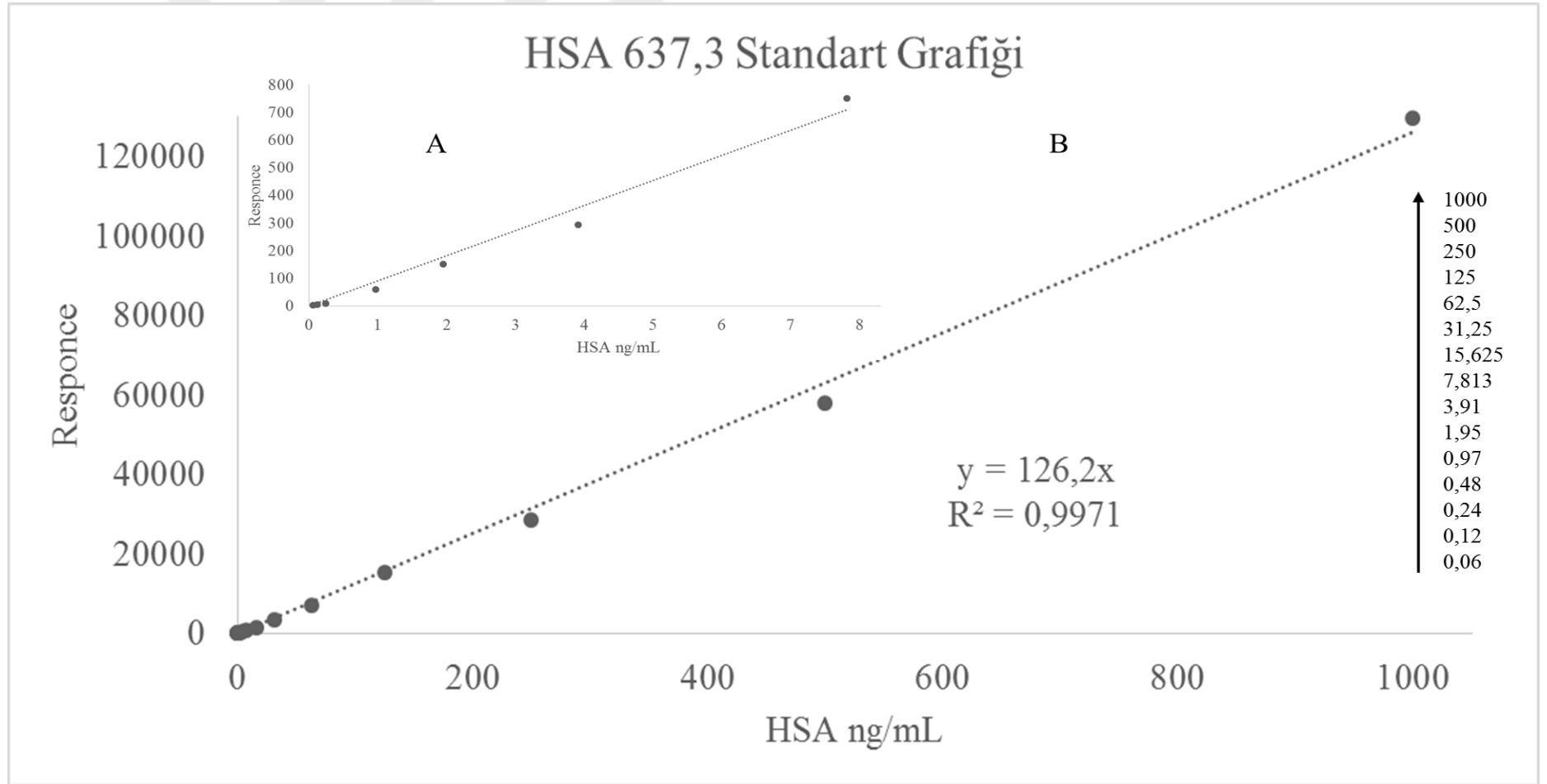
Şekil 14. CS MRM standart grafiği kromatogramları ve CS hesaplaması



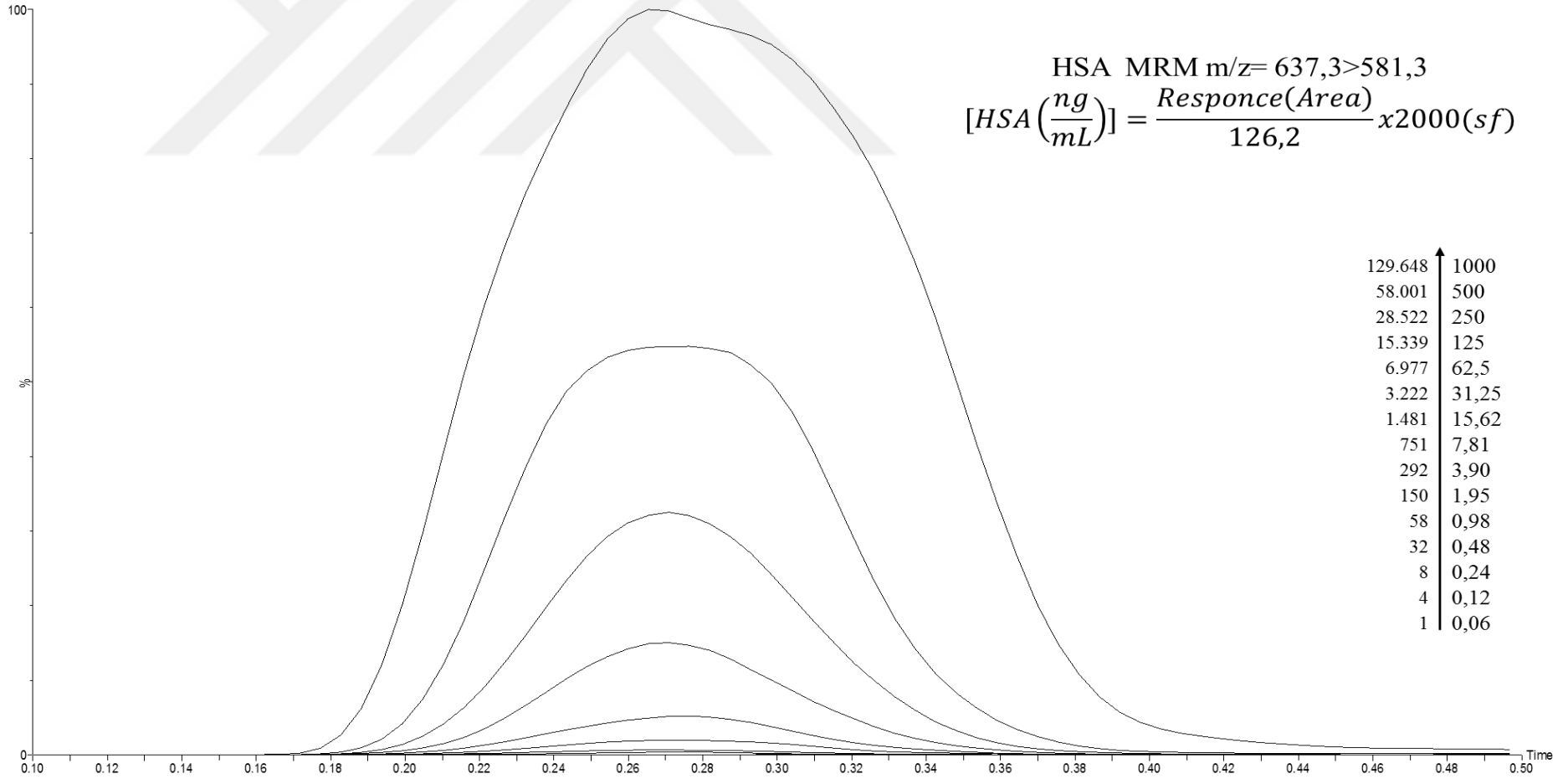
Şekil 15 A ve B. A: 0,06-8 ng/mL B: 0,06-1000 ng/mL CS 448,2 SIR standart grafikleri



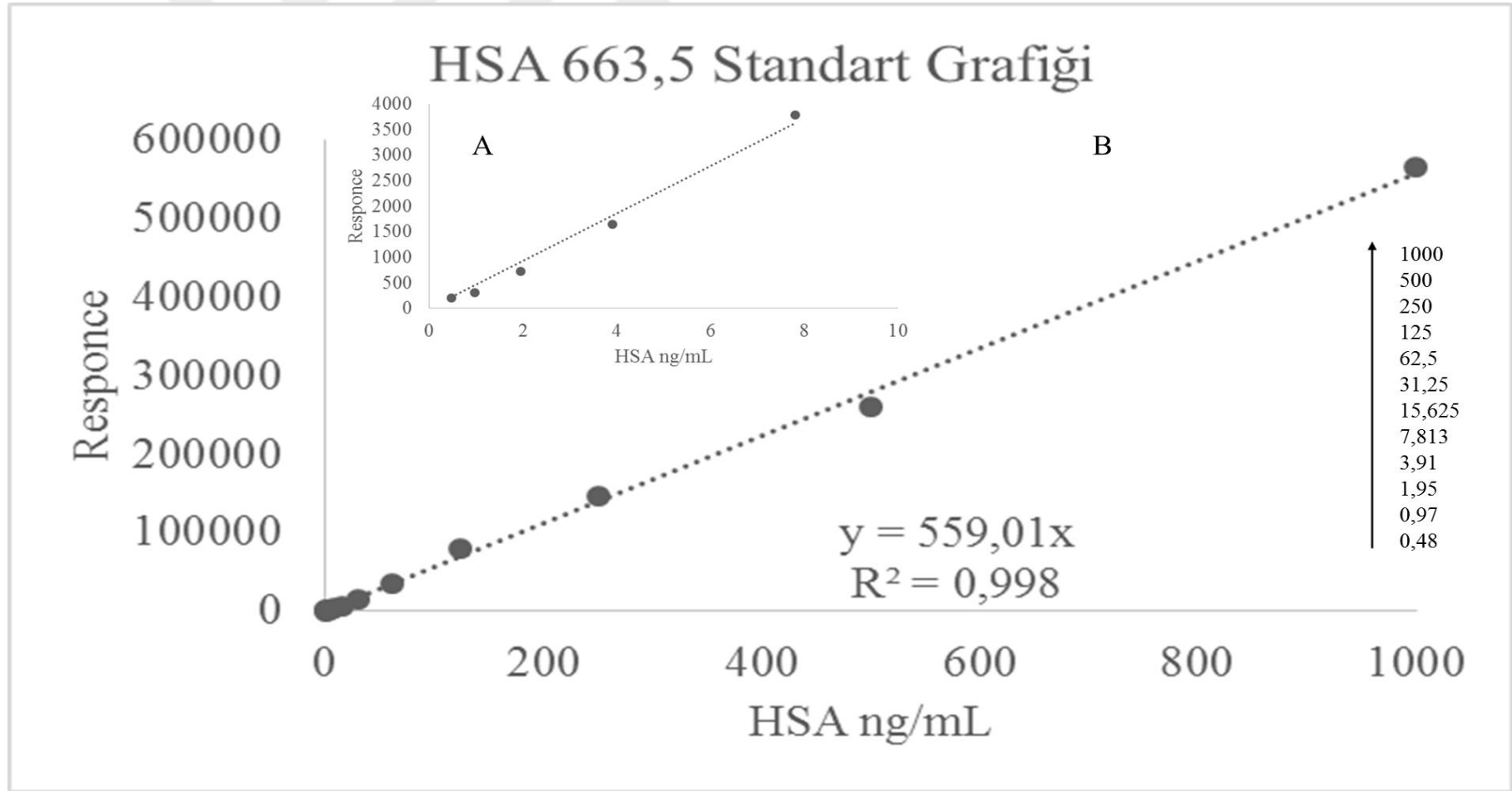
Şekil 16. CS SIR standart grafiği kromatogramları



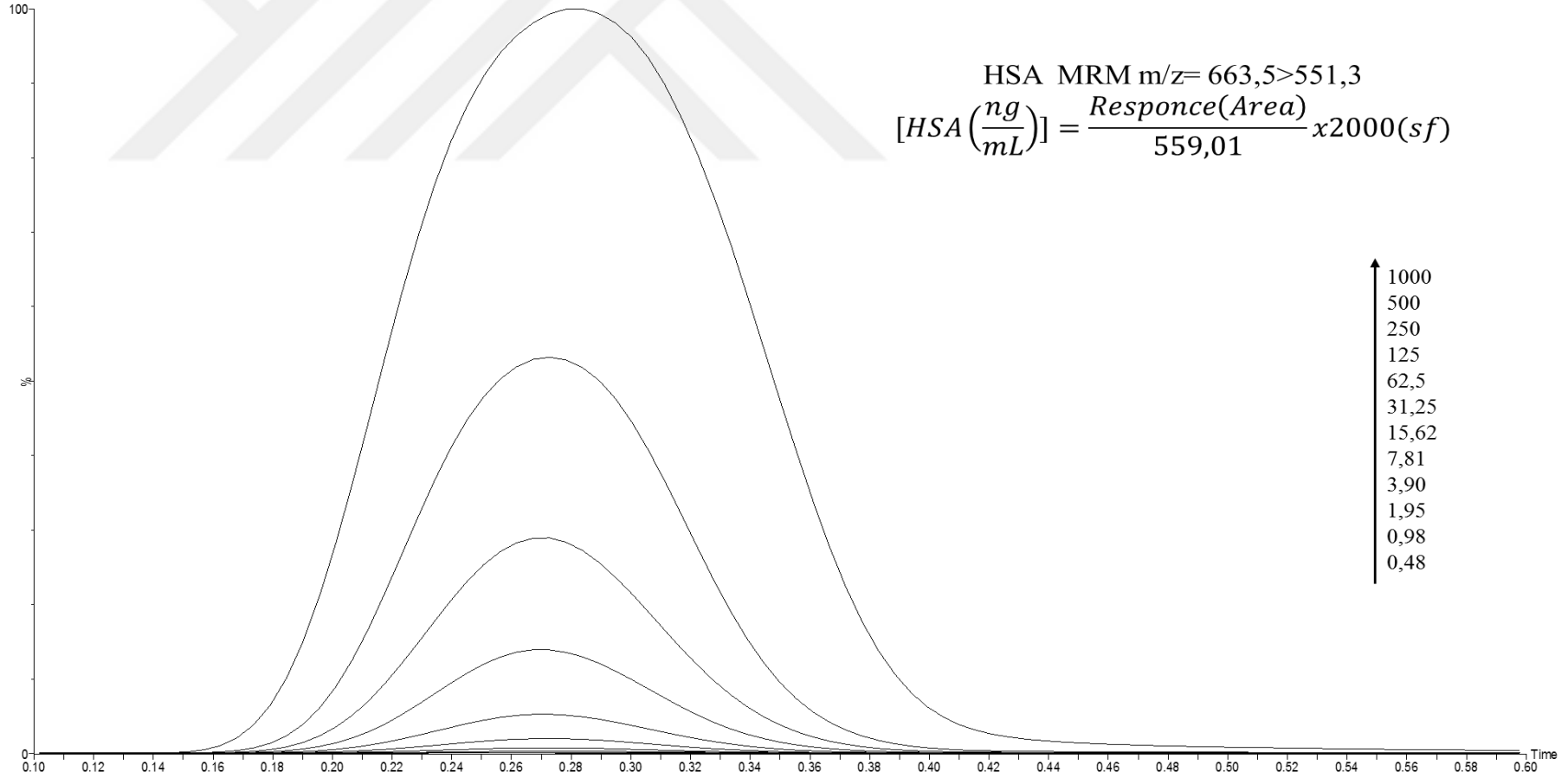
Şekil 17 A ve B. A: 0,06-8 ng/mL B: 0,06-1000 ng/mL HSA 637,3>581,3 MRM standart grafikleri



Şekil 18. HSA MRM standart grafiği kromatogramları



Şekil 19 A ve B. A: 0,48-8 ng/mL B: 0,48-1000 ng/mL HSA 663,5>551,3 MRM standart grafikleri



Şekil 20. HSA MRM standart grafiği kromatogramları

Standart grafikler, standart konsantrasyonunun kütle spektroskopisindeki response değerine karşı elde edilen değerlerin grafikleştirilmesiyle oluşturulmuştur. Kromatogramlarda görüldüğü gibi CS ve DS kimyasal degradasyonu ile elde edilen bir fragman aynı kütle/yük oranını vermiştir. Genel yapısına bakıldığında da, bu fragman tek bir karboksil grubunda farklanma göstermiştir. Her ne kadar bulunan veriler ışığında, DS için hazırlanan kolonun DS'yi tutacağı aynı şekilde CS için hazırlanan kolonun da CS'yi tutacağı ve elüatlarda CS veya DS'ye rastlanılmayacağından emin olursa da yine de kolonda adsorpsiyon ile tutulan CS veya DS için farklı ölçümler maddelerin kimyasal yönelimleri sonucunda kütle spektrometresinde elde edilmiştir. Buna göre CS'nin 448,2 m/z oranındaki fragmanı MRM ölçümlerinde parçalanmamıştır. Farklı Collision Enerji uygulandığında ise yine kütle spektrometresi MS detektöründeki sinyalinde bir azalma meydana gelmemiştir. Bu durumda, bu fragmanın iyonlaşmadığını göstermektedir. DS'nin verdiği fragman ise parçalanmış ve MRM sinyali oluşturmuştur. Dolayısıyla DS ve CS'nin 448,2 m/z fragmanları SIR ve MRM ölçümleri farkından ötürü girişim yapmamakta ve ayrı olarak ölçülebilmektedirler. Buna göre 448,2 m/z fragmanının parçalanma ürünleri ile elde edilen MRM sonuçları SIR sonuçlarından çıkarılarak CS miktarı hesaplanmıştır (Eşitlik 1).

$$\text{Eşitlik 1. } \left[ CS_{448,2} \left( \frac{ug}{mL} \right) \right] = (Response_{(CS)} - Response_{(DS)}) \times 7,86$$

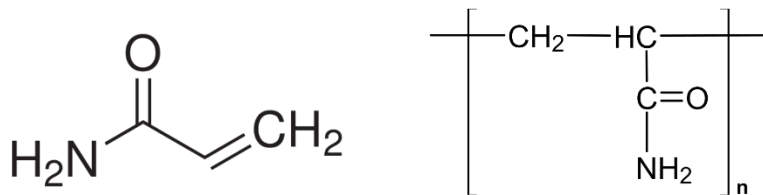
Tüm GAG'ların hesaplanmasında da verdikleri fragmanların konsantrasyonları toplam olarak hesaplanmış ve konsantrasyonlar total CS, DS ve HSA şeklinde verilmiştir (Tablo 4).

**Tablo 4.** GAG'ların konsantrasyon hesapları (C: Konsantrasyon)

| Glikozaminoglikan      | Hesaplama                         |
|------------------------|-----------------------------------|
| Dermatan Sülfat A (DS) | $C_{DS\ 448,2} + C_{DS\ 338,2}$   |
| Kondroitin Sülfat (CS) | $C_{CS\ 394,2} + C_{CS\ 448,2}$   |
| Heparan Sülfat (HSA)   | $C_{HSA\ 637,3} + C_{HSA\ 663,5}$ |

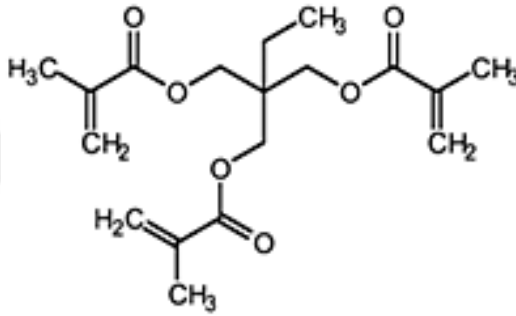
### 3.2. Polimerlerin Hazırlanması ve HPLC Kolonuna Doldurulması

Polimerler hazırlanırken, sülfat ve karboksil grubu içeren negatif yüklü GAG moleküllerini non-kovalent olarak çekebilecek bazik-nötral monomer molekülleri arasından, akrilamid seçilmiştir. Akrilamid yapısında amin ve oksijen grubu ihtiva etmesi ve pozitif yük kazandırması nedeni ile (Şekil 21) aranan özelliklere sahip olması ve sıklıkla kullanılan monomer moleküllerden birisi olduğu için seçilmiştir.



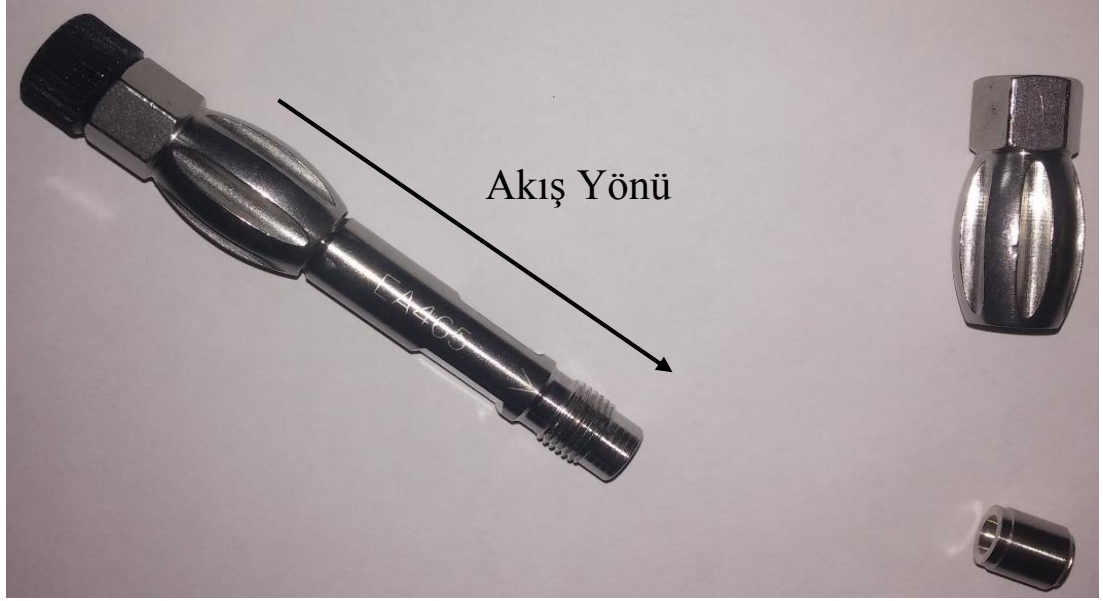
**Şekil 21.** Akrilamid ve akrilamid polimerlerinin kimyasal gösterimi

Akrilamid polimerizasyonu, yöntem kısmında anlatıldığı üzere presipitasyon polimerizasyon yöntemine göre gerçekleştirilmiş ve elde edilen polimerler kurutulduktan sonra HPLC kolonuna doldurulmuştur. Bu aşamada elde edilen polimerler uniform kürecikler şeklinde elde edilmiştir. Böylelikle elde edilen küreciklerin sadece yüzeylerinde baskılanma gerçekleştiğinden polimerin içerisinde gömülen GAG moleküllerinin etkisi presipitasyon polimerizasyonu ile minimize edilmiş, hatta belki de sıfırlanmıştır. Akrilamid üzerindeki amid grubu glikozaminoglikanların üzerindeki negatif yüklü sülfat ve hidroksil grupları ile etkileşerek GAG'ların çevresini sarmış, bu monomerler, TRIM çapraz bağlayıcısı (Şekil 22) ve AIBN ile polimerleştirildiğinde ise moleküler baskılanmış polimerler elde edilmiştir. Presipitasyon polimerizasyonu, küçük uniform kürecikler şeklinde oluşturulabilmesi, esnek olması ve kolonun içinde homojen dağılabilme özelliğinden ötürü tercih edilmiştir (21).



**Şekil 22.** TRIM kimyasal yapısı

Polimerin esnek oluşu da sıvı basıncına daha dayanıklı bir katı faz ekstraksiyon materyali sağlamaktadır. Kromatografik cihazlarda basıncın yükselmesi de önemlidir. Bu çalışmada, Şekil 23'te görülen kolona polimerler doldurulmuş ve HPLC pompasına bağlanmıştır (Şekil 23). Pompa sisteminde geri basınç oluştuğunda pompanın ara yüzünde hata oluşmakta ve akış kesilmektedir, kolon doldurma işlemine devam edildiğinde bir süre sonra kolonda boşluk kalmadığında akış hata vermeden devam etmekte, fakat basınç küçük dalgalanmalar göstermektedir bu dalgalanmalar da kolonun içinde bazı boşluklar olduğuna işarettir.



**Şekil 23.** Waters X-Bridge HPLC kolonu

### 3.3 Kromatografik Kolon Dolgu Materyallerinin Karakterizasyonu

Hazırlanan kolonlara öncelikle standart DS, CS, ve HSA'nın metanol çözeltileri 500 ng/mL olacak şekilde yüklenmiştir. Yükleme işleminden sonra elüsyon sıvısı; metanol:asetik asit (4:1) verilerek 0,3 mL/dk akış altında her 15 dakikada bir toplanan fraksiyonlar farklı tüplere alınmıştır. Toplanan fraksiyonlardaki sıvı faz, azot yardımıyla kurutulmuş, üzerine 3 M Metanolik HCl eklenerek kimyasal parçalamaya tabii tutulmuştur, bu işlemden sonra tekrar kurutularak susuz amonyum asetat (10mM) çözeltisinde çözülmüştür, bu çözelti aynı zamanda yürütücü faz olarak MS/MS analizinde kullanılmıştır. Polimer ekstraksiyon zamanları bu sıvıların analizine göre yapılmıştır.

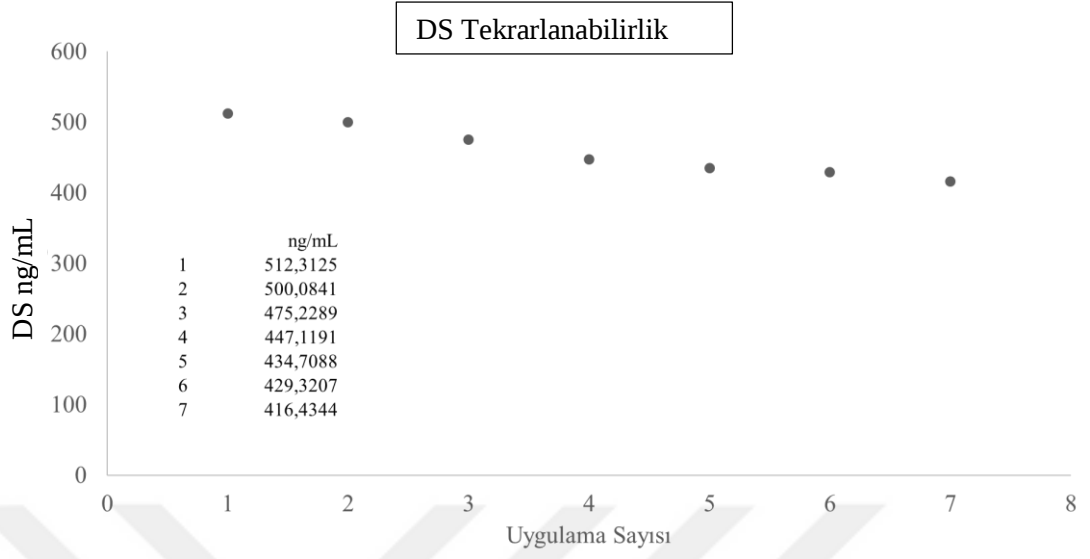
Buna göre her polimerin elüsyon zamanlarını saptamak için, kolon içinde hiç GAG kalmayınca kadar elüsyon yapılmış ve elüsyon zamanları elüsyon sıvısında hiç GAG kalmayınca kadar ölçülmüştür. CS ve DS için 45'inci dakikada fraksiyonlarda GAG'a rastlanmamış, bu nedenle 30'uncu dakikadan sonra her 1 dakikada bir fraksiyon toplanarak DS ve CS için sırasıyla 32 ve 38 dakika tam elüsyon zamanı olarak belirlenmiştir. HSA için ise 60'ıncı dakikada elüsyon sıvısında HSA miktarı belirlenememiş ve 45'inci dakikadan sonra her 1 dakikada bir ölçüm alınarak 54 dakika tam elüsyon zamanı olarak belirlenmiştir (Tablo 5).

**Tablo 5.** GAG seçimli polimerlerin elüsyon zamanı optimizasyonu

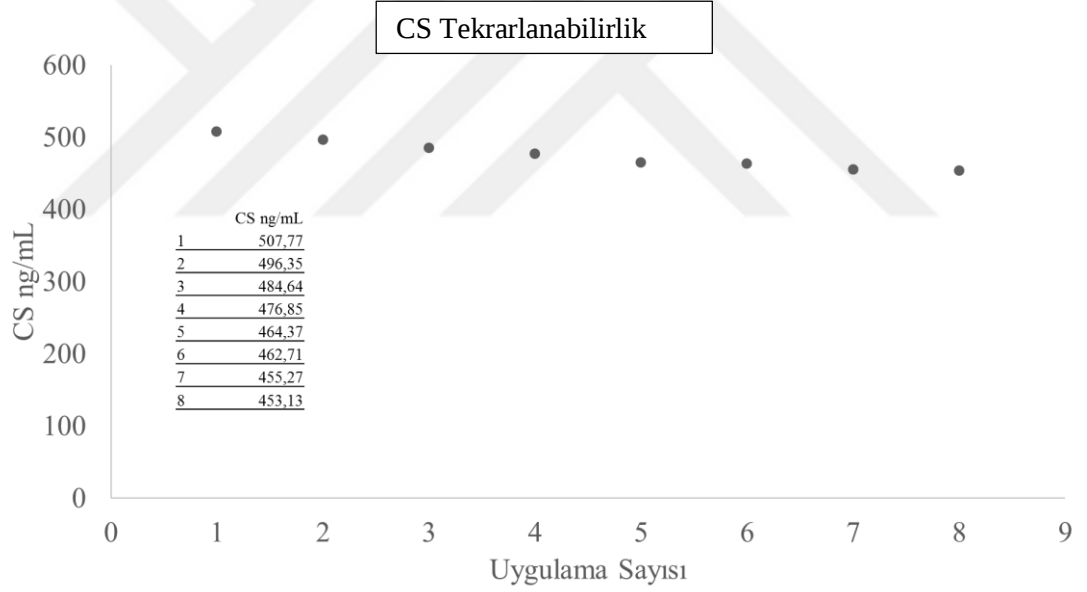
| Polimer | Yıkama Süresi              |
|---------|----------------------------|
| DS      | 32 dk/ Akış Hızı: 0,3mL/dk |
| CS      | 38 dk/ Akış Hızı: 0,3mL/dk |
| HSA     | 54 dk/ Akış Hızı: 0,3mL/dk |

Polimerlerin yıkama süresi tespit edildikten sonra, 500 ng/mL standart örnek uygulanan kolonlar tablodaki yıkama sürelerine göre yıkanarak tekrarlanabilirlikleri

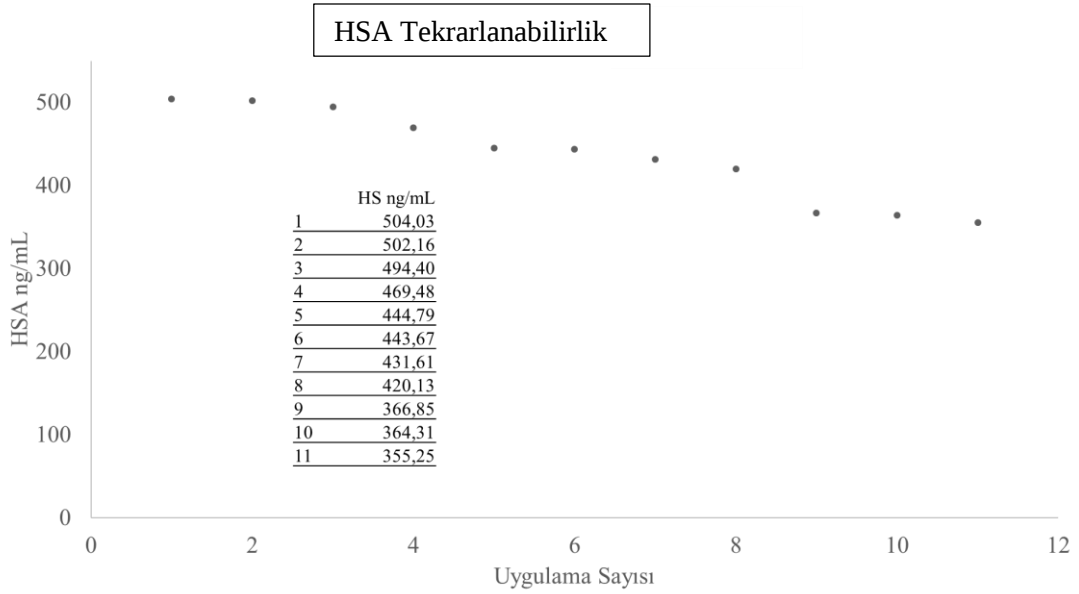
hesaplanmıştır. Buna göre şekil 24, 25 ve 26'daki tekrarlanabilirlik değerleri gösterilmiştir.



**Şekil 24.** Aynı polimere 7 kez DS 500 ng/mL örnek uygulaması



**Şekil 25.** Aynı polimere 8 kez CS 500 ng/mL örnek uygulaması



**Şekil 26.** Aynı polimere 11 kez HSA 500 ng/mL örnek uygulaması

Eklenen örneklerle ve bulunan değerlere bakıldığında, kolon kullanımına bağlı olarak kolondan elüsyon zamanının arttığı görülmektedir. Bu, düşünüldüğü üzere kolonun doldurulma süreçlerinden kaynaklanmaktadır. Akış hızının ilk ölçümden sonraki her ölçüm için optimizasyonu bu sorunu ortadan kaldırabilir. Buna rağmen moleküler baskılanmış polimerlerin tutma kapasitelerinin %70'in üzerinde geri elde edilebilmesi moleküler baskılanmış polimerlerde uygun olarak görülmektedir. Hazırlanan kolonların verimliliğine ve tekrarlanabilirliğine bakıldığında en iyi sonuçlar sırasıyla CS, HSA ve DS kolonu şeklinde bir sıralamayla karşımıza çıkmaktadır. Bu kıyaslama, tekrarlanan ölçümlerde polimerin tutma kapasitesindeki azalmaya bağlı olarak her üç polimerin tutma kapasitesi sonuçlarına göre kıyaslama yapılmıştır. Bu durumda polimerin kullanılması sonucunda elüsyon zamanında da artış görülmesi olasıdır.

### 3.4 Gerçek Örnek Denemeleri

Gerçek idrarlarda elde edilen GAG değerleriyle ilgili önceki çalışmaların değerlerine bakıldığında, sağlıklı 0-3 yaş arası sağlıklı çocuklarda HSA % 19,2 CS % 56,3 DS ise % 3,3 oranında olduğu görülür (34). Miligram seviyelerinde bulunan bu miktarlar için idrar örneklerinden elde edilen GAG'lar 2000 kat seyreltilmiştir. Standart grafikler de buna göre hazırlanmıştır. Gerçek örnek denemelerinde idrar örnekleri yöntem bölümünde belirtildiği gibi hazırlanmış ve metanolde çözülerek içerisine CS, DS ve HSA'nın her birinin 500 ng/mL konsantrasyon içerecek şekilde standart eklenmiş ve kolonlara yüklenmiştir. Sonrasında da elüsyon sıvısı uygulanarak GAG'lar kimyasal parçalanmaya maruz bırakılmış ve MS analizleri gerçekleştirilmiştir. Tüplerde toplanan elüsyon sıvıları kütle spektrometresinde analiz edilerek kesin GAG miktarının hesaplanabilmesi için standart grafiklerle birlikte idrarlar standart katma metodu uygulanarak hesaplama yapılmıştır (Tablo 6). Pool idrardan alınan örnek 6 kez sisteme verilmiş standart sapma değerleri buna göre hesaplanmıştır.

**Tablo 6.** İdrar örnekleri ve bulunan sonuçlar, (Recovery) (n=6)

| <b>Eklenen GAG</b>     | <b>Standart GAG</b> | <b>Bulunan GAG</b>  | <b>İdrardaki GAG</b> |
|------------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| Standart GAG Karışımı  | 500 ng/mL           | 504,214±18,02 ng/mL |                      |
| Dermatan Sülfat (DS)   | 500 ng/mL           | 514,2±21,8 ng/mL    | 14,2 ng/mL           |
| Kondroitin Sülfat (CS) | 500 ng/mL           | 681,45±28,1 ng/mL   | 181,45 ng/mL         |
| Heparan Sülfat (HSA)   | 500 ng/mL           | 547,21±24,3 ng/mL   | 47,21 ng/mL          |

Bulunan sonuçlara göre, standart GAG karışımında % 0,8 birimlik ölçüm artışı meydana gelmiştir. Diğer idrar ölçümlerinde de farklanmalar meydana gelmiştir, karışımdaki farklanma, aynı çözeltide bulunan GAG'ların matriks etkisi olduğunu düşündürmektedir fakat bu göz ardı edilecek kadar azdır. Buna göre sağlıklı kişideki GAG değerleriyle (ref) ölçümde bulunan değerler karşılaştırıldığında, geliştirdiğimiz seçici kolonla elde edilen değerlerin çok benzer sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir, bu da MIP ile yapılan analizin doğruluğunun ve özgüllüğünün ideale yakın olduğunu göstermektedir.

### 3.5 Baskılanmamış Polimerlerle GAG Analizi

Yöntem bölümünde belirtilen şekilde, GAG'ların baskılanmadığı kontrol polimeri (Nonimprinted polymer-NIP) de benzer süreçle hazırlanarak boş kolonlara doldurulmuştur. Bu işlemten sonra sisteme uygulanan 500 ng/mL'lik GAG karışımı metanolde çözülerek verilmiştir. Baskılanmış kolonların aksine elüsyon fazı olarak metanol uygulanmış ve tutma kapasiteleri aşağıdaki tabloda belirtilmiştir (Tablo 7).

**Tablo 7.** NIP Karakterizasyonu

| <b>GAG</b> | <b>15 dk</b> | <b>30 dk</b> | <b>45 dk</b> | <b>60 dk</b> |
|------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| HSA        | 466 ng/mL    | 18 ng/mL     | 8 ng/mL      | 0            |
| CS         | 483 ng/mL    | 4 ng/mL      | 0            | 0            |
| DS         | 473 ng/mL    | 9 ng/mL      | 2 ng/mL      | 0            |

Elde edilen bu sonuçlara göre baskılanmamış polimer farklı GAG'lara bir seçicilik göstermemiştir. Polimerin pozitif yüklü yapısı nedeniyle, adsorpsiyon gözlenmektedir. Her ne kadar iyonik adsorpsiyon gözlenirse de NIP, MIP ile karşılaştırıldığında katı-fazda kolonda kalma süresi (retention time) uzamış bu da 45 dk'arda örnek görülmesine yol açmıştır. Sonuç olarak, NIP'de spesifik bir ayırma gerçekleşmemiştir.

#### 4. TARTIŞMA

Bu çalışmada, idrar GAG'larının ortamdan spesifik olarak ayrıştırılarak doğru analiz edilmeleri için MIP yöntemiyle seçici bir kromatografik kolon geliştirilmiştir. Seçilen 3 GAG (CS, DS ve HSA)'ın kimyasal degradasyonu sonucu oluşan fragmanlar SIR (MS) ve MRM (MS/MS) metodunda ölçülmüştür. Elde edilen değerlerle bir kütüphane oluşturulmuştur. Bu işlem sırasında, kimyasal parçalama oluşturulan GAG'lardan CS ve DS'nin aynı m/z değeri (448,2) verdiği görülmüştür. Yapılarında sadece bir karboksil grubu yönelimi farkı olan bu polisakkaritlerin verdiği fragmanlardan DS'nin bir fragmanı MRM ölçümünde parçalanmış, fragmanın bu parçalanma özelliği sayesinde CS ve DS ayırt edilebilmiştir. GAG fragmanlarının tayiniyle oluşturulan bu kütüphane kullanılarak her bir GAG için standart grafikler çizilmiş ve idrar örneklerindeki GAG'lar bu grafikler temel alınarak kantifiye edilmiştir. Kolon optimizasyon sonuçlarına göre, ardı ardına uygulanan standart ölçümlerinde kolon dolgu materyali iyi bir tekrarlanabilirlik özelliği göstermiştir. Geliştirilen yöntemin doğru sonuç verip vermediğini saptamak için ise, sağlıklı çocuklardan alınan idrar örnekleri MIP kolonundan geçirilerek analiz edilmiş ve sonuçta her bir GAG için bilinen referans değerlere yakın değerler elde edilmiştir. Kısaca, MIT ile hazırlanmış dolgu materyali söz konusu 3 GAG'a seçicilik göstermiş, kontrol amacıyla baskılanmamış dolgu materyaliyle yapılan ölçümlerde ise bir seçicilik gözlenmeyip sadece kolonun pozitif yüklü yapısından kaynaklanan bir adsorpsiyon saptanmıştır. Bu da, çalışmanın hedefine uygun olarak, geliştirilen kolonun seçici bir şekilde GAG'ları ayırarak analizini kolaylaştırdığını göstermektedir.

Bu alanda yapılmış olan önceki çalışmalar değerlendirildiğinde, spesifik GAG ölçümlerinin dışında, total GAG ölçüm yöntemleri de bulunduğu görülmektedir. . Bu yöntemler her ne kadar  $\mu\text{g}$  düzeylerinde ölçümlere olanak sağlasalar da, LOD değerleri yine  $\mu\text{g}$  düzeyinde kalmaktadır (35,36). Bu yöntemlerle de GAG tayini yapılabilir, ancak bu yöntemlerle spesifik GAG türlerinin belirlenememesi hastalık teşhisi konusunda zorluklar yaşanmasına neden olur. Buna karşılık geliştirdiğimiz sistem, total GAG ölçümü yapan bu yöntemlere göre çok daha duyarlı ve seçicidir.

HPLC ve MS ile yapılan GAG tayin çalışmalarında en önemli nokta hareketli fazın doğru seçilmesidir. Kütle spektrometresi ile yapılan çalışmalarda daha verimli sonuçlar elde edilmiş olmasına rağmen HPLC ile yapılan çalışmaların, MS sistemine göre yürütücü faz bakımından daha az verimli olduğu bildirilmiştir (37,38). Bunun nedeni, HPLC çalışmalarında GAG fragmanlarının ucundaki monosakkaritin özelliğine göre floresans ölçümlerinin gerçekleştirilmiş olması, ancak iduronik asit veya glukuronik asitin farkının HPLC ile belirlenememiş olmasındandır. Ölçümler sadece glukuronik asit, galaktozamin veya glukozamin üzerinden yapılabilmektedir, ancak her ne kadar ölçüm yapılabilir olsa da GAG'ların detektöre gelme zamanı aynıdır, bu da sonuçta ölçümün seçimliliğini azaltmaktadır (39).

Mukopolisakkaridoz I, II ve VI hastalarının örneklerinde disakkaritleri metanoliz yöntemi ile parçaladıktan sonra, HSA ve DS'nin parçalanma ürünlerini MS/MS analiz eden Auray-Blais ve arkadaşları'nın . elde ettiği kütle kromatogramlarına bakıldığında, piklerin yakın çıktığı, bunun da CS ile yapılacak ölçümlerde girişimlere açık olabileceğini gösterdiği belirtilmiştir (16). Bu yöntemden elde edilen veriler ışığında, bizim yöntemimizde elde ettiğimiz kolon dolgu materyali daha seçici ve aynı zamanda internal standarta gerek duymayan bir sistemdir.

Barosso ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmaya göre (40), akciğer dokusu ekstraktlarındaki GAG seviyeleri Kondroitinaz ABC enzimi ile parçalanarak belirlenmek istenmiştir. Bu çalışmada kütle spektroskopisi ölçümü yine elde edilen fragmanlara göre yapılmıştır. Yapılan çalışmada en düşük değer olarak 0,1 ng/mL belirtilmiştir, bu duyarlılığa rağmen yöntemde enzim kullanılmış olması maliyeti arttıran bir faktördür.

Daha önce yapılan bu çalışmalarda görüldüğü gibi spesifik GAG tayini yapabilmek oldukça zor ve ön işlem gerektiren bir durumdur. Polianyonik yapısıyla yüksek polariteye sahip olan GAG'lar önce enzimatik ya da kimyasal olarak parçalanmakta, elde edilen fragmanlar MS ve HPLC cihazlarında ayırt edilebilmektedir. Bu yöntemler her ne kadar duyarlı olsa da, ayırt edici güçleri geliştirdiğimiz yöntemden çok daha azdır. Moleküler baskılama yoluyla oluşturduğumuz polimerlerin taşıma kapasiteleri de ölçümlerde gösterildiği gibi genel kabul gören ayrılan kalıp molekülün %90 oranında geri bağlanması gerekir prensibine (41) göre başarılı sonuçlar vermiştir. Bu veri de hazırlanan yapay reseptörlerin, bu affinite kolonunda güvenle kullanılabilir olduğunu göstermektedir. MIT ile geliştirdiğimiz bu yöntem ile GAG'lar seçimli bir şekilde ayrılabilen ve analizleri rahatlıkla gerçekleştirilebilmektedir. Her ne kadar pozitif-nötral polimerler negatif yükleri çekme kapasitesine sahip olsa da, deneylerimizden elde ettiğimiz bulgular, oluşturulan yapay oyukların GAG'lara daha seçici olduğunu ve ortama eklenen GAG birimlerinin standart grafiklerdeki miktarına göre orantılı olduğunu ve elde edilen standart sapma düzeylerinin kabul edilebilir bir şekilde, % 5'in altında olduğunu göstermektedir. Kolon dolgu materyalinin geliştirilmesi sırasında, presipitasyon polimerizasyonu ile hazırlanan uniform küreciklerin yüzeyleri baskılandığı için polimer içerisinde gömülme meydana gelmediği saptanmıştır. . Bu durum, verimlilikte de artışa neden olmuştur. Bu kürecikler esneklik, dolayısıyla dayanıklılık da sağladığından bu yolla elde edilen polimerin iyi bir kolon dolgu materyali olarak kullanılabileceği öngörülmüştür

Yaşa bağlı GAG değerleri profiline bakıldığında idrar ile atılan GAG'ların çocukluk çağında en yüksek değerlerde olduğu gözlemlenmektedir (42). Bu nedenle çalışmamızda deneyeceğimiz örnekler için çocuk idrarı seçilerek yüksek konsantrasyon ile doğrulama yoluna gidilmiştir. Çocuk idrarlarında çöktürme ile metilen mavisi ile elde edilen total Glikozaminoglikan miktarlarında da bunu doğrulayabilmemiz açısından önemlidir.

Kolon yıkama sürelerine bakıldığında, 15. dakikadan önce GAG miktarının belirlenebildiği ve kolonların tamamen temizlenmesinin 60 dakikanın altında olduğu görülmektedir. Buna göre, tayin süresi ölçümler için oldukça uygundur ve kolonun göreceli olarak kısa zamanda temizlenmesi, daha az maliyetli olmasını ve kullanılabilirliğinin artmasını sağlamaktadır.

Çalışmamızda, gerçek idrar örneklerinin kolona uygulanabilmesi için seyreltme gerçekleştirilmiştir. Bu seyreltme ile normal idrarda bulunması gereken GAG miktarları standart grafiklerin seviyelerine inmiş ve ölçüm gerçekleştirilmiştir.

Kolonların yıkama işlemlerinden sonra uygulanan kimyasal parçalama işlemi sistemi offline bir ölçüm haline getirmiştir. Böyle bir yaklaşım, her ne kadar online MS/MS veya HPLC ölçümleri için uygun olmasa da, GAG'ları parçalama işlemi olmaksızın seçimli olarak ölçebilecek TOF cihazları için uygundur, yani geliştirdiğimiz kolon sadece HPLC'de değil tüm kromatografik sistemlerde

alışabilme potansiyeli göstermektedir. Kimyasal fragmanların saflaştırılması ve baskılanması üzerinden ölçüm gerçekleştirilebilirse, geliştirdiğimiz kolonlar online MISPE sistemi olarak da kullanılabilecektir.

Çalışmamızda, idrar örneklerine ekleme yapılması ile elde edilen ktle spektrumlarının oldukça tutarlı olduğu tespit edilmiştir. Eklenen miktardan önce, idrardan aynı ktlede daha zayıf sinyalde pikler elde edilmiş, 500 ng/mL olarak eklenen GAG türleri ile ise ktle spektrumlarının sinyali artmış şekilde elde edilmiştir. Bu da yöntemin doğruluğunu ve fragmanların standartlara benzer şekilde elde edilebilirliğini göstermektedir.

Son olarak, baskılanmamış polimerlerle yapılan analizlerde yıkama suyuna gerek kalmadan sadece idrar örneklerinin akışını sağlayan metanol hareketli fazı ile ölçüm yapılmış, ancak eklenen standart çözelti kolondan yaklaşık 15. dk'da, tutulmadan çıkmışlardır. Katı fazda hareket kabiliyeti azalan ve pozitif ykler tarafından çekilen GAG'larda hareketli fazda bir farklanma olmamıştır.



## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada idrar GAG tayininde kullanılmak üzere, GAG seçimli bir kromatografik kolon dolgu materyali başarı ile geliştirilmiştir. Bu kolon HPLC pompa sisteminde 300 µL/dk akış hızı altında denenmiş ve bu akış hızında herhangi bir geri basınç olamaması dolayısıyla pompa sisteminde bir sorun görülmemiştir. Basınçta zaman zaman dalgalanma olması, doldurma prosesinin daha fazla geliştirilmesi gerektiğini göstermektedir. Buna bağlı olarak seçilen polimerin, üretim şekli nedeniyle esnek olması geri basınç probleminin kolay aşılmasını sağlamıştır. Bu da presipitasyon polimerizasyonu yöntemiyle elde edilen kolon dolgu materyalinin kullanılabilir olduğunu göstermektedir.

Yapılan çalışmada, sülfatlanmış ve negatif yüklü GAG'ları daha seçimli hale getirilebilecek akrilamidin monomer olarak seçilmesi geliştirdiğimiz kolon dolgu materyalinin seçiciliğini artırmıştır. Bu şekilde karşıt yüklü monomerlerin seçilmesi ayırma gücü açısından önemlidir.

Kütle spektrometresi çalışmasında offline sistem kullanılmıştır, bu şekilde sistem her ne kadar kontaminasyona açık bir yapı haline gelmiş olsa da sonuçlarımızın çok etkilenmediği görülmüştür. Sistemin online sistem haline getirilmemesinin nedeni ise kolon elüsyon adımıdan sonra, toplanan fraksiyonların kimyasal parçalama işlemine tabi tutulmasıdır. Bu nedenle sistem offline olarak tasarlanmıştır. MRM ölçümlerinde sadece parçalanmış fragmanın iyonlaşması durumunda bu iyondan kaynaklanan ürünlerin oluşturduğu sinyallerin ölçümü yapıldığından doğruluk son derece yüksektir.

Kolon karakterizasyonunda, her ne kadar MS/MS sistemi ile karakterizasyon yapılmış olsa da GAG'ların büyük kütlelere sahip olması nedeniyle TOF sistemlerinde direkt online ölçümlerin uygun olabileceği öngörülmektedir.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar idrar GAG'larının seçimli bir şekilde ayrılarak tayin edilmesinde moleküler baskılama yoluyla elde edilen polimerlerin kromatografik kolon dolgu materyali olarak kullanılabileceğini ve yöntemin düşük maliyet, hızlı ayırma, duyarlı ve seçici sonuç verme gibi avantajlar sağlayabileceğini göstermektedir. Bu aşamada, konuyla ilgili yapılacak çalışmalarda teknik ve klinik uygulamalar ön plana çıkmalıdır. Teknik olarak, her 3 GAG'ı birlikte seçebilen tek bir MIP geliştirilmesi maliyeti daha da düşürecek ve analiz süresini kısaltacaktır. Klinik olarak ise geliştirilen ve doğru-seçici ve kullanılabilir özellikler taşıyan mevcut sistemin geniş hasta gruplarında kullanılmasıyla değerli veriler elde edilecektir.

Sonuç olarak bu çalışmada, moleküler baskılama yöntemiyle geliştirilen GAG seçici kromatografik kolon dolgu materyali sayesinde GAG ayırma işlemi basitleştirilmiş, hızlandırılmış, ayrıca yüksek seçicilikle farklı bileşiklerin olduğu karmaşık vücut sıvılarından ayırma gibi kullanımı arttıracak avantajlar yakalanmıştır. Moleküler baskılanmış ekstraksiyon kolonları ayrıca diğer birçok dolgu materyaline göre maliyeti düşük sistemlerdir. Böylelikle, GAG'ın kromatografik analizlerine paralel yeni, ekonomik, seçici ve kolay uygulanabilir bir materyal elde edilmiştir. Tüm bu avantajlar sayesinde GAG tayinlerinin önemli olduğu hastalıklarda, hastanın tanı ve izleminde önemli bir ölçüm kolaylığı ve doğruluğu sağlayabilecek bu yöntemle sağlık alanında katma bir değer elde edileceği öngörülebilir.

## KAYNAKLAR

1. Iozzo R V. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem* [Internet]. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA; 1998 Jan 28 [cited 2015 Oct 29];67:609–52. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.biochem.67.1.609>
2. Iozzo R V, Schaefer L. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol* [Internet]. 2015 Mar [cited 2015 Sep 7];42:11–55. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0945053X15000402>
3. Oguma T, Toyoda H, Toida T, Imanari T. Analytical method of chondroitin/dermatan sulfates using high performance liquid chromatography/turbo ionspray ionization mass spectrometry: application to analyses of the tumor tissue sections on glass slides. *Biomed Chromatogr* [Internet]. 2001 Aug [cited 2015 Nov 30];15(5):356–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11507718>
4. Oguma T, Tomatsu S, Montano AM, Okazaki O. Analytical method for the determination of disaccharides derived from keratan, heparan, and dermatan sulfates in human serum and plasma by high-performance liquid chromatography/turbo ionspray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Biochem* [Internet]. 2007 Sep 1 [cited 2015 Nov 30];368(1):79–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17603992>
5. Tomatsu S, Montaña AM, Oguma T, Dung VC, Oikawa H, Gutiérrez ML, et al. Validation of disaccharide compositions derived from dermatan sulfate and heparan sulfate in mucopolysaccharidoses and mucopolipidoses II and III by tandem mass spectrometry. *Mol Genet Metab* [Internet]. 2010 Mar [cited 2015 Nov 30];99(2):124–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19932038>
6. MPSQN - Clinical: Mucopolysaccharides (MPS), Quantitative, Urine [Internet]. [cited 2015 Dec 16]. Available from: <http://www.mayomedicallaboratories.com/test-catalog/Clinical+and+Interpretive/81473>
7. Bassi PF, Costantini E, Foley S, Palea S. Glycosaminoglycan Therapy for Bladder Diseases: Emerging New Treatments. *Eur Urol Suppl* [Internet]. 2011 Oct [cited 2015 Dec 1];10(6):451–9. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S156990561100056X>
8. Byers S, Rozaklis T, Brumfield LK, Ranieri E, Hopwood JJ. Glycosaminoglycan accumulation and excretion in the mucopolysaccharidoses: characterization and basis of a diagnostic test for MPS. *Mol Genet Metab* [Internet]. 1998 Dec [cited 2015 Nov 30];65(4):282–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9889015>
9. Coutinho MF, Lacerda L, Alves S. Glycosaminoglycan storage disorders: A review. *Biochem Res Int*. 2012;2012.

10. Fuller M, Meikle PJ, Hopwood JJ. Glycosaminoglycan degradation fragments in mucopolysaccharidosis I. *Glycobiology*. 2004;14(5):443–50.
11. Silvestro L, Tarcomnicu I, Savu SR. HPLC-MS / MS of Highly Polar Compounds. *Tandem Mass Spectrom - Appl Princ*. 2008;
12. Genovese F, Manresa A a, Leeming DJ, Karsdal MA, Boor P. The extracellular matrix in the kidney: a source of novel non-invasive biomarkers of kidney fibrosis? *Fibrogenesis Tissue Repair* [Internet]. *Fibrogenesis & Tissue Repair*; 2014;7(1):4. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3986639&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
13. Afratis N, Gialeli C, Nikitovic D, Tsegenidis T, Karousou E, Theocharis AD, et al. Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment. *FEBS J* [Internet]. 2012;279(7):1177–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22333131>
14. Kittlick PD. Inflammation, glycolytic metabolism, and glycosaminoglycans. *Exp Pathol* [Internet]. 1986 Jan [cited 2015 Dec 1];30(1):1–19. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0232151386800512>
15. Page C, Rose M, Yacoub M, Pigott R. Antigenic heterogeneity of vascular endothelium. *Am J Pathol* [Internet]. 1992;141(3):673–83. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0026669801&partnerID=tZOtx3y1>
16. Auray-Blais C, Bh  rer P, Gagnon R, Young SP, Zhang HH, An Y, et al. Efficient analysis of urinary glycosaminoglycans by LC-MS/MS in mucopolysaccharidoses type I, II and VI. *Mol Genet Metab* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011;102(1):49–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2010.09.003>
17. Iida S, Takazono I, Suzuki K, Shimada A. Analysis of matrix glycosaminoglycans (GAGs) in urinary stones by high-performance liquid chromatography. *Urolithiasis* [Internet]. 1996;13(2):173–81. Available from: <http://www.ecmjournal.org/journal/smi/pdf/smi99-21.pdf>
18. Du J, Eddington N. Determination of the chondroitin sulfate disaccharides in dog and horse plasma by HPLC using chondroitinase digestion, precolumn derivatization, and fluorescence detection. *Anal Biochem* [Internet]. 2002 Jul 15 [cited 2015 Dec 31];306(2):252–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12123663>
19. Flangea C, Schiopu C, Sisu E, Serb A, Przybylski M, Seidler DG, et al. Determination of sulfation pattern in brain glycosaminoglycans by chip-based electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* [Internet]. 2009 Dec [cited 2015 Nov 30];395(8):2489–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19826794>
20. Beltran A, Borrull F, Marc   RM, Cormack PAG. Molecularly-imprinted polymers: useful sorbents for selective extractions. *TrAC Trends Anal Chem* [Internet]. 2010 Dec [cited 2015 Dec 1];29(11):1363–75. Available from:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993610002529>

21. Haginaka J. Monodispersed, molecularly imprinted polymers as affinity-based chromatography media. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* [Internet]. 2008 Apr 15 [cited 2015 Dec 1];866(1-2):3–13. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023207005119>
22. Andersson LI. Molecular imprinting for drug bioanalysis. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* [Internet]. 2000 Feb [cited 2015 Dec 1];739(1):163–73. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378434799004326>
23. Bergmann NM, Peppas NA. Molecularly imprinted polymers with specific recognition for macromolecules and proteins. *Prog Polym Sci* [Internet]. 2008 Mar [cited 2015 Dec 1];33(3):271–88. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670007001141>
24. Ge Y, Turner APF. Too large to fit? Recent developments in macromolecular imprinting. *Trends Biotechnol* [Internet]. 2008 Apr [cited 2015 Dec 1];26(4):218–24. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779908000516>
25. Ye L, Weiss R, Mosbach K. Synthesis and Characterization of Molecularly Imprinted Microspheres. *Macromolecules* [Internet]. American Chemical Society; 2000 Oct [cited 2015 Nov 11];33(22):8239–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/ma000825t>
26. Bossi A, Bonini F, Turner APF, Piletsky SA. Molecularly imprinted polymers for the recognition of proteins: the state of the art. *Biosens Bioelectron* [Internet]. 2007 Jan 15 [cited 2015 Oct 30];22(6):1131–7. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566306002958>
27. Turiel E, Martín-Esteban A. Molecularly imprinted polymers for sample preparation: a review. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2010 Jun 4 [cited 2015 Dec 1];668(2):87–99. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267010004216>
28. Piletsky SA, Alcock S, Turner AP. Molecular imprinting: at the edge of the third millennium. *Trends Biotechnol* [Internet]. 2001 Jan [cited 2015 Dec 1];19(1):9–12. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779900015237>
29. Kryscio DR, Peppas NA. Critical review and perspective of macromolecularly imprinted polymers. *Acta Biomater* [Internet]. 2012 Feb [cited 2015 Nov 17];8(2):461–73. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706111004922>
30. Balamurugan K, Gokulakrishnan K, Prakasam T. Preparation and evaluation of molecularly imprinted polymer liquid chromatography column for the separation of Cathine enantiomers. *Saudi Pharm J* [Internet]. King Saud University; 2012;20(1):53–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2011.06.004>

31. Zhang T, Xu G, Regev O, Blum FD. Low-temperature polymerization of methyl methacrylate emulsion gels through surfactant catalysis. *J Colloid Interface Sci* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2015 Nov 30];461:128–35. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979715301740>
32. Wang X-H, Xie L-F, Dong Q, Liu H-L, Huang Y-P, Liu Z-S. Synthesis of monodisperse molecularly imprinted microspheres with multi-recognition ability via precipitation polymerization for the selective extraction of cyromazine, melamine, triamterene and trimethoprim. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* [Internet]. 2015 Nov 12 [cited 2015 Nov 30];1007:127–31. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023215302749>
33. Zaia J. Principles of Mass Spectrometry Of Glycosaminoglycans. *J Biomacromolecular Mass Spectrom*. 2005;1:3–36.
34. Harangi F, Györke Z, Melegh B. Urinary glycosaminoglycan excretion in healthy and stone-forming children. *Pediatr Nephrol* [Internet]. 1996 Oct [cited 2015 Dec 16];10(5):555–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s004670050159>
35. Enobakhare BO, Bader DL, Lee DA. Quantification of sulfated glycosaminoglycans in chondrocyte/alginate cultures, by use of 1,9-dimethylmethylene blue. *Anal Biochem* [Internet]. 1996 Dec 1 [cited 2015 Dec 14];243(1):189–91. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269796905023>
36. FARNDAL R, BUTTLE D, BARRETT A. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* [Internet]. 1986 Sep 4 [cited 2015 Dec 28];883(2):173–7. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0304416586903065>
37. Dell A, Rogers ME, Thomas-Oates JE, Huckerby TN, Sanderson PN, Nieduszynski IA. Fast-atom-bombardment mass-spectrometric strategies for sequencing sulphated oligosaccharides. *Carbohydr Res* [Internet]. 1988 Aug [cited 2015 Dec 31];179:7–19. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0008621588841053>
38. Mallis LM, Wang HM, Loganathan D, Linhardt RJ. Sequence analysis of highly sulfated, heparin-derived oligosaccharides using fast atom bombardment mass spectrometry. *Anal Chem* [Internet]. 1989 Jul 1 [cited 2015 Dec 31];61(13):1453–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2774193>
39. Frazier SB, Roodhouse KA, Hourcade DE, Zhang L. The Quantification of Glycosaminoglycans: A Comparison of HPLC, Carbazole, and Alcian Blue Methods. *Open Glycosci* [Internet]. 2008 Jan 1 [cited 2016 Jan 9];1:31–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2904615&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

40. Barroso B, Didraga M, Bischoff R. Analysis of proteoglycans derived sulphated disaccharides by liquid chromatography/mass spectrometry. *J Chromatogr A* [Internet]. 2005 Jul [cited 2015 Dec 31];1080(1):43–8. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967305005017>
41. Ye L, Mosbach K. Molecularly imprinted microspheres as antibody binding mimics. 2001;48:149–57.
42. Komosinska-Vassev K, Blat D, Olczyk P, Szeremeta A, Jura-Półtorak A, Winsz-Szczotka K, et al. Urinary glycosaminoglycan (uGAG) excretion in healthy pediatric and adolescent population. *Clin Biochem* [Internet]. 2014 Sep [cited 2015 Dec 16];47(13-14):1341–3. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009912014004068>



## **ÖZGEÇMİŞ**

Arař. Gör. ZİHNİ ONUR UYGUN

Ege Üniversitesi Tıp Fakóltesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı 35100  
İzmir/Türkiye

Telefon : 232-3903699

e-posta : onur\_uygun@hotmail.com

## **EĞİTİM BİLGİLERİ**

- Ege Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Tıbbi Biyokimya  
Yüksek Lisans Devam Ediyor
- Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya  
Yüksek Lisans 2012
- Ege Üniversitesi  
Fen Fakóltesi  
Biyokimya  
Lisans 2010

## **AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM**

- Ege Üniversitesi Temel Tıp Bilimleri, Tıbbi Biyokimya  
Araştırma Görevlisi 2014-Halen
- Kafkas Üniversitesi Temel Tıp Bilimleri, Tıbbi Biyokimya  
Araştırma Görevlisi 2014-2014

## **UZMANLIK ALANLARI**

Biyokimya, Biyosensörler, Kromatografi, Moleküler Baskılama, Sensörler, Biyoanalitik Yöntemler, Elektrokimya, Kütle Spektrometresi, Sıvı Kromatografisi

## **PROJE DENEYİMİ**

- 2015-TIP-025 Glikozaminoglikan Tayini İçin Moleküler Baskılanmış Kromatografik Kolon Dolgu Materyal Geliştirilmesi Ege Üniversitesi

- |                                                                                          |                       |                   |        |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|-------------------|--------|
| 10000 TL                                                                                 | 15.06.2015-15.06.2016 | Araştırmacı/Uzman | Ulusal |
| • 109T172 Meme Kanseri Biyomarkerleri İçin Elektrokimyasal Biyosensör Sistemleri TÜBİTAK |                       |                   |        |
| 297999 TL                                                                                | 01.04.2010-01.04.2013 | Bursiyer          | Ulusal |

## ÖDÜLLER

- FEBS Young Lecturer Bursary Federation of European Biochemical Societies 2015
- 9. Uluslararası Elektrokimya Kongresi 2011 Poster Sunumu Üçüncülüğü Ege Üniversitesi 2011

## YAYINLARI

### SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

- **Uygun, Zihni Onur;** Uygun, Hilmiye Deniz Ertugrul, A short footnote: Circuit design for faradaic impedimetric sensors and biosensors, 2014, SENSORS AND ACTUATORS B-CHEMICAL
- **Uygun, Zihni Onur;** Dilgin, Yusuf, A novel impedimetric sensor based on molecularly imprinted polypyrrole modified pencil graphite electrode for trace level determination of chlorpyrifos, 2013, SENSORS AND ACTUATORS B-CHEMICAL
- Sezginturk, Mustafa Kemal; **Uygun, Zihni Onur,** An impedimetric vascular endothelial growth factor biosensor-based PAMAM/cysteamine-modified gold electrode for monitoring of tumor growth, 2012, ANALYTICAL BIOCHEMISTRY
- **Uygun, Zihni Onur;** Sezginturk, Mustafa Kemal, A novel, ultra sensible biosensor built by layer-by-layer covalent attachment of a receptor for diagnosis of tumor growth, 2011, ANALYTICA CHIMICA ACTA

### Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

- Moleküler yaşam bilimleri mezuniyet sonrası eğitiminde danışman-öğrenci ilişkisinin öğrenci gözünden değerlendirilmesi, XXVII. Ulusal Biyokimya Kongresi, 2015
- Low Cost and Highly Selective Electrochemical Impedance Spectroscopy Based Molecular Imprinted Sensor for Pesticide, Chlorpyrifos, Detection, XXIII International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 2015
- Beneficiency And Satisfaction From Mentor Through Postgraduate Student Perception: Impact Of Expectations And Quality-Quantity Of Mentor-Student Relationship, A Joint Biochemical Society and FEBS Workshop-Enhancing Molecular Science Education, 2015

- VEGF-Receptor based Biosensor for Tumor Growth Diagnosis: A new immobilization design by SAM of Mercaptoundecanoic acid, 25. Ulusal Kimya Kongresi Erzurum 2011, 2013
- Moleküler basklanmış polipirol modifiyeli impedimetrik klorpirifos sensörü, 26'ncı Uluslararası Katılımlı Ulusal Kimya Kongresi, 2012
- A novel, ultra sensible biosensor built by layer-by-layer covalent attachment of a receptor for diagnosis of tumor growth, 4th EucheMs chemistry congress, 2012
- A Biosensor based on Electrochemical Impedance Spectroscopy for Analysis of Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF-Receptor for Immobilization by PAMAM Dendrimers, 9. Uluslararası Elektrokimya Kongresi, 2011

#### **Kitap Bölümleri**

- Biosensors-Micro and Nanoscale Applications, Molecularly Imprinted Sensors-New Sensing Technologies, ISBN: 978-953-51-4250-8, 2015
- State of the Art in Biosensors - General Aspects, Impedimetric Biosensors for Label-Free and Enzymless Detection , ISBN: 978-953-51-1004-0, 2013
- Biosensors-Emerging Materials and Application , Biosensors For Cancer Biomarkers, ISBN: 978-953-307-328-6, 2011