

BİLİRUBİN UZAKLAŞTIRILMASI İÇİN HSA TAKILI PHEMA KRİYOJELLERİN HAZIRLANMASI

PREPARATION OF HSA-BOUND PHEMA CRYOGELS FOR BILIRUBIN REMOVAL

MAHDİ KAVOSHCHIAN

PROF. DR. SERAP ŞENEL

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Kimya Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
Yüksek Lisans Olarak Hazırlanmıştır.

2015

MAHDİ KAVOSHCHIAN' in hazırladığı “**Bilirubin Uzaklaştırması için HSA Takılı PHEMA Kriyojellerin Hazırlanması**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **KİMYA ANABİLİM DALI'** nda **YÜKSEK LİSANS** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Adil Denizli

Başkan

.....

Prof. Dr. Serap Şenel

Danışman

.....

Prof. Dr. Sema Bektaş

Üye

.....

Prof. Dr. Handan Yavuz Alagöz

Üye

.....

Yrd. Doç. Dr. Fatma Yılmaz

Üye

.....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğime,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

Beyan ederim.

06/02/2015

İmza

MAHDİ KAVOSHCHIAN

ÖZET

BİLİRUBİN UZAKLAŞTIRIMASI İÇİN HSA TAKILI PHEMA KRİYOJELLERİN HAZIRLANMASI

Mahdi KAVOSHCHIAN

Yüksek Lisans, Kimya Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Serap ŞENEL

Ocak 2015, 70 sayfa

Bu tez çalışması kapsamında hiperbilirubinemili insan plazmasından bilirubinin seçimli olarak uzaklaştırılması için HSA immobilize PHEMA kriyojelleri hazırlanmıştır. PHEMA kriyojeller serbest radikal polimerizasyonu yöntemi ile sentezlenmiştir. PHEMA kriyojeller şişme testleri, BET ve SEM analizleri ve kan uyumluluk testleri ile karakterize edilmiştir. PHEMA kriyojellerin denge şişme değeri 7.86 g H₂O/g kriyojel ve sahip olduğu gözeneklilik oranı %69.6 olarak saptanmıştır. PHEMA kriyojellerin BET yöntemi ile saptanan spesifik yüzey alanı ortalama 27.2 m²/g ve ortalama gözenek çapı 68.2 Å'dur. Kriyojellerin aktivasyonu için optimum CNBr derişimi 60 mg/mL olarak saptanmıştır. Aktivasyonun ardından pH, akış hızı, etkileşim süresi ve HSA derişimi parametrelerinin HSA immobilizasyonuna etkisi incelenmiştir. CNBr aktive edilmiş PHEMA kriyojellere maksimum HSA immobilizasyonu 12.40 mg/g olarak pH:7'de, 1.0 mg/mL HSA derişiminde, 0.75 mL/dk akış hızında 30 dk etkileşim süresiyle elde edilmiştir. Kan uyumluluğu çalışmaları yapılmış ve protrombin zamanı (PT), aktive edilmiş kısmi tromboplastin zamanı (APTT), fibrinojen testi ve trombosit pıhtılaşma zamanı

(TCT) belirlenmiştir. HSA immobilize PHEMA kriyojeller kullanılarak elde edilen platelet kaybı % 2.32, lökosit kaybı %5.17'dir.

PHEMA-HSA kriyojellerinin bilirubin uzaklaştırılma etkinliğine plazmadaki bilirubin derişiminin, etkileşim süresinin ve sıcaklığının etkisi sürekli sistemde incelenmiştir. Plazma örneklerine bilirubin yüklemesi yapılarak plazmadaki toplam bilirubin seviyesi 3.0 mg/dL seviyesine çıkarılmış ve farklı oranlarda HSA içeren PHEMA kriyojellerle etkileştirilerek zamanla plazmadaki bilirubin seviyesindeki azalma incelenmiştir. 2 saat sonunda plazmadaki bilirubin 1.23 mg/dL (hiperbilirubinemi için minimum toplam bilirubin seviyesi) seviyesinin altına indirilmiştir. Maksimum adsorpsiyon 3.0 mg/dL bilirubin içeren plazmadan 37.5 °C'de 25.35 mg/g olarak bulunmuştur. 1.0 M NaCl ve 0.1 M NaOH desorpsiyon ajanı olarak kullanılmıştır. Tüm çalışmalarda desorpsiyon yüzdesi %97'nin üstündedir. Freundlich ve Langmuir adsorpsiyon modelleri adsorplanan moleküllerin adsorbentle etkileşimini belirlemek için kullanılmış ve adsorpsiyonun Langmuir modeline uyduğu sonucuna varılmıştır. Adsorpsiyon işlemini kontrol eden mekanizmaların belirlenmesinde yalancı-birinci ve yalancı ikinci dereceden kinetik modeller incelenmiştir. Yalancı-ikinci dereceden kinetik modelin HSA immobilize PHEMA kriyojellerle bilirubin adsorpsiyonu için daha uygun olduğu bulunmuştur. HSA immobilize PHEMA kriyojellerin tekrar kullanılabilirlikleri incelenmiş ve 10 adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsü sonunda kriyojellerin adsorpsiyon kapasitesinde kayda değer bir azalma gözlenmemiştir.

Anahtar Kelimeler:

Bilirubin, kriyojel, hiperbilirubinemi, HSA, immobilizasyon, adsorpsiyon.

ABSTRACT

PREPARATION OF HSA-BOUND PHEMA CRYOGELS FOR BILIRUBIN REMOVAL

Mahdi KAVOSHCHIAN

Master of Science, Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Serap ŞENEL

January 2015, 70 pages

In this study, HSA-immobilized PHEMA cryogels were prepared to remove bilirubin from human hyperbilirubinemi plasma. PHEMA cryogels were synthesized by free radical polymerization method. Cryogels were characterized by swelling tests, BET and SEM analysis and blood compatibility tests. The equilibrium swelling value and porosity were determined as 7.86 g H₂O/ g cryogel and 69.6%, respectively. The specific surface area determined by BET was 27.2 m²/g and the average pore diameter was 68.2 Å. The optimum CNBr concentration for activation of cryogels was determined as 60 mg/mL. The effect of pH, flow rate, incubation time, and HSA concentration on HSA immobilization was examined. The maximum HSA immobilization was achieved at pH 7 for 1.0 mg/mL HSA concentration when the flow rate and incubation time were 0.75 mL/min and 30 min. Prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), fibrinogen time (FT) and thrombocyte clotting time (TCT) were determined in compatibility tests for blood. Platelet and leucocyte losses were 2.32 % and 5.17 %.

The effect of bilirubin concentration in plasma, incubation time and temperature on bilirubin removal efficiency of PHEMA-HSA cryogels was examined in continuous mode. The plasma samples were over loaded with bilirubin up to 3.0 mg/dL and were interacted with PHEMA cryogels having different amounts of HSA and the

decrease of bilirubin level in time was followed. Following an incubation period of 2 h, the bilirubin level in plasma was lowered to 1.23 mg/dL (minimum total bilirubin level for hyperbilirubinemi). The maximum bilirubin adsorption capacity was 25.35 mg/g from a plasma sample containing 3.0 mg/dL bilirubin at 37.5 °C. The desorption agent was 1.0 M NaCl and 0.1 M NaOH. The desorption ratio was over 97 % in all runs. Freundlich and Langmuir adsorption models were treated to examine the interaction between adsorbate and adsorbent and Langmuir model was better fitted. The pseudo-first order and pseudo-second order kinetic models were examined to determine the mechanism in adsorption process. The pseudo-second kinetic model was found suitable to describe the adsorption of bilirubin by HSA immobilized PHEMA cryogels. The reusability of HSA immobilized PHEMA cryogels was examined and no significant decrease in adsorption capacity was recorded following 10 consecutive adsorption-desorption cycles.

Keywords

Bilirubin, cryogel, hyperbilirubinemi, HSA, immobilization, adsorption.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca bana değerli bilgilerini ve yardımlarını sunan, bu dönem içerisinde karşılaştığım tüm zorluklar karşısında desteğini eksik etmeyen Sayın danışman hocam Prof. Dr. Serap Şenel'e,

Tezimin deneysel çalışmalarını yürütebilmem için bana laboratuvarını açan, bilimsel bilgilerini alçak gönüllülükle bizlerle paylaşan, değerli bilim insanı Sayın hocam Prof. Dr. Adil Denizli'ye,

Bilimsel katkı ve destekleri için Prof. Dr. Handan Yavuz'a

Tezime başladığım ilk andan itibaren, sıcaklığı, engin bilgisi ve iyi kalpliliğiyle her zaman yanımda olan, sorduğum hiç bir soruyu cevapsız bırakmayan, sevinç ve üzüntülerimi paylaştığım Recep Üzek'e,

Bilgisi, tecrübesi ile her zaman yanımda olan ve tez çalışmam boyunca yardımını esirgemeyen Dr. Nilay Bereli'ye,

Tez çalışmam boyunca bana her şekilde en fazla destek olan arkadaşlarım Esmâ Sari Üzek, Canan Armutcu, Yeşeren Saylan, Fatma Kartal, Kemal Çetin başta olmak üzere bütün Bioreg grubu çalışanlarına

Hayatım boyunca yanımda olamasalar da desteklerini esirgemeyen canımdan çok sevdiğim aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Mahdi Kavoshchian

2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER.....	viii
ŞEKİLLER.....	ix
KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Afinite Kromatografisi.....	3
2.2.Bilirubin ve Bilirubin Metabolizması	5
2.2.1.Bilirubin-İnsan Serum Albumini Etkileşmesi	9
2.2.2. Bilirubin Tayini	10
2.2.3. Bilirubin Giderimi-Klinik Uygulamalar	12
2.3. Ekstrakorporal Afinite Terapisi	13
2.4.Hemoperfüzyon	13
2.5.Biyoafinite adsorbanları	14
2.5.1. Sorbent Materyalleri Olarak Jeller	15
2.5.1.1.Kriyojeller	16
2.5.1.2.Kriyojel Sentezindeki Bileşenler.....	18
2.5.2.Bilirubin Giderimi İçin Afinite Adsorbanları	19
3. DENEYSEL YÖNTEMLER.....	22
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	22
3.2. PHEMA Kriyojellerin Hazırlanması	22
3.3. PHEMA Kriyojelin karakterizasyonu	22
3.3.1. Şişme özelliğinin incelenmesi.....	22
3.3.2. Yüzey Alanı ve Gözeneklilik Ölçümleri	23
3.3.3. Yüzey Morfolojisi	23
3.4. HSA İmmobilizasyonu.....	23

3.4.1. CNBr Aktivasyonu	23
3.4.2. HSA İmmobilizasyonu	24
3.5. Kan Uyumluluğu Testleri	24
3.5.1. Pıhtılaşma Zamanı (CT)	24
3.5.2. Aktifleştirilmiş Kısmi Tromboplastin Zamanı (APTT)	25
3.5.3. Protrombin Zamanı (PT)	25
3.5.4. Hücre Yapışma Çalışmaları	25
3.6. İnsan Plazmasından Bilirubin Uzaklaştırılması	25
3.7. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik	26
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	27
4.1. PHEMA Kriyojellerin Karakterizasyonu	27
4.2. PHEMA Kriyojellere HSA İmmobilizasyonu	28
4.2.1. CNBr Derişiminin Etkisi	29
4.2.2. pH Etkisi	30
4.2.3. Akış Hızının Etkisi	31
4.2.3. İnkübasyon Süresinin Etkisi	32
4.2.4. HSA Başlangıç Derişiminin Etkisi	33
4.3. Kan Uyumluluğu Çalışmaları	34
4.4. İnsan Plazmasından Bilirubin Uzaklaştırılması	36
4.5. Adsorpsiyon İzotemleri	40
4.5. Adsorpsiyon Kinetiği	42
4.5. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik	45
5. SONUÇLAR	56
6. KAYNAKLAR	58
ÖZGEÇMİŞ	65

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Ligand-hedef molekül çiftleri.	3
Çizelge 4.1. Pıhtılaşma zamanları*.....	35
Çizelge 4.2. Kriyojellere platelet ve lökosit yapışması.	36
Çizelge 4.3. PHEMA-HSA5 kriyojeline bilirubin adsorpsiyonu için Langmuir ve Freundlich sabitleri.	42
Çizelge 4.4. Bilirubin adsorpsiyonu için yalancı-birinci ve ikinci derece kinetik verileri.....	45

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Biliverdin-bilirubin dönüşmesi.....	6
Şekil 2.2. Bilirubin metabolizması	7
Şekil 2.3. Hemoperfüzyon sistemi.....	14
Şekil 2.4. Kriyojel sentezi: 1, çözeltideki makromolekül; 2, çözücü; 3, düşük molekül ağırlıklı çözünen molekülleri; 4, dondurulmuş çözücünün polikristalleri; 5, donmamış sıvı mikrofaz; 6, polimerik kriyojel; 7, makro gözenekler; 8, çözücü.....	17
Şekil 4.1. PHEMA kriyojellerin SEM görüntüleri.....	28
Şekil 4.2. Hidroksil gruplarının CNBr aktivasyon mekanizması.....	29
Şekil 4.3. CNBr derişiminin HSA bağlanmasına etkisi. HSA derişimi: 0.5 mg/mL; Akış hızı: 0.75 mL/dk; pH: 7; T:25 °C.	30
Şekil 4.4. pH'ın HSA bağlanmasına etkisi. HSA derişimi: 0.5 mg/mL; Akış hızı: 0.75 mL/dk; pH: 7; T:25 °C; t: 1.0 saat.	31
Şekil 4.5. Akış hızının adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisi. HSA derişimi: 0.5 mg/mL; pH: 7; T:25 °C; t: 1.0 saat.	32
Şekil 4.6. PHEMA kriyojellere HSA bağlanmasına inkübasyon süresinin etkisi. HSA derişimi: 1.0 mg/mL; Akış hızı: 0.75 mL/dk; pH: 7; T:25 °C.....	33
Şekil 4.7. HSA derişiminin immobilizasyona etkisi. Akış hızı: 0.75 mL/dk; pH: 7; T:25 °C; t: 30 dk.	34
Şekil 4.8. HSA immobilize PHEMA* ve PHEMA kriyojellerin plazmadan bilirubin uzaklaştırma etkinliği. T: 25°C; akış hızı: 0.75 mL/dk.	37
Şekil 4.9. PHEMA ve HSA immobilize PHEMA kriyojellerinin bilirubin adsorpsiyon kapasitesi. Plazmadaki bilirubin derişimi: 3.0 mg/dL; T: 25°C; akış hızı: 0.75 mL/dk; t: 60 dk.	38
Şekil 4.10. PHEMA ve PHEMA-HSA5 kriyojellerinin bilirubin adsorpsiyon kapasitesi üzerine bilirubin derişiminin etkisi. T: 25°C; akış hızı: 0.75 mL/dk; t: 60 dk.	39
Şekil 4.11. PHEMA-HSA5 kriyojelinin bilirubin adsorpsiyon kapasitesi üzerine sıcaklığın etkisi. Plazmadaki bilirubin derişimi: 3.0 mg/dL; akış hızı: 0.75 mL/dk; t: 60 dk.	40
Şekil 4.12. Langmuir adsorpsiyon izotermi.	41
Şekil 4.13. Freundlich adsorpsiyon izotermi.....	42
Şekil 4.16. HSA immobilize PHEMA kriyojellerin tekrar kullanılabilirliği.	46

KISALTMALAR

HSA	İnsan serum albumin
CNBr	Siyanojen bromür
PHEMA	Poli(2-hidroksietilmetakrilat)
MBAA	N,N-metilen bisakrilamit
APS	Amonyum persülfat
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin
CT	Pıhtılaşma Zamanı
APTT	Aktive Edilmiş Kısmi Tromboplastin Zamanı
PT	Protrombin Zamanı
DMSO	Dimetilsülfoksit

1. GİRİŞ

Bilirubin (MA 585 Da), 'hem' degradasyonu ile oluşan lineer bir tetrapireol olup, hayli lipofilik bir moleküldür. "Hem oksijenaz", bilirubin üretiminde hız belirleyen enzim olup, "hem" in biliverdine dönüşümünü sağlar, sonra biliverdin, biliverdin redüktaz yardımı ile bilirubine indirgenir. Fizyolojik koşullarda bilirubin serum albumine bağlı olup sonraki metabolizma basamakları için karaciğere taşınır. Karaciğerde, UDP-glukuronozil transferaz yardımı ile polar-glukuronid ana konjugatları oluşup safraya verilir. Safra tuzları bağırsakta bakteriler yardımı ile çoğu dışkı, bir kısmı idrarla atılan, bir kısmı ise yeniden soğurumla karaciğere dönen ürobilinojenlere dönüştürülür. Serumda, konjuge olmamış (serbest), mono konjuge, dikonjuge ve proteine tersinmez bağlı fraksiyonları mevcuttur.

Bilirubin/albumin molar oranı 1:1 değerini aştığında, serbest bilirubin beyin hücreleri dahil bir çok hücrede membran lipidleri ile birleşir. Yeni doğanlarda bilirubin ensefalopati veya kernikterus hastalığına yol açar.

Çok yüksek (>3mg/dl) bilirubin derişimi nedeni ile dokuların renklenmesi sarılıktır. Toksik etkilerinin yanı sıra, albumine bağlı bilirubinin serbest radikalik türler için etkin bir antioksidan olduğu da saptanmıştır.

Bilirubin nitel ve nicel analizi için çok sayıda yöntem mevcuttur. Diazotize sülfanilik asitle tepkime sonucu oluşan azodipireolün 530nm'de spektrofotometrik ölçümüne dayanan diazo yöntemi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi(HPLC), bilirubinin bilirubin oksidaz kullanımı ile biliverdine dönüştürölüp 425nm veya 460nm 'deki absorbans azalmasının takip edildiğı enzimatik yöntem, bilirubinin maksimum absorbans ölçümüne dayanan spektrofotometrik yöntem (aynı zamanda bilirubinometre sistemlerinin çalışma prensibidir), bilirubinin barbiturik asitle tepkimesine dayanan kolorimetrik yöntem, HRP katalizörlüğünde uygun bir peroksit reaktifi ile yükseltgenmesine dayalı peroksidaz yöntemi örnek verilebilir.

Bilirubin giderimi için plazma değışimi, hemodiyaliz, fototerapi, hemoperfüzyon gibi seçenekler mevcuttur. En etkin olan, kanın adsorban sistemi içeren ekstrakorporal bir birimden geçirilerek bilirubin gideriminin sağlandığı hemoperfüzyondur. Hemoperfüzyon, genel olarak acil durumlarda kandan nefrotoksik ilaç veya zehir gideriminde, böbrek hastalıklarında kandan atık ürün gideriminde ve karaciğer transplantasyonu öncesi ve sonrası destek tedavi amacı ile kullanılır.

Sistemde sorbentin kanla uyumlu olması gerekir. Hemoperfüzyon sisteminde sorbent içeren kartuş (kolon), 200- 300ml /dak hızla kan akışını sağlayan pompa, kolondaki basınç düşmesini saptayan birimler, kan pıhtılaşma süresinin 30 dakikadan fazla olmasını sağlayan sürekli heparin kullanımı gibi birimler ve önlemler gerekir. İyon değiştirici reçineler veya iyonik olmayan makroporöz reçineler en yaygın olarak aktif kömür sorbent olarak kullanılır. Aktif karbon kullanımında granüller albumin selüloz nitrat (kollodiyon) polimeri veya akrilik hidrojel polimeri ile kaplanır. Karbon içeren membran ve fiberlerle, tanecik embolizasyonu, platelet azalması, kan basıncı düşmesi gibi yan etkiler giderilmeye çalışılmıştır.

Bu çalışmada, bilirubin uzaklaştırılması için HEMA bazlı kriyojeller, HEMA fonksiyonel monomer, N,N- metilen bisakrilamid (MBAA) çapraz bağlayıcı, amonyum persülfat (APS) ve N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin(TEMED) redoks çifti, çözücü olarak su varlığında serbest radikal polimerizasyonu yöntemi ile sentezlenmiştir.

CNBr aktivasyonunu takiben yapıya HSA kovalent olarak bağlanmıştır. Ligand takılı ve takılı olmayan kriyojeller, şişme testleri, BET ve SEM analizleri ve kan uyumluluk testleri ile karakterize edilmiştir. Sentezlenen adsorbanların sürekli sistemde bilirubin giderme performansları incelenmiştir. Prosese ilişkin adsorpsiyon izotermi ve proses kinetiği araştırılmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Afinite Kromatografisi

Afinite kromatografisi, endüstriyel uygulamalar, biyoteknoloji ve biyotıp alanlarında geniş uygulama potansiyeli olan, biyo- tanıma bazlı kromatografik bir yöntemdir [1-3]. Hedef molekülü içeren hareketli fazın, hedef moleküle özgü ligand içeren katı destekten oluşturulmuş, kolon içindeki stasyoner fazdan geçirilip, ligand-hedef molekül etkileşimi ile hedef molekülün alıkonması, bağlanması, diğer bileşenlerin kolondan alıkonmadan uzaklaştırılması ve sonunda hedef molekülün kolondan elüsyon basamaklarını içerir.

Aktif biyomolekülü denature veya fonksiyonel olarak farklı formlarından ayırma, büyük hacimli örneklerden düşük derişimli bileşenlerin izolasyonu, spesifik kirleticilerin uzaklaştırılması, immünoglobulin saflaştırılması, lektin ve ters faz kromatografisi, biyotin ve biyotinlenmiş molekül saflaştırılmasında olduğu gibi birçok uygulama alanı vardır [4].

Ligand ve hedef molekülün biyolojik etkileşimi, elektrostatik veya hidrofobik, van der Waals etkileşimleri ve /veya hidrojen bağı ile olabilir. Bu biyolojik etkileşimler için ligand- hedef molekül çiftleri [4], Çizelge 2.1'de gösterilmiştir:

Çizelge 2.1. Ligand-hedef molekül çiftleri.

Ligand	Hedef
Enzim	Substrat analogu, inhibitör, kofaktör
Antibadi	Antijen, virüs, hücre
Hormon, vitamin	Reseptör, taşıyıcı protein
Lektin	Polisakkarit, glikoprotein, hücre, hücre yüzey reseptörü
Glutatiyon	Glutatiyon-S-transferaz veya GST füzyon proteinleri
Metal iyonları	Poli (His) füzyon proteinleri, yüzey histidin, sistein ve/veya triptofan içeren doğal proteinler
Nükleik asit	Histonlar, tamamlayıcı baz dizilimi, nükleik asit polimeraz, nükleik aside bağlanan proteinler

Katı destek matrisinin seçiminde [5],

- Çözünmez olması,
- Afinite ligandını bağlayabilmek için kimyasal reaktivite,
- Kimyasal ve mekanik kararlılık
- Uygun partikül formu,
- Hidrofilik yapı,
- Enzimatik veya mikrobiyal etkilere direnç,
- Yüksek yüzey alanı,
- Çok düşük veya tercihen hiç, spesifik olmayan adsorpsiyon,
- Makroporozite,
- Ucuzluk

gibi kriterler aranır. Gözenek çapı, saflaştırılacak biyomolekülün çapının en az beş katı olmalıdır. Geleneksel matrisler, agaroz, selüloz, silika, polimetakrilat, hidrofilik vinil polimerleri, hidroksi alkilmetakrilat, poliakrilamid vb, bazlıdır. Ayrıca membranlar, monolitik adsorbanlar, poröz olmayan destek malzemeleri kullanımları da vardır.

Ligand olarak, hedef moleküle spesifik (monospesifik) veya grup spesifik, tersinir bağlanma gerçekleştirebilecek, kimyasal modifikasyona uygun bileşenler seçilir. Antibadi, biyomimetik boya ligandlar, vitaminler, enzim kofaktörleri, DNA, protein, küçük peptitler, ligand olarak kullanılabilir [6]. Ligand, uygun bir aktivasyon yöntemini takiben katı desteğe bağlanır. Bu işlem sırasında fonksiyonelliğini yitirmemesi gerekir. Bu amaçla, hedef moleküle etkileşiminde yer almayan gruplarla matrise bağlanır. Afinite ligandları kovalent olarak immobilize edilebilir. Spesifik olmayan veya biyospesifik etkileşimlerle yüzeye adsorbe edilebilir. Diğer seçenekler, gözenek içinde tutuklama veya metal-iyon afinite kromatografisinde olduğu gibi metal iyonu ile koordinasyondur. Ligandın, bağlama işleminde kullanılan çözücüler ile uyumlu olması gerekir.

Kovalent immobilizasyonda, amin, hidroksil, aldehit, karboksil, sülfidril grupları afinite ligandlarını destek materyaline bağlamak için kullanılır. Diğer immobilizasyon tekniklerine göre kimyasal reaktif kullanımı ve basamak sayısı

fazladır. Hazırlanan matrisin kararlılığı yüksek olup, periyodik rejenerasyon gerektirmez. Adsorpsiyon yolu ile immobilizasyonda, proses spesifik veya spesifik olmayan türde gerçekleştirilebilir. Spesifik olmayan türde, Coulomb etkileşimleri, hidrojen bağları ve /veya hidrofobik etkileşimler devrededir. Spesifik etkileşimde ise, örneğin antibadi adsorpsiyonu için protein A veya protein G veya biyotin içeren afinite ligandlarının adsorpsiyonu için avidin veya streptavidin kullanımı gerekir.

Ayrıca, ligandın sterik uygunluğunun az olduğu durumda ya da sterik engellemelerin önüne geçmek için ligand uzatma kolu ile matrise bağlanır. Genelde bağlanacak molekül kütlesi, 1000Da'dan az ise uzatma kolu kullanılır [8]. Uzatma kolu, zincirin her bir ucunda iki fonksiyonel grup içeren alifatik, lineer hidrokarbon zincirleridir (Örnek: Hekzametilen diamin). Gruplardan biri, amino ile, matrise bağlanır. Diğer grup, genellikle karboksil ile, liganda bağlanır. Hidrofobik, uzun uzatma kollarının spesifik olmayan etkileşimlere yol açma riski vardır.

Sterik kısıtlama, uzatma kolu oryantasyonu, çok noktalı bağlanma, ligand aktivitesini belirleyen önemli parametrelerdir. Ligandın hedef moleküle oluşturduğu kompleksin dissosiyasyon sabiti, 10^{-4} - 10^{-8} M olmalıdır [9].

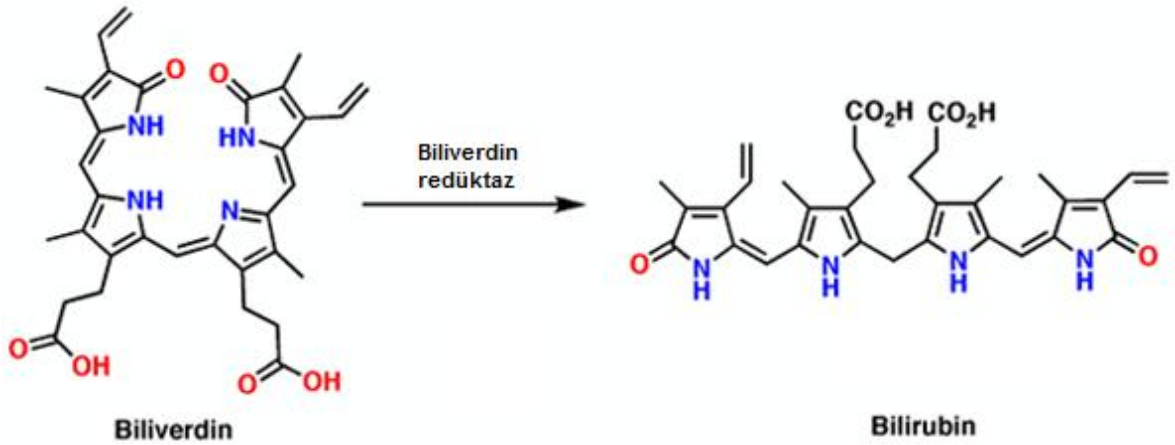
Elüsyon, spesifik olarak yarışmacı bir ligand kullanarak veya pH, iyonik şiddet değişimi gibi işlemlerle spesifik olmayan türde gerçekleştirilebilir.

2.2.Bilirubin ve Bilirubin Metabolizması

Ana safra pigmenti olan bilirubin, tetrapiröl dikarboksilik asit yapısındadır. Molar kütlesi 584.7g/mol'dür. Bilirubin IX α (konjuge olmamış bilirubin) için sistematik ismi 1'8'-diokso-1,3,6,7-tetrametil-2,8-divinilbiladiyen- α ,c-dipropiyonik asit (4,5)'tir [10]. 10 no'lu karbon atomunda metilen köprüsü ile bağlı iki rijit düzlemsel dipirolde oluşan, simetrik sayılabilen bir tetrapiroldür. Konformasyonu yarı açık bir kitabı andırır. Hidrofilik karboksil grupları içermesine rağmen, hayli lipofilik bir moleküldür. Çünkü pirol azot atomlarına molekül içi hidrojen bağları ile bağlı olduklarından bu hidrofilik grupların su ile etkileşimi mümkün olmaz [11].

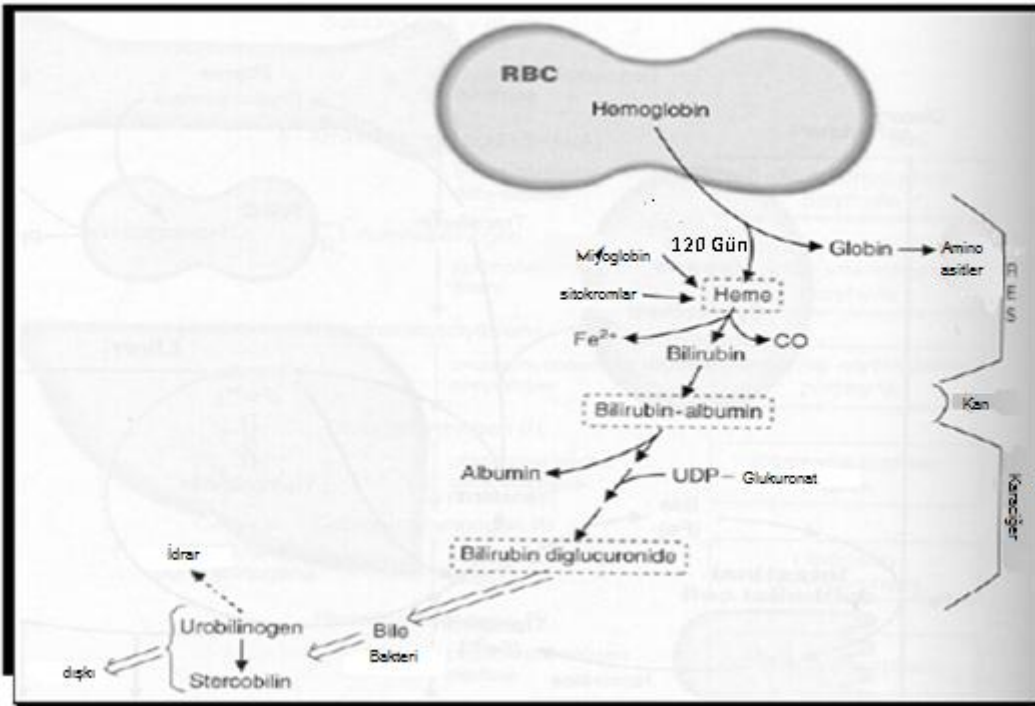
Alyuvarların ortalama yaşam süreleri 120 gündür. Hemoglobinin yıkımında, globin, demir, ve 'hem' ortaya çıkar. Bilirubin, alyuvarlarda 'hem' yıkımı ile oluşan ana safra pigmentidir. Bu 'hem'in yaklaşık %80'i hemoglobinden, %20'si ise 'hem' içeren peroksidaz, miyoglobinin gibi proteinlerin katabolizması ile elde edilir [12]. Hem oksijenaz ile 'Hem' yıkımında önce yeşil renkli biliverdin pigmenti, karbon

monoksit ve demir oluşur. Bu reaksiyonda, üç oksijen molekülü harcanmakta ve nikotin amid adenin dinükleotid fosfat hidrojenaz (NADPH) gibi indirgeyici reaktif gerekmektedir [13]. Biliverdin, sitosolil biliverdin redüktaz (aktivite için, NADH veya NADPH gerektiren) yardımı ile hızla turuncu-sarı renkli bilirubine indirgenir [14] (Şekil 2.1). Bu nedenle memelilerde biliverdin düzeyi düşüktür. Safraya salımı için enerji kullanımı gerektiren metabolik basamaklara ihtiyaç duyulduğu için, bilirubin sentezinin fizyolojik avantajı açık değildir. Bilirubinün yükseltgendiğinde tekrar biliverdine dönüşmesi, onun antioksidan aktivitesinin bir göstergesi olmuştur. Sentez için muhtemelen bu özelliği baskın olmaktadır.



Şekil 2.1. Biliverdin-bilirubin dönüşmesi.

Sentezlenen konjuge olmamış bilirubin (serbest bilirubin), suda çözünmez. Albumin tarafından karaciğere taşınır. Burada glukuronil transferaz yardımı ile glukuronik asitle konjuge olarak suda çözünür forma dönüştürülür, safraya verilir. Bir veya iki şeker birimi, ester bağlantısında konjuge olmamış bilirubinün propiyonik asit yan zincirlerinin karboksil gruplarına bağlanarak monokonjuge veya dikonjuge bilirubin oluştururlar. Konjugasyon, albumine veya hücre içi proteinlere bağlanmayı azaltır, bağırsakta yeniden absorpsiyonu önler. Safra tuzları bağırsağa eriştiğinde bakterilerce ürobilinojen adlı bileşiklere dönüşür [15]. Bu bileşiklerin çoğu dışkı ile vücuttan atılır. Bir kısmı geri soğurumla tekrar karaciğere döner. Küçük bir kısmı ise idrarla atılır. Bilirubin metabolizma bozukluğu deri ve diğer dokularda sararma ile ortaya çıkar. Bilirubin metabolik döngüsü Şekil 2.2’de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Bilirubin metabolizması.

Bilirubin, yaşlanmış eritrositlerin yıkımı sırasında açığa çıkar. Günlük üretilen bilirubinin yaklaşık %20'si miyogloblin, sitokrom P450 izoenzimleri gibi 'hem' proteinlerinden elde edilir. Karaciğer, dalak ve kemik iliğinin monositik makrofajlarında oluşup plazmaya salınır. Oluşum hızı, 24 saat için yetişkinlerde 250-300mg'dır. Serumdan izole edilen dört bilirubin fraksiyonu vardır [16]. Bunlar,

- Konjuge olmamış bilirubin (α -B)
- Monokonjuge bilirubin (β -B)
- Dikonjuge bilirubin (λ -B)
- Proteine tersinmez bağlı fraksiyon (δ -B)

olarak belirlenmiştir.

Serbest bilirubin, birçok hücre türü, hücre içi organeller ve fizyolojik prosesler için hayli toksiktir. Fosfolipid membranlarında topaklanma yolu ile membran bütünlüğüne zarar verme ve membrana bağlı enzimleri inhibe etme yolu ile toksisite ortaya çıkar [17]. Dehidrojenaz, RNA sentez, protein sentez enzimlerini, ayrıca DNA sentezini inhibe eder. Toplam bilirubin derişiminin %0.1'inden az olmasına rağmen, serbest bilirubin derişimi, toksisite için toplam bilirubinden daha uygun bir belirleyicidir. Konjuge olmamış bilirubin, dolaylı (indirect) ve konjuge

bilirubin ise doğrudan (direct) tepkime veren olarak da adlandırılır. Bu terimler, bilirubin ölçümü için kullanılan laboratuvar testlerinde bilirubinin belli boyalarla tepkime türlerini ifade eder. Suda çözünen konjuge form, kan örneğine eklenen boya ile doğrudan tepkirken, suda çözünmeyen serbest bilirubin, çözeltiye alkol ekleninceye kadar reaktiflerle tepkime vermez.

Plazma, safra ve idrar pH'ına bağlı olarak, yüksüz diasit, mono anyon veya dianyon formlarında olabilir. Bu anyonlar için pK_a değerleri 8.12 ve 8.44 olduğu için, alkali ortamda iyonize fraksiyonlar, düşük ve fizyolojik pH değerlerinde ise diasit formu baskındır [18].

Serumda bilirubin normal düzeyleri, konjuge bilirubin için 0-0.3 mg/dL, toplam bilirubin için 0.3-1.9 mg/dL'dir [19]. Albumin bağlama kapasitesinin üstünde bilirubin varsa (hiperbilirubinemi) bu ekstra serbest bilirubin, özellikle beyinde olmak üzere çeşitli dokularda bağlanma ve birikme eğilimi gösterir. Kernikterus, sarılık, Gilbert sendromu, Crigler-Najjar sendromu, ensefalopati gibi hastalıklara, yeni doğan bebeklerde hızlı eritrosit hemolizi veya glukuronil transferaz yokluğu nedeniyle sarılığa, hatta ileri seviyede beyin hasarının olduğu vakalarda ölüme neden olabilir [20,21]. Konjuge türün normal düzeyin üstünde olması halinde, safra yolları tıkanıklığı, safra taşları, siroz akla gelir. Serumda bilirubin düzeyinin yüksekliği, antibiyotik, steroidler, barbituratlar gibi birçok ilacın etkisi ile de ortaya çıkabilir. Düşük bilirubin düzeyi ise demir eksikliği ve koroner arter hastalık belirtisi olarak değerlendirilir [22].

Bilirubininin normal derişimlerde önemli bir fizyolojik fonksiyonu vardır. Güçlü bir antioksidan ve antinflammatuardır. Bilirubin ve biliverdin, peroksil ve hidroksil radikali ve hidrojen peroksit karşı kuvvetli antioksidan aktivitesi gösterirler. Lipid ve lipoproteinlerin yükseltgenmesini baskılar ve diğer yükseltgenme türlerini önlerler. Serumda oksidatif strese karşı ana savunma mekanizmalarından biridir. Ayrıca, kardiyovasküler, immünolojik, serebral sistemler için koruyucu etkisi vardır [23]. Karaciğere ilişkin hastalıkların tedavi etkinliğinin değerlendirilmesinde önemli bir ölçüttür.

Klinik olarak sarılık saptandığında, konjuge olmamış bilirubin artışı prehepatik veya hepatik sarılığa işaret eder. Konjuge bilirubin artışı ise posthepatik sarılığın göstergesidir. Yeni doğanlardaki fizyolojik sarılık ise bilirubin için yeterli konjugasyonu sağlayacak enzimin mevcut olmamasından kaynaklanır.

2.2.1.Bilirubin-İnsan Serum Albumini Etkileşmesi

İnsan serum albumini (HSA), kan serumundaki toplam proteinin yaklaşık %60'ını oluşturan, tipik kan derişimi 50mg/L olan, kan plazmasındaki miktarı en çok olan proteindir. 585 amino asitlik tek bir polipeptit zincirinden oluşur [24]. Molekül kütlesi, 66700 Da ve izoelektrik noktası 5.67'dir. Proteoliz ile ayrıldığında her biri tek başına bağlama kapasitesini koruyan 6 homolog alt bölgeye ayrılır. HSA yapısı, 17 tane disülfid köprüsü ile stabilize edilir.

Yağ asitleri, aminoasitler, Cu^{2+} ve Zn^{2+} gibi metaller, bilirubin gibi metabolitler ve farmasotik ilaçlar gibi suda çözünmeyen çözünenlerin kan akımında hedef organlara taşınımında önemli rol oynar [26]. Bu bileşenlerin albumine bağlanabilmesi, çeşitli bağ konumlarının varlığını, hem de bağlanma için üç boyutlu konformasyonunu ayarlayabilme yeteneğini gösterir. Hiçbir ligand bağlanmasa bile sürekli konformasyon değişimi gösterir. Bu değişkenlik onun ayrıntılı üç boyutlu yapı saptanmasına uygun kristalizasyonu için neden uzun süre geçtiğini açıklar.

HSA, difüzyon için, çözünmüş ligand miktarını artırarak ligandlarının difüzyon akısını da artırır. Esasında ligandın proteine bağlanması difüzyon katsayısını yaklaşık 10 kat azaltır. Ancak bu düşme çok fazlası ile çözünür tür derişimindeki artışla karşılanır. Zira daha yüksek derişim, daha büyük derişim farkına yol açarak difüzyon hızında artışla sonlanır [24]. Ligand bağlayan proteinlerin bir kısmı ligandlarını hedef hücre membran yakınında rastgele, bazıları ise spesifik konumlarda bırakırlar. Birçok hücre yüzeyinde bu proteinler için reseptörler vardır. Reseptöre bağlanmayı, reseptörün aracılık ettiği protein-ligand kompleksinin endositozu, sonra asit lizozomal bölümünde ligandın kompleksten ayrılması ve bağlayıcı proteinin tekrar plazmaya dönmesi izler. HSA'nın ayrıca ekstraselüler akışkan seviyelerinin ve plazma pH ve kan basıncının regülasyonunda önemli katkısı vardır.

Serum albuminleri için bağlanma konumlarının tamamı kesinlikle aydınlatılamamakla beraber, HSA için, küçük heterosiklik veya aromatik bileşikler için yüksek afiniteli iki, uzun zincirli yağ asitleri için 2-3, ve metaller için iki bağlanma konumu belirlenmiştir. Bilirubin için bağlanma konumları, IIA ve IIIA alt bölgelerindedir. Bilirubin-albumin etkileşimi, ultrafiltrasyon, ultrasantrifüj, jel kromatografisi, diyaliz, elektroforez, afinite kromatografisi yöntemleri ile çalışılmış

ve bağlanma sabiti, primer bağlanma konumu için 10^8 M^{-1} ve ikinci konum için 10^7 M^{-1} olarak saptanmıştır. Bu değerler, sıgır serum albumini; BSA'dan 2-13 kat fazladır [26].

Bilirubin-HSA etkileşimi için gerçekleştirilen bir model çalışması ile $\Delta H^0 = -13.5 \text{ kCal/mol}$ ve $\Delta S^0 = -0.0085 \text{ kCal/mol}$ der. değerleri rapor edilmiştir [27]. Entalpi değişimi için verilen değerden elektrostatik etkileşimin hidrofobik etkileşimden daha baskın ve önemli olduğu sonucuna varılmıştır. Bağlanma konumundaki lizin veya arjinin birimlerinin bilirubin karboksil grupları ile kritik tuz köprüleri oluşturduğu, yani etkileşimin bilirubin pirol halkaları ve aromatik aminoasitler arasında gerçekleştiği belirlenmiştir. Elektrolit ve yağ asidi anyonları HSA-bilirubin etkileşimini inhibe eder [28].

2.2.2. Bilirubin Tayini

Safra pigmentlerinin, doğal formlarında veya türevlendirilmiş tetrapirrol olarak veya azo türevlerine dönüştürüldükten sonra miktarları saptanır.

Klinik laboratuvarlarında, serum toplam bilirubin (TB) ve doğrudan tepkiyen (konjuge tür-DB) seviyeleri saptanır. DB/TB oranı %20-30'un altında ise konjuge olmamış hiperbilirubinemi, oran %70'in üstünde ise konjuge hiperbilirubinemi tanısı konulur. Ara değerler için tanı, karışık türdür [11].

Bilirubinler, ışığa ve yükseltgenmeye çok duyarlıdır. Safra veya idrar safra pigmentleri için bu akışkanlarda bilirubinleri koruyacak albumin olmadığı için analizlerin çok dikkatli yapılması gerekir. 1-5mM askorbat, antioksidan olarak eklenmeli ve işlem kırmızı ışık altında yapılmalıdır. Konjuge olmamış tür, asidik ortamda kloroform ile serumdan ekstrakte edilebilir. Spektrofotometrik olarak saptanır. Ancak genel olarak diazo tepkimesi kullanılır [29]. Bu tepkimede, konjuge bilirubinler dipirolik azo pigmentlerine ayrışır. Konjuge olmamış tür için, üre, etanol gibi hızlandırıcı bir reaktifle hidrojen bağları parçalanıp, diazo reaktifine bağlanmak için merkezi $-\text{CH}_2-$ uygun duruma getirilir. Oluşan azo pigmentleri, 540nm'de spektroskopik pik verirler. Ancak, konjuge ve konjuge olmamış bilirubin ayrımı için diazo yöntemi çok özgün değildir. Zira konjuge olmayan tür, hızlandırıcı olmadan tepkime verir (% 2.8). Konjuge form ise 10 dakikalık periyotta tamamen tepkimez (%93).

En duyarlı, doğru yöntem, alkali ortamda metil türevlerinin oluşturulmasına dayanır. Zira alkali metanoliz, konjuge olmamış bilirubin ile mümkün değildir. Türevlerin ayrımı, HPLC veya ince tabaka kromatografisi ile olur.

Bilirubin fraksiyonlarının ölçümü, diazo tepkimesi, HPLC, spektrofotometri, enzimatik yöntemler, fiber optik sensörler, elektrobiyokimyasal sensörler, florimetrik yöntemler ve ayırma bazlı yöntemlerle gerçekleştirilir [30]. Herbir yöntemin kendine özgü eksiklik veya üstünlükleri vardır. Doğrudan diazo tepkimesi [31,32], bilirubin konjugatları ve δ -Bilirubini ölçer. Ancak çok güvenilir sonuçlar elde edilemez. Bilirubin konjugatları için spesifik yöntemler tercih edilmelidir. Tepkime pH denetimlidir. Ayrıca tayinde diğer 'hem' proteinlerinin girişim riski vardır. Enzimatik yöntemler, asidik pH'da tüm konjuge olmamış bilirubinleri ölçer. pH:10'da ise konjuge bilirubinler ölçülür. Çoklu ölçümler gerekir. Sarılık tanısında, konjuge türlerin ölçümü daha yararlıdır. Düşük kararlılık ve enzim maliyeti yöntemin dezavantajlarıdır [33]. Katalitik ve elektrokatalitik tepkimeler, fiziksel ve kimyasal çevre değişikliklerine çok duyarlıdır. HPLC ile bilirubin tetraپیrolleri olarak ölçüm yapılır. Ancak HPLC, rutin analizler için uygun değildir [34]. Spektrofotometrik ölçümler [35], konjuge olmamış bilirubin ve bilirubin konjugatlarının toplamının ölçümünü sağlayacak şekilde tasarlanabilir. Konjuge olmamış tür, 450nm'de tipik spektroskopik pike sahiptir. In vivo ortamda, bilirubin albumine bağlı olduğu için maksimum absorbanın 475nm'ye kaydığı gözlenir.

Serumda toplam bilirubin derişimi, dimetilsülfoksit (DMSO) içinde çinko iyonları ile floresans reaksiyonu yolu ile saptanabilir [36]. Keza dolaylı olarak, tris (4,7-difenil-1,10-fenentrolin) rutenyum klorürün çözünmüş oksijen ile floresans sönümüne dayalı tayin de kullanılabilir [37]. Bilirubin oksidaz enziminin katalizlediği, bilirubinin biliverdine yükseltgenme reaksiyonu sırasında oksijen harcandığı için, floresans söndürücü materyal ve enzim birlikte optik fiber tip yüzeyine kovalent kaplanır. Uygun pH'daki bilirubin oksidaz sadece konjuge bilirubin ile tepkidiğinden, enzim kullanımı ile konjuge bilirubin derişimi seçimli olarak ölçülebilir. Deneysel çalışmalarda, birkaç saatte enzim aktivitesinin azalması bir sorundur. Bu sorun, moleküler baskılanmış polimerler yardımı ile enzime gerek kalmadan giderilebilir. Hiperbilirubineminin yol açtığı cilt sararma şiddeti, özel reflektans fotometresi ile ölçülebilir [38].

2.2.3. Bilirubin Giderimi-Klinik Uygulamalar

Bilirubin derişimini toksik düzeyin altına indirmek için, fototerapi, plazma değişimi, hemodiyaliz, hemoperfüzyon ve fenobarbital ile işlem kullanılabilir. Ancak bunlar seçimli olmayan yöntemlerdir [17]. Albumin gibi plazma desteklerine ihtiyaç vardır. Plazma değişiminde [39], vücuttan alınan kanın plazma fraksiyonu, bilirubin, endotoksin ve yardımcı aktivatör uzaklaştırıldıktan sonra, albumin, koagölasyon faktörü ve hepatik rejeneratif stimölasyonu sağlayan madde eklenerek veya değişim transfüzyonunda sağlıklı donör kanı vücuda geri verilerek metabolik hastalık tedavi edilir. Seçimliliği olmadığı için hepatik rahatsızlıklar için başarısı sınırlıdır. Ancak proteine bağlı toksinlerin uzaklaştırılmasında etkindir. Büyük hacımlarda taze donmuş plazma gereksinimi dezavantajlarındandır.

Hemoperfüzyonda, adsorban kan hücrelerine zarar verdiği için daha ziyade plazma perfüzyonu kullanılır İşlem, bilirubin giderimini sağlayan afinite sorbentini içeren ekstrakorporal bir kolondan kanın geçirilmesidir. Yüksüz reçine ve iyon değiştirici reçine içeren makroretiküler reçineler veya aktif kömür, adsorban olarak kullanılır [40]. Bilirubin, albumine kuvvetle bağlı olduğu için, hiperbilirubinemi için etkin değildir. Kana, kendisi adsorbe olan emniyetli bir bağ koparıcı ajan (sodyum benzoat) eklenerek yöntem etkinleştirilir. En yaygın kullanılan bir tedavi yöntemidir. Ancak her tedavi seansında 250-300mL kanın vücuttan çekilmesi ve sorbent etkinliğinin çabuk kaybolması dezavantajlarıdır.

Diyaliz, özünenin yarı geçirgen bir membran üzerinden derişim gradiyenti altında geçişidir. Diyalizat olarak plazma kullanımı ile arıtım miktarı artırılır. Hemodiyaliz, kanın özel bir filtreden geçirilerek zararlı atık, ekstra tuz,ve akışkan giderimi işlemidir.. Böbrek fonksiyonu % 10-15 düzeyine düştüğünde kullanılır [41].Proses difüzyon denetimli olduğu için yavaş yürür. Moleküler hemoperfüzyon adsorban geri döngölü sistem (MARS), hemodiyaliz kan saflaştırma tekniği ve moleküler adsorbanı birleştirir. Asit-baz dengesi ve su-elektrolit dağılımını düzenler

Fototerapide, floresan tüpleri, halojen lambaları, fiber optik sistem, galyum nitrür ışık yayan diyotlar kullanılabilir [42]. Bilirubin derişimi, 222-325 µM olduğunda tercih edilir Yeni doğan ve bebeklerde, hiperbilirubinemi ve sarılık için sıklıkla kullanılır. Tedavide 460-490 nm'lik mavi-yeşil ışık en etkindir. Işık kullanımı, vücuttaki bilirubin molekülünü suda çözünür izomerlerine dönüştürerek vücuttan atılımını sağlar. Bilirubinin ışık absorpsiyonu ile iki izomerik formu oluşur. Bunlar,

yapısal izomerler ve konfigürasyonel izomerlerdir. Konfigürasyonel izomerizasyon tersinir, yapısal izomerizasyon tersinmez yürür. Bu izomerler, normal bilirubinden daha az lipofilik oldukları için glukuronidasyon olmaksızın safraya verilirler. Işık absorpsiyonunda oluşuma ilişkin diğer bir seçenek, uyarılmış haldeki bilirubinin oluşmasıdır. Oksijenle renksiz fotooksidasyon ürünleri oluştururlar. Oluşan ürünler, idrara verilir. Ancak ışığın deriden penetrasyonunun birkaç milimetre ile sınırlı oluşu, DNA'ya zarar verme riskleri de yöntem uygulanırken dikkate alınmalıdır.

Bilirubin detoksifikasyonu için ekstrakorporal bilirubin oksidaz veya sentetik metalloporfirin de kullanılabilir. Metalloporfirinler [43], 'hem'deki merkezi demir atomu yerine Zn, Sn, Cr gibi metallerin geçtiği 'hem' analoglarıdır. Hem oksijenazı inhibe ederek 'hem' degradasyonunu ve konjuge olmamış bilirubin üretimini azaltırlar. Örneğin kalay mezoporfirin enjeksiyonu, birkaç haftalık bebeklerde serum bilirubin düzeyini %76 azaltır. Fenobarbital ise hepatik bilirubin metabolizmasındaki basamakları hızlandıran anti-epileptik bir ilaçtır. Glukuronil transferaz aktivitesini indükler, hepatik kan akışını artırır. Ayrıca glutatyon S-transferaz izozimlerinin aktivitesini indükler.

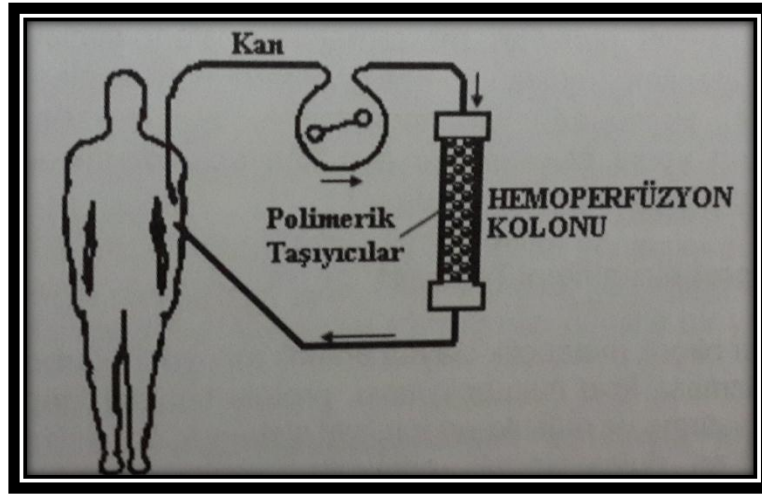
2.3. Ekstrakorporal Afinite Terapisi

İnsan plazmasından bilirubin, patojenik antibadiler, toksik metal iyonları, kolesterol gibi toksik bileşenlerin giderimi ekstrakorporal tedavinin amacıdır. Ekstrakorporal afinite tedavisi, hemodiyaliz, hemoperfüzyon vb. gibi ekstrakorporal tedavideki sakıncaları giderir. Örneğin, hemoperfüzyonda kolon dolgu maddesi olarak afinite taşıyıcıları kullanılarak işlem etkinliği artırılır. En yaygın tedavi seçeneklerinden biri olarak kullanılan plazma değişim yöntemine göre, daha ucuz, enfeksiyon riskinin giderildiği, plazma bileşenlerinde yol açtığı önemsiz miktarda değişim, yöntemin ilaç tedavisi ile birlikte yürütülebilmesi ve en önemlisi hiçbir madde eklenmesine gerek kalmadan, işlemi takiben hastanın kendi plazmasının vücuda geri verilebilme üstünlükleri sayılabilir.

2.4.Hemoperfüzyon

Vücuttan alınan kanın uygun bir adsorbanla dolu kolondan geçirilip toksik bileşenlerden arındırıldıktan sonra vücuda geri verilmesi işlemidir (Şekil 2.3). Diyaliz etkinliğini belirleyen, suda çözünürlük, molekül ağırlığı gibi parametreler, bu yöntemde elimine edilir [44]. İşlem etkinliği daha yüksektir. 2 veya 3 saatlik hemoperfüzyon ile, 8 saatlik hemodiyaliz kadar toksik madde giderimi sağlanır.

Adsorban olarak aktif kömür kullanımında adsorpsiyon kapasitesi büyüktür. Ancak spesifik olmayan adsorpsiyon nedeni ile kapasite giderek azalır. Kanın aktif kömürle doğrudan teması, kan bileşenlerine zarar verir. Alyuvar ve akyuvarların parçalanması, adsorpsiyon partiküllerinin embolizasyonu ortaya çıkar. Hemoperfüzyon, diyalizle uzaklaştırılabilen aynı bileşikler (salisilat, barbiturat gibi) için başarılı sonuçlar verir. Zayıf ekstraselüler dağılım gösteren ilaçlar için etkisizdir. Hemoperfüzyon kartuşları, yüksek poroziteli ve yüzey alanlı olmalıdır. Pratik uygulamalarda partikül salımını önlemek ve biyouyumluluğunu artırmak için adsorbanın, polietilen glikol, jelatin, akrilik polimerlerle kaplanması gibi önlemler alınabilir.



Şekil 2.3. Hemoperfüzyon sistemi.

2.5.Biyoafinite adsorbanları

Doğal veya sentetik, inorganik veya organik bazlı çok sayıda adsorban seçeneği vardır. Doğal veya sentetik, polimer bazlı adsorbanlar, agaroz, dekstran, kitin, kitosan, akrilik kopolimerleri, poliamid, poli(vinil alkol) vb. adsorbanlar yaygın olarak kromatografik çalışmalarda destek materyali olarak kullanılmıştır [3].

Uygun bir adsorban için kimyasal ve fiziksel kararlılık, mekanik dayanım, yüksek makro gözeneklilik, büyük iç ve dış yüzey alanı, spesifik olmayan adsorpsiyon oranını azaltmak için hidrofilik yüzey, yeterli miktarda fonksiyonel grup içermesi gibi özellikler aranır. Matrisin, uygun bir aktivasyon yöntemi (siyanojen bromür, glutaraldehit reaksiyonu, triazin reaksiyonu vb.) ile aktivasyonunu takiben, analitle etkileşim için ligand bağlanır. Ligand, protein, antijen, inhibitör vb. olabilir. Ligand tek bir biyomoleküle spesifik veya Protein A, Protein G veya lektin gibi grup

spesifik olabilir. Afinite ligandlarının biyospesifik türleri, proteinler için yüksek özgünlük gösterirler. Ancak bu tür ligandlar pahalıdır, büyük ölçekli uygulamalar için kararlı değildirler ve immobilizasyonda zorluklarla karşılaşılır. Pseudo spesifik grup, aminoasitler gibi biyolojik kökenli veya triazin boyaları ve metal iyonları gibi biyolojik kökenli değildir. Uygun durumlarda biyomolekülle etkileşime girecek fonksiyonel gruplara sahip bir monomer, komonomer olarak kullanılıp kopolimer sentezi ile aktivasyon ve ligand bağlama basamakları elimine edilir. Özellikle sterik kısıtlamaları azaltmak için, gerektiğinde ligand bağlanması için uzatma kolu kullanılabilir. Protein ligand immobilizasyonu için fiziksel yöntemler kullanıldığında, yüzeye elektrostatik, hidrofilik/hidrofobik ve van der Waals kuvvetleri ile bağlanma olur. Protein sızması, çok noktalı bağlanma veya istenmeyen yan etkileşim olasılıkları dikkatle incelenmelidir. Kimyasal immobilizasyonda, kuvvetli kovalent veya koordinasyon bağları devrededir. En önemli sorun, ligand yapısal konfigürasyonunda değişme olması ihtimalidir.

Kromatografik çalışmalarda, tanecik formunda sentezlenen adsorbanın dolgu yatak kolonlarında kullanılması durumunda tanecik içeren akışkanlar için uygun olmaması ve akışın bloke olma riski sorunlar yaratır [11]. Genişletilmiş yatak türünde bu sorun giderilmekle beraber, yüksek makaslama kuvvetleri etkisi ile örneğin kolondan kan geçirildiğinde kan hücrelerinin bütünlüğüne zarar verilir. Özel kolon kullanımı ve donanım gerekir. Sözü edilen sakıncaları ortadan kaldırmak için bağlantılı makrogözenekli jel, kriyojel formunda adsorban kullanılır.

Kromatografik kolonların kesikli sistemlere göre yüksek adsorpsiyon kapasitesi eldesinde üstünlükleri vardır [17]. Zira sürekli sistemde adsorbanla sürekli olarak taze çözelti etkileşmektedir. Kesikli düzende ise adsorpsiyon prosesi ilerledikçe belli miktarda adsorban ile etkileşen çözünen miktarı azalmaktadır.

2.5.1. Sorbent Materyalleri Olarak Jeller

Hidrojeller, suda çözünmeyen, yapılarına yüksek oranda su veya biyolojik akışkan alabilen, çapraz bağlı örgü yapısına sahip hidrofilik yapılardır. Enzim ve hücre immobilizasyonu, kontrollü ilaç ve protein salınımı, doku mühendisliği, sensörler, hijyen ürünleri üretimi gibi birçok alanda çok sayıda uygulamalarına rastlanır. Ancak düşük mekanik dayanımları, difüzyon kısıtlamalı kütle taşınım hızı gibi uygulamada sınırlayıcı özellikleri de vardır. İdeal bir sorbentin, iç kütle transfer kısıtlamasının minimum olduğu poröz, spesifik olmayan adsorpsiyonun düşük

olduğu hidrofilik öncüllerden hazırlanan materyal olması ve belirlenen hedef için hızlı ve seçimli adsorpsiyonla kullanılabilmesi gerekir. Poröz formda materyal üretimi için mikroemülsiyon oluşumu, faz ayrımı, gaz üfleme tekniği gibi çeşitli seçenekler vardır.

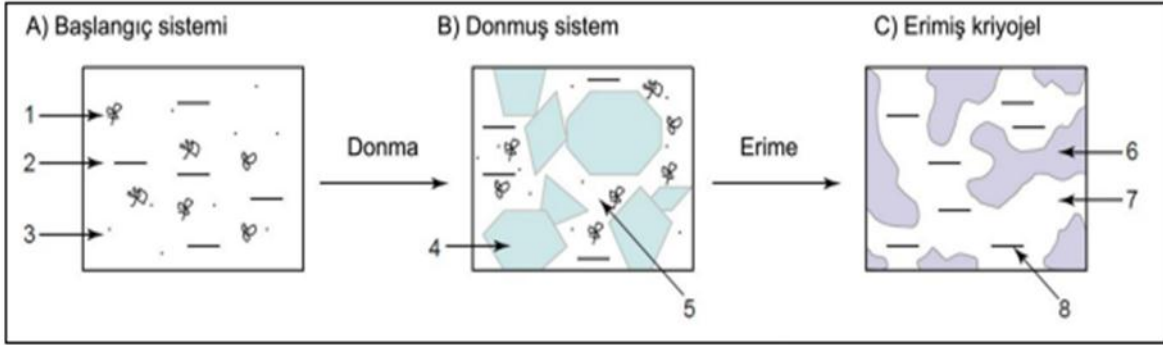
Konvansiyonel sorbentler, tanecik formunda sentezlenir. İyon-değişim reçinelerinde kullanılan çapraz bağlı polistiren-divinil benzen, aktif karbon ve modifiye silika ticari ürünler arasındadır. Ancak bu ürünlerin, hidrofobisite, yüksek maliyet ve spesifik olmayan adsorpsiyon dezavantajları vardır. Aljinat, kitosan, agaroz, dekstran gibi doğal polimerlerden elde edilen tanecik formundaki sorbentler ise düşük mekanik dayanıklılığa sahiptir. Özellikle kromatografik uygulamalarda agaroz ve dekstran bazlı sorbentler yüksek akış hızlarında sıkıştırılabilirler. Steril olmayan ortamlarda mikrobiyal degradasyon riski de vardır. Polisakkarit sorbentler için kimyasal ve mekanik kararlılığı iyileştirmek için çapraz bağlama miktarı artırılmıştır

2.5.1.1.Kriyojeller

Bir kalıp içinde tek parça blok halinde sentezlenen, poröz polimerik materyal, MONOLİT, sorbent sistemleri için diğer bir seçenektir. Gerekli etkileşim için spesifik yüzey alanı sağlayan küçük gözenekler ve sıvı akışını kolaylaştıran büyük gözenekler barındırır. En üstün avantajları, gözenekli partiküllerde kütle transferinin difüzyon kontrollü olmasına karşın, monolitlerde konveksiyon ile gerçekleşmesidir. Bu ise boyutu 1-5 μm 'lik geniş kanallar ile olur [45]. Kolon uygulamalarında düşük hidrolik direnç, analitlerin hızlı ayrımı diğer öne çıkan avantajlarıdır.

Monolitler arasında, birbirine bağlı, boyutu 200 μm 'ye varan makrogözenek yapısı ve sıfır altı sıcaklıklarda hazırlanmaları nedeni ile bu ismi alan jeller, KRİYOJELLER eşsiz bir seçenektir. Toksik organik çözücülere gerek kalmadan, sulu ortamda ve orta derecedeki (-10°C ve -30°C arasında) düşük sıcaklıklarda sentez yapılabilir. Kriyojellerin sentez basamakları Şekil 2.4'te verilmiştir. Ayrıca birbirine bağlı makrogözeneklerin oluşumu için sentez aşamasındaki büyüyen buz kristalleri kalıp görevi yapmaktadır. Makrogözenekli jellerde gözenek boyutları, diğer monolitik ortamlardan en az 10 kat daha fazladır. Bu nedenle tanecik içeren akışkan, kan, atık su örnekleri, mikrobiyal hücre içeren örneklerle ilgili çalışmalar için çok elverişlidir. Monolit, çubuk, levha, disk gibi farklı formlarda

üretilebilir. Karıştırmalı reaktör uygulamalarında kriyojelin aşınmasını önlemek üzere plastik taşıyıcı içinde sentezlenerek kullanılmaktadır [46].



Şekil 2.4. Kriyojel sentezi: 1, çözeltideki makromolekül; 2, çözücü; 3, düşük molekül ağırlıklı çözünen molekülleri; 4, dondurulmuş çözücünün polikristalleri; 5, donmamış sıvı mikrofaz; 6, polimerik kriyojel; 7, makro gözenekler; 8, çözücü[47].

Jelleşme yeteneğine sahip, düşük veya yüksek molekül ağırlığına sahip monomerik veya polimerik öncüllerin hatta kolloidal sistemlerin kriyojelasyonu ile sentezlenirler. Polimerik, protein, katı veya kompozit jellerin oluşumu kriyotropik jelleşmedir. Proses, öncülleri içeren sistemin dondurulması, bir süre dondurulmuş halde bekletme ve erime basamaklarını içerir. Polimerizasyon için gerekli bileşenleri içeren çözelti dondurulur. Dondurma hızının hızlı veya yavaş olması, sırası ile daha küçük (daha az düzenli) veya daha büyük (daha düzenli), çözücünün su olması halinde buz kristalitlerini oluşturur. Sıvı ve buz içinde çözünürlük farkı, kriyokonsantrasyon etkisine yol açar. Yani çözünmüş bileşikler, giderek azalan donma sıcaklığı ile sulu sıvı faza itilir. Bu fazda uygun öncülle gözenek oluşumu için beklenir. Gözenek çeperini oluşturan bileşiklerin fiziksel veya kimyasal çapraz bağlanması ve sonra oda sıcaklığında erime ile işlem tamamlanır. Isı indüksiyonlu (termotropik) jel öncülleri kriyojel sentezinde kullanılamaz. Sıcaklık gradyenti, iyonik şiddet, öncül bileşimi, pH vb.faktörler sentezlenen kriyojelin yapısal özelliklerini etkiler. Saf polimerik formda veya katı nano/mikropartikül ile gömülü olarak hazırlanabilirler. Yapısal özelliklerinin saptanması için mikroskobik analiz (SEM; TEM), şişme testi, NMR, TG, DSC, x-ışınları difraksiyonu, relaksometri, denge adsorpsiyonu gibi yöntemler kullanılır. Kriyojeller, kovalent, iyonik veya kovalent olmayan türde olabilir. Gözenek boyutları herhangi bir büyüklükteki çözünen geçişi için uygundur. Plazmid, virüs gibi nanopartiküller hatta mikropartiküller için geçiş kolaylığının yanı sıra osmotik, kimyasal ve mekanik kararlılıkları nedeni ile kromatografik matris,elektroforez ve

immünodifüzyon için matris, biyomolekül ve hücre immobilizasyonu için etkin taşıyıcı olarak kullanımı vb. biyomedikal ve biyomühendislik uygulamalarında yaygındır [48,49].

2.5.1.2.Kriyojel Sentezindeki Bileşenler

Kriyojeller, dondurulmuş çözeltilerde monomerlerin veya lineer polimerlerin çapraz bağlanma polimerizasyonu ile hazırlanmaktadır. Monomerik öncüllerden sentezde [50] sağlanması gereken koşullar şöyle özetlenebilir:

- Monomerlerin çözünürlüğü, sadece pozitif sıcaklıklarda değil donmamış sıvı mikrofazlarda da yeterince yüksek olmalıdır. Aksi takdirde jelleşme için kritik konsantrasyona erişilemez.
- Seçilen çözücü, kristallenebilir olmalıdır. Zira donmamış sıvı mikrofaz oluşamaz ve kriyokonsantrasyon etkileri ortaya çıkmayacaktır.
- Serbest radikal polimerizasyonu ile kriyotropik jelleşme yürütülecekse, polimerizasyon başlatıcı sisteminin negatif sıcaklıklarda performansı önemlidir. Termal bozunma ile primer radikal veren peroksit gibi kimyasal başlatıcılar kriyopolimerizasyon için uygun değildir. Redoks başlatıcı çifti kullanılmalıdır. Polimerizasyonun radyasyonla başlatılıp yürütülmesinde bu sınırlama ortadan kalkmış olur. Elektron demeti veya fotobaşlatıcılar da kullanılabilir.

Çeşitli monovinil- divinil komonomer çiftleri, serbest radikal kopolimerizasyonunda kullanılır. Daha çok akrilamid, N,N'- dietilakrilamid, N,N- dimetilakrilamid, akrilik asit, N-izopropilakrilamid, 2 -hidroksi etilmetakrilat ve N,N-metilen (bis) akrilamid, poli(etilenglikol diakrilat) ve biyobozunur çapraz bağlayıcılar ile amonyum persülfat ve N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin (TEMED) redoks başlatıcı sistemi kullanılır. Başlatıcı eklemekten tepkime çözeltisinin soğutulması gerekir. RAFT gibi kontrollü radikal polimerizasyon teknikleri hem su hem de organik ortam için uygundur. Sulu veya organik çözücülerde kimyasal başlatıcılarla lineer polimerden de sentez mümkündür. BSA, jelatin gibi proteinler, kitosan gibi polisakkaritler, PVA, gibi sentetik polimerler, donmuş çözeltide glutaraldehit ile çapraz bağlanır. Etilen glikol diglisidil eter gibi diepoksitler, TEMED varlığında DNA ve fibroin kriyojelleri için kullanılır. Lineer polimer yerine mikrometre boyutundaki jel partikülleri ile de kriyojel hazırlanabilir.

Su, kullanılan en yaygın çözücüdür. Formamid, dimetil sülfoksit, dioksan, benzen gibi organik çözücüler hidrofobik jel sentezinde kullanılır.

Jelleşme sıcaklığı, genellikle çözücü donma sıcaklığının 2 veya 20°C altındadır. Monomer veya polimer öncül başlangıç derişimi, kriyokonsantrasyon etkisi nedeniyle, konvansiyonel jellere göre daha düşüktür [51]. Ayrıca daha geniş konsantrasyon aralığında çalışmak mümkündür. Çalışılan konsantrasyon aralığı genellikle %2-%20 (w/v)'dir. Başlangıç derişiminin artırılması veya sentez sıcaklığının düşürülmesi gözenek boyutunu azaltır, mekanik dayanımı artırır. Ayrıca monomer veya polimer derişimi artırıldığında gözenek çeperi kalınlaşır.

Düşük molekül ağırlıklı (NaCl, CaCl₂ gibi) tuz eklenmesi kalın çeperli ve daha küçük gözenek oluşumuna yol açar. Zira tuz eklenmesi ile donma noktası azaldığından donmamış çözelti hacmi artar.

Kriyojel sistemine mikro veya nano partikül eklenmesi, elastiklik modülü artırılmış hibrit kriyojel oluşturur.

2.5.2.Bilirubin Giderimi İçin Afinite Adsorbanları

Ekstrakorporal afinite tedavisinde, özellikle hemoperfüzyon kolon dolgu maddesi olarak inorganik veya organik bazlı destek materyallerine biyospesifik veya pseudo biyospesifik ligand bağlanarak oluşturulan sistemler, çok ilgi çekmektedir. Çalışmalar, yoğunlukla sentetik polimer kullanımını içermektedir. Önceleri partikül formunda sentezlenip, uygun ligand ile modifiye edilen adsorbanlar yerine, bugün moleküler baskılanmış polimerler veya tanecik formu yerine membran veya kriyojel hatta baskılı kriyojel formunda adsorbanlar öne çıkmaktadır.

Denizli ve ark. süspansiyon kopolimerizasyonu ile sentezlenen p (EGDMA-HEMA) mikropartiküllerine Congo red boya bağlayarak 37°C'de 11.7mg/g bilirubin adsorpsiyon kapasitesi belirlemişlerdir [52]. Bir başka çalışmalarında aynı mikropartiküller, Cibacron Blue F3GA boya ile modifiye edilip ve dolgulu kolon sisteminde kullanılarak maksimum bilirubin adsorpsiyon kapasitesi 37°C'de 32.5mg/g olarak belirlenmiştir [53]. Altıntaş ve ark. dispersiyon polimerizasyonu ile sentezlenen 1.6µm çapındaki p(GMA) mikrokürelere Cibacron Blue F3GA bağlayarak 241.5mg/g kapasite ile sulu çözeltiden, 332 mg/g 'lık kapasite ile insan serumundan bilirubin giderimi gerçekleştirmişlerdir [54]. Kuroda ve ark, ise ağırlıkça 75/25 DVB/ GMA oranında sentezlenen makroporöz p(GMA_DVB)

partiküllerini albuminle kaplayıp, glutaraldehit ile çapraz bağladıklarında bilirubin için seçtikleri sistemde en yüksek kapasite değerine, 30mg/g, ulaşmışlardır [55]. Pseudospesifik ligand olarak Cibacron Blue F3 GA'nın PVA mikrokürelere immobilizasyonu ve sentezde magnetit katkısı ile manyetik formda sentezlenen adsorban için Xu ve ark. 15.6mg/g kapasite değerine ulaşmışlardır [56]. Zhang ve Jin ise Cibacron Blue F3GA ligandı içeren, PVA kaplı, mikroporöz p(tetrafloroetilen, MPTFE) membranımsı kapileri taşıyıcı matris olarak kullanıp 76.2 mg/g değerine varan kapasiteye ulaşmışlar, ayrıca artan sıcaklık ile kapasitenin arttığını belirlemişlerdir [57]. Bir başka çalışmalarında, aynı taşıyıcı matris ve bilinen PTFE kapileri ile sırası ile 60 ve 70 dakikalık dengeye varış süreleri sonunda 71.2 ve 53.8 mg/g bilirubin giderimi sağlanmışır [58]. Kapiler, radyasyon uyarmalı aşı polimerizasyonu kullanılıp epoksi gurupları ile kazandırılmıştır. Sentezlenen adsorbanlar, hem membran hem mikro kolon avantajlarına sahiptir. Bu çalışmaların hepsinde bilirubin kaynağı insan serumudur. Şenel ve ark. CibacronBlue F3GA'yı poliamid 'hollow-fiber' formundaki membranlara immobilize ederek bilirubin için 48.9 mg/g adsorpsiyon kapasitesi rapor etmişlerdir [59].

Yu ve ark [60]. glutaraldehit ile çapraz bağlanmış kitosan reçineleri, di-,tri-, tetra- ve penta-aminle modifiye edip (protonlanmış amin gurubu içeren) matrislerin, elektrostatik ve hidrofobik etkileşimler etkin olmak üzere, konjuge ve serbest bilirubin giderim performanslarını incelemişler ve sonuçlarını yüzde giderim olarak ifade etmişlerdir. %80'e varan değerler rapor edilmiştir. Rad ve ark., süspansiyon polimerizasyonu ile ve manyetik formda sentezlenen p(HEMA) partiküllere albumin immobilize ederek insan serumundan 64.7mg/g 'lık kapasite ile bilirubin giderimi elde etmişlerdir [61]. Doğal polimerik destek olarak kitosan partikülleri kullanılıp, karbodiimid ve azot plazma ile aktive edilen matrise polilisine bağlanarak sulu fosfat tamponundan bilirubin giderimi incelenmiş, 4⁰C'de 1.13mg/g kapasite saptanmıştır [62].

Avramescu ve ark [63], su/1-oktanol/ DMSO/ EVAL kombinasyonu ile mikrofiltrasyon membranı, etilen vinil alkol membranına, BSA ligandı bağlayarak 25.0mg/g bilirubin adsorpsiyon kapasiteli adsorbanı sentezlemişlerdir. Uzun ve Denizli, HSA bağlı manyetik p(HEMA) partiküllerini manyetik olarak stabilize akışkan yatak kolon sisteminde kullanarak, literatürde ilk kez insan plazmasından

bilirubin giderilmesini incelemişler ve 88.3mg/g kapasite değerine erişmişlerdir [64].

Mikroporöz naylon, formaldehit ile aktive edilip, hidrofilitesini artırmak için kovalent olarak kitosan bağlanıp, sonra Cibacron Blue F3GA boya ligandı takılarak hazırlanan sorbentin bilirubin adsorpsiyon kapasitesi 63.4mg/g olarak belirlenmiştir [65]. Shi ve ark [66] ise bisoksiran ile mikroporöz poliamid membranı aktive edip kitosan kapladıktan sonra poli (L-lisin) ligandı bağlayıp bilirubini fosfat çözeltisinden gidermede kullanmışlardır. Sağlanan giderim, 28.6mg/g'dır. Han ve Zhang [67] ise politetrafloroetilen fiberlere radyasyon indüksiyonlu p(GMA) aşıladıktan sonra fiberdeki epoksi guruplarını polietilenimin (PEI) ile modifiye etmişlerdir. BSA varlığında 9.6mg/g bilirubin giderimi sağlanmıştır. Bir diğer çalışmada poröz, çapraz bağlı poliakrilamidden kısmen aminlenmiş poliakrilamid ile desteklenen, biyouyumlu β -siklodekstrin reçinesi sentezlenmiş, 37⁰C'de ve fosfat tamponundan bilirubin adsorpsiyon kapasitesi, 42.2mg/g olarak saptanmıştır [68].

Perçin ve ark [69]. adsorban için kriyojel formunu kullanmışlardır. Aminoasit içeren komonomer, N-metakriloil- L- triptofan metil ester (MATrp), HEMA bazlı kriyojel sentezinde kullanılmıştır. Sentez için yığın polimerizasyon yöntemi seçilmiştir. Aktivasyon ve ligand bağlama basamakları elimine edilerek elde edilen yapı ile 22.2mg/g bilirubin giderimi sağlanmıştır. Baydemir ve ark. önce bilirubin baskılı, N-metakriloil-L- tirosin metil ester içeren p(HEMA-MAT) partiküllerini yığın polimerizasyon yöntemi ile sentezleyip bunları HEMA bazlı, serbest radikal polimerizasyon yöntemi ile sentezlenen kriyojellere gömerek kriyojellerin yüzey alanını artırmışlar ve 10.3 mg/g adsorpsiyon kapasitesi elde etmişlerdir. Ayrıca hazırlanan matrisin bilirubin için, kolesterol ve testosterona göre bağıl seçicilik katsayıları sırası ile 8.6 ve 4.1'dir [70]. Aynı gurup, MAT fonksiyonel monomeri kullanıp. HEMA bazlı, bilirubin baskılı partiküller ile 3.4mg/g bilirubin adsorpsiyon kapasitesi rapor etmişlerdir [71]. Syu ve ark. ise yığın polimerizasyon yöntemi ile metakrilik asit bazlı, α -bilirubin baskılı p(MAA-EGDMA) partiküllerini sentezlemiş, polimerizasyon reaksiyonu için termal ve UV radyasyonu ile başlatma reaksiyonlarının etkinliğini araştırmışlardır. 0.83mg/g kapasite değeri rapor edilmiştir [72].

3. DENEYSEL YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

2-Hidroksietil metakrilat (HEMA) ve N,N,N',N'-tetrametilen diamin (TEMED) Fluka (Buchs, İsviçre) firmasından, N,N'-metilen-bis(akrilamid) (MBAA), akrilamid, amonyum persulfat (APS) insan serum albümin (HSA) ve siyanojen bromür (CNBr) ise Sigma (St Louis, ABD) firmasından alınmıştır. Kullanılan diğer kimyasal maddeler ise analitik saflıkta olup Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Deneylerde kullanılan su, yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) ile ters ozmoz Barnstead (Dubuque, IA) Ropure LP® birimi ve ardından Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloid uzaklaştırma birimi ve iyon değiştirici dolgulu kolon sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun (deiyonize su) iletkenliği 18 MΩ/cm'dir. Deneylerde kullanılacak cam malzemeler bir gece boyunca 4 M nitrik asitte bekletilmiş ve saf sudan geçirilmiştir.

3.2. PHEMA Kriyojellerin Hazırlanması

Poli(HEMA) kriyojel kolon hazırlanırken HEMA ve çapraz bağlayıcı olarak metilen bisakrilamid (MBAA) kullanılmıştır. Monomer çözeltisi, 0.283 g MBAA'nın 10 mL deiyonize su içinde çözülmesinin ardından 1.3 mL HEMA ve 3.7 mL deiyonize su içeren çözeltiyle karıştırılarak hazırlanmıştır. Başlatıcı olarak amonyum persülfat (APS; 0.02 g) katalizör olarak ise N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamin (TEMED; 25µL) bu çözeltiye eklenmiştir. Daha sonra çözeltiden 3'er mL alınıp buz kalıbı içerisine yerleştirilen 5 mL'lik şırıngalara eklenmiş sonra ağızları sıkıca kapatılarak -16°C'de 24 saat süre ile polimerizasyon gerçekleştirilmiştir. 24 saat sonunda şırıngalar buzdolabından çıkarılmış ve oda sıcaklığında buz eritilerek makrogözeneklerin oluşması sağlanmıştır. Polimerizasyon artıklarının uzaklaştırılması için deiyonize su ile yıkanmış ve polimerler deiyonize su içerisinde ağız sıkıca kapalı olarak kullanılabilecek kadar 4°C 'de saklanmıştır.

3.3. PHEMA Kriyojelin karakterizasyonu

PHEMA kriyojelin karakterize edilebilmesi için şişme özellikleri, yüzey özellikleri ve yapısal özellikleri bu çalışma kapsamında incelenmiştir.

3.3.1. Şişme özelliğinin incelenmesi

PHEMA kriyojelin şişme test deiyonize su kullanılarak yapılmıştır. İlk olarak kuru kriyojel dikkatli bir şekilde tartılmış ve daha sonra 50 mL deiyonize su bulunan küçük şişeler içine koyulmuştur. Şişe izotermal su banyosu içerisinde sabit

sıcaklıkta ($25 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$) 2 saat süreyle bekletilmiş ardından polimer numunesi periyodik olarak su içerisinde alınmış ve dikkatli bir şekilde tartılmıştır. Kriyojellerin şişme oranları aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Şişme Oranı } \% = [(W_s - W_o) / W_o] \times 100 \quad (3.1)$$

Burada W_o ve W_s sırasıyla şişmeden önce ve sonraki kriyojel kütlesini göstermektedir.

3.3.2. Yüzey Alanı ve Gözeneklilik Ölçümleri

Kriyojellerin gözenek hacmi ve ortalama gözenek çapı civa porozimetresi ile belirlenmiştir (Carlo Erba Model 200, İtalya). Spesifik yüzey alanları BET yöntemi ile hesaplanmıştır.

3.3.3. Yüzey Morfolojisi

Poli(HEMA) kriyojelin yüzey ve yığın yapısı taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. Numuneler oda sıcaklığında 7 gün boyunca kurutulmuştur. Kurumuş kriyojel iletken bir yapıştırıcıyla SEM örnek plakası üzerine tutturulmuştur. Daha sonra örnek yüzeyleri vakum altında püskürtmeli kaplama metodu ile 200 Å kalınlığında metalik altın kaplanarak yüzey iletken hale getirilmiştir. Hazırlanan örnekler SEM örnek yuvasına yerleştirilerek farklı büyütme oranlarında fotoğrafları çekilmiştir (JEOL, JEM 1200 EX, Tokyo, Japonya).

3.4. HSA İmmobilizasyonu

PHEMA kriyojellere HSA immobilizasyonu, CNBr ile yüzey aktivasyonunun ardından HSA çözeltisinin kolondan geçirilmesiyle gerçekleştirilmiştir.

3.4.1. CNBr Aktivasyonu

CNBr aktivasyon ajanı olarak PHEMA kriyojelin aktivasyonunda kullanılmıştır. Aktivasyon işlemi için farklı derişimlerde CNBr (CNBr, Sigma, St. Louis, MO) (5-80 mg/mL) sulu çözeltisi hazırlanmıştır. 2.0 M NaOH kullanılarak hazırlanan çözeltilerin pH'sı 11.5'e ayarlanmıştır. Çözelti kriyojelden $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 60 dk boyunca geçirilmiş ve aktivasyon işlemi başlamıştır. Fazla aktivasyon ajanı 0.1 M NaHCO_3 (100 mL) çözeltisiyle yıkanarak uzaklaştırılmıştır. 1 saat boyunca FeCl_3 (50 mL) (%5, w/v) çözeltisi ve 1.0 M etanol amin (pH: 9.1) çözeltisi kolondan geçirilerek yüzeyde kalan tüm diğer aktif gruplar (izoüre, v.s.) kapatılmıştır. CNBr aktive

olmuş kolonlar 4 defa 0.5 M NaCl içeren sulu çözeltiyle yıkanarak HSA immobilizasyonu için +4°C'de saklanmıştır.

3.4.2. HSA İmmobilizasyonu

CNBr ile aktive edilmiş PHEMA kriyojellere HSA immobilizasyon işlemi oda sıcaklığında sürekli sistemde incelenmiştir. HSA'nın yüzeye immobilizasyonunda optimum koşulların belirlenebilmesi için farklı pH, derişim, sıcaklık ve zaman aralığında HSA çözeltileri ile tepkimeye sokularak ligand bağlanması incelenmiştir. HSA immobilizasyonuna pH etkisi 4.0-8.0 aralığında, akış hızı 0.5-2.0 mL/dk, derişim etkisi sulu çözeltilerde HSA derişimi 0.1-3.0 mg/mL aralığında ve inkübasyon zamanı etkisi 0-120 dk aralığında incelenmiştir.

CNBr ile aktive edilmiş PHEMA kriyojelle immobilize olan HSA miktarı, derişim farkı kullanılarak UV-Görünür spektrofotometre (UV mini-1240, Shimadzu, Tokyo, Japonya) de 280 nm'de ölçülen absorbans değerleri ile hesaplanmıştır.

Kalibrasyon eğrisi derişimi bilinen HSA çözeltileri kullanılarak elde edilmiş ve kolondan geçirilen HSA'nın derişiminin bulunmasında kullanılmıştır. Aktive edilmiş PHEMA kriyojelle tutuklanan HSA miktarı aşağıdaki formül kullanılarak bulunmuştur:

$$q = [(C_i - C_t) \cdot V] / m \quad (3.2)$$

Burada, q birim kriyojeldeki tutuklanan HSA miktarını (mg/g); C_i ve C_t sırasıyla başlangıç ve immobilizasyon sonrası elde edilen çözeltideki HSA derişimini (mg/mL); V sulu çözelti hacmini (mL) ve m kriyojel kütlesini (g) göstermektedir.

3.5. Kan Uyumluluğu Testleri

3.5.1. Pıhtılaşma Zamanı (CT)

PHEMA kriyojel 0.1 M fosfat tamponu (pH: 7.4) ile 24 saat oda sıcaklığında etkileştirilmiş sonrasında cam filtrede 0.5 M NaCl çözeltisi ve saf su kullanılarak yıkanmıştır. Yeni alınmış donmuş insan plazması (0.1 mL) 37°C'de 2 dakika ön ısıtmaya tabi tutulmuş ve daha sonra kriyojel ile etkileştirilmiştir. Pıhtılaşma zamanı fibrometre yöntemi kullanılarak ölçülmüştür[73].

3.5.2. Aktifleştirilmiş Kısmi Tromboplastin Zamanı (APTT)

PHEMA kriyojel 0.1 M fosfat tamponu (pH: 7.4) ile 24 saat oda sıcaklığında etkileştirilmiş sonrasında cam filtrede 0.5 M NaCl çözeltisi ve saf su kullanılarak yıkanmıştır. Yeni alınmış donmuş insan plazması havuzundan (0.1 mL) ve kısmi tromboplastin (0.3 mL, bioMerieux, Marcy-l'Etoile, France) 37°C'de 2 dakika ön ısıtmaya tabi tutulmuş ve bu iki çözelti karıştırılarak kriyojel ile etkileştirilmiştir. 30 saniye sonra CaCl₂ (0.1 mL, 0.025 M) eklenmiş ve daha sonra aktif tromboplastin zamanı (APTT) fibrometre yöntemi kullanılarak belirlenmiştir [74].

3.5.3. Protrombin Zamanı (PT)

Protrombin zamanını (PT) ölçebilmek için tek aşamalı protrombin yöntemi uygulanmıştır [75]. PHEMA kriyojel 0.1 M fosfat tamponu (pH: 7.4) ile 24 saat oda sıcaklığında etkileştirilmiş sonrasında cam filtrede 0.5 M NaCl çözeltisi ve saf su kullanılarak yıkanmıştır. Yeni alınmış donmuş insan plazması havuzundan (0.1 mL) ve kısmi tromboplastin (0.3 mL, bioMerieux, Marcy-l'Etoile, France) 37°C'de 2 dakika ön ısıtmaya tabi tutulmuş ve bu iki çözelti karıştırılarak kriyojel ile etkileştirilmiştir. 30 saniye sonra CaCl₂ (0.1 mL, 0.025 M) eklenmiş ve daha sonra protrombin zamanı (APTT) fibrometre yöntemi kullanılarak belirlenmiştir [76].

3.5.4. Hücre Yapışma Çalışmaları

İnsan kanı, PHEMA-HSA kriyojeller ile etkileştirilmiştir. Kan ile etkileşim sağlanmadan önce daha ileri safsızlıklara (280 nm'de elde edilen absorbans ile tespit edilebilir) sebep olmaması için kriyojel 0.1 M KCl içeren tampon çözeltisi ile yıkanmıştır. PHEMA kriyojel kan ile 1 saat boyunca etkileştirilmiştir. Kan numuneleri işlemin başında ve sonunda ortamdan geri çekilmiş ve mikroskop kullanılarak numunelerin platelet ve lökosit sayımı yapılmıştır.

3.6. İnsan Plazmasından Bilirubin Uzaklaştırılması

İnsan plazmasından bilirubin uzaklaştırılması çalışmaları sürekli sistemde incelenmiştir. Üniversite Hastanesine (Hacettepe Üniversitesi) bağışlanan yeni donmuş plazmalar kullanılmıştır. Yapay plazmaya bilirubin yüklemesi yapılarak bilirubin seviyesi hiperbilirubinemi hastalarınıninkine aynı seviyeye getirilmiştir. Farklı seyreltme oranları kullanılarak yapay plazmadaki bilirubin miktarı değiştirilmiştir. Daha sonra hazırlanan plazma örnekleri HSA-immobilize PHEMA kriyojelleri ile etkileştirilmiştir. Bilirubin uzaklaştırılmasında optimum koşulların

belirlenebilmesi için bilirubin derişimi, etkileşim süresi ve sıcaklık gibi parametrelerin etkisi incelenmiştir. Ayrıca immobilize olan HSA'nın bilirubin uzaklaştırmadaki etkinliğini belirleyebilmek amacıyla değişik oranlarda HSA immobilize PHEMA-HSA kriyojeller kullanılmıştır. Tüm adsorpsiyon deneyleri karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir. Uzaklaştırılan bilirubin miktarı, kolondan geçirilmeden önce ve kolondan geçirdikten sonra plazma örneklerindeki bilirubin derişiminin belirlenmesiyle hesaplanmıştır. Plazma örneklerindeki bilirubin derişimi Roche Cobas integra 400 (İsviçre) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gram adsorban başına adsorplanan bilirubin miktarı aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$q = [(C_i - C_t) \cdot V] / m \quad (3.3)$$

Burada, q birim kriyojeldeki tutuklanan bilirubin miktarını (mg/g); C_i ve C_t sırasıyla başlangıç ve immobilizasyon sonrası elde edilen çözeltideki bilirubin derişimini (mg/mL); V sulu çözelti hacmini (mL) ve m kriyojel kütlesini (g) göstermektedir.

3.7. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

HSA immobilize PHEMA kriyojelden bilirubin desorpsiyonu, sürekli sistemde 20 mL 1.0 M NaCl ve 0.1 M NaOH içeren çözelti kriyojellerden 1 saat süreyle geçirilmesiyle incelenmiştir. Kriyojelin rejenere olup olmadığı desorpsiyon çözeltisindeki bilirubin miktarının Bölüm 3.6 'daki yöntem kullanılarak belirlenmesiyle gerçekleştirilmiştir. Desorpsiyon oranı kriyojellere adsorplanan bilirubin miktarı ve desorpsiyon ortamındaki derişim kullanılarak hesaplanmıştır. Bu işlem için aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır:

$$\text{Desorpsiyon oranı (\%)} = \frac{\text{Yıkama ortamına salınan bilirubin miktarı}}{\text{kriyojele adsorbeolan bilirubin miktarı}} \times 100 \quad (3.4)$$

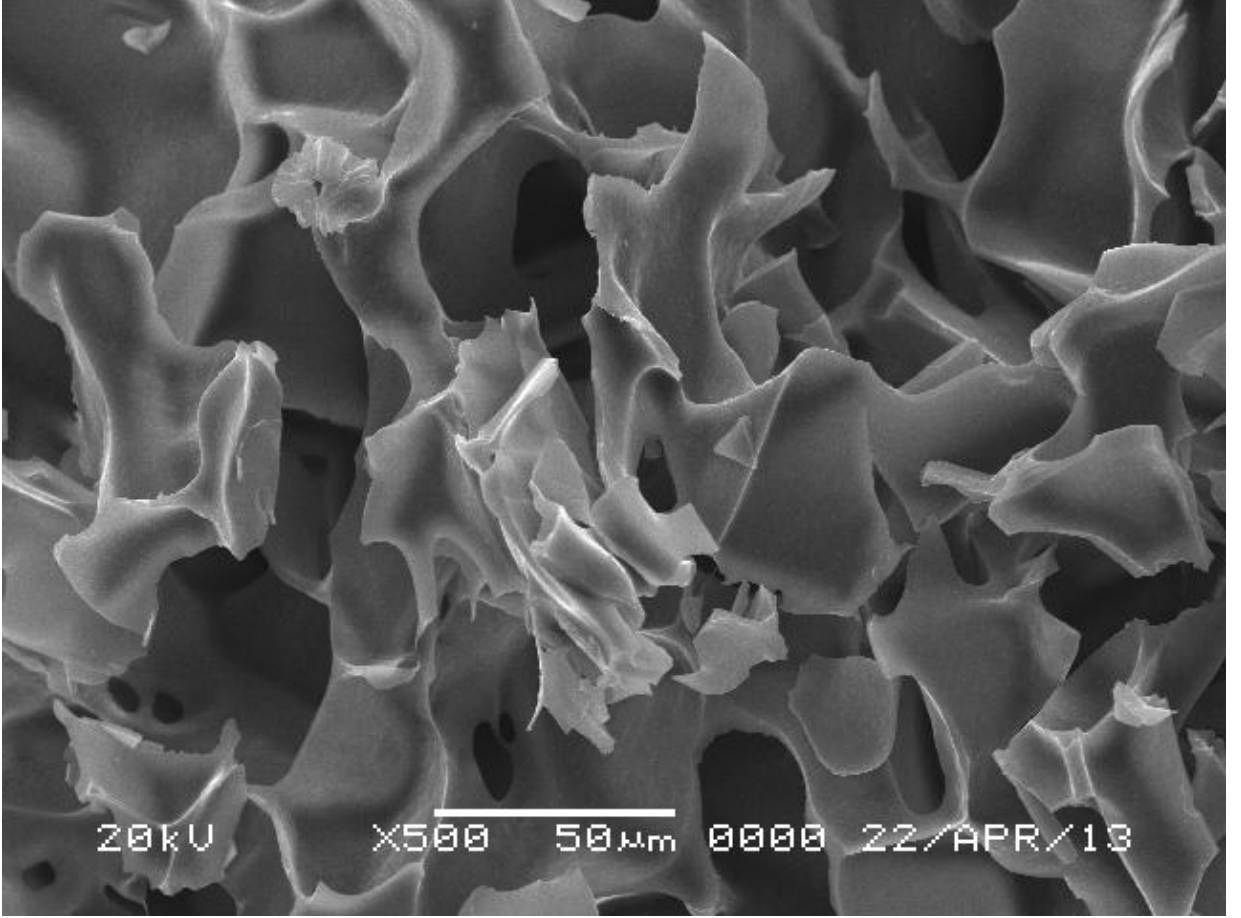
PHEMA-HSA kriyojelin tekrar kullanılabilirliğini belirlemek için bilirubin adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi aynı kriyojelle 10 kez kullanılarak tekrarlanmıştır. Rejenerasyon ve sterilizasyon amacı ile PHEMA-HSA kriyojel, desorpsiyon işleminin ardından 50mM NaOH çözeltisi ve deiyonize su ile yıkanmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, hiperbilirubinemi insan plazmasından bilirubinin uzaklaştırılması için HSA immobilize edilmiş kan ile uyumlu PHEMA kriyojeller hazırlanmıştır. PHEMA fizyolojik uyumluluğu, mekanik direnci, kimyasal ve biyolojik olarak kararlılığı nedeniyle seçilmiştir. Hazırlanan PHEMA kriyojeller şişme testleri, taramalı elektron mikroskopu (SEM), yüzey alanı ve gözeneklilik ölçümleri ile karakterize edilmiştir. PHEMA ve HSA-immobilize PHEMA kriyojellerin kan-uyumluluk testleri yapılmıştır. Daha sonra PHEMA kriyojellerin hidroksil fonksiyonel grupları farklı koşullarda CNBr ile aktive edilmiş ve aktive edilmiş kriyojellere HSA kovalent olarak bağlanmıştır. Hazırlanan HSA immobilize PHEMA kriyojellerin insan plazmasından bilirubini uzaklaştırma etkinliği belirlenmiş ve son aşamada kriyojellerin tekrar kullanılabilirliği incelenmiştir.

4.1. PHEMA Kriyojellerin Karakterizasyonu

Kriyojelin gözenek yapısını gösteren SEM görüntüleri Şekil 4.1'de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi PHEMA kriyojeller gözeneksiz ince polimer duvarlarına ve hareketli fazın akışına olanak sağlayan birbiriyle bağlantılı gözenek ağına (10 -100 μm çapında) sahiptir. Matrisin gözenek boyutu protein moleküllerine göre oldukça büyüktür ve kolaylıkla geçmelerine olanak verir. Hareketli fazın gözeneklerden konvektif akışının bir sonucu olarak kütle transfer direnci ihmal edilebilir düzeydedir. PHEMA kriyojelin denge şişme değeri 7.86 g $\text{H}_2\text{O}/\text{g}$ kriyojel, gözeneklilik oranı ise %69.6' dır.



Şekil 4.1. PHEMA kriyojellerin SEM görüntüleri.

Sentezlenen PHEMA kriyojeller opak, süngerimsi ve elastik bir yapıya sahiptir. Ayrıca su içerisine atılıp şiştiklerinde gözeneklerde bulunan su, kriyojeller elle sıkıştırıldığında kolaylıkla uzaklaştırılabilmektedir. Sıkıştırılmış bir parça kriyojel tekrar suya atıldığında şişmekte ve orijinal boyutunu ve yapısını tekrar kazanmaktadır.

PHEMA kriyojelin spesifik yüzey alanı çok noktalı BET yöntemi ile ortalama $27.2 \text{ m}^2/\text{g}$ olarak bulunmuştur. Gözenek boyutu (BJH cihazı ile) belirlenmiştir. Gözeneklerin çapı $20 - 245 \text{ Å}$ aralığında değişmektedir ve ortalama çap 68.2 Å 'dır. Bu da PHEMA kriyojellerdeki makro gözeneklerin varlığını onaylamaktadır ve bu gözenek çapı kan gibi viskozitesi yüksek sıvıların kolondan akışı için uygundur.

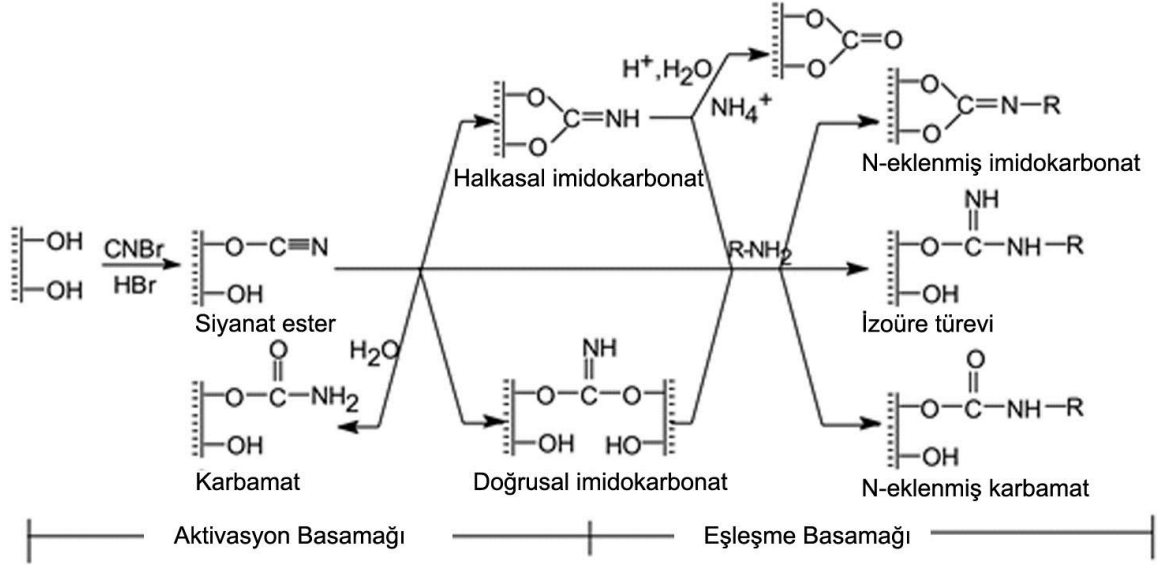
4.2. PHEMA Kriyojellere HSA İmmobilizasyonu

Hiperbilirubinemi insan plazmasından bilirubinin seçimli olarak uzaklaştırılması için HSA biyoafinite ligandı olarak kullanılmıştır. PHEMA kriyojellere HSA'nın kovalent

olarak bağlanması için optimum koşulları belirlemek üzere gerçekleştirilen çalışmaların sonuçları aşağıda rapor edilmiştir.

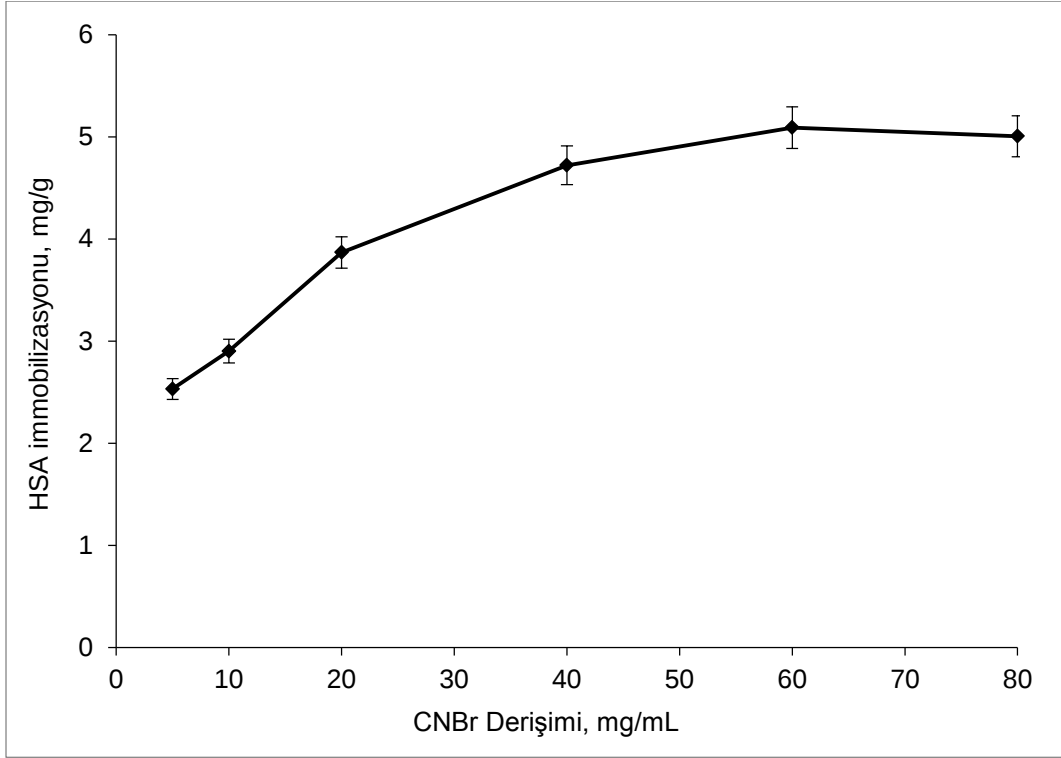
4.2.1. CNBr Derişiminin Etkisi

Polimer yüzeyindeki hidroksil fonksiyonel gruplarının CNBr ile aktivasyonu afinite sorbentlerin hazırlanması için uzun süredir kullanılan etkili ve bilinen bir yöntemdir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Hidroksil gruplarının CNBr aktivasyon mekanizması.

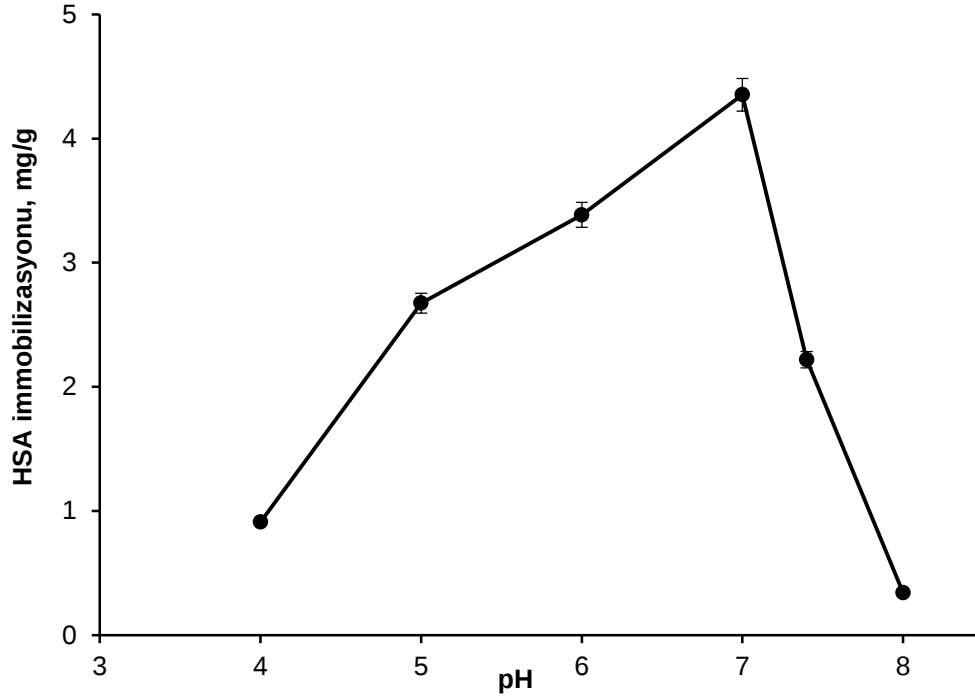
En uygun aktivasyon ajanı derişiminin belirlenmesi için aktivasyon ortamındaki CNBr derişimi 5-80 mg/mL arasında değiştirilmiştir. Daha sonra farklı aktivasyon derecelerine sahip PHEMA kriyojeller pH 7.0 fosfat tamponunda HSA sulu çözeltileri ile (0.5 mg/mL) etkileştirilmiştir. Şekil 4.3' te görüldüğü gibi kriyojellere bağlanan HSA miktarı CNBr derişiminin artması ile artmakta ve 60 mg/mL değerinden itibaren sabit kalmaktadır. Aktivasyon basamağında kullanılan aktivasyon ajanının (CNBr) derişiminin artması kriyojellerin yüzeyinde daha fazla sayıda aktif bölgenin oluşmasını sağlamaktadır. Bunun sonucunda bağlanan HSA miktarı CNBr derişimi ile artmaktadır. Yüzeydeki ligandların serbestliği taşıyıcıya bağlanan ligandların derişimiyle ilgilidir ve performansını etkileyen en önemli faktörden biridir. Yüzeye çok yoğun bir şekilde immobilize edilmesi durumunda HSA'nın etkin bağlama bölgelerinin ulaşılabilirliği kısıtlanmış olacaktır. Buna göre optimum CNBr derişimi 60 mg/mL olarak belirlenmiş ve sonraki aşamalarda HSA immobilizasyonu için aktivasyon basamağında bu derişim kullanılmıştır.



Şekil 4.3. CNBr derişiminin HSA bağlanmasına etkisi. HSA derişimi: 0.5 mg/mL; Akış hızı: 0.75 mL/dk; pH: 7; T:25 °C.

4.2.2. pH Etkisi

CNBr ile aktive edilmiş PHEMA kriyojellere HSA immobilizasyonunda ortam pH'sının etkisinin belirlenmesi için pH 4-8 arasında değiştirilmiştir. Şekil 4.4'te görüldüğü gibi en yüksek HSA bağlanması pH 7'de gözlenmiştir. Bu pH'da immobilize edilen HSA miktarı 4.35 mg/g 'dır.

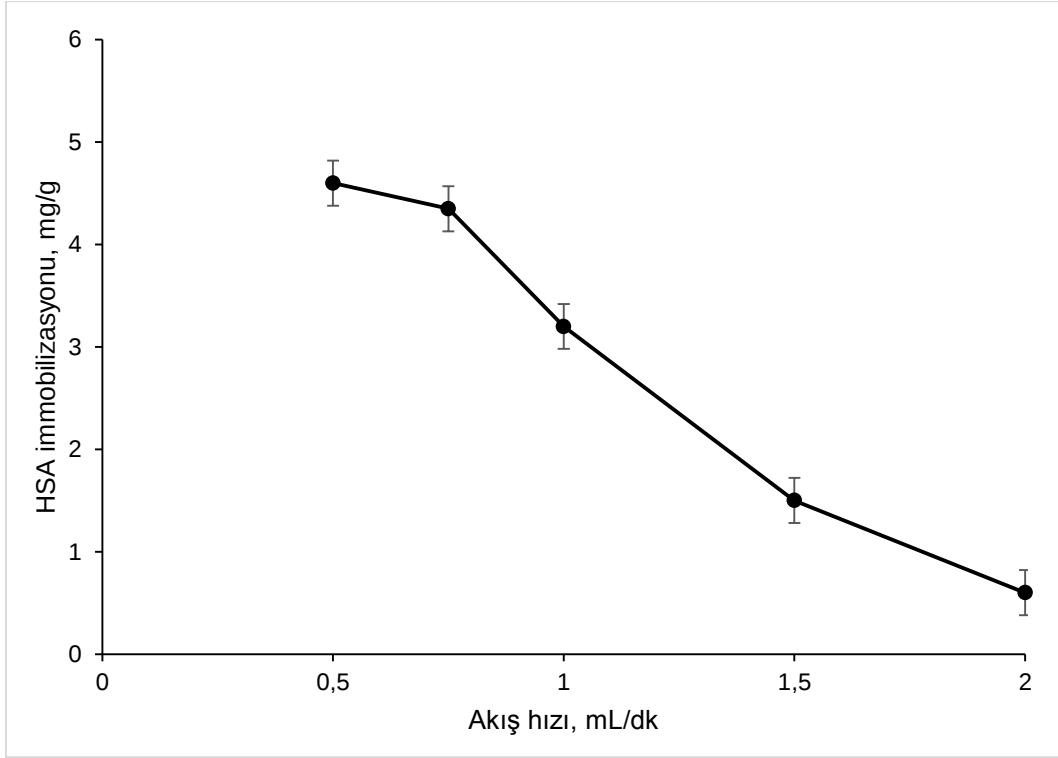


Şekil 4.4. pH'ın HSA bağlanmasına etkisi. HSA derişimi: 0.5 mg/mL; Akış hızı: 0.75 mL/dk; pH: 7; T:25 °C; t: 1.0 saat.

İzoüre türevlerinin pK değerleri yaklaşık 9.5'tir ve dolayısıyla nötral pH'ta pozitif yüklüdür. Dolayısıyla negatif yüklü HSA (pI: 4.7) ile etkileşmek için uygun pH değeridir.

4.2.3. Akış Hızının Etkisi

CNBr ile aktive edilmiş PHEMA kriyojellere HSA immobiizasyonuna akış hızının etkisini incelemek için 0.5-2.0 mL/dk akış hızlarında çalışılmış ve HSA adsorpsiyon kapasitesindeki değişim Şekil 4.5'te verilmiştir.



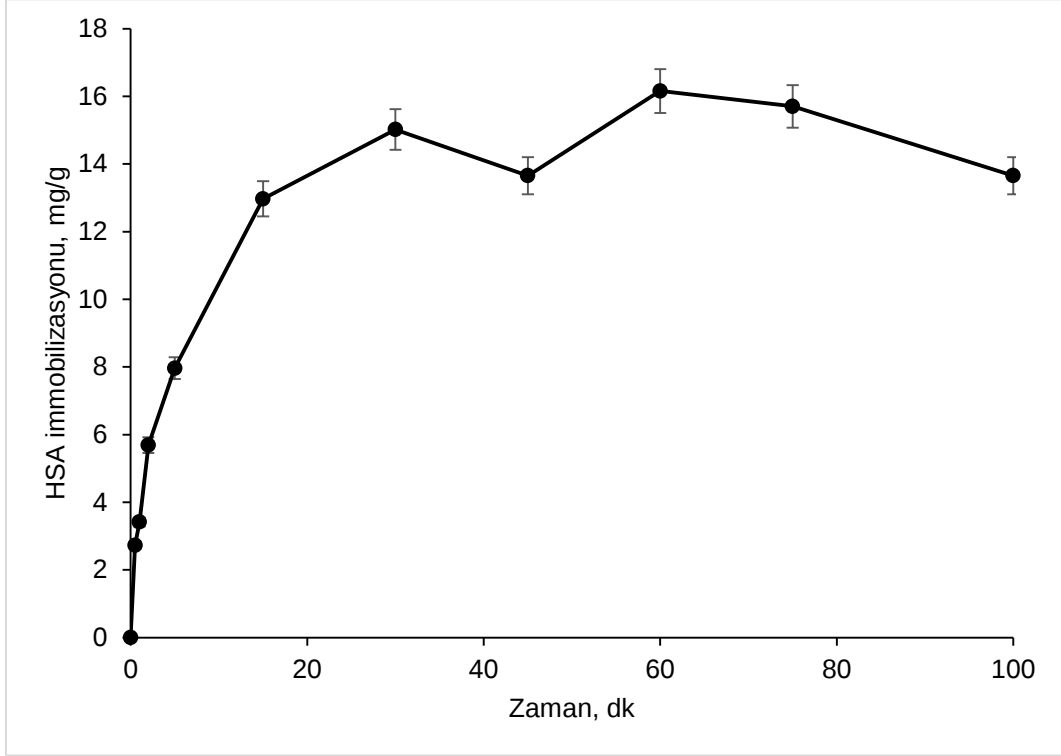
Şekil 4.5. Akış hızının adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisi. HSA derişimi: 0.5 mg/mL; pH: 7; T:25 °C; t: 1.0 saat.

Şekilden de görüldüğü gibi akış hızının artması CNBr ile aktifleştirilmiş PHEMA kriyojellere immobilize olan HSA miktarını düşürmüştür. 0.5 mL/dk akış hızında immobilize edilen HSA miktarını 4.60 mg/g iken 2.0 mL/dk akış hızına çıkıldığında 0.60 mg/g değerine düştüğü saptanmıştır. Bu davranış akış hızının artmasıyla birlikte çözeltideki HSA moleküllerinin aktif yüzeyle olan etkileşim süresini azaltacağı için adsorpsiyon kapasitesinde düşmeye sebep olmaktadır. Sonuç olarak, 0.5 mL/dk akış hızı ile 0.75 mL/dk akış hızları arasındaki adsorpsiyon kapasitelerinde fazla bir fark olmadığı için 0.75 mL/dk akış hızı optimum akış hızı olarak belirlenmiş ve diğer parametrelerin etkilerinin incelendiği deneylerde bu akış hızında çalışılmıştır.

4.2.3. İnkübasyon Süresinin Etkisi

Adsorpsiyon işleminin hızına etki eden adsorpsiyon basamaklarının anlaşılması için etkileşim süresi önemli bir adımdır. PHEMA aktive kriyojellere HSA immobilizasyonu yaklaşık olarak 30 dk civarında dengeye ulaşmıştır (Şekil 4.6). Adsorpsiyonun bu derece hızlı olması, beklenildiği gibi HSA'nın aktive olmuş yüzeye yüksek afinite ile bağlandığını göstermektedir. Sonuç olarak HSA immobilizasyonu için optimum etkileşim süresinin 30 dk olduğu bulunmuş ve daha

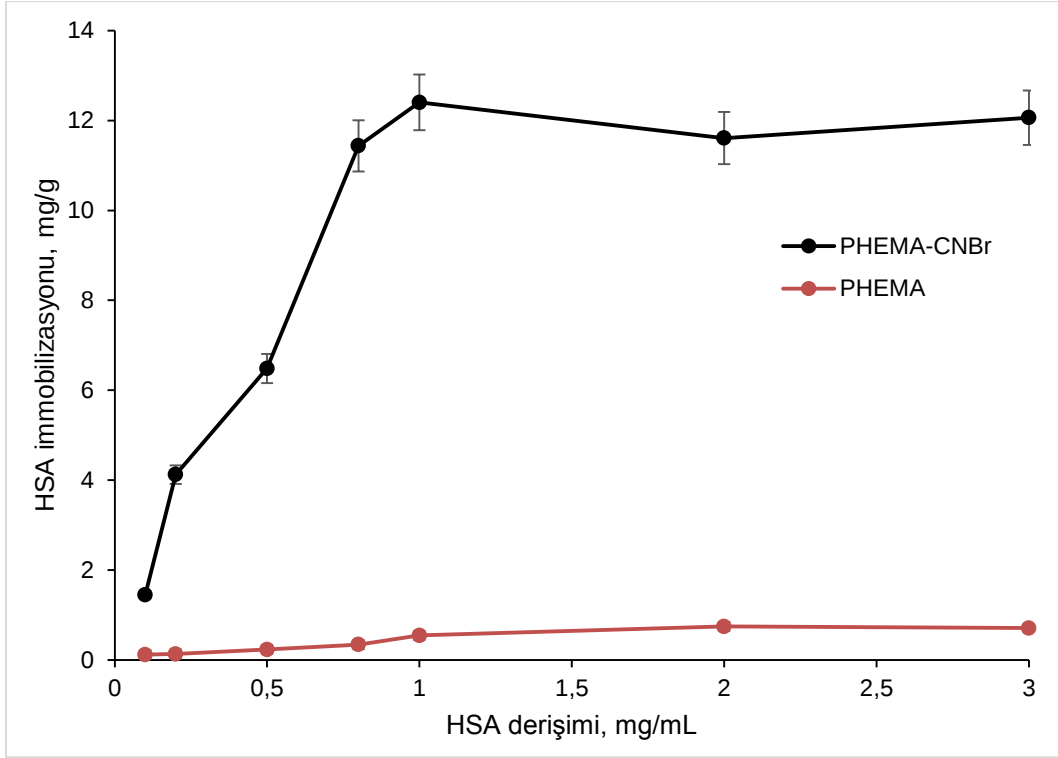
sonra yapılan immobilizasyon çalışmalarında aktive edilmiş kriyojelle HSA çözeltileri 30 dk etkileştirilmiştir.



Şekil 4.6. PHEMA kriyojellere HSA bağlanmasına inkübasyon süresinin etkisi. HSA derişimi: 1.0 mg/mL; Akış hızı: 0.75 mL/dk; pH: 7; T:25 °C.

4.2.4. HSA Başlangıç Derişiminin Etkisi

CNBr ile aktive edilmiş PHEMA kriyojellerine HSA immobilizasyonuna HSA başlangıç derişiminin etkisi, sulu çözeltideki HSA derişimi 0.1-3.0 mg/mL aralığında değiştirilerek incelenmiştir. Şekil 4.7’de HSA derişiminin immobilizasyona etkisi ve aktive edilmemiş PHEMA kriyojeller üzerine özgün olmayan HSA bağlanması verilmiştir.



Şekil 4.7. HSA derişiminin immobilizasyona etkisi. Akış hızı: 0.75 mL/dk; pH: 7; T:25 °C; t: 30 dk.

Şekilde görüldüğü gibi aktive edilmiş PHEMA krijojellere HSA immobilizasyonu ortamındaki HSA derişiminin artması ile yüzeye difüzlenen HSA miktarı arttığı için immobilizasyon miktarında derişime bağılı olarak artış göstermiş ve 1.0 mg/mL HSA derişimi seviyesinde doygunluğa ulaşmıştır. Elde edilen maksimum HSA immobilizasyonu PHEMA kriyojeli ve CNBr ile aktive edilmiş PHEMA kriyojeli için sırasıyla 0.74 mg/g kriyojel ve 12.40 mg/g kriyojel olarak saptanmıştır. Krijojellere immobilize edilen HSA miktarları karşılaştırıldığında PHEMA kriyojele tutulan HSA'nın sadece yüzeye difüzlenen HSA'dan kaynaklı olduğu ve spesifik olmayan etkileşimler sonucu gerçekleştiği anlaşılmaktadır.

4.3. Kan Uyumluluğu Çalışmaları

Biyomalzemelerin tıbbi uygulamalarda kullanılabilmesi için bazı kriterleri karşılaması gerekmektedir. İstenilen son kullanım amacına bağılı olarak, biyomalzeme, kan uyuşabilirliği, doku uyuşabilirliği, kanserojenlik, sitotoksosite, mutajenisite, biyodegradasyon ve mekanik kararlılık gibi bazı testlere tabi tutulmalıdır [75]. Biyomalzeme yüzeyine ilk adsorplanan protein molekülünün miktarı ve türü ardından gelecek olan pıhtılaşma basamaklarını (intrinsik yol üzerinden) ve komplement aktivasyonunu (intrinsik ve ekstrinsik yol üzerinden)

belirler [77]. Bu nedenle bir biyomalzemenin kan uyuşabilirliğini belirlemek için yapılması gereken öncelikli işlemler pıhtılaşma zamanları ve hücre yapışması testleridir.

PHEMA ve HSA-immobilize PHEMA kriyojellerin kan uyuşabilirliğini belirlemek üzere, protrombin zamanı (PT), aktive edilmiş kısmi tromboplastin zamanı (APTT), fibrinojen zamanı ve trombosit pıhtılaşma zamanı (TCT) belirlenmiştir. APTT testi, biyomalzeme yüzeyinde intrinsik pıhtılaşma faktörlerinin aktivasyonunu ve PT testi ekstrasik pıhtılaşma faktörlerinin aktivasyonunu göstermektedir. CT testi in-vitro pıhtılaşma zamanını göstermektedir. Çizelge 4.1 bu testlerde elde edilen pıhtılaşma verilerini özetlemektedir.

Çizelge 4.1. Pıhtılaşma zamanları*.

Malzeme	Test		
	APTT (saniye)	PT (saniye)	CT (saniye)
Kontrol Plazma	32.5	17.2	270
PHEMA	32.4	16.8	262
PHEMA-HSA	32.3	16.9	267

* Her bir sonuç 3 paralel çalışmanın ortalamasıdır.

Çizelgeden görüleceği gibi PHEMA ve HSA-immobilize PHEMA kriyojellerin pıhtılaşma süreleri kontrol plazma ile karşılaştırıldığında azalmıştır. Ancak bu azalma vücut tarafından tolere edilebilir orandadır. Bu nedenle HSA immobilize PHEMA kriyojellerin kan uyumluluğunun oldukça iyi olduğu sonucuna varılmıştır.

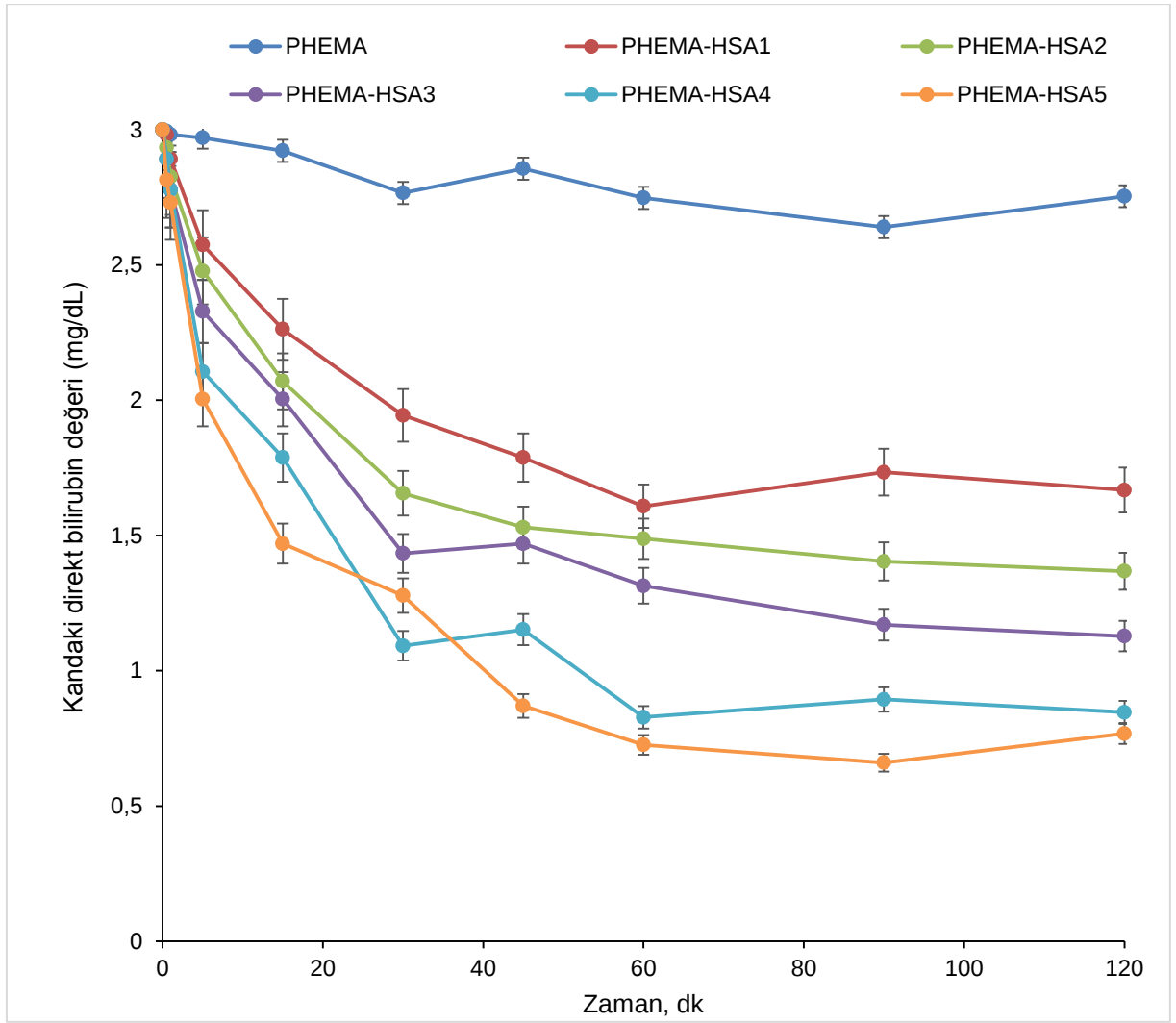
Çizelge 4.2. in-vitro kan deneylerinde elde edilen hematolojik parametreleri özetlemektedir. HSA immobilize PHEMA kriyojeller kullanılarak elde edilen platelet kaybı % 2.32, lökosit kaybı %5.17'dir. Bu sonuçlara göre kriyojeller üzerine belirgin bir hücre yapışmasının olmadığı söylenebilir.

Çizelge 4.2. Kriyojellere platelet ve lökosit yapışması.

Malzeme	Platelet ($\times 10^{-3}/\text{mm}^3$)		Lökosit ($\times 10^{-3}/\text{mm}^3$)	
	Başlangıç/Son	Kayıp (%)	Başlangıç/Son	Kayıp (%)
PHEMA	430/400	6.98	5.8/5.3	8.62
PHEMA-HSA	430/420	2.32	5.8/5.5	5.17

4.4. İnsan Plazmasından Bilirubin Uzaklaştırılması

İnsan plazmasında toplam bilirubin seviyesi 1.23 mg/dL değerinin üzerinde ise hiperbilirubinemi tanısı konmaktadır. Bu çalışmada hiperbilirubinemi hastalarından bilirubin uzaklaştırılması için HSA immobilize PHEMA kriyojeller kullanılmıştır. Bu amaçla yapay plazma örneklerine bilirubin derişimi 3.0 mg/dL olacak şekilde bilirubin yüklemesi yapılmıştır. Farklı miktarlarda HSA immobilize edilmiş PHEMA kriyojeller hazırlanan plazma çözeltileriyle 2 saat boyunca oda sıcaklığında etkileştirilmiştir ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.8’ de verilmiştir.



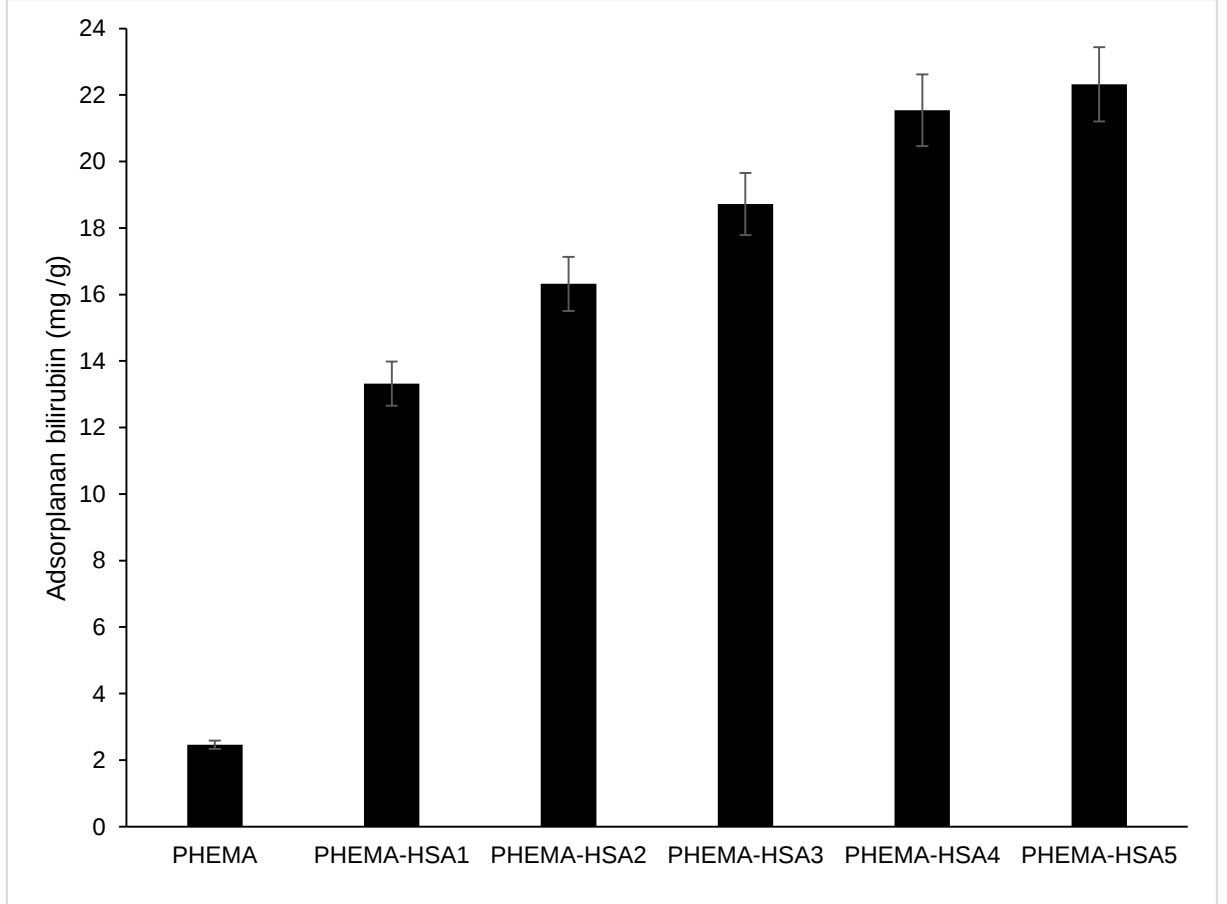
Şekil 4.8. HSA immobilize PHEMA* ve PHEMA kriyojellerin plazmadan bilirubin uzaklaştırma etkinliği. T: 25°C; akış hızı: 0.75 mL/dk.

* PHEMA-HSA1: 0.1 mg/mL HSA çözeltisi ile etkileştirilmiş CNBr ile aktive edilmiş kriyojel;
PHEMA-HSA2: 0.2 mg/mL HSA çözeltisi ile etkileştirilmiş CNBr ile aktive edilmiş kriyojel;
PHEMA-HSA3: 0.5 mg/mL HSA çözeltisi ile etkileştirilmiş CNBr ile aktive edilmiş kriyojel;
PHEMA-HSA4: 0.75 mg/mL HSA çözeltisi ile etkileştirilmiş CNBr ile aktive edilmiş kriyojel;
PHEMA-HSA5: 1.0 mg/mL HSA çözeltisi ile etkileştirilmiş CNBr ile aktive edilmiş kriyojel.

Şekilde etkileşim süresince plazmadaki bilirubin derişimindeki değişim gözlenmektedir. 2 saatlik etkileşim süresi sonrasında PHEMA kriyojellerin yüzeyine yaklaşık olarak 2.46 mg spesifik olmayan bilirubin adsorpsiyonu gerçekleşmiştir. HSA immobilize PHEMA kriyojellerde ise plazmadaki bilirubin seviyesinde önemli oranda azalma görülmüştür. HSA immobilizasyonunun etkinliğini bu sonuçlar ortaya koymaktadır. Kriyojel yüzeyinde HSA immobilizasyon miktarı arttıkça uzaklaştırma etkinliğindeki artış belirginleşmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi ilk 2 saat sonunda HSA immobilize PHEMA kriyojeller, plazmadaki izin verilen bilirubin seviyesini 1.23 mg/dL değerinin altına indirmiştir. PHEMA ve

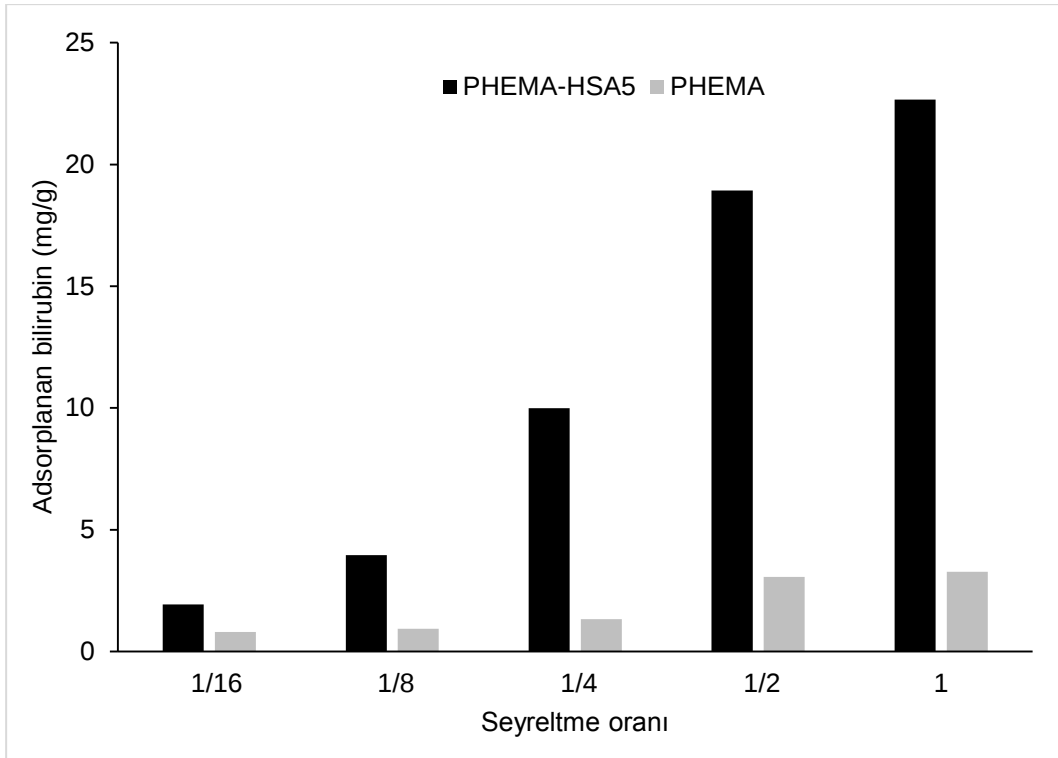
HSA immobilize PHEMA kriyojellerinin bilirubin adsorpsiyon kapasiteleri Şekil 4.9'da verilmiştir.

Kriyojel yüzeydeki HSA miktarı arttıkça adsorplanan bilirubin miktarı arttığı için en yüksek HSA içeren PHEMA-HSA5 numaralı kriyojel bilirubin derişiminin ve diğer parametrelerin etkisinin incelenmesinde kullanılmıştır.



Şekil 4.9. PHEMA ve HSA immobilize PHEMA kriyojellerinin bilirubin adsorpsiyon kapasitesi. Plazmadaki bilirubin derişimi: 3.0 mg/dL; T: 25°C; akış hızı: 0.75 mL/dk; t: 60 dk.

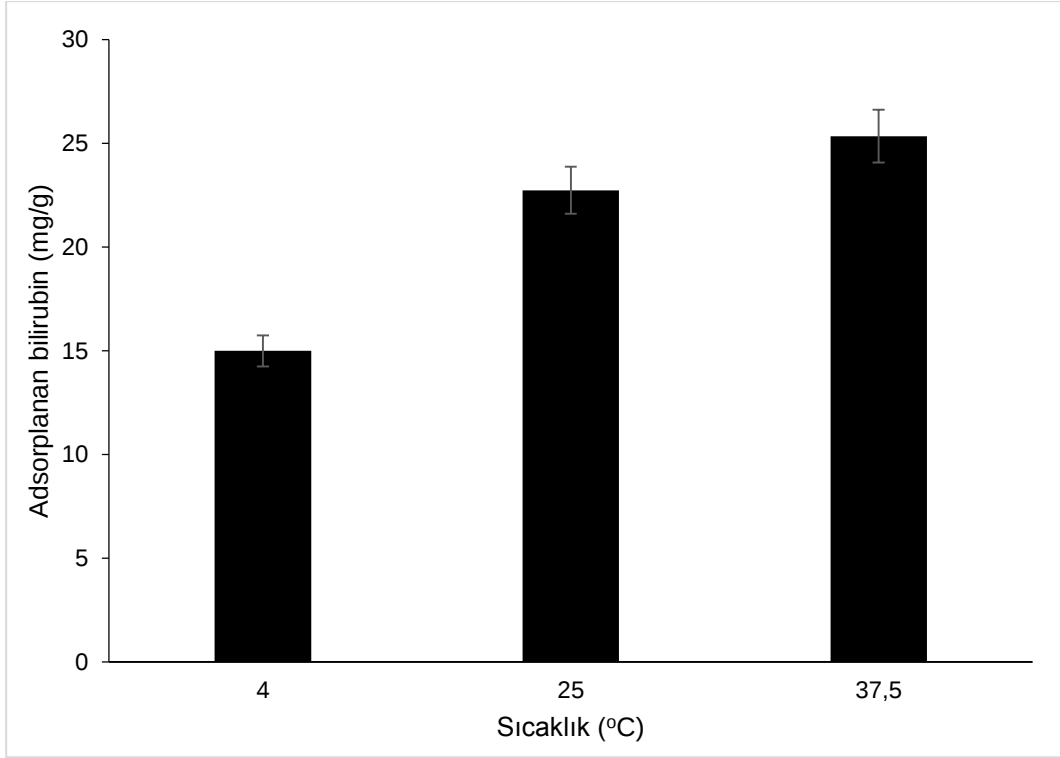
PHEMA ve PHEMA-HSA5 kriyojellerinin bilirubin adsorpsiyon kapasitesi üzerine bilirubin derişiminin etkisi incelenmiştir. Bu amaçla hazırlanan 3.0 mg/dL bilirubin içeren plazma örnekleri 1/2, 1/4, 1/8 ve 1/16 oranlarında bilirubin içermeyen plazma örnekleriyle seyreltme uygulayarak farklı miktarlarda bilirubin içeren plazma örnekleri hazırlanmıştır. Daha sonra bu örnekler 60 dk boyunca oda sıcaklığında PHEMA ve PHEMA-HSA5 kriyojelleriyle etkileştirilmiş ve sonuçlar Şekil 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.10. PHEMA ve PHEMA-HSA5 kriyojellerinin bilirubin adsorpsiyon kapasitesi üzerine bilirubin derişiminin etkisi. T: 25°C; akış hızı: 0.75 mL/dk; t: 60 dk.

Plazmadaki bilirubin derişiminin artmasıyla birlikte PHEMA ve PHEMA-HSA5 kriyojellerinin adsorpsiyon kapasitesi artmış ve sırasıyla 3.28 mg/g ve 22.67 mg/g maksimum adsorpsiyon kapasitesine ulaşılmıştır.

PHEMA-HSA5 kriyojellerinin bilirubin adsorpsiyon kapasitesi üzerine, sıcaklığın etkisi incelenmiş ve sıcaklık artışıyla birlikte adsorpsiyon kapasitesinde artış olmuştur (Şekil 4.11). Maksimum adsorpsiyon kapasitesi 37.5 °C'de 25.35 mg/g olarak bulunmuştur. Benzer sayısal sonuçlar literatürde yapılan çalışmalarda da saptanmıştır [78,79]. Sıcaklığın artması bilirubin molekülünün yapısında konformasyonel değişimlere sebep olmakta ve sıcaklık artışıyla cis konformasyonundan trans konformasyonuna dönüşmektedir [79]. Bu tür konformasyonel değişimlerin sonucunda, bilirubin molekülü, kriyojelin yüzeyindeki HSA moleküllerine bağlanırken daha az sterik engelle karşılaşmakta ve adsorpsiyon kapasitesi artmaktadır.



Şekil 4.11. PHEMA-HSA5 kriyojelinin bilirubin adsorpsiyon kapasitesi üzerine sıcaklığın etkisi. Plazmadaki bilirubin derişimi: 3.0 mg/dL; akış hızı: 0.75 mL/dk; t: 60 dk.

4.5. Adsorpsiyon İzotemleri

Adsorpsiyon izotermi, denge halinde çözeltideki adsorbat derişimi ile katı faza adsorplanan adsorbat miktarı arasındaki bağlantıyı tanımlar. Adsorpsiyon, adsorbent yüzeyinde biriken madde derişimi ve çözeltide kalan madde derişimi arasında bir denge oluşuncaya kadar devam eder ve bu denge adsorpsiyon izotermiyle açıklanmaktadır. Adsorplanan moleküllerin adsorbentle etkileşimini belirlemek için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon modelleri elde edilen verilere uygulanmıştır.

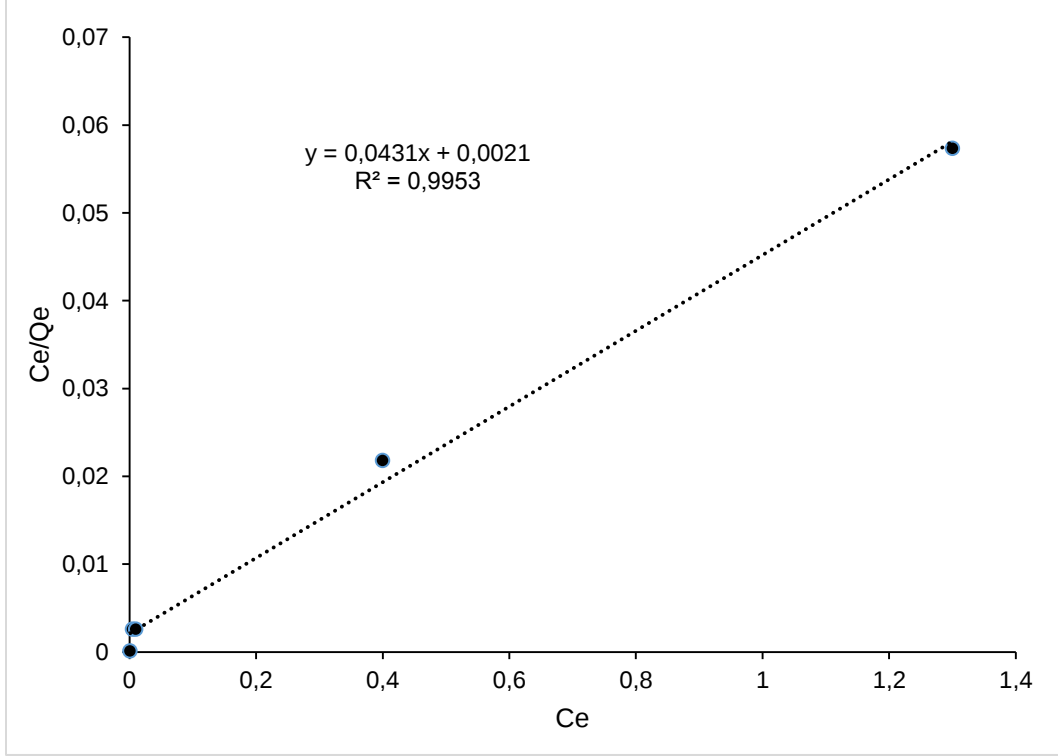
Langmuir adsorpsiyon izotermi Eşitlik 4.1 ile tanımlanır. Langmuir adsorpsiyon modeli moleküllerin belirli sayıda, her biri yalnızca tek molekül bağlayabilen bölgelere bağlandığını ve bu bölgelerin enerji bakımından da eşdeğer olduğunu ve komşu bölgelerde adsorplanan moleküller arasında etkileşim olmadığını varsayar.

$$Q = Q_{\max} \cdot b \cdot C_e / (1 + bC_e) \quad (4.1)$$

Bu eşitlikte Q adsorbente bağlanan bilirubin miktarını (mg/g), C_e çözeltideki denge bilirubin derişimini (mg/mL), b Langmuir sabitini (mL/mg) ve $Q_{\max}$ maksimum adsorpsiyon kapasitesini (mg/g) göstermektedir. Denklem doğrusallaştırıldığında:

$$1/Q_e = 1/(Q_{\max} \cdot b)(1/C_e) + 1/Q_{\max} \quad (4.2)$$

Eşitliği elde edilir. $1/C_e$ karşı $1/Q$ grafiğinin y eksenini kestiği nokta $1/Q_{\max}$ değerini ve eğimi $1/Q_{\max} \cdot b$ değerini vermektedir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Langmuir adsorpsiyon izotermi.

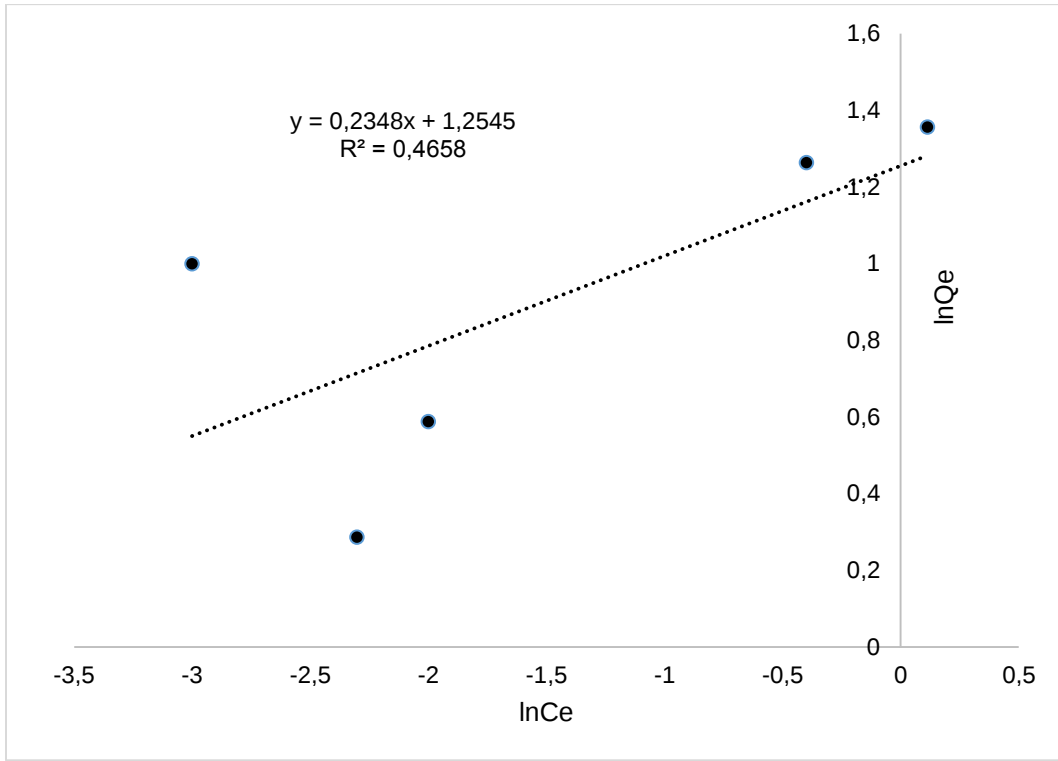
Freundlich eşitliği (4.3) adsorbente adsorbat arasındaki bağlanmanın komşu bağlanma bölgelerinin dolu olup olmadığına bağlı olarak değiştiğini varsayar.

$$Q_{eq} = K_f C_{eq}^{1/n} \quad (4.3)$$

Bu eşitlikte Q_{eq} adsorpsiyon miktarı (mg/g) ve C_e çözeltideki denge bilirubin derişimidir (mg/L). K_f ve $1/n$ sırasıyla adsorpsiyon kapasitesini ve adsorpsiyon şiddetini gösteren Freundlich sabitleridir. Bu eşitlik her iki tarafın logaritması alınarak daha kullanışlı hale getirilebilir:

$$\ln Q_{eq} = \ln K_f + 1/n \ln C_{eq} \quad (4.4)$$

Deneysel veriler Freundlich modeline uyarlanmış ve $\ln C_{eq}$ 'nin $\ln Q_{eq}$ 'ye karşı grafiği çizilmiştir (Şekil 4.13). Adsorpsiyon sabitleri kesim noktası ve eğimden hesaplanmıştır.



Şekil 4.13. Freundlich adsorpsiyon izotermi

Langmuir ve Freundlich izotermi için hesaplanan değerler Çizelge 4.3'te verilmiştir. Korelasyon katsayılarından adsorpsiyon işleminin Langmuir adsorpsiyon modeline daha uygun olduğu görülmektedir. Ayrıca, Langmuir adsorpsiyon izoterminden hesaplanan maksimum adsorpsiyon değeri ($Q_{\max}$) deneysel verilerle uyuşmaktadır.

Çizelge 4.3. PHEMA-HSA5 kriyojeline bilirubin adsorpsiyonu için Langmuir ve Freundlich sabitleri.

Deneysel	Langmuir			Freundlich		
$Q_{\max}$ (mg/g)	$Q_{\max}$ (mg/g)	b (mg/dL)	R^2	K_f	1/n	R^2
22.67	23.20	20.52	0.9953	17.96	0.23	0.4658

4.5. Adsorpsiyon Kinetiği

Adsorpsiyon işleminin hızına etki eden basamaklarının anlaşılması için etkileşim süresi önemlidir. Adsorpsiyon işlemini kontrol eden mekanizmalar kütle transferi ve kimyasal reaksiyondur. Bu mekanizmaların belirlenmesinde deneysel verilere yalancı birinci ve ikinci derece kinetik modeller uygulanmıştır. Ölçülen derişimlerin adsorbanın yüzey derişimine eşit olduğu varsayılmıştır. Lagergren'in birinci derece

hız eşitliği sıvı çözültiden çözünenin adsorpsiyonunda en çok kullanılan eşitliktir. Aşağıdaki eşitlikle gösterilir;

$$dq_t/dt = k_1(q_{eq}-q_t) \quad (4.5)$$

Eşitlik 4.5’de, k_1 yalancı-birinci derece adsorpsiyon hız sabiti (dk^{-1}), q_{eq} ve q_t sırasıyla denge zamanında ve herhangi bir t anında adsorplanan bilirubin miktarını (mg/g) göstermektedir. $t = 0$ ’da $q_t = 0$ ve $t = t$ anında $q_t = q_t$ sınır koşulların uygulanıp integralinin alınması;

$$\log[q_{eq}/(q_{eq}-q_t)] = (k_1 t)/2.303 \quad (4.6)$$

eşitliğini vermektedir. Eşitlik 4.6 tekrar düzenlenerek doğrusallaştırılabilir:

$$\log(q_{eq}-q_t) = \log(q_{eq}) - (k_1 t)/2.303 \quad (4.7)$$

t ’ye karşı $\log(q_{eq})$ grafiğinin doğrusallığı kinetik modelin uygulanabilirliğini göstermektedir (Şekil 4.14). Yalancı birinci-derece kinetik ifadede $\log(q_{eq})$, t ’ye karşı $\log(q_{eq}-q_t)$ grafiğinin ordinat eksenini kesim noktasına eşit olmalıdır.

Adsorpsiyon denge kapasitesine dayalı yalancı-ikinci derece eşitlik aşağıdaki şekilde verilebilir:

$$dq_t/dt = k_2 (q_{eq}-q_t)^2 \quad (4.8)$$

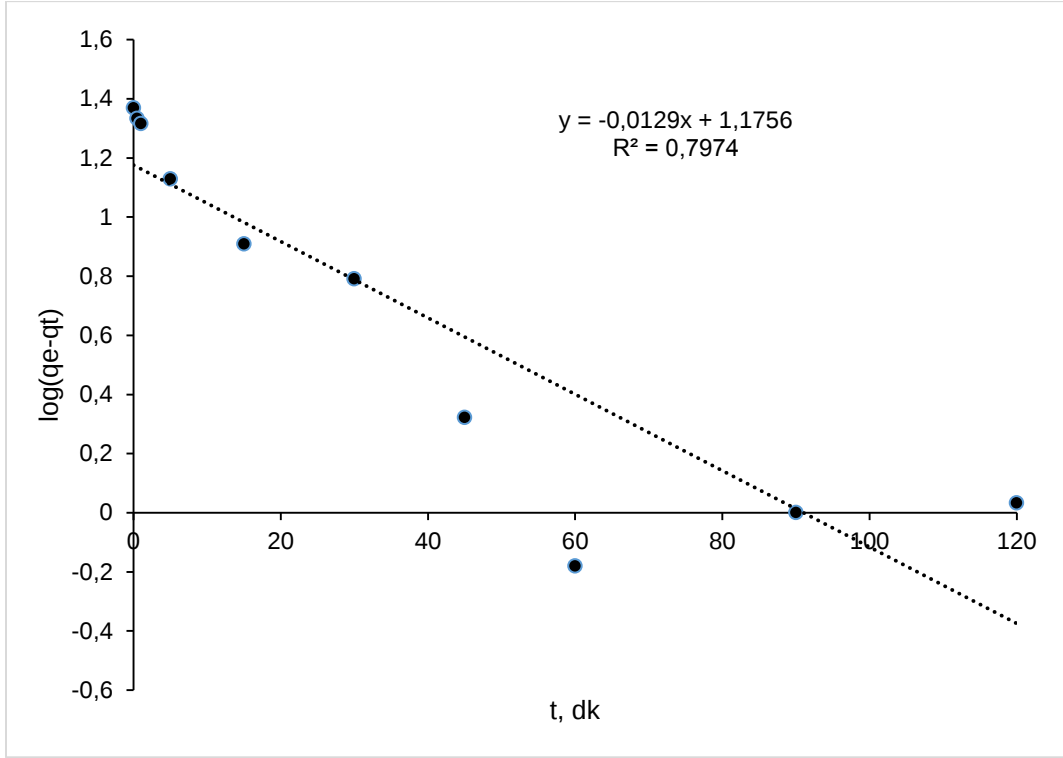
Eşitlik 4.17’ de k_2 yalancı-ikinci derece hız sabitidir ($g.mg^{-1}.dak^{-1}$). Eşitlikte $t = 0$ anında $q_t = 0$ ve $t = t$ ’de $q_t = q_t$ sınır koşullarının uygulanması ile

$$1/(q_{eq}-q_t) = (1/q_{eq}) + k_2 t \quad (4.9)$$

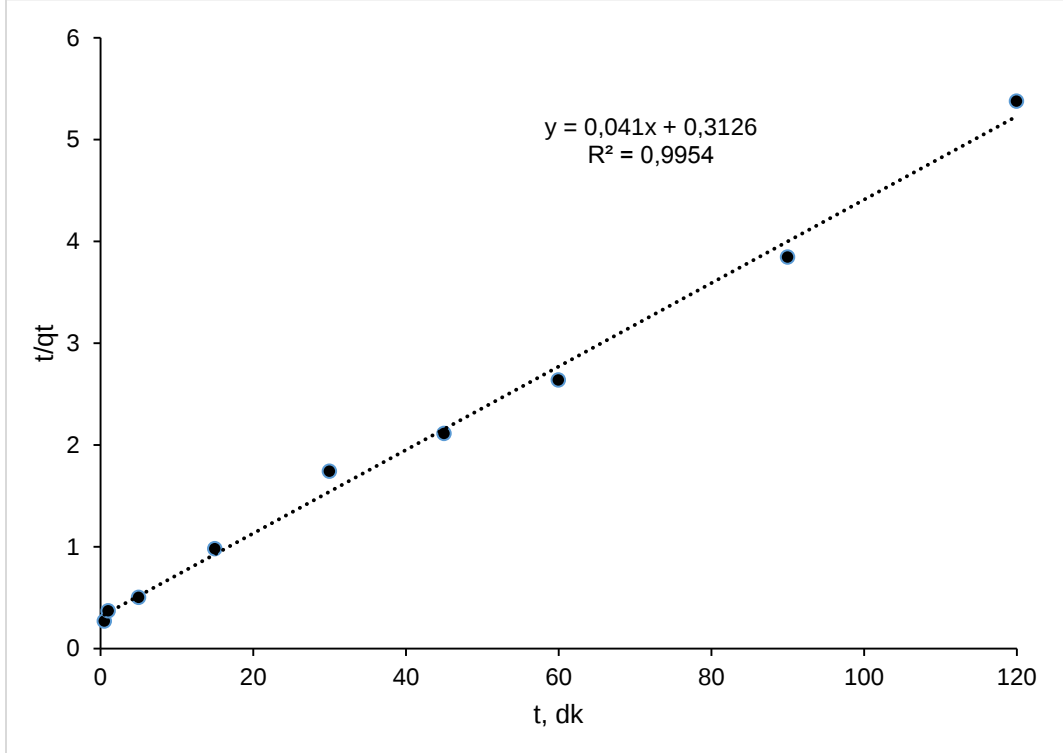
eşitliği elde edilir. Bu eşitliğin doğrusal hali,

$$(t/q_t) = (1/k_2 q_{eq}^2) + (1/q_{eq})t \quad (4.10)$$

şeklindedir. İkinci derece kinetiğin uygulanabilir olması için t ye karşı t/q_t grafiğinin doğrusal olması gereklidir (Şekil 4.15). Hız sabiti (k_2) ve denge adsorpsiyonu (q_{eq}) sırasıyla kesim noktası ve eğimden elde edilebilir.



Şekil 4.14. Bilirubin adsorpsiyonu için yalancı-birinci derece adsorpsiyon kinetiği.



Şekil 4.15. Bilirubin adsorpsiyonu için yalancı-ikinci derece adsorpsiyon kinetiği.

PHEMA-HSA5 kriyojellerinin bilirubin adsorpsiyonuna ait kinetik analiz verilerinden hesaplanan yalancı-birinci ve yalancı-ikinci derece kinetik parametreleri Çizelge 4.4'te verilmiştir. Çizelgedeki korelasyon katsayıları incelendiğinde; kriyojel yüzeyindeki HSA ile bilirubin arasındaki etkileşimin yalancı-ikinci derece kinetik modeline daha uygun olduğu görülmektedir. Ayrıca yalancı-ikinci dereceden elde edilen adsorpsiyon kapasite değeri de deneysel sonuçlarla uyumludur. Hız kontrol mekanizması, adsorpsiyon işlemi sırasında üç olası mekanizmaya göre değişebilmektedir (1) Adsorpsiyon işleminin ilk aşamalarında dış yüzey kütle transferi veya film difüzyon işlemi. (2) Bu aşamayı reaksiyon veya sabit hız basamağı takip etmektedir. (3) Son aşamada ise adsorpsiyon işleminin önemli bir miktarda azaldığı gözenek içi difüzyon basamağı gerçekleşmektedir. Bu hız kontrol mekanizmaları, yalancı birinci derece kinetik model (difüzyon kontrollü) ve yalancı ikinci derece kinetik model (kimyasal kontrollü) ile açıklanmaktadır. Adsorpsiyon hızını belirleyen basamak analitin adsorbent yüzeyine difüzyonu ise adsorpsiyon işlemi yalancı birinci derece adsorpsiyon modeli ile uyumluluk göstermektedir. Adsorpsiyon hızını belirleyen basamak analit ile adsorbent arasındaki etkileşim olduğu koşullarda ise adsorpsiyon işlemi yalancı ikinci derece kinetik model ile uyumluluk göstermektedir. Birinci durumda adsorpsiyon işlemi difüzyon kontrollü; ikinci durumda ise kimyasal kontrollü olarak adlandırılmaktadır. Kinetik veriler analiz edildiğinde, PHEMA-HSA5 kriyojellerine bilirubin adsorpsiyonunun herhangi bir difüzyon kısıtlaması olmaksızın kimyasal kontrollü gerçekleştiği sonucu elde edilmiştir.

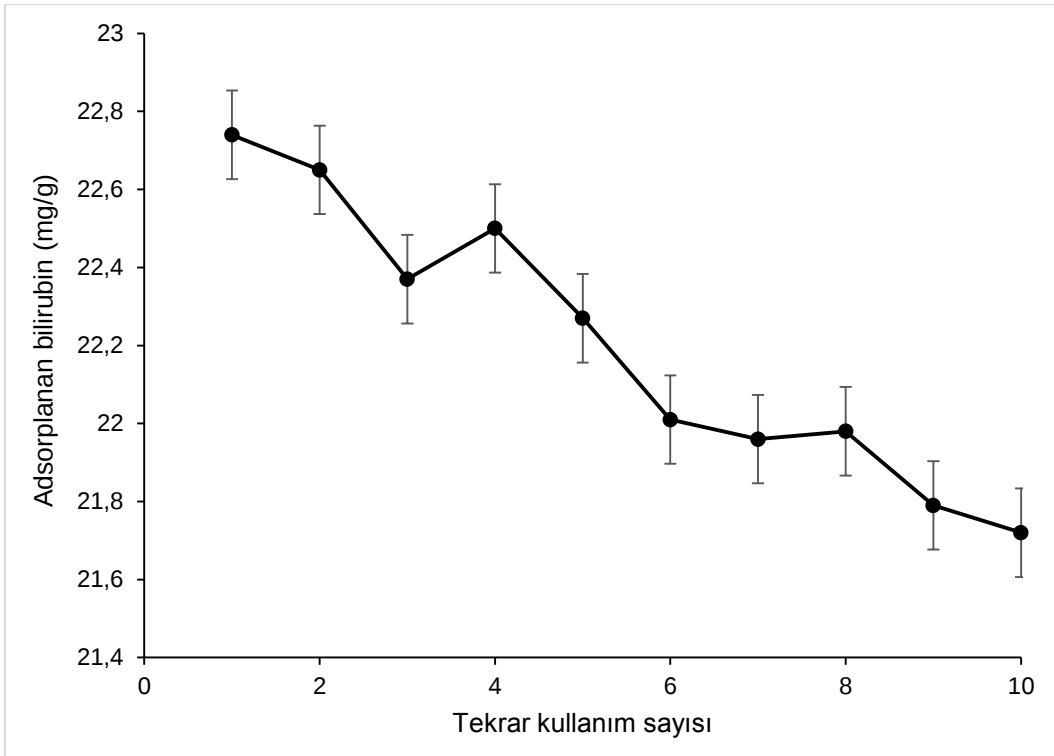
Çizelge 4.4. Bilirubin adsorpsiyonu için yalancı-birinci ve ikinci derece kinetik verileri.

Başlangıç	Deneysel	Birinci-dereceden kinetik			İkinci-dereceden kinetik		
Derişim (mg.dL ⁻¹)	Q _{eq} (mg/g)	k ₁ (dk ⁻¹)	q _{eq} (mgg ⁻¹)	R ²	k ₂ (mg/dLdk)	q _{eq} (gmg ⁻¹)	R ²
3.0	22.67	0.03	14.98	0.7924	0.13	24.39	0.9954

4.5. Desorpsiyon ve Tekrar Kullanılabilirlik

HSA immobilize PHEMA kriyojeldən bilirubin desorpsiyonu, sürekli sistemde 20 mL 1.0 M NaCl ve 0.1 M NaOH içeren çözelti kriyojellerden 1 saat süreyle geçirilmesiyle incelenmiştir. Adsorplanan bilirubin %97 oranında desorbe edilmiştir.

Ligand moleküllerin PHEMA katı desteğe kovalent olarak bağlandığının bir göstergesi olarak desorpsiyon çözeltilerinde HSA gözlenmemiştir. Sonuç olarak desorpsiyon ajanının sadece HSA ile bilirubin arasındaki tersinir bağları kırdığı söylenebilir. Adsorpsiyon-desorpsiyon işlemi aynı kriyojeller ile 10 kez tekrarlanmıştır. Kriyojellerin adsorpsiyon kapasitesindeki değişim Şekil 4.16'da verilmiştir. 10 kez kullanım sonrasında adsorpsiyon kapasitesi %4 oranında azalmıştır. Desorpsiyon verilerine göre 1.0 M NaCl ve 0.1 M NaOH içeren çözeltinin uygun bir desorpsiyon ajanı olduğu ve HSA immobilize PHEMA kriyojellerin tekrar kullanılabilirliğine olanak sağladığı söylenebilir.



Şekil 4.16. HSA immobilize PHEMA kriyojellerin tekrar kullanılabilirliği.

5. SONUÇLAR

- PHEMA kriyojeller, hareketli fazın akışına olanak sağlayan, geniş ve kesintisiz olarak bir biriyle bağlantılı bir gözenek ağına sahiptir.
- PHEMA kriyojellerin denge şişme değeri 7.86 g H₂O/g kriyojel olarak bulunmuştur.
- PHEMA kriyojellerine sahip olduğu gözeneklilik oranı %69.6' dır.
- PHEMA kriyojellerin spesifik yüzey alanı BET yöntemi ile ortalama 27.2 m²/g olarak bulunmuştur.
- Gözeneklerin çapı 20-245 Å aralığında değişmektedir ve ortalama gözenek çapı 68.2 Å' dur. Bu değerler kan gibi viskozitesi yüksek sıvıların kolondan akışı için uygundur.
- Hiperbilirubinemi insan plazmasından bilirubinin seçimli olarak uzaklaştırılması için HSA biyoafinite ligandı olarak kullanılmıştır. PHEMA kriyojellere HSA'nın kovalent olarak bağlanması için optimum koşullar belirlenmiştir.
- Aktivasyon için gerekli optimum CNBr derişimi 60 mg/mL olarak belirlenmiş ve sonraki aşamalarda bu derişimde çalışılmıştır.
- PHEMA kriyojellere maksimum HSA immobilizasyonu pH:7'de olmuştur.
- HSA immobilizasyonu üzerine HSA başlangıç derişiminin etkisi incelenmiş ve aktive edilmiş PHEMA kriyojelden geçirilmesi gereken optimum HSA derişimi 1.0 mg/mL olarak belirlenmiştir.
- HSA moleküllerinin CNBr ile aktive edilmiş PHEMA kriyojellere immobilizasyonu ilk dakikalarda oldukça hızlı gerçekleşmiş ve 30 dakika içerisinde dengeye ulaşılmıştır.
- PHEMA ve HSA-immobilize PHEMA kriyojellerin pıhtılaşma süreleri kontrol plazma ile karşılaştırıldığında azalmıştır. Ancak bu azalma vücut tarafından tolere edilebilir orandadır. Bu nedenle HSA immobilize PHEMA kriyojellerin kan uyumluluğunun oldukça iyi olduğu sonucuna varılmıştır.
- HSA immobilize PHEMA kriyojeller kullanılarak elde edilen platelet kaybı % 2.32, lökosit kaybı %5.17'dir. Bu sonuçlara göre kriyojeller üzerine belirgin bir hücre yapışmasının olmadığı söylenebilir.

- 2 saatlik etkileşim süresi sonrasında PHEMA kriyojellerin yüzeyine yaklaşık olarak 2.46 mg spesifik olmayan bilirubin adsorpsiyonu gerçekleşmiştir. HSA immobilize PHEMA kriyojellerde ise plazmadaki bilirubin seviyesinde önemli oranda azalma görülmüştür. HSA immobilizasyonunun etkinliğini bu sonuçlar ortaya koymaktadır. Kriyojel yüzeyinde HSA immobilizasyon miktarı arttıkça uzaklaştırma etkinliğindeki artış belirginleşmektedir. 2 saat sonunda HSA immobilize PHEMA kriyojeller plazmadaki bilirubin sınır seviyesi olan 1.23 mg/dL değerinin altına indirmiştir.
- Adsorplanan moleküllerin adsorbanla etkileşimini belirlemek için Langmuir ve Freundlich adsorpsiyon modelleri elde edilen verilere uygulanmıştır. Korelasyon katsayılarından adsorpsiyon işleminin Langmuir adsorpsiyon modeline daha uygun olduğu görülmektedir. Ayrıca, Langmuir adsorpsiyon izoterminden hesaplanan maksimum adsorpsiyon değeri (Q_{max}) deneysel verilerle uyumaktadır.
- Deneysel verilere yalancı birinci ve ikinci derece kinetik modeller uygulanmıştır. Korelasyon katsayıları incelendiğinde; kriyojel yüzeyindeki HSA ile bilirubin arasındaki etkileşimin yalancı-ikinci derece kinetik modeline daha uygun olduğu saptanmıştır ve PHEMA-HSA5 kriyojellerine bilirubin adsorpsiyonunun herhangi bir difüzyon kısıtlaması olmaksızın kimyasal kontrollü gerçekleştiği sonucu elde edilmiştir.
- Adsorpsiyon-Desorpsiyon işlemi aynı kriyojeller ile 10 kez tekrarlanmıştır. Kriyojellerin adsorpsiyon kapasitesinde kayda değer bir azalma gözlenmemiştir. Desorpsiyon verilerine göre 1.0 M NaCl ve 0.1 M NaOH içeren çözeltinin uygun bir desorpsiyon ajanı olduğu ve bu çalışmada kullanılan HSA immobilize PHEMA kriyojellerin tekrar kullanılabilirliğine olanak sağladığı söylenebilir.

6. KAYNAKLAR

- [1] Hage, D.S., Affinity Chromatography: A Review of Clinical Applications, (University of Nebraska), *Clinical Chemistry* VOL 45, NO.5, 593–615 ,**1999**.
- [2] Pfaunmiller, E.L, Paulemond, M.L, Dupper, C.M, Hage, D.S, affinity monolith chromatography a review of principles and recent applications, *Anal Biyoanal chem*, 405, 7, 2133-45, **2013** .
- [3] Hage, D.S, Cazes, J, Handbook of affinity chromatography (Chromatographic science series Vol.92), Taylor & Francis, **2005**.
- [4] Anonim, Affinity chromatography principles and methods, [http://www.Xrey.bmc.uu.se/courses/MPC/literature files/pdf](http://www.Xrey.bmc.uu.se/courses/MPC/literature%20files/pdf) , (December, **2014**).
- [5] Mohr, b., Pommerening, K., Affinity Chromatography Practical and Theoretical Aspects (Chromatographic science seriesVol.53), *Marcel Dekker Inc*, **1985**.
- [6] Magdeldin, S., Moser, A., Affinity Chromatography: Principles and Applications, <http://www.intechopen.com/download/pdf/33046> , (Mar **2012**).
- [7] Zachariou, M., Affinty Chromatography Methods and Protocols, (Methods in Molecular Biology 421), *Humana Press NJ*, **2008**.
- [8] Turkova, J., Bioaffinity Chromatography Jornal of Chromatography Library Vol .55 , *Eisevier Sci. Publishers* , **1993**.
- [9] Janson, J-C., protein purification principles high resolution methods and applications Vol.54, *John Wiley & Sons, NJ*, **2011**.
- [10] Roy Chowdhury, J., Wolkoff , A.W., Roy Chowdhury, N., Arias, I.M., Hereditary Jaundice and disorders of bilirubin metabolism, *The Online Metabolic & Molecular Bases of in herited Disease* , 2161-2208, **2010**.
- [11] Fevery, J., Bilirubin in Clinical Practice a review, *Liver International ISSN*, 1478-3223, **2008**.
- [12] Chopra, S., MD, MACP, Elizabeth B.Rand, MD, Bilirubin metabolism, [http://www.uptodate.com/ Bilirubin metabolism.](http://www.uptodate.com/Bilirubin%20metabolism), **2014**.
- [13] Wang, X., Chowdhvry, J, R., Chowdhvry, N-R., *Current pediatrics* 16, 70-74, **2006**.
- [14] Hansen, T.W.R., Core coucepts Bilirubin Metabolism, *Neoreviews*, Vol.11, No.6, 316-22, **2010**.

- [15] Sepen, J., Bosma, P., Bilirubin the gold within, *Circulation*, 1, 26, 2547-2549, **2012**.
- [16] Puppallwar, P.V., Goswami, K., Dhok, A., Review on evolution of methods on bilirubin estimation, *Journal of Dental and Medical Sciences* Vol.1, 1ss.3, 17-28, **2012**.
- [17] Denizli, A., Extracorporeal Affinity Therapy, *Hacettepe J. Biol & Chem*, 39.2, 93, 110, **2011**.
- [18] Ostrow, J.D, Mukerjee, P., Tiribelli, C., Structure and binding of unconjugated bilirubin relevance for physiological and pathophysiological function, *J. Lipid Res*, 35, 1715-1737, **1994**.
- [19] Anonim, <http://www.princeton.edu/~achaney/tmve/wiki100k/docs/Bilirubin.html>, (December, **2014**).
- [20] Bafra, B., Lata, S., Sunny, L., Rana, S., Pundir, C.S., Constantine of an amperometric bilirubin biosensor based on covalent immobilization of bilirubin oxidase onto zirconia coated silica nanoparticles chitosan hybrid film, *Biosensor and Bioelect*, 44, 64-69, **2013**.
- [21] Kannan, P., Chen, H., Tswen-wen lee, V., Kim, D.H., Highly sensitive amperometric detection of bilirubin using enzyme and gold nanoparticles on sol-gel film modified electrode, *Talanta*, 86, 400-407, **2011**.
- [22] Li, X., Rosenzweig, Z., A fiber optic sensor for rapid analysis of bilirubin in serum, *Analytica Chimica Acta*, 353, 263-273, **1997**.
- [23] Mayer, M., Association of serum bilirubin concentration with risk of coronary artery disease., *Clin Chem*, Vol. 46, No.11, 1723-1727, **2000**.
- [24] Richard, A., Weisiger, Albumin and other carrier proteins, http://www.gastrohep.com/ebooks/rodes/Rodes_2_4_1.pdf, (December, **2014**).
- [25] Roca, L., Calligaris, S., Tiribelli, C., Factors Affecting the Binding of Bilirubin to Serum Albumins: Validation and Application of the Peroxidase Method, <http://www.nature.com/pr/journal/v60/n6/full/pr2006398a.html>, *Pediatric Research*, **2006**.
- [26] Roca, R., Calligaris, S., Wennberg, R.P., Ahlfors, C.E., Malik, S.G., Ostrow, J.D., Tiribelli, C., a dynamic model for bilirubin binding to hsa validation and application of the peroxidase method, *Pediatric Research*, 60, 724-728, **2006**.

- [27] Petersen. C.E., Ha, C.E., Harohalli, K., Feix, J.B., Bhagavan, N.V., A dynamic model for bilirubin binding to human serum albumin, *Journal of Biological Chemistry*, 275,28,20985-95, **2000**.
- [28] Beaven, G.H., Albis. A.D., Grazer, B., The interaction of bilirubin with HSA, *Eur. J. Biochem*, 33, 500-510, **1973**.
- [29] Doumas, B.T., Wu, T.W., the measurement of bilirubin fractions in serum, *Crit Rev clin Lab Sci.*, 28, 5-6, 415-45, **1991**.
- [30] Basil T. Doumas, and Tai-Wing Wu, The Measurement of Bilirubin Fractions in Serum, *Critical Reviewsin Clinical Laboratory Sciences*, 28, 5, 415-445, **1991**.
- [31] Li, X., Rosenzweig, Z., A fiber optic sensor for rapid analiysis of bilirubin in serum, *Analytica chemica Acta*, 353, 263-273, **1997**.
- [32] Gil, M.H., Alonso-Chamarro, J., Study of an enzyme coupled system for the development of fibre optical bilirubin sensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 11, 4, 347-354, **1996**.
- [33] Klemm, J., Prodromidis, M.L., Karayannis, M.I., An Enzymic Method for the Determination of Bilirubin Using an Oxygen Electrode, *Electronanalysis*, 12, 4, 292, **1999**.
- [34] Makowski, G.S., Advances in Clinical chemistry, *Elsevier Inc*, Vol.50, **2010**.
- [35] Upstone, S.L., Ultraviolet/Visible Light Absorption Spectrophotometry in Clinical Chemistry, *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, PP, 1699-1714, **2013**.
- [36] Kohashi, K., Date, Y., Tsuruta, Y., Fluorescence reaction of bilirubin with zinc ion in dimethyl sulfoxide and its application to assay of total bilirubin in serum, *Analytica Chimica Acta*, 365, 177-182, **1998**.
- [37] Quaranta, M., Borisov, S., Klimant, I., Indicators for optical oxygen sensors, *Bioanalytical Reviews*, 4, 2-4,115-157, **2012** .
- [38] Dai, J., Parry, D.M., Krahn, J., Transcutaneous bilirubinometry: Its role in the assessment of neonatal jaundice, *Clinical Biochemistry*, 30(1), 1-9, **1997**.
- [39] Anonim, <http://www.transfusionguidelines.org.uk/transfusion-handbook/11-therapeutic-apheresis/11-1-therapeutic-plasma-exchange-tpe>, **2015**
- [40] Shalkham, A.S., Kirrane, B.M., Hoffman, R.S., Goldfarb, D.S., Nelson, L.S., The Availability and Use of Charcoal Hemoperfusion in the Treatment of

- Poisoned Patients, *American Journal of Kidney Diseases*, 48, 2, 239-241, **2006**.
- [41] Himmelfarb, J., Ikizler, T.A., Hemodialysis, *N. Engl. J. Med.*, 363, 1833-1845, **2010**.
- [42] William, O.H., Phototherapy A Review, *Brown Medical Schoolfda Conference*, **2003**.
- [43] Maines, M.D., heme oxygenase clinical applications and functions, *CRC Press, Florida*, **1992**.
- [44] Duan, Z.J., Li, L.L., Ju, J., Gao, Z.H., He, G.H., Treatment of hyperbilirubinemia with blood purification in China, *World Jurnal of Gastroenterolesy*, 12(46): 7467–7471, **2006**.
- [45] Plieva, F.M., Mattiasson, B., Macroporous Gel Particles As Novel Sorbent Materials: Rational Design, *Ind.Eng.Chem.Res.* 47 (12), 4131–4141, **2008**.
- [46] Tripathi, A, Kumar, A., Multi-featured macroporous agarose-alginate cryogel: synthesis and characterization for bioengineering applications, *Macromol Biosci*, 11, 22-35, **2011**.
- [47] Denizli, A., Küfrevioğlu, Ö. F., Protein Kromotografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler, *Pozitif Matbacılık 1. Baskı*, **2010**.
- [48] Lozinsky, V.I, Plieva, F.M, Galaev, I.Y, Mattiasson, B., The potential of polymeric cryogels in bioseparation, *Bioseparation*, 10, 163-188, **2011**.
- [49] Jungbauer, A., Hahn, R., Monoliths for fast bioseparation and bioconversion and their applications in biotechnology, *J. Sep. Sci*, 27, 767-78, **2004**.
- [50] Okay, O., Lozinsky, V.L., Synthesis and Structure–Property Relationships of Cryogels, *Polymeric Cryogels, Advances in Polymer Science*, 263, 103-157, **2014**.
- [51] Mattiasson, B., Kumar, A., Galeaev, I.Y., Macroporous Polymers: Production Properties and Biotechnological/Biomedical Applications, *CRC Press*, **2009**.
- [52] Denizli, A. Kocakulak, M., Pişkin, E., Specific sorbents for bilirubin removal from human plasma, *JAPS*, 68, 3, 373-380, **1998**.
- [53] Denizli, A. Kocakulak, M., Pişkin, E., Bilirubin removal from human plasma in a packed-bed column system with dye-affinity microbeads, *J: Chromatogr, B: Biomed Sci Appl*, 10, 25-31, **1998**.

- [54] Altıntaş, E.B., Türkmen, D., Karakoç, V., Denizli, A., Efficient removal of bilirubin from human serum by monosize dye affinity beads, *J Biomater Sci Polym Ed*, 22, 957-971, **2011**.
- [55] Kuroda, H., Tanaka, T., Osawa, Z., selected adsorption of bilirubin by macroporous (gma_dvb) beads, *Die Angew. Makromol*, 237, 143, **1996**.
- [56] Xu, H., Zhang, G., Zhang, F., Wang, S., Study on Removal of Bilirubin with Magnetic Affinity Separation Technique, *Chin.J.Chem.Eng.* 11, 4, 456-459, **2003**.
- [57] Zhang, L., Jin, G., Bilirubin removal from human plasma by Cibacron Blue F3GA using immobilized microporous affinity membranous capillary method, *Journal of Chromatography B*, 821, 1, 112–121, **2005**.
- [58] Zhang, L., Jin, G.. New Sorbent For Bilirubin Removal From Human Plasma, *Chin.Chem. Lett*, 16, 1495, **2005**.
- [59] Senel, S., Denizli, F., Yavuz, H., Denizli, A., Bilirubin removal from human plasma by dye affinity microporous hollow fibers, *Separation Science and Technology*, 37,(2002), **1989**.
- [60] Yu, Y., He, B., Gu, H., Adsorption of Bilirubin by amine_ containing crosslinked chitosan resin arti, *Biotech*, 28, 307, **2000**.
- [61] [60] Rad, A.Y., Yavuz, H., Kocakulak, M., Denizli, A., Bilirubin Removal from Human Plasma with Albumin Immobilised Magnetic Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) Beads, *Macromol. Biosci*, 3, 417, **2003**.
- [62] Chandy, t., Sharma, C.P., Polylysine-Immobilized Chitosan Beads as Adsorbents for Bilirubin, *Artif. Organs*, 16, 568, **1992**.
- [63] Avramescu, M.E., Sager, W.F.C., Borneman, Z., Wessling, M., Adsorptive membranes for bilirubin removal, *Journal of Chromatography B*, 803, 2, 215–223, **2004**.
- [64] Uzun, L., Denizli, A., Bilirubin removal performance of immobilized albumin in a magnetically stabilized fluidized bed, *J Biomater Sci Polym Ed*, 17, 791-806, 2006.
- [65] Xia, B., Zhang, G., Bilirubin removal by Cibacron Blue F3GA attached nylon-based hydrophilic affinity membrane, *Journal of Membrane Science*, 226, 9–20, **2003**.

- [66] Shi, W., Zhang, F., Zhang, G., Adsorption of bilirubin with polylysine carrying chitosan-coated nylon affinity membranes, *Journal of Chromatography B*, 819, 301–306, **2005**.
- [67] Han, X.Y., Zhang, Z.P., Preparation of grafted polytetrafluoroethylene fibers and adsorption of bilirubin, *Polym. Int*, 58, 1126, **2009**.
- [68] Wang, H., Ma, J., Zhang, Y., He, B., adsorpsiyon of bilirubin on the polimeric B-cyclodextrin supported by partial aminated polyacrylamide gel, *React. Funct. Polym*, 32, 1, **1997**.
- [69] Perçin, I., Baydemir, G., Ergün, B., Denizli, A., Macroporous PHEMA-based cryogel discs for bilirubin removal, *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 41, 172-177, **2013**.
- [70] Baydemir, G., Bereli, N., Andaç, M., Say, R., Galaev, I.Y., Denizli, A., Bilirubin recognition via molecularly imprinted supermacroporous cryogels, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 68, 1, 33-38, 2009.
- [71] Baydemir, G., Andaç, M., Bereli, N., Say, R., Denizli, A., Selective Removal of Bilirubin from Human Plasma with Bilirubin-Imprinted Particles, *Ind. Eng. Chem. Res*, 46, 9, 2843–2852, 2007.
- [72] Syu, M.J., Deng, J.H., Nian, Y.M., Towards bilirubin imprinted poly(methacrylic acid-co-ethylene glycol dimethylacrylate) for the specific binding of bilirubin, *Analytica Chimica Acta*, 504, 167–177, **2004**.
- [73] Doumas, B.T., Watson, W.A. and Biggs, H.C., Albumin standards and Management of serum albumin with bromocresol green, *Chin. Chim. Acta.*, 31, 87-96, **1971**.
- [74] Lagergren, H., Olsson, P., Swedenborg, J., Inhibited platelet adhesion: A non-thrombogenic characteristic of a heparin coated surface, *Surgery*, 75, 643–650, **1974**.
- [75] Brash, J.L., *Modern Aspects of Protein Adsorption on Biomaterials*, Missirlis, Y.F., Lemm, W. Eds., Kluwer Academic Publishers, 39-47, **1991**.
- [76] Doumas, B.R., Biggs, H., , Determination of serum albümin. In *Standart methods of Clin. Chem.*, 7, 175, **1972**.
- [77] Denizli, A., Heparin-immobilized poly(2-hydroxyethyl methacrylate)based microspheres, *J. Appl. Polym. Sci.*, 74, 655-662, **1999**.

- [78] Takase, S., Baba, S., A Study of Bilirubin Adsorption in Bilirubin Adsorbents BR-601, In: T. Oda, *Ed., Proc. 5th Symp. Plasmapheresis*, Tokyo, p. 175, **1985**.
- [79] Willson, R.A., Hofmann, A.F.G., Kuster, G.R., *Gastroenterology*, 66, 95, **1974**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : MAHDİ KAVOSHCHIAN
Doğum Yeri : İRAN
Medeni Hali : Bekâr
E-posta : mahdi_kavosh@yahoo.com
Adresi : Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Beytepe, Ankara, Türkiye

Eğitim

Lise : Sema Lisesi-Tebriz-İRAN
Lisans : Azad Üniversitesi, Labratuvar Bölümü, Miyaneh, İran
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fenbilimleri Enstitüsü, Kimya Bölümü

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce :

İş Deneyimi

Deneyim Alanları

Kriyojeller, moleküler baskılama, afinite kromatografisi, polimer

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar